

PROIZVODNJA BIODIZELA IZ ULJA MIKROALGI

Bojana R. Danilović, Jelena M. Avramović, Jovan T. Ćirić, Dragiša S. Savić, Vlada B. Veljković

Tehnološki fakultet, Univerzitet u Nišu, Leskovac, Bulevar oslobođenja 124, Srbija

Izvod

Jedan od obećavajućih izvora ulja za proizvodnju biodizela predstavljaju mikroalge čijim gajenjem se može proizvesti do 100 puta više biodizela po jedinici površine u odnosu na suncokret i uljanu repicu. Sadržaj ulja u mikroalgama može biti do 77% suve biomase, a produktivnost do 122 mg/l/d. U ovom radu je prikazan pregled dosadašnjih proučavanja mogućnosti korišćenja mikroalgi (tehnike izolovanja, gajenja i izdvajanja biomase, kao i načini konverzije ulja) za dobijanje biodizela. Prednosti upotrebe mikroalgi je povećana efikasnost proizvodnje, mogućnost gajenja u sredinama koje su neodgovarajuće za gajenje biljaka, pri čemu ne zahtevaju puno prostora za gajenje i nemaju negativan uticaj na svetske zalihe hrane i vode. Zbog trenutno većih proizvodnih troškova, mikroalge još uvek nisu održivi izbor za proizvodnju biodizela jer je cena biodizela iz mikroalgi veća od cene dizela.

Ključne reči: biodizel, mikroalge, gajenje, ekstrakcija, *in situ* transesterifikacija.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Glavni nedostatak upotrebe "sirovina prve generacije" (jestive uljarice, žitarice, itd.) za dobijanje biodizela je stalna dilema: hrana ili gorivo, odnosno rast cena hrane na bazi jestivih ulja zbog njihove povećane potrošnje u proizvodnji biogoriva [1]. Zbog toga, nova istraživanja se usmeravaju ka "sirovinama druge generacije", u koje spadaju nejestivi i lignocelulozni materijali, kao što su: ostaci pri preradi šećerne trske, drveta i useva, komunalni čvrsti otpad, itd. [2]. U skorije vreme, sve veći broj istraživača proučava upotrebu tzv. "sirovina treće generacije", u koje spadaju mikroorganizmi, kao što su: kvasci, gljive i alge, čija se biomasa može koristiti kao sirovina za dobijanje biodizela.

Jedan od obećavajućih alternativnih izvora ulja koje se može upotrebiti kao sirovina za proizvodnju biodizela predstavljaju mikroalge. To su jednoćelijski ili kolonijalni fotosintetski organizmi, koji poslednjih godina imaju sve veću industrijsku primenu u proizvodnji hemikalija i nutritivnih suplemenata [3]. Značaj algi u prirodi je da, zahvaljujući procesu fotosinteze, učestvuju u obnavljanju i održavanju količine kiseonika u atmosferi. Procenjuje se da mikroalge proizvode oko polovinu ukupnog atmosferskog kiseonika. Do sada je opisano oko 35.000 vrsta algi, od ukupno 200.000–800.000 vrsta koliko se pretpostavlja da postoji u prirodi [4]. Potencijalna industrijska primena algi proizilazi iz činjenice da je preko 15.000 komponenti (antioksidansi, masne kiseline, enzimi, peptidi, toksini i steroli) dobijeno iz algi. Osim toga, mikroalge mogu rasti veoma brzo i za 24 h (odnosno za 3,5 h u eksponen-

PREGLEDNI RAD

UDK 662.756.3:620.952:66

Hem. Ind. 68 (2) 213–232 (2014)

doi: 10.2298/HEMIND130205046D

cijalnoj fazi rasta) mogu udvostručiti svoju masu [5]. Jednostavna jednoćelijska struktura mikroalgi omogućava veliku brzinu fotosinteze, efikasno vezivanje ugljenika i brzu akumulaciju ulja u biomasi (do 77% suve biomase, odnosno produktivnost ulja pri fototrofnom gajenju mikroalgi do 122 mg/l dnevno [6]). Gajenjem algi može se postići veći energetski prinos po jedinici površine u odnosu na kopnene useve [7].

Mikroalge pružaju mogućnost proizvodnje do 100 puta više biodizela po jedinici površine gajenja u odnosu na suncokret i uljanu repicu [8]. Pored toga, prednosti upotrebe mikroalgi kao izvora za proizvodnju biogoriva su povećana efikasnost i smanjeni troškovi proizvodnje. Troškovi izdvajanja i transporta mikroalgi su niži u odnosu na troškove transporta ostalih sirovina za proizvodnju biodizela. Isto tako, mikroalge ne zahtevaju puno prostora za gajenje, pri čemu, za razliku od upotrebe žitarica, uljarica i drugih biljnih kultura, upotreba algi kao sirovine za dobijanje goriva nema negativan uticaj na svetske zalihe hrane i vode [9]. Mikroalge se mogu gajiti u različitim sredinama koje su nepogodne za ostale biljke, na primer u slatkoj, otpadnoj ili morskoj vodi, kao i na neobrađivom zemljištu. Mogu se, takođe, gajiti na farmama ili u bioreaktorima.

Ograničenja rasta mikroalgi odnose se, uglavnom, na intenzitet svetlosti i temperaturu tokom gajenja. Solarna energija u tropskim i subtropskim oblastima pruža više energije za fotosintezu ali, s druge strane, dovodi do povećanja temperature koja može biti letalna za mikroalge [10]. U kontekstu proizvodnje biodizela, samo one mikroalge sa visokim sadržajem stearinske (C18:0) i oleinske (C18:1) kiseline su potencijalni izvori, jer lipidi iz ovakvih mikroorganizama oponašaju svojstva ulja veće vrednosti, pospešuju oksidativnu stabilnost i imaju veću mogućnost prilagođavanja u industrijskoj proizvodnji biodizela [11].

Prepiska: D.S. Savić, Tehnološki fakultet, Bulevar oslobođenja 124, 16000 Leskovac, Srbija.

E-pošta: savic@tf.ni.ac.rs

Rad primljen: 5. februar, 2013

Rad prihvaćen: 6. jun, 2013

Biodizel se iz mikroalgi, nakon gajenja i sakupljanja biomase, može dobiti na dva načina. Prvi način podrazumeva prethodnu ekstrakciju ulja iz mikroalgalne biomase uz pomoć rastvarača, praćenu reakcijom transesterifikacije i/ili esterifikacije odgovarajućim alkoholom u prisustvu katalizatora (kiselog, baznog ili enzima) ili u odsustvu katalizatora pod natkritičnim uslovima metanola. Ovaj način podrazumeva utrošak rastvarača i energije za ekstrakciju i transesterifikaciju, što utiče na povećanje cene sirovog biodizela, a doprinosi i zagađenju životne sredine. Drugi način je direktna transesterifikacija algalne biomase, tzv. *in situ* postupak, kojim se unapređuje proces proizvodnje biodizela iz mikroalgi u smislu smanjenja proizvodnih troškova [12].

Makroalge mogu, takođe, biti sirovina za proizvodnju biodizela [13], iako je sadržaj ulja u njima manji nego kod mikroalgi. Ispitivanja bazno katalizovane metanolize ulja dobijenih iz nekih vrsta makroalgi pokazala su da se veća količina ulja, a samim tim i biodizela, može dobiti iz makroalgi roda *Oedogonium* spp., dok je količina sporednih proizvoda – glicerola, pigmenta i drugih sastojaka veća kod upotrebe ulja makroalgi roda *Spirogyra* spp. [13].

U ovom radu je prikazan pregled dosadašnjih proučavanja mogućnosti korišćenja mikroalgi za dobijanje biodizela. Prikazane su tehnike za izolovanje, gajenje i izdvajanje algi, kao i načini konverzije ulja algi u biodizel.

KULTURE MIKROALGI ZA DOBIJANJE ULJA

Izolovanje mikroalgi

Mikroalge koje se koriste za proizvodnju biodizela mogu se izolovati iz prirodnog staništa ili kupiti iz odgovarajućih kolekcija kultura, kao što su: UTEX (SAD), ANACC (Australija), CCAP (Velika Britanija), NIES (Japan), SAG (Nemačka), CPCC (Kanada), itd. Iako su vrste iz kolekcija kultura dobro proučene, usled kontinualnog presejavanja može doći do gubitka određenih karakteristika, pa se preporučuje izolovanje mikroalgi iz okoline [14].

Postupak izolovanja mikroalgi obuhvata izbor odgovarajućeg prirodnog staništa iz koga se izdvajaju, kao i obogaćivanje i prečišćavanje izolovane kulture. Kako naseljavaju veliki broj staništa, različite vrste mikroalgi se mogu izolovati iz različitih uzoraka vode i zemljišta. Obogaćivanje kulture podrazumeva obezbeđivanje pogodnih uslova koji omogućavaju rast i razmnožavanje odgovarajuće vrste uz, istovremeno, sprečavanje rasta ili uništavanje ostalih vrsta mikroorganizama [15]. Jedan od načina obogaćivanja mikroalgi je dodatak male količine uzorka u odgovarajuću hranljivu podlogu i inkubacija na odgovarajućoj temperaturi tokom 3–4 nedelje. Nakon toga, fotosintetske vrste se prebacuju na čvrste mineralne podloge, dok se za miksotrofne i

heterotrofne vrste koriste supstrati sa organskim izvorom ugljenika. Prečišćavanje mikroalgi se vrši presejavanjem morfološki različitih izolata na nove odgovarajuće podloge sve dok se ne dobiju identične kolonije. Pre prenošenja na čvrste podloge, mikroalge koje se izoluju iz uzoraka vode mogu se izdvojiti filtracijom. Isto tako, izolovanje mikroalgi se može vršiti direktno upotrebom mikromanipulatora, pri čemu se individualne ćelije prenose na odgovarajuću čvrstu ili tečnu podlogu [16].

Podloga koja se koristi za rast mikroalgi mora da zadovolji određene uslove, odnosno da sadrži [17]:

- odgovarajuće vrste i količine soli,
- izvor ugljenika – kako oko 50% biomase čini ugljenik, dovoljno snabdevanje ugljenikom je od posebnog značaja za uspešno gajenje, pri čemu izvor ugljenika može biti neorganski (gasoviti CO₂ ili bikarbonati) i organski (šećeri ili acetati),
 - odgovarajući i ekonomičan izvor azota – azot predstavlja važan element pri gajenju mikroalgi (čini do 10% suve biomase) jer može uticati na metaboličke puteve i promenu sastava ćelije algi, pri čemu se, zavisno od vrste koje se gaji i optimalne pH vrednosti, najčešće nitrati, amonijak ili urea koriste kao izvori azota,
 - odgovarajuće koncentracije ostalih važnih elemenata (na primer, kalijum, magnezijum, natrijum, fosfor i sumpor),
 - elemente u tragovima neophodne za rast koji se dodaju u veoma malim količinama i
 - ukoliko je potrebno, organska jedinjenja ili supstance koje podstiču rast, kao što su vitamini, hormoni i sl.

Minimalne nutritivne potrebe mikroalgi mogu se izračunati iz približne molekularne formule za biomasu: CO_{0,48}H_{1,83}N_{0,11}P_{0,01} [18]. Neki nutritivni elementi, kao što je fosfor, moraju se dodati u značajnom višku. Fosfati grade komplekse sa jonima metala, tako da ćelije algi ne mogu iskoristiti celokupnu količinu dodatog fosfora [18].

Kako uzorci iz kojih se vrši izolovanje mikroalgi sadrže i veliki broj drugih vrsta mikroorganizama (uglavnom protozoe i bakterije), dobijanje unialgalne kulture zahteva njihovo uklanjanje. Prečišćavanje kulture može se vršiti [16]:

- ispiranjem ćelija serijskim prenošenjem u novu sterilnu podlogu,
- UV zračenjem (ćelije algi su otpornije na UV zrake u odnosu na bakterije, tako da se izlaganjem UV zračenju, ispiranjem, razblaživanjem uzorka i prenošenjem na selektivnu čvrstu podlogu mogu dobiti čiste kulture mikroalgi) i
- dodatkom antibiotika (različiti antibiotici se mogu koristiti za eliminisanje plesni i cianobakterija iz uzorka).

Primena genetičkog inženjerstva za poboljšanje proizvodnih svojstava algi

Mnoge mikroalge nemaju sposobnost proizvodnje velikih količina ulja tokom eksponencijalne faze rasta. Primenom genetičkog inženjerstva može se uticati na promenu metaboličkih puteva sinteze određenih komponenti i poboljšati produktivnost i prinos mikroalgi [19]. Tako, genetički modifikovane mikroalge se mogu koristiti za sintezu rekombinantnih proteina i vakcina [20], proizvodnju biohidrogena [21] i bioremediaciju kontaminiranog zemljišta [22]. Do sada je genetički modifikovano više od 30 vrsta algi [23].

Ekspresijom gena moguće je uticati na sintezu ulja i razmnožavanje mikroalgi. Povećanje sinteze ulja može dovesti do smanjenja deobe ćelija. U ovom slučaju, ekspresija gena može, ipak biti poželjna ukoliko se može kontrolisati i aktivirati kada ćelije dostignu dovoljnu gustinu [24]. Inhibicija metabolizma ulja može, takođe, izazvati probleme sa razmnožavanjem i produktivnošću biomase jer se obezbeđivanje energije i prekursora za deobu ćelija zasniva na kataboličkim putevima [25]. Početak primene metaboličkog inženjerstva zasnivao se na konverziji acetil-koenzima A ((acetil-CoA) u malonil-CoA u prisustvu acetil-CoA karboksilaze, koja predstavlja prvi korak u biosintezi masnih kiselina. Međutim, nekoliko pokušaja povećanja sinteze acetil-CoA karboksilaze u cilju povećanja sadržaja ulja nije dalo željene rezultate [26]. Drugu mogućnost predstavlja blokiranje određenih metaboličkih puteva, što dovodi do akumuliranja supstanci bogatih energijom [25]. Komplementarna strategija za povećanje akumulacije ulja je smanjenje katabolizma ulja koje, osim povećanja skladištenja ulja, može imati štetan efekat na rast i razmnožavanje ćelija [25]. Osim primene genetičkog inženjerstva u cilju povećanja produkcije ulja, moguće je težiti i poboljšanju kvaliteta ulja, kako bi bilo pogodnije za proizvodnju biodizela.

U sastavu ulja nekih vrsta *Chlorophyceae*, najzastupljenije su palmitinska (C16:0) i oleinska (C18:1) kiselina, zatim polinezasićene masne kiseline linolna (C18:2) i linoleinska (C18:3), dok su polinezasićene masne kiseline sa brojem C atoma iznad 18 malo zastupljene [27]. Dužina lanca i stepen nezasićenosti masnih kiselina u ulju mikroalgi utiču na svojstva dobijenog biodizela, i to: jodni broj, oksidativnu stabilnost, cetanski broj i tačku začepjenja hladnog filtera [28]. Mali cetanski broj i veliki jodni broj biodizela povezuje se sa metil estrima polinezasićenih masnih kiselina (C18:2 i C18:3). Takođe, oksidativna stabilnost biodizela smanjuje se povećanjem sadržaja metil estara polinezasićenih masnih kiselina. Biodizel sa većim sadržajem metil estara masnih kiselina sa većim brojem C-atoma pokazuje nepovoljniju tačku začepjenja hladnog filtera, dok je biodizel sa visokim sadržajem oleinske kiseline pokazivao znatno bolja svojstva [29]. Metil estri ulja mikroalgi

roda *Chlorella*, koji su sastavljeni uglavnom iz metil-oleata (65%) i metil-linoleata (18,5%), imaju zadovoljavajuća svojstva goriva: tačka začepjenja hladnog filtera: 13 °C, jodni broj 112,2 g I₂/100 g, kinematska viskoznost od 4,43 mm²/s na 40 °C i oksidativna stabilnost oko 4,5 h [30].

GAJENJE MIKROALGI I IZDVAJANJE ULJA

Gajenje mikroalgi

Mikroalge se najčešće gaje kao fotoautotrofne kulture u kojima ćelije koriste svetlosnu energiju i CO₂ kao izvor ugljenika. Međutim, proizvodnja biomase fotoautotrofnih kultura je ograničena usled smanjenja dostupnosti svetlosti sa povećanjem broja ćelija. U suprotnom, niska koncentracija biomase kultura povećava troškove izdvajanja ćelija mikroalgi. Jedna od mogućih alternativa je upotreba heterotrofnih kultura koje, u odsustvu svetlosti, koriste organska jedinjenja (šećere i organske kiseline) kao izvor ugljenika. Za razliku od fotoautotrofnih, heterotrofne kulture se mogu gajiti u konvencionalnim mikrobim bioreaktorima. Ovakav način gajenja ima određene prednosti, kao što su jednostavnija promena procesnih uslova i veći prinos biomase od 20 do 100 g/l [31]. Takođe, kontrolisanjem uslova rasta može se postići povećana proizvodnja željenog proizvoda, na primer, povećana akumulacija ulja [32]. Tako, u odnosu na autotrofni rast, heterotrofni rast vrste *Chlorella protothecoides* odlikuje se većom proizvodnjom biomase i četiri puta većem sadržaju ulja u ćelijama [33,34]. Xu i sar. [34] su ustanovili da je integracija heterotrofnog rasta mikroalge *C. protothecoides* i transesterifikacije, jeftin, izvodljiv i efikasan metod za dobijanje biodizela visokog kvaliteta iz mikroalgi. Međutim, heterotrofni uslovi nisu pogodni za sve vrste algi, a mogu izazvati i promene u sastavu ćelija [31]. Osim toga, pri proceni dugoročne održivosti ovakvog načina proizvodnje, moraju se uzeti u obzir i troškovi proizvodnje organskih supstrata [32]. Smanjenje troškova izdvajanja biomase može se postići i primenom miksotrofnih kultura koje, kao izvor ugljenika, istovremeno koriste CO₂ i organska jedinjenja [35]. Pojedini sistemi za proizvodnju biomase pomoću miksotrofnih kultura podrazumevaju pripremu početnog inokuluma pomoću organskih supstrata, kako bi se dobila veća koncentracija ćelija pre prenošenja u otvorene bazene. Glavna prednost ovih sistema je povećana proizvodnja biomase ali se, kao i kod heterotrofnih sistema, mora izvršiti procena ekonomske isplativosti upotrebe organskog izvora ugljenika [32].

Za gajenje mikroalgi mogu se koristiti tri tipa industrijskih reaktora: fotobioreaktori, otvoreni bazeni i hibridni sistemi. Otvoreni bazeni predstavljaju plitke bazene u kojima se dotok nutritijenata obezbeđuje proticanjem rastvora. Glavna prednost ovih sistema je

njihova jednostavnost koja uslovljava niske troškove proizvodnje biomase. Tehnička i biološka ograničenja ovih sistema dovela su do razvoja zatvorenih fotobioreaktora, koji predstavljaju zatvorene osvetljene sudove za kontrolisanu proizvodnju biomase. Iako zahtevaju veća ulaganja, fotobioreaktori imaju određene prednosti u odnosu na otvorene sisteme [36]:

- rizik od kontaminacije je minimalan, što omogućuje gajenje unialgalne kulture,
- pružaju bolju kontrolu procesnih uslova (pH vrednost, temperatura, intenzitet svetlosti, koncentracija CO₂ itd.),
- manji gubitak CO₂,
- sprečeno je isparavanje vode,
- omogućavaju dobijanje veće koncentracije ćelija i
- omogućavaju proizvodnju složenih biofarmaceutika.

Najčešće se koriste fotobioreaktori u vidu vertikalnih kolona, ravnih ploča ili cevni fotobioreaktori. U tabeli 1 naglašene su prednosti i nedostaci fotobioreaktora koji se koriste u proizvodnji mikroalgi.

Svetlost u fotobioreaktorima se obezbeđuje prirodnim ili veštačkim osvetljenjem koje može biti spoljašnje ili unutrašnje [37]. Prinos ulja u sistemima na otvorenom koji koriste dnevnu svetlost iznosi 100–130 m³/ha [18]. S druge strane, prinos ulja pri upotrebi veštačkog osvetljenja može dostići do 172 m³/ha usled

stabilnosti i konstantne izloženosti osvetljenju [38]. Pri visokom intenzitetu svetlosti, maksimalna brzina nastajanja kiseonika tokom fotosinteze u cevnom fotobioreaktoru može dostići 10 g O₂/(m³min). Nivo rastvorenog kiseonika koji je mnogo veći od vrednosti koja odgovara zasićenosti vazduhom inhibira fotosintezu. Takođe, visoke koncentracije kiseonika u kombinaciji sa jakim osvetljenjem dovode do fotooksidativnog oštećenja ćelija [39]. Povećan intenzitet svetlosti može dovesti do fotoinhibicije, pri čemu dolazi do smanjenja brzine rasta mikroalgi. Do fotoinhibicije dolazi pri povećanju intenziteta svetlosti malo iznad intenziteta koji obezbeđuje maksimalnu brzinu rasta [18]. U zavisnosti od intenziteta svetlosti i vremena izlaganja, fotoinhibicija može biti reverzibilna ili ireverzibilna [40].

Hibridni sistemi koji se koriste za kultivaciju mikroalgi su kombinacija otvorenih bazena i fotobioreaktora u kojima se proces proizvodnje biomase izvodi u dve faze. Prva faza se izvodi u fotobioreaktoru i obuhvata pripremu početnog inokuluma sa dobrim karakteristikama rasta i minimalnom kontaminacijom. U drugoj fazi, inokulum se prenosi u otvoreni bazen, kako bi se maksimizirao rast biomase i akumulacija ulja [32].

Sadržaj ulja u mikroalgama varira u zavisnosti od vrste i može se kretati od 5 do 77% u odnosu na suhu biomasu [18,41]. Tako, sadržaj ulja kod vrste *Chlorella* iznosi od 5 do 58% [42–49], kod vrste *Chlorococcum* od

Tabela 1. Prednosti i nedostaci bioreaktora koji se koriste za gajenje mikroalgi [33]

Table 1. Advantages and disadvantages of bioreactor types used for microalgae cultivation [33]

Tip bioreaktora	Prednosti	Nedostaci
Otvoreni bazeni	Relativno ekonomični Lako čišćenje Pogodni za masovno gajenje mikroalgi	Loša kontrola uslova gajenja Poteškoće u gajenju mikroalgi na duži vremenski period Niska produktivnost Visoki zahtevi za površinom Primena ograničena samo na nekoliko vrsta mikroalgi Podložni kontaminaciji
Vertikalne kolone	Visok stepen prenosa mase Dobro mešanje uz mali napon smicanja Niska potrošnja energije Visok potencijal za povećanje razmere Jednostavnija sterilizacija i održavanje temperature Pogodnost za imobilizaciju mikroalgi Smanjena fotoinhibicija i fotooksidacija	Mala površina izložena svetlosti Konstrukcija zahteva složene materijale Sa povećanjem razmere smanjuje se površina izložena svetlosti
Ravne ploče	Velika površina izložena svetlosti Pogodni za imobilizaciju mikroalgi Visoka produktivnost biomase Relativno jeftini Lako čišćenje i održavanje temperature Niska akumulacija nagrađenog kiseonika	Povećanje razmere zahteva izgradnju pregrada Određeni stepen rasta na zidovima reaktora Mogućnost uticaja hidrodinamičkog pritiska na određene vrste mikroalgi
Cevni reaktori	Velika površina izložena svetlosti Pogodni za gajenje kultura na otvorenom Dobra produktivnost biomase Relativno jeftini	Postojanje gradijenta pH rastvorenog kiseonika i CO ₂ duž reaktora Stvaranje naslaga Određeni stepen rasta na zidovima reaktora Visoki zahtevi za površinom

19 do 25% [45, 47], *Scenedesmus* od 1 do 29% [42,44–45,47,50], *Botryococcus* od 6 do 28% [46,51], *Desmodesmus* od 17 do 58% [10,45,48,52] i *Chlamydomonas* od 25 do 51% [42,52]. Osim razlike u sadržaju, uočena je razlika u sastavu ulja, tako da su neke vrste bogatije neutralnim lipidima od drugih [41].

Rast mikroalgi zavisi od nekoliko faktora koji uključuju abiotičke (svetlost, temperatura, koncentracija nutritijenata, kiseonik, CO₂, pH, salinitet i prisustvo toksičnih elemenata), biotičke (prisustvo patogena i konkurentnost u odnosu na druge vrste algi) i procesne (mešanje, stepen razblaženja, frekvencija uklanjanja biomase i dodatak bikarbonata) faktore [8]. Tokom početnih faza rasta nastaju velike količine polarnih lipida i polinezasićenih C16 i C18 masnih kiselina. Međutim, sa ulaskom u stacionarnu fazu sastav nastalih ulja se menja i sastoji se, uglavnom, od neutralnih zasi-

ćenih masnih kiselina dugih lanaca (18:0 i 16:0). Ipak promene u sastavu ulja zavise od vrste mikroalgi, pa plavo-zelene mikroalge pokazuju vrlo malu promenu u sastavu tokom ciklusa rasta. Sadržaj polinezasićenih C16 i C18 masnih kiselina, mono- i di-galaktozil-diglicerida, sfingolipida i fosfoglicerida u vrstama *Euglena gracilis* i *Chlorella vulgaris* povećava se sa povećanjem količine svetlosti [14]. Morske vrste mikroalgi proizvode veću količinu fosfolipida u odnosu na količinu triacilglicerola (TAG) [53]. Fosfolipidi nisu pogodni za proizvodnju biodizela transesterifikacijom. S druge strane, slatkovodne vrste proizvode velike količine zasićenih neutralnih lipida, pa su mnogo pogodnije za proizvodnju biodizela [54]. Produktivnost biomase, sadržaj, produktivnost i načini ekstrakcije ulja, kao i uslovi gajenja pojedinih slatkovodnih mikroalgi prikazani su u tabeli 2.

Tabela 2. Produktivnost biomase, sadržaj ulja i produktivnost ulja pojedinih slatkovodnih mikroalgi
Table 2. Biomass productivity, oil content and oil productivity of some fresh water microalgae

Vrsta mikroalge	Podloga ^a	Tehnika				Produktivnost biomase, g/l/d	Sadržaj ulja, %	Produktivnost ulja, mg/l/d	Lit.	
		Gajenje	Izdvajanje biomase	Razaranja ćelija	Ekstrakcije ulja					
<i>Chlorococcum</i> sp.	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,28	19,3	53,7	[47]	
<i>Chlorococcum</i> sp.	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,05	11	5,71	[48]	
<i>Chlorococcum macrostigmatum</i>	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Hloroform: metanol 2:1	–	25,1	–	[45]	
<i>Chlorella</i> sp.	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,23	18,7	42,1	[47]	
<i>Chlorella</i> sp.	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	–	20	–	[45]	
<i>Chlorella</i> sp.	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,04	46	19,64	[48]	
<i>Chlorella sorokiniana</i>	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,23	19,3	44,7	[47]	
<i>Chlorella vulgaris</i>	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,20	18,4	36,9	[47]	
					Metanol: hloroform 2:1	0,17	19,2	32,6		
	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	–	Autoklav	Metanol: hloroform 1:1	0,07	5	3,5	[46]
					Perlice	0,07	10	7		
					Mikrotalasi	0,07	8	5,6		
					Ultrazvuk	0,07	10	7		
					Osmotski pritisak	0,07	6	4,2		
					0,07	8	5,6			
BBM	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	0,56	20	112	[6]		
BBM	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	0,08	26	21	[42]		
–	Fototrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	–	Ultrazvuk	<i>n</i> -Heksan	0,18	5,1	7,4	[44]	

Tabela 2. Nastavak
Table 2. Continued

Vrsta mikroalge	Podloga ^a	Tehnika				Produktivnost biomase, g/l/d	Sadržaj ulja, %	Produktivnost ulja, mg/l/d	Lit.	
		Gajenje	Izdvajanje biomase	Razaranja ćelija	Ekstrakcije ulja					
<i>Chlorella protothecoides</i>	Hidrolizat jerusalimske artičoke	Heterotrofno	Centrifugiranje i liofilizacija	–	<i>n</i> -Heksan	3,4–4,1	43–46	1400–1700	[43]	
	–	Heterotrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	–	<i>n</i> -Heksan	2,2–7,4	50,3–57,8	1210–3701	[49]	
	–	Heterotrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	–	<i>n</i> -Heksan	0,62	55	343	[30]	
<i>Scenedesmus</i> sp.	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,26	21,1	53,9	[47]	
	BG11			–	Metanol: hloroform 1:1	0,21	19,6	40,8	[46]	
				Autoklav		0,07	4	2,8		
				Perlice		0,07	8	5,6		
				Mikrotalasi		0,07	10	7		
				Ultrazvuk		0,07	6	4,2		
				Osmotski pritisak		0,07	5,8	4,1		
	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	–	20,7–25	–	[45]	
	<i>Scenedesmus</i> sp.	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	0,03–0,04	22–45	13,2–16,1	[48]
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,19	18,4	35,1	[47]
<i>Scenedesmus obliquus</i>	–	Fototrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	Ultrazvuk	<i>n</i> -heksan	0,09	17,7	15,9	[44]	
	N11	Fototrofno	Centrifugiranje		Metanol: hloroform 2:1	0,06	12,7	7,14	[50]	
	N11+ glukoza	Miksotrofno				0,1–0,5	6,6–11,8	11,6–58,6		
	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje		Metanol: hloroform 1:2	0,09	29	25	[42]	
<i>Botryococcus</i> sp.	modifikovana Chu 13	Fototrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	Ultrazvuk	<i>n</i> -Heksan	0,06–0,22	5,7–25,8	3,5–46,9	[51]	
	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	–	Metanol: hloroform 1:1	0,04	8	3,2	[46]	
				Autoklav		0,04	11	4,4		
				Perlice		0,04	28	11,2		
				Mikrotalasi		0,04	28,5	11,4		
				Ultrazvuk		0,04	8,5	3,4		
				Osmotski pritisak		0,04	10	4		

Tabela 2. Nastavak
Table 2. Continued

Vrsta mikroalge	Podloga ^a	Tehnika				Produktivnost biomase, g/l/d	Sadržaj ulja, %	Produktivnost ulja, mg/l/d	Lit.
		Gajenje	Izdvajanje biomase	Razaranja ćelija	Ekstrakcije ulja				
<i>Desmodesmus</i> sp.	Modifikovana Bold 3N	Fototrofno	Centrifugiranje	Perlice	Metanol: hloroform 2:1	–	36–58	–	[10]
	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	–	21,7	–	[45]
	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	Ultrazvuk	Metanol: hloroform 1:2	0,093	19,7	18	[52]
<i>Desmodesmus</i> sp.	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,06	34	5,7	[48]
<i>Desmodesmus elegans</i>	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	–	16,9	–	[45]
<i>Chlamydomonas</i> spp.	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	Ultrazvuk	Metanol: hloroform 1:2	0,134	25,3	34	[52]
<i>Chlamydomonas pitschmanii</i>	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	0,05	51	25	[42]
<i>Chlamydomonas mexicana</i>	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	0,07	28	21	[42]
<i>Neochloris oleabundans</i>	–	Fototrofno	Centrifugiranje i zamrzavanje	Ultrazvuk	n–Heksan	0,09	29	26,1	[44]
	BBM	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 1:2	0,53	23	122	[6]
<i>Monodus subterraneus</i>	BG11	Fototrofno	Centrifugiranje	–	Metanol: hloroform 2:1	0,19	16,1	30,4	[47]

^aSastav podloga (g/dm³):**BG11:** NaNO₃ 1,5; K₂HPO₄·3H₂O 0,04; MgSO₄·7H₂O 0,075; CaCl₂·2H₂O 0,036; C₆H₈O₇ 0,006; Feri–amonijum citrat 0,006, Na₂MgEDTA 0,001; Na₂CO₃ 0,02; H₃BO₃ 0,003; MnCl₂·4H₂O 0,002; ZnSO₄·7H₂O 0,0002; Na₂MoO₄·2H₂O 0,0004; CuSO₄·5H₂O 0,00008; Co(NO₃)₂·6H₂O 0,00005**BBM:** NaNO₃ 0,249; CaCl₂·2H₂O 0,0250; MgSO₄·7H₂O 0,075; K₂HPO₄ 0,072; KH₂PO₄ 0,175; NaCl 0,025; EDTA 0,16; KOH 0,077; FeSO₄·7H₂O 0,012; H₃BO₃ 0,028; ZnSO₄·7H₂O 0,019; MnCl₂·4H₂O 0,004; MoO₃ 0,002; CuSO₄·5H₂O 0,004; Co(NO₃)₂·6H₂O 0,001.**Modifikovana Chu 13:** KNO₃ 0,2; K₂HPO₄ 0,04; MgSO₄·7H₂O 0,1; CaCl₂·2H₂O 0,054; FeC₆H₆O₇ 0,01; C₆H₈O₇ 0,1; NaHCO₃ 0,036; H₃BO₃ 0,003; MnCl₂·4H₂O 0,002; ZnSO₄·7H₂O 0,0002; Na₂MoO₄·2H₂O 0,0004; CuSO₄·5H₂O 0,00008; Co(NO₃)₂·6H₂O 0,00005**Modifikovana Bold 3N:** NaNO₃ 0,374; CaCl₂ 0,019; MgSO₄ 0,036; K₂HPO₄ 0,038; KH₂PO₄ 0,088; NaCl 0,025; FeCl₃·6H₂O 0,002; Na₂EDTA• 2H₂O 0,005; ZnSO₄• 7H₂O 0,00007; CoSO₄·7H₂O 0,00002; MnSO₄·4H₂O 0,0005; Na₂MoO₄·2H₂O 1,48×10⁻⁸; Na₂SeO₃ 1,73×10⁻⁷; NiCl₂·6H₂O 1,49×10⁻⁸; tiamin–HCl 0,0001; biotin 2×10⁻⁶, B12 1×10⁻⁶**N11:** KNO₃ 1; Na₂HPO₄·H₂O 0,083; KH₂PO₄ 0,052; MgSO₄·7H₂O 0,050; CaCl₂·2H₂O 0,010; Fe–EDTA 0,01; MnCl₂·4H₂O 0,099; NiSO₄·6H₂O 0,024; ZnSO₄·7H₂O 0,063; CuSO₄·5H₂O 0,005; CoSO₄·7H₂O 0,003; NH₄VO₃ 0,003; (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 0,002

Proučavanje uticaja temperature na rast pokazalo je da su mikroalge otpornije na niže temperature i da mogu preživeti temperature i do 18 °C niže od optimalnih, dok je povišenje temperature iznad optimalne za samo 2–4 °C letalno. Zbog toga, veoma je važno održavati temperaturu tokom gajenja mikroalgi na 20–26 °C [8]. Mešanje je jedan od veoma važnih procesnih faktora jer dovodi do ravnomerne distribucije ćelija, toplote i metabolita, uz istovremeno ubrzavanje prenosa mase gasova. Takođe, određeni stepen turbulencije je poželjan da bi se obezbedila cirkulacija mikroalgi iz mračnog u osvetljeni deo reaktora.

Promenom uslova gajenja mikroalgi moguće je uticati na produktivnost ulja. Smanjenje pH vrednosti usled povećanog sadržaja CO₂ može inhibirati rast dok aeracija sa većim sadržajem CO₂ dovodi do povećanja produktivnosti ulja kod *Nannochloropsis oculata*, *Scenedesmus obliquus* i *Chlorella kessleri* [55,56]. Neke vrste algi mogu povećati sadržaj ulja za 10 do 20% usled smanjenja koncentracije kiseonika [57]. Najefikasnija metoda za povećanje akumulacije ulja je ograničavanje sadržaja azota koja, osim povećane akumulacije, dovodi i do promene sastava ulja od slobodnih masnih kiselina (SMK) do TAG [58]. Razmnožavanje ćelija pri limitiranoj količini azota je sprečeno, ali se ugljenik još uvek koristi

i prevodi u TAG koji se skladište unutar ćelija [11]. Visoke koncentracije gvožđa povećavaju, takođe, akumulaciju ulja u *C. vulgaris*, što ukazuje na to da se određeni metabolički putevi mogu modifikovati izlaganjem visokim koncentracijama oligoelemenata u podlozi [59].

Izdvajanje biomase

Izdvajanje biomase zahteva jedan ili više koraka odvajanja tečne i čvrste faze. Biomasa se može izdvojiti centrifugiranjem, filtracijom ili taloženjem (tabela 2). U cilju lakšeg izdvajanja biomase, ovi procesi mogu biti praćeni flokulacijom. Izdvajanje biomase predstavlja poseban problem zbog male veličine ćelija (3–30 µm) i relativno malog sadržaja ćelija (< 0,5 kg suve biomase/m³ pri komercijalnoj proizvodnji) mikroalgi [60]. Ćelije mikroalgi izdvojene tokom trajanja stacionarne faze imaju niži sadržaj polarnih lipida u odnosu na ćelije sakupljene tokom eksponencijalne faze [61].

Izbor metode za izdvajanje biomase zavisi od karakteristika mikroalgi (na primer, veličine i gustine ćelija), kao i od vrednosti proizvoda. Izdvajanje biomase se, najčešće, vrši u dva koraka. Prva faza se sastoji u odvajanju biomase iz suspenzije, pri čemu se vrši koncentrovanje 100–800 puta, kako bi se dobila koncentracija suve materije od 2–7% (sadržaj biomase zavisi od njene početne koncentracije i primenjenih metoda koje uključuju flokulaciju, flotaciju ili sedimentaciju). Druga faza podrazumeva koncentrisanje biomase centrifugiranjem, filtracijom ili agregacijom ultrazvukom i zahteva veću potrošnju energije [62].

Flokulacija predstavlja stvaranje agregata ćelija dodatkom flokulanata, čime se ubrzava proces odvajanja ćelija iz tečnosti. Pri agregaciji čestica uključene su dve vrste sila: na većim rastojanjima deluju elektrostatičke odbojne sile, dok na veoma malim rastojanjima deluju jače intermolekularne ili Van der Valsove sile. Ćelije mikroalgi nose negativno naelektrisanje koje sprečava agregaciju ćelija u rastvoru. Površinsko naelektrisanje može se neutralisati ili smanjiti dodatkom flokulanata, kao što su viševalentni katjoni i katjonski polimeri. Flokulanti trebaju biti jeftini, netoksični, efikasni u malim koncentracijama i bez uticaja na dalji tok procesa [63]. Najčešće se kao flokulanti koriste gvožđe(III)-hlorid, gvožđe(III)-sulfat i aluminijum(III)-sulfat. Dodatkom flokulanata koji sadrže dvovalentne i trovalentne katjone smanjuje se negativno naelektrisanje površine ćelija. Efikasnost elektrolita da izazove flokulaciju meri se kritičnom koncentracijom flokulanta ili koncentracijom neophodnom da izazove brzu flokulaciju [63]. Osim elektrolita, flokulaciju može izazvati promena pH uz upotrebu nejonskih polimera [64], bioflokulanata (na primer, hitozan) [65] ili ultrazvuka [66].

Flotacija predstavlja proces izdvajanja pri kome se mehurići gasa ili vazduha pripijaju uz čvrste čestice i nose ih na površinu tečnosti. Flotacija je pogodnija i

efikasnija za izdvajanje mikroalgi od sedimentacije [67]. Takođe, za razliku od flokulacije, ne zahteva dodavanje hemijskih agenasa [68]. Međutim, postoji veoma malo dokaza o ekonomskoj i tehničkoj održivosti primene flotacije za izdvajanje biomase [62].

Izdvajanje biomase taložnim metodama zavisi od gustine i veličine ćelija mikroalgi, kao i od brzine taloženja [62]. Nedostatak ove metode je neefikasno taloženje mikroalgi male gustine [69], kao i ograničenost primene na ćelije mikroalge veće od 70 µm, kao što je *Spirulina* spp. [70].

Primena filter presa pod pritiskom ili vakuumom pogodna je za velike količine biomase, dok u određenim slučajevima može biti relativno spora. Dodatno, filtracija je pogodnija za veće mikroalge, kao što su *Coelastrum proboscideum* i *Spirulina platensis*, a ne može se koristiti za ćelije mikroalgi manjih dimenzija, npr. *Scenedesmus*, *Dunaliella* ili *Chlorella* [60]. U tom slučaju, kao moguće rešenje može se primeniti membranska mikrofiltracija ili ultra-filtracija [62].

Većina mikroalgi se može izdvojiti iz suspenzije centrifugiranjem. Izdvajanje centrifugiranjem predstavlja brz ali energetski zahtevan metod izdvajanja biomase, koji zavisi od taložnih karakteristika ćelija i vremena zadržavanja mulja u centrifugi. Nedostaci procesa ogledaju se u velikoj potrošnji energije i troškovima održavanja opreme [66]. Prednosti centrifugiranja su visoka efikasnost izdvajanja [71] i mogućnost upotrebe za velike količine suspenzije [62].

Jedna od mogućnosti gajenja mikroalgi koja dodatno olakšava proces izdvajanja ćelija je primena imobilizacionih tehnika sa ciljem ograničavanja kretanja ćelija algi. Najčešće se koristi metoda imobilizacije ćelija u gel, pri čemu se, zbog male toksičnosti i visoke transparentnosti, najčešće kao nosači koriste prirodni polisaharidi, kao što su agar i alginati [72]. Proces se sastoji u mešanju polimera sa ćelijama mikroalgi i stabilizaciji dodatkom dvovalentnih jona, kako bi se formirale kuglice. Kako su imobilizovane kuglice relativno velike u poređenju sa ćelijama mikroalgi, njihovo izdvajanje iz rastvora može se izvršiti filtracijom koja ne zahteva značajnu količinu energije. Primena imobilizacije u gajenju mikroalgi za proizvodnju biodizela pokazala se veoma pogodnom jer je proces energetski efikasan, a dobijeno ulje ima sličan profil masnih kiselina i ME kao i ulje uljarica [73].

Nakon izdvajanja, biomasa sadrži 5–15% suve materije i podložna je kvarenju, tako da je neophodno preraditi je neposredno nakon izdvajanja. Najčešće se za produžavanje stabilnosti biomase koriste metode sušenja: na suncu, pri niskom pritisku, zamrzavanjem, u fluidizovanom sloju ili sprej-sušenje [62]. Temperatura na kojoj se odvija sušenje može uticati na sastav i prinos ulja u biomasi. Na primer, pri sušenju biomase na 60 °C zadržava se visoka koncentracija TAG u mastima i

vrlo malo smanjuje prinos ulja, dok više temperature dovode do smanjenja i koncentracije TAG i prinosa ulja [58].

Razaranje ćelija

Proizvodnja biodizela u određenim slučajevima zahteva oslobađanje ulja iz ćelija mikroalgi. Ovaj postupak se mora obaviti na najekonomičniji i energetski najefikasniji način uz izbegavanje korišćenje velikih količina organskih rastvarača i maksimiziranje prinosa biodizela, a bez značajnijeg prisustva sporednih proizvoda. Ukupan prinos biodizela značajno zavisi od primenjene metode razaranja ćelija i uređaja koji se koristi [19]. Razaranje ćelija može se vršiti primenom različitih metoda, kao što su: u autoklavu, primena mikrotalasa i ultrazvuka ili dodatak 10% rastvora NaCl. Mikrotalasi visoke frekvencije mogu se koristiti kao efikasno sredstvo za razaranje ćelija uljarica [74], ali se mogu primeniti i za razaranje velikih količina mikroalgi [46]. Ultrazvuk izaziva razaranje ćelijskog zida i membrane usled kavitacije i često se primenjuje za razgradnju mikrobnih ćelija [75]. Metoda dezintegracije ćelija pomoću perlica izaziva direktna mehanička oštećenja ćelija usled obrtanja velikom brzinom u prisustvu finih perli [75].

Ekstrakcija ulja

Idealni metod za ekstrakciju ulja iz mikroalgi treba da bude specifičan za lipide, kako bi se minimizirala ekstrakcija ne-lipidnih supstanci ali, isto tako, selektivan za određene frakcije lipida, na primer neutralne lipide koji sadrže mono-, di- i tri nezasićene masne kiseline [76]. Kako uklanjanje vode zahteva značajna ulaganja, potrebno je da primenjeni metod ekstrakcije ulja bude efikasan kada se primenjuje direktno na vlažnu biomasu [19]. Primenom kisele i bazne hidrolize mogu se ekstrahovati ulja iz vlažne biomase bez upotrebe organskih rastvarača i uz smanjenje koncentracije hlorofila u dobijenim uljima [77].

Ekstrakcija ulja iz mikroalgi je otežana usled prisustva debelog ćelijskog zida. Zbog toga, za ekstrakciju ulja iz mikroalgi retko se koriste mehaničke prese koje se najčešće primenjuju za ekstrakciju ulja iz uljarica. Najčešće se proces ekstrakcije vrši primenom organskih rastvarača, koji su pogodni za primenu na suvoj biomasu, ili superkritičnih fluida (na primer, superkritični CO₂) pogodnih za primenu na vlažnoj algalnoj biomasu [78]. Nakon ekstrakcije ulja, smeša koja se sastoji od rastvarača, preostale vode, ulja i ostataka ćelija, podvrgava se razdvajanju tečno-čvrsto (na primer, filtracijom), kako bi se uklonili ostaci ćelija. Pri ekstrakciji organskim rastvaračima, nakon razdvajanja tečno-čvrsto, primenjuje se neka od metoda za razdvajanje tečno-tečno, kao što su destilacija ili vakuum uparivanje u cilju uklanjanja rastvarača i preostale vode [57]. Pri upotrebi smeša nepolarnih i polarnih rastvarača, voda se uklanja iz rastvarača i ulja dvofaznom sepa-

racijom i dekantovanjem. S druge strane, tokom ekstrakcije superkritičnim fluidima, smanjenje pritiska dovodi do isparavanja vode i rastvarača i taloženja lipida.

Pri izlaganju ćelija bikompatibilnom rastvaraču, molekuli rastvarača ulaze u ćeliju, izazivajući oštećenja membrane [79]. Da bi se postigla potpuna ekstrakcija, moraju se razoriti veze između lipida i ostalih nelipidnih komponenti, a istovremeno treba izbeći degradaciju lipida. Pri ulasku nepolarnog rastvarača (hloroform ili heksan) u ćeliju, dolazi do stvaranja van der Waalsovih sila između rastvarača i neutralnih lipida i građenja kompleksa rastvarač-lipidi. Usled koncentracionog gradijenta dolazi do izlaska kompleksa iz ćelije i ulaska čistog rastvarača. Na ovaj način, neutralni lipidi se ekstrahuju iz ćelije i ostaju rastvoreni u rastvaraču. Međutim, neki neutralni lipidi se nalaze u citoplazmi vezani za polarne lipide tako da van der Waalsove sile koje se formiraju nisu dovoljno jake da raskinu veze između nepolarnih i polarnih lipida. S druge strane, polarni rastvarači, kao što je metanol ili izopropanol, mogu da raskinu veze između lipida i proteina gradeći vodonične veze sa polarnim lipidima iz kompleksa. Pri upotrebi smeše polarnog i nepolarnog rastvarača, rastvarači prodiru u ćeliju i reaguju sa lipidnim kompleksom. Nepolarni rastvarač stvara van der Waalsove sile sa neutralnim lipidima iz kompleksa, dok polarni rastvarač gradi vodonične veze sa polarnim lipidima. Vodonične veze su dovoljno jake da poremete veze lipida i proteina, pri čemu se kompleks rastvarača i lipida može odvojiti od ćelijske membrane i izbaciti iz ćelije. Dodatak polarnog rastvarača nepolarnom ubrzava ekstrakciju neutralnih lipida koji su vezani za membranu što, međutim, neizostavno dovodi i do ekstrakcije polarnih lipida [57].

Najčešće se, kao rastvarač, koristi smeša hloroform/metanol (tabela 2) u zapreminskim odnosima 1/2 [10,47], 2/1 [6,42,45] ili 1/1 [46], pri čemu preostala voda predstavlja tercijalnu komponentu u smeši i omogućava potpunu ekstrakciju neutralnih i polarnih lipida. Primena smeše rastvarača ne zahteva potpuno sušenje biomase. Donju, organsku fazu čini hloroform i deo metanola, kao i rastvoreni neutralni i polarni lipidi, dok je gornja, vodena faza sastavljena od vode sa delom metanola i većeg dela nelipidnih komponenti (proteini i ugljeni hidrati) [80].

Iako je klasična Folch-ova ekstrakcija hloroformom pogodna za ekstrakciju ulja mnogih mikroalgi, manje toksični organski rastvarači se sve češće koriste. Efikasnost *n*-heksana pri ekstrakciji ulja iz mikroalgi je manja u poređenju sa hloroformom, ali je njegova toksičnost manja i ima veoma mali afinitet prema nelipidnim kontaminantima i visoku selektivnost prema frakcijama neutralnih lipida [19]. Primenom smeše hloroform/metanol postižu veći prinosi ekstrahovanog ulja algi (32 mas.%) u odnosu na *n*-heksan (22 %), a primenjeni

sistem ekstrakcije ne utiče na sastav MEMK [81]. Međutim, troškovi i zaštita životne sredine su problemi koji se moraju rešiti pre primene organskih rastvarača u procesu [82].

Smeša heksan/izopropanol (3/2, v/v) može se koristiti kao manje toksična zamena za smešu hloroform/metanol sa sličnim delovanjem [83]. Čisti alkoholi, kao što su butanol, izopropanol i etanol su jeftini, lako isparljivi i imaju jak afinitet prema kompleksu lipida koji je vezan za membranu ćelija. Međutim, njihova polarna priroda je nedostatak jer ograničava interakcije sa slobodnim globulama neutralnih lipida [57].

Upotreba superkritičnih fluida zasniva se na poboljšanju prenosa mase usled dobre rastvorljivosti, visoke difuzivnosti i niske viskoznosti. U poređenju sa konvencionalnim procesima, ekstrakcija superkritičnim fluidima daje veći prinos, olakšava recikliranje i obezbeđuje dobijanje proizvoda visoke čistoće [84]. Najčešće se koristi superkritični CO₂. Nizak kritični pritisak CO₂ (72,9 atm) uslovljava male troškove kompresije, dok niska kritična temperatura CO₂ (31,1 °C) omogućava uspešnu ekstrakciju termički osetljivih frakcija lipida bez degradacije [57]. Osim toga, prednosti upotrebe superkritičnog CO₂ ogledaju se u njegovoj niskoj toksičnosti i nezapaljivosti, kao i slaboj reaktivnosti [76].

TRANSESTERIFIKACIJA I ESTERIFIKACIJA ULJA IZ MIKROALGI

Reakcije tranesterifikacije i esterifikacije ulja se mogu katalizovati homogenim katalizatorima, heterogenim katalizatorima i enzimima, a mogu se izvoditi i u odsustvu katalizatora na povišenoj temperaturi i povišenom pritisku (tzv. superkritičnim uslovima).

Homogeno katalizovane reakcije

Homogeni bazni katalizatori (KOH i NaOH), koji se, inače, upotrebljavaju u cilju ubrzanja reakcije transesterifikacije različitih biljnih ulja, kao, na primer: suncokretovog [85–88], palminog [89,90] ili sojinog [91], ne mogu se primeniti u reakciji transesterifikacije lipida iz mikroalgi zbog prisustva velikih količina SMK. U reakciji SMK sa baznim katalizatorom stvaraju se sapuni [92], čime se smanjuje prinos biodizela i otežava izdvajanje glicerola [93].

Prommuak i sar. [94] su ispitivali bazno katalizovanu metanolizu ulja ekstrahovanog iz suvih mikroalgi *C. vulgaris*, u opsegu koncentracije KOH od 2–8% (računato na biomasu), pri odnosu metanol: biomasa (v/w) 8:1, 12:1 i 16:1, na temperaturi od 60 °C, u trajanju od 1, 2, 3 ili 4 h. Najveći prinos metil estara masnih kiselina (MEMK) postiže se pri sledećim uslovima: koncentracija KOH 6%, odnos metanol:biomasa 16:1 u toku 2 h reakcije. Povećanje koncentracije KOH do 6 % (molski odnos metanol:biomasa 16:1, vreme trajanja reakcije 4 h) vodi do porasta prinosa biodizela. Ukoliko se količina

katalizatora poveća na 8%, prinos biodizela se smanjuje, jer se deo katalizatora koristi za reakciju saponifikacije, pri čemu dolazi do nastajanja sapuna i vode, koji ometaju reakciju transesterifikacije.

U slučaju dobijanja biodizela iz mikroalgi, prihvatljivija je primena kiselih katalizatora, npr H₂SO₄, koji nisu osetljivi na prisustvo SMK, i koji istovremeno katalizuju esterifikaciju SMK i transesterifikaciju TAG [78]. Uprkos ovoj prednosti, kiselo katalizovana transesterifikacija ulja algi je do sada malo proučavana. Johnson i Wen [95] su, transesterifikacijom ulja prethodno ekstrahovanog iz mikroalgi *Schizochytrium limacinum* u prisustvu sumporne kiseline kao katalizatora, ostvarili prinos sirovog biodizela od 57% (računato na masu algi). Sadržaj MEMK u sirovom biodizelu, dobijenom nakon centrifugisanja i razdvajanja gornjeg – metilestarskog sloja od donjeg – glicerolno-metanolnog sloja, bio je približno 66%, dok su ostatak činili i monoacilgliceroli, diacilgliceroli, TAG i masne kiseline.

Ulja mikroalgi se mogu podvrgnuti tzv. kiselom predtretmanu koji uključuje esterifikaciju SMK u prisustvu kiselog katalizatora. Ovim predtretmanom se smanjuje sadržaj SMK do nivoa kada je moguća primena baznih katalizatora (dvostepeni proces). Glavni nedostatak ovog dvostepenog procesa je upotreba viška baznog katalizatora u cilju neutralizacije kiselog katalizatora, što doprinosi povećanju troškova proizvodnje biodizela [78]. Dvostepeni proces koji kombinuje kiselo-katalizovanu esterifikaciju i bazno-katalizovanu transesterifikaciju može se prihvatiti kao rešenje kojim se prevazilaze nedostaci homogene kisele i bazne katalize [96]. Chen i sar. [97] su izveli dvostepeni proces koji se sastojao iz esterifikacije ulja iz slatkovodnih (*Scenedesmus*), morskih (*Nannochloropsis*) i heterotrofnih (*Dinoflagellate*) vrsta algi metanolom u prisustvu sumporne kiseline, kako bi se smanjio sadržaj SMK, nakon čega je u drugom koraku izvršena bazno katalizovana transesterifikacija ulja. Dvostepenim procesom za vreme od 30 min postignuta je 100% konverzija TAG na 65 °C pri molskom odnosu metanol:ulje 12:1 i 2% KOH. Međutim, metanolizom suncokretovog ulja u jednostepenom postupku na 20 °C, pri molskom odnosu 6:1, 1% KOH kao katalizatora i intenzitetu mešanja 120 rpm, ostvaren je prinos u opsegu 80–90% nakon 15–20 min reakcije [85].

Heterogeno katalizovane reakcije

Primena heterogenih katalizatora u proizvodnji biodizela ima niz prednosti: proces odvajanja i prečišćavanja proizvoda se pojednostavljuje, smanjuje se zagađenje životne sredine, mogućnost ponovne upotrebe regenerisanog katalizatora, što kao posledicu daje pozitivan ekonomski efekat [98]. Najveći broj istraživanja heterogeno katalizovane transesterifikacije različitih biljnih ulja odnosi se na primenu oksida zemnoalkalnih metala kao katalizatora reakcije. Katalitička aktivnost

baznih heterogenih katalizatora raste sa povećanjem njihove baznosti, odnosno katalizatori najveće baznosti ostvaruju najveću konverziju [99]. Najčešće korišćeni heterogeni katalizator u reakciji transesterifikacije biljnih ulja je CaO, čijom upotrebom se mogu postići visoki prinosi MEMK i preko 98% [100].

Ne postoji mnogo objavljenih rezultata o primeni heterogenih katalizatora za dobijanje biodizela iz mikroalgi, uglavnom zbog činjenice da su mikroalge relativno nova sirovina i nisu komercijalno dostupne na tržištu [78]. Čisti CaO i MgO nisu pokazali aktivnost u transesterifikaciji ulja mikroalge *N. oculata*, dok je CaO na Al₂O₃, u koncentraciji od 80% omogućio prinos biodizela od 97,5% pri molskom odnosu metanol:ulje 30:1 na temperaturi od 50 °C [101]. Sadržaj MEMK u biodizelu dobijenom metanolizom lipida mikroalge *Nannochloropsis gaditana* u prisustvu hijerarhijskih beta zeolita bio je manji od 30% [102]. Transesterifikacijom ulja iz mikroalgi *Nannochloropsis* spp. pri temperaturi od 65 °C u prisustvu Mg–Zr kao čvrstog katalizatora u toku 4 h trajanja reakcije postignut je zanemarljivo mali prinos MEMK od 22,2%, pri koncentraciji katalizatora 10% i masenom odnosu metanol:ulje 10:1. Dalje povećanje masenog odnosa metanol:ulje na 20:1 dovodi do opadanja prinosa MEMK [103].

Enzimski katalizovane reakcije

Enzimski katalizovana sinteza biodizela ima određene prednosti: visoku selektivnost, manju potrošnju energije, manje sporednih proizvoda i otpada [104], nižu reakcionu temperaturu [105], eliminisanje stvaranja sapuna [106], laku regeneraciju glicerola i katalizatora [106], a moguća je i potpuna konverzija sirovina sa visokim sadržajem SMK u estre [107]. Ovaj način dobijanja biodizela iz ulja mikroalgi je već proučavan [108–110].

Li i sar. [109] su enzimski katalizovanom transesterifikacijom ostvarili najveću konverziju ulja iz mikroalge *C. protothecoides* od 98,15% za 12 h pri sledećim optimalnim uslovima: 75% imobilisane lipaze, sadržaj vode 10% (računato na količinu lipida), molski odnos metanol: ulje 3:1 (metanol je dodavan postepeno, u tri dela, kako bi se izbegla inhibicija enzima), temperatura 38,8 °C i pH 7.0. Isto tako, Lai i sar. [108] su proučavali uticaj molskog odnosa metanol:ulje, reakcione temperature, zapremine rastvarača i sadržaja vode na prinos biodizela pri enzimski katalizovanoj transesterifikaciji ulja iz mikroalge *Chlorella pyrenoidosa*. Korišćene su dve vrste enzima, i to lipaze plesni *Penicillium expansum* (PEL) i kvasca *Candida antarctica* (Novozym 435), u prisustvu dva sistema rastvarača (jonski rastvarač 1-butil-3-metilimidazol-heksafluorofosfat, [BMIm][PF₆], i organski rastvarač *tert*-butanol). Pod optimalnim uslovima, u prisustvu PEL i Novozym 435 viši prinosi MEMK postignuti su u jonskom rastvaraču (90,7 i 86,2%, redom) u odnosu na reakciju u *tert*-butanolu (48,6 i 44,4%, redom).

Tran i sar. [110] primenili su dva načina proizvodnje biodizela iz mikroalge *C. vulgaris* ESP-31 u prisustvu imobilisane lipaze vrste *Burkholderia* sp. C20 kao katalizatora. Prvi je podrazumevao transesterifikaciju prethodno ekstrahovanog ulja, a drugi direktnu transesterifikaciju razorene mikroalgalne biomase. Postupkom transesterifikacije prethodno ekstrahovanog ulja za 48 h reakcije postignuta je konverzija ulja od 72,12% (43,27% biomase) pri sledećim optimalnim uslovima: količina enzima 1203,11 U/g, temperatura 40 °C, sadržaj vode 65,52 mas.%, molski odnos metanol:ulje 12,35:1, sadržaj heksana 67,46 mas.%.

IN SITU TRANSESTERIFIKACIJA

Konvencionalni postupak dobijanja biodizela iz mikroalgi podrazumeva prethodnu ekstrakciju ulja iz mikroalgi pomoću organskih rastvarača, nakon čega se primenjuje reakcija transesterifikacije. Međutim, ovaj međukorak može se izbeći ukoliko se direktno transesterifikuje ulje sadržano u algama. Ovaj postupak je poznat kao *in situ* transesterifikacija [111]. *In situ* transesterifikacija je energetski efikasniji postupak u odnosu na postupak sinteze biodizela iz ekstrahovanog ulja algi [112]. Dalje unapređenje *in situ* transesterifikacije se može postići primenom mikrotalasnog zračenja, jer se ovim postupkom dobija manje sporednih proizvoda i manje otpada u odnosu na klasični postupak ekstrakcije i transesterifikacije [113].

In situ transesterifikacija mikroalgi je izvođena u odsustvu katalizatora, tj. u superkritičnim uslovima, i u prisustvu homogenih i heterogenih katalizatora i enzima.

In situ transesterifikacija u superkritičnim uslovima

Metanol u superkritičnim uslovima rastvara nepolarne TAG, stvarajući jednofazni sistem ulje:metanol i ubrzavajući sintezu MEMK [114]. Tako, na primer, Levine i sar. [115] predlažu proces koji se sastoji iz dve faze: intraćelijske hidrolize lipida vlažne algalne biomase (80% vlage) superkritičnom vodom, praćene superkritičnom *in situ* etanolizom vlažnog čvrstog materijala sa visokim sadržajem masnih kiselina, bez prisustva katalizatora. Na ovaj način eliminiše se potreba za sušenjem biomase i ekstrakcijom ulja iz algi.

Voda prisutna u algalnoj biomasi se ponaša kao kosolvent u procesu sa superkritičnim metanolom, što ubrzava konverziju ulja iz algi u MEMK, a takođe povećava rastvorljivost ulja u metanolu. *In situ* transesterifikacija alge *Nannochloropsis* sp. CCMP1776 sa 90% sadržaja vode pod superkritičnim uslovima metanola u velikoj meri skraćuje reakciono vreme (25 min), pojednostavljuje proces prečišćavanja biodizela i maksimizira konverziju TAG do odgovarajućih alkil estara [114].

Soh i Zimmerman [116] predlažu primenu superkritičnog CO₂, uz metanol kao kosolvent u smeši je efikasna u ekstrakciji, transesterifikaciji i separaciji proiz-

voda pri nižim reakcionim temperaturama i čija se prednost ogleda u povećanoj selektivnosti i rastvorljivosti, kao i manjem utrošku energije. Za razliku od metanola, glicerol je skoro potpuno nerastvoran u superkričnom CO₂ i po nastajanju će se izdvojiti iz smeše.

In situ transesterifikacijom karbonizovane algalne biomase pri superkričnim uslovima etanola (270–325 °C) postignut je prinos etil estara masnih kiselina (EEMK) > 90% [117]. Primenom superkričnih uslova temperature i pritiska etanola u *in situ* transesterifikaciji mikroalgi, moguće je postići visoke prinose EEMK primenom malih količina etanola, čime se doprinosi smanjenju troškova i manjem ulaganju u rekupe-raciju alkohola. Naime, pri molskom odnosu etanol:masne kiseline od 5/1, postignut je prinos EEMK od 79% nakon 150 min, dok je pri molskom odnosu 20/1 prinos EEMK bio 89% nakon 180 min, pri temperaturi od 275 °C [118]. Poređenja radi, prinos EEMK pri superkričnim uslovima etanola nakon 120 min pri molskom odnosu etanol ulje 3/1 i 6/1 bio je u oba slučaja 60%, dok su pri istim molskim odnosima, kiselo katalizovanom (5% H₂SO₄) *in situ* transesterifikacijom na 60 °C ostvareni prinosi između 5 i 10% [118].

Homogeno katalizovana *in situ* transesterifikacija

Johnson i Wen [95] su poredili dva postupka kiselo katalizovanog (H₂SO₄) dobijanja biodizela iz heterotrofne mikroalge *Schizochytrium limacinum*: *in situ* transesterifikaciju algi i transesterifikaciju prethodno ekstrahovanog ulja. Nezavisno od korišćenog rastvarača (hloroform, heksan ili petroletar), *in situ* postupkom su dobijeni veći prinosi MEMK. Pri tome, jedino je transesterifikacija uz hloroform dala visok sadržaj MEMK u sirovom biodizelu. Međutim, u slučaju bazno katalizovane transesterifikacije biomase i ulja ekstrahovanog iz mikroalge *C. vulgaris*, pri količini KOH od 4%, molskom odnosu metanol:biomasa, odnosno metanol:ulje 16:1, prinos MEMK nakon 4 h reakcije bio je znatno veći u postupku koji uključuje prethodnu ekstrakciju ulja i transesterifikaciju, zbog veće debljine zida mikroalge [94].

Visoki prinosi i dobar kvalitet biodizela mogu postići *in situ* kiselo-katalizovanom transesterifikacijom mikroalge *C. pyrenoidosa* u prisustvu *n*-heksana [103]. Optimalni uslovi obuhvatili su: 1 g algi u prahu, 6 ml *n*-heksana i 4 ml metanola sa 0,5 M sumporne kiseline, pri temperaturi od 90 °C. Tokom 2 h reakcije pri optimalnim uslovima postignut je prinos od 95% biodizela sa sadržajem MEMK od 99%.

Pri istraživanju *in situ* transesterifikacije mikroalgi vrste *Chaetoceros gracilis*, Wahlen i sar. [119] su definisali sledeće parametre: vrstu alkohola, količinu alkohola po jedinici biomase, temperaturu reakcije i koncentraciju katalizatora kao ključne za uspešnu konverziju masti iz algi u biodizel. Ispitujući ekstrakciju ulja iz mikroalgi *C. gracilis* metanolom, utvrđeno je da se

dobija znatno manja količina TAG iz algalne biomase, u odnosu na ekstrakciju etanolom, 1-butanolom, 2-metil-1-propanolom ili 3-metil-1-butanolom. Međutim, kada je postupak izvođen u prisustvu 1,8 zapr.% H₂SO₄ kao katalizatora, vrsta korišćenog alkohola nije imala uticaj na prinos dobijenih MEMK. Pri ovoj metanolizi, prinos MEMK posle 125 min je bio 14,8% (računato na biomasu). Povećavajući zapreminu metanola na 2,5 ml po 100 mg biomase (maseni odnos 20:1), prinos MEMK se povećao 22,6% nakon 150 min. Dalje povećanje masenog odnosa metanol:biomasa do 40:1 nije dovelo porastu prinosa MEMK. Primenjeni maseni odnos metanol:biomasa je daleko veći od uobičajenog masenog odnosa koji se koristi u metanolizi suncokretovog ulja (1:4,5, koji odgovara molskom odnosu 6:1).

Optimalan odnos metanol:ulje je proučavan od strane mnogih istraživača. Tako, povećanje masenog odnosa metanol:suve alge od 0,4:1 na 3,2:1 u kiselo katalizovanoj *in situ* transesterifikaciji mikroalgi *C. pyrenoidosa* dovelo je do povećanja prinosa biodizela sa 69,4 na 94,3%, dok je sadržaj MEMK ostao iznad 98% [103]. Dalje povećanje masenog odnosa metanol:suve alge do 7,9:1 nije doprinelo povećanju prinosa biodizela i sadržaja MEMK, kao posledica otežane separacije usled viška metanola. Međutim, povećanje masenog odnosa metanol:suve alge do 9,5:1 ima pozitivan uticaj na *in situ* metanolizu biomase pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, dok dalje povećanje masenog odnosa metanol:suve alge ne doprinosi povećanju prinosa [120].

Generalno, na višim temperaturama esterifikacije postižu se veći prinosi biodizela, zbog veće brzine reakcije, kao i zbog poboljšanog razaranja ćelija, pri čemu ulje lakše dolazi u kontakt sa reaktantima. Međutim, veoma visoke temperature reakcije mogu dovesti do smanjenja prinosa pri dužem trajanju reakcije [33]. Miao i Wu [33] su razvili integrisani metod dobijanja biodizela kiselo katalizovanom metanolizom ulja iz heterotrofne mikroalge *C. protothecoides*. Pri molskom odnosu metanol:ulje 30:1 i koncentraciji katalizatora 100%, računato na masu ulja, nema značajne razlike u prinosu biodizela na 30 (56%) i 50 °C (58%) [33]. Rezultati ispitivanja uticaja temperature (50–110 °C) i vremena trajanja (0,5–4 h) kiselo katalizovane *in situ* proizvodnje biodizela iz mikroalge *C. pyrenoidosa* pokazali su da se viši prinosi biodizela postižu pri višoj temperaturi, naročito u prvom času reakcije, dok nije bilo značajne promene u sadržaju MEMK u uzorcima uzetim u opsegu 0,25 do 4 h, što ukazuje da je efikasna ekstrakcija ulja iz biomase ključni korak *in situ* transesterifikacije. Najveće količine biodizela dobijene su na 90 i 110 °C (95% prinosa za 2 h), dok su prinosi na 20, 50 i 70 °C rasli nakon četvrtog sata reakcije [103]. Povećanje temperature sa 60 na 90 °C, u toku 10 min reakcije, pri direktnoj transesterifikaciji algalne vrste *C. gracilis*, dovelo je do porasta prinosa MEMK sa 23,7 na 33,7%. S

druge strane, porastom temperature sa 60 na 80 °C, tokom 20 min trajanja reakcije, postignuto je značajno povećanje prinosa, uz maksimalni prinos MEMK od 34,1%. Promenom koncentracije H₂SO₄ od 1,2 do 2,4% (v/v), u trajanju 10 min na 80 °C, uočen je neznatan porast prinosa MEMK sa 28,2 na 31,7% [119].

Heterogeno katalizovana *in situ* transesterifikacija

Jedino su Li i sar. [121] istraživali heterogenu *in situ* transesterifikaciju suvih mikroalgi *Nannochloropsis* sp., korišćenjem 10% Mg–Zr kao katalizatora. Pri zapreminskom odnosu metanol:metilen dihlorid 3:1, u toku 4h trajanja reakcije na temperaturi od 65 °C postignut je prinos MEMK od 28%.

Enzimski katalizovana *in situ* transesterifikacija

Primenom postupka direktne transesterifikacije razorene mikroalge *C. vulgaris* ESP-31 u prisustvu imobilisane lipaze iz vrste *Burkholderia* sp. C20, pri optimalnim uslovima (količina katalizatora 1233,1 U/g, temperatura 40 °C, molski odnos metanol:ulje 67,93:1, sadržaj heksana 80,57% i vreme trajanja reakcije 48 h), konvertovano je 97,3% ulja (odnosno 58,3% biomase) u biodizel. Imobilisana lipaza u postupku direktne transesterifikacije razorene biomase bila je otporna na visoke količine metanola (molski odnos metanol:ulje veći od 67,93), aktivna i pri visokom sadržaju vode (>71,39%) i mogla je biti korišćena u 6 ciklusa bez značajnog gubitka aktivnosti [110].

Unapređenje procesa *in situ* transesterifikacije

Jones i sar. [122] su iskoristili mogućnost vezivanja ćelija za jonoizmenjivačku smolu (Amberlit), radi koncentrisanja razblažene suspenzije želija. Nakon toga, smola sa vezanom biomasom tretirana je 5% rastvorom sumporne kiseline u metanolu, radi eluiranja biomase, *in situ* transesterifikacije i regeneracije smole. Na ovaj način, sakupljanje i transesterifikacija algi se odigravaju istovremeno, čime se gubi potreba za međukoracima, kao što su liziranje ćelija, sušenje i ekstrakcija rastvaračem.

U svrhu daljeg unapređenja *in situ* proizvodnje biodizela iz algi ispitivana je primena ultrazvuka [123,124], mikrotalasnog zračenja [120,124], kao i primena kosolvenata [125]. Takođe, sprovedena je optimizacija procesnih faktora primenom metodologije površine odziva [112,113,120,126–128].

Primena ultrazvuka i mikrotalasnog zračenja

Ultrazvuk ima sve veću ulogu u hemijskim procesima, naročito u slučajevima kada klasične metode zahtevaju drastične uslove ili veoma dugo trajanje reakcije i predstavlja važno sredstvo zelene hemije u smislu minimizacije otpada i uštede energije [123]. Mikrotalasno zračenje se, takođe, koristi poslednjih godina kao efikasan način skraćivanja vremena reakcije trans-

esterifikacije. Njene prednosti su značajno smanjenje količine sporednih proizvoda i kratko vreme separacije [129].

Koberg i sar. [124] su proučavali značaj ultrazvuka i mikrotalasa u unapređenju procesa proizvodnje biodizela iz algi. Oni su izveli reakciju transesterifikacije prethodno ekstrahovanog ulja i *in situ* transesterifikaciju mikroalgi *Nannochloropsis algae* u prisustvu ultrazvuka (na 50 °C) ili mikrotalasa (na 60 °C), uz SrO kao katalizator, u trajanju od 5 min. U prvom slučaju (ekstrakcija i transesterifikacija) prinos biodizela bio je 18,9, odnosno 32,8% u prisustvu ultrazvuka, odnosno mikrotalasa, redom. Još veći prinosi biodizela postignuti su *in situ* transesterifikacijom, i to 20,9 i 37,1% primenom ultrazvuka, odnosno mikrotalasa, respektivno, što potvrđuje ne samo da je *in situ* transesterifikacija jednostavniji i brži proces, već i da se na ovaj način postižu viši prinosi biodizela. Pored toga, u prisustvu mikrotalasa postižu se veći prinosi biodizela u odnosu na ultrazvuk (i do 99,9%), što se pripisuje većoj izloženosti ćelija mikrotalasima usled njihovog razlaganja na manje klustere, koji su dostupniji za transesterifikaciju. Ubrzanje reakcije transesterifikacije vezuje se za jonsku prirodu prelaznog stanja reakcije transesterifikacije pod dejstvom mikrotalasa. Takođe, SrO se, kao čvrsti bazni katalizator može izdvojiti iz reakcione smeše i ponovo koristiti [124].

Direktna transesterifikacija suve biomase (sa sadržajem lipida 26%) mikroalge *C. vulgaris*, pod dejstvom ultrazvuka u trajanju od 30 min na sobnoj temperaturi, uz sumpornu kiselinu kao katalizator rezultovala je 60% prinosom MEMK [123]. *In situ* transesterifikacijom suve biomase pod dejstvom mikrotalasa postiže se visok procenat ekstrakcije ulja i njegova efikasna konverzija u biodizel, a takođe se smanjuje vreme trajanja reakcije i zapremina rastvarača u odnosu na postupak koji uključuje transesterifikaciju ekstrahovanog ulja [120].

Primena kosolvenata

U pokušaju daljeg pojednostavljenja procesa dobijanja biodizela iz mikroalgi, kao i smanjenja energetske troškova samog postupka, Xu i Mi [125] su ispitali direktnu bazno katalizovanu (KOH) *in situ* transesterifikaciju mikroalgi, u prisustvu kosolvenata, ali bez ikakvog mešanja i zagrevanja. Od svih analiziranih kosolvenata (toluena, dihlormetana i dietiletra), kao i njihovih kombinacija (etar/toluen, toluen/metanol i dihlormetan/metanol), sistem toluen/metanol (u zapreminskom odnosu 2:1) pokazao se najefikasnijim, uz postignuti prinos biodizela 76% u prvom i 10% u drugom ciklusu transesterifikacije.

Optimizacija procesa primenom metodologije površine odziva

Primenom statističkih metoda moguće je postići bolje razumevanje i poznavanje procesa i odrediti opti-

malne procesne uslove koji obezbeđuju maksimalni prinos biodizela iz lipida mikroalgi.

Centralni kompozitni dizajn 2^3 (6 aksijalnih i tri centralne tačke) primenjen je u planiranju eksperimenata metanolize sintetskog ulja algi (sastav masnih kiselina *C.vulgaris*) [126]. Tri procesne promenljive (molski odnos metanol:ulje, temperatura reakcije i količina katalizatora) ispitivane su na dva nivoa u cilju optimizacije procesa primenom metodologije površine odziva. Model drugog reda predvideo je da se najviši prinos ME postiže pri sledećim optimalnim uslovima: molski odnos metanol:ulje 14:1, 0,42% NaOH na temperaturi od 43 °C.

Haas i Wagner [127] su primenili metodu površine odziva u optimizaciji *in situ* transesterifikacije algi u odsustvu kosolventa. Ispitivan je uticaj pripreme sirovine (netretirana, sušena u pećnici i ispirana vodom/sušena) na prinos proizvoda, kao i uticaj promene reakcione temperature (23 do 65 °C), količine alkohola (maseni odnos metanol:biomasa od 2,5:1 do 6,3:1) i kiselog katalizatora (maseni odnos H_2SO_4 :biomasa od 0,588 do 1,254) u toku 2 h reakcije. Rezultati su pokazali da odnos zapremine metanola i biomase (V/w) i temperatura imaju najznačajniji uticaj na prinos proizvoda, pri čemu najveći odnos metanol:biomasa (V/w) i najviša primenjena temperatura (65 °C) daju najveće prinose, dok promena koncentracije katalizatora nije imala značajan uticaj u ispitivanom opsegu uslova. Smanjenje sadržaja vode u biomasi smanjuje potrebnu količinu metanola za postizanje visokih prinosa. Sušenje u pećnici smanjuje zapreminu metanola na 4 ml/g supstrata, uz prinos od 83% u odnosu na maksimalni teorijski (90%), dok ispiranje biomase vodom praćeno naknadnim sušenjem nije doprinelo ni povećanju prinosa ni smanjenju potrebne zapremine metanola.

Centralni kompozitni dizajn 2^2 primenjen pri istraživanju kisele *in situ* metanolize mikroalge *N. oculata* pokazao je da je zapreminski odnos metanol:HCl najznačajnija promenljiva koja utiče na prinos MEMK, dok vreme trajanja reakcije nije značajno uticalo na prinos [96]. Na osnovu eksperimentalnih rezultata i metodologije površine odziva, optimalni uslovi *in situ* metanolize suvih algi *Nannochloropsis* spp. pod dejstvom mikrotalasnog zračenja definisani su kao: maseni odnos metanol:suva biomasa 9,5:1, koncentracija KOH 2% i reakciono vreme od 4 min [120].

Korišćenjem metode površine odziva, Patil i sar. [128] ispitivali su uticaje tri faktora: maseni odnos metanol:vlažna biomasa (3,2:1 do 9,5:1), temperatura (240–260 °C) i vreme reakcije (10–30 min), vreme reakcije (3–9 min) i koncentracija katalizatora (1–3% u odnosu na suhu biomasu) na proces proizvodnje biodizela iz biomase pri natkritičnim uslovima i mikrotalasnom zračenju, redom. Pri optimalnim uslovima maseni odnos metanol:vlažna biomasa 7,1:1, temperatura 225 °C i vreme 25 min ostvaren je prinos MEMK od oko 84%

(računato na ukupni sadržaj lipida). S druge strane, pod dejstvom mikrotalasnog zračenja pri optimalnim uslovima (maseni odnos metanol:vlažna biomasa 9,5:1, koncentracija katalizatora 2% KOH i vreme reakcije 4 do 5 min na temperaturi od 60 do 64 °C) postignut je prinos MEMK oko 80%.

Primenivši metodologiju površine odziva, Patil i sar. [113] su optimizovali postupak *in situ* transesterifikacije suve biomase *Nannochloropsis salina* pod dejstvom mikrotalasnog zračenja. Na osnovu analize eksperimenata i metodologije površine odziva, došlo se do sledećih optimalnih uslova za dati postupak: maseni odnos metanol:suva biomasa 10:1, koncentracija KOH 2,5% (u odnosu na suhu biomasu), reakciono vreme 8–10 min pri utrosku energije od 1400 W tokom procesa.

POVEĆANJE RAZMERE PROCESA

Bioinženjeringom se može postići heterotrofni rast nekih mikroalgi, čime je moguće dobiti veće količine biomase i ulja iz mikroalgi [33,34], a samim tim i veće količine biodizela. Dosadašnja ispitivanja dala su dobre rezultate na laboratorijskom nivou. Postavlja se pitanje: može li se biodizel proizvoditi iz ulja heterotrofnih mikroalgi i na industrijskom nivou? U cilju utvrđivanja primene iste tehnologije i u velikim bioreaktorima, Li i sar. [109] su proučavali enzimski katalizovanu transesterifikaciju ulja iz mikroalge *C. protothecoides* u laboratorijskom (5 dm³), poluindustrijskom (750 dm³) i industrijskom (11,000 dm³) bioreaktoru. Rezultati su pokazali da se sadržaj lipida neznatno smanjuje povećanjem razmere kultivacije, i iznosi 46,1, 48,7 i 43,0% u uzorcima iz laboratorijskog, poluindustrijskog i industrijskog bioreaktora, redom. Utvrđeno je da se kultivacija heterotrofne mikroalge *C. protothecoides* proizvodnja biodizela iz nje može proširiti i na industrijski nivo.

ZAKLJUČAK

Značaj mikroalgi u prirodi ogleda se u tome što obavljajući fotosintezu učestvuju u obnavljanju i održavanju količine kiseonika u atmosferi. Međutim, alge mogu predstavljati i značajan izvor različitih industrijski značajnih komponenti. Jedna od mogućnosti primene mikroalgi jeste i sinteza ulja koje se može koristiti za proizvodnju biodizela. Za razliku od ostalih sirovina koje se koriste za dobijanje biodizela, upotreba mikroalgi pruža niz prednosti kao što su: veći prinos po jedinici površine, povećana efikasnost, smanjeni troškovi izdvajanja i transporta biomase, kao i smanjeni troškovi proizvodnje biodizela. S obzirom da sadržaj i sastav ulja veoma zavisi od uslova rasta mikroalgi, izmenom sastava podloge ili načina gajenja može se značajno povećati prinos ulja. Pored toga, veoma značajan korak u

povećanju sadržaja ulja predstavlja primena genetičkog inženjerstva. Fototrofno gajenje mikroalgi je energetski povoljnije, međutim veći prinos biomase može se postići heterotrofnim gajenjem. Ipak, održivost proizvodnog sistema najviše zavisi od svojstava vrste mikroalge koja se koristi, a što nameće potrebu za stalnim izolovanjem novih sojeva, proučavanjem uslova rasta i produkcije ulja mikroalgi. Tokom procesa proizvodnje ulja energetski je vrlo zahtevan postupak izdvajanja biomase. Uglavnom se za izdvajanje biomase primenjuju metode koje su već prisutne u industriji (najčešće centrifugiranjem). Kako je podložna kvarenju, za povećanje održivosti biomase nakon izdvajanja koriste se različite metode sušenja.

Proizvodnja biodizela iz mikroalgi može se obaviti na dva načina. Prvi podrazumeva ekstrakciju ulja iz biomase i transesterifikaciju i/ili esterifikaciju ulja odgovarajućim alkoholom u prisustvu katalizatora ili u odsustvu katalizatora pod natkritičnim uslovima metanola. Metode koje se koriste za ekstrakciju ulja iz uljarica nisu pogodne za mikroalge, pa se ekstrakcija odvija nakon razaranja ćelija i uz primenu odgovarajućih organskih rastvarača ili superkritičnih fluida. Dobijanje biodizela iz izdvojenog ulja može se vršiti primenom homogene katalize u prisustvu kiselih katalizatora, kao i heterogenom katalizom. Veoma dobri rezultati prinosa biodizela postignuti su primenom enzimski katalizovane reakcije transesterifikacije. Drugi način predstavlja direktnu transesterifikaciju algalne biomase (*in situ* postupak) kojim se unapređuje proces proizvodnje smanjenjem troškova. Primenom ovog postupka izbegava se proces ekstrakcije ulja, a pokazalo se da *in situ* kiselo katalizovana transesterifikacija može dati veći prinos biodizela u poređenju sa procesom transesterifikacije ekstrahovanom ulja.

Usled povećanih potreba za biogorivima, upotreba mikroalgi za proizvodnju biodizela predstavlja značajan korak u zamenu fosilnih goriva. U tu svrhu neophodni su stalni razvoj tehnologija i optimizacija procesa gajenja, izdvajanja biomase i ulja mikroalgi, kao i dobijanja biodizela.

Zahvalnica

Rad je urađen u okviru projekta III 45001 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

LITERATURA

[1] S.N. Naik, V.V. Goud, P.K. Rout, A.K. Dalai, Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **14** (2010) 578–597.
 [2] Y. C. Sharma, B. Singh, J. Korstad, A critical review on recent methods used for economically viable and eco-friendly development of microalgae as a potential feed-

stock for synthesis of biodiesel. *Green Chem.* **13** (2011) 2993–3006.
 [3] P. Chen, M. Min, Y. Chen, L. Wang, Y. Li, Q. Chen, Review of the biological and engineering aspects of algae to fuels approach, *Int. J. Agricult. Biolo. Eng.* **2** (2009) 1–28.
 [4] K.H. Cardozo, T. Guaratini, M.P. Barros, V.R. Falcao, A.P. Tonon, N.P. Lopes, Metabolites from algae with economical impact, *Com. Biochem. Physiol., C* **146** (2007) 60–78.
 [5] K. Vijayaraghavan, K. Hemanathan, Biodiesel production from freshwater algae, *Energ. Fuels* **23** (2009) 5448–5453.
 [6] J. Pruvost, G. Van Vooren, B. Le Gouic, A. Couzinet-Mossion, J. Legrand, Systematic investigation of biomass and lipid productivity by microalgae in photobioreactors for biodiesel application, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 150–158.
 [7] A.F. Clarens, E.P. Resurreccion, M.A. White, L.M. Colosi, Environmental life cycle comparison of algae to other bioenergy feedstocks, *Environ. Sci. Technol.* **44** (2010) 1813–1819.
 [8] T. Mata, A. Martins, N. Caetano, Microalgae for biodiesel production and other applications: A review, *Renew. Sustain. Energ. Rev.* **14** (2010) 217–232.
 [9] K. Hundt, B.V. Reddy, Algal biodiesel production from power plant exhaust and its potential to replace petrodiesel and reduce greenhouse gas emissions, *Int. J. Low-Carbon Technol.* **6** (2011) 294–298.
 [10] Y.Y. Pan, S.T. Wang, L.T. Chuang, Y.W. Chang, C.N.N. Chen, Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 10510–10517.
 [11] X. Meng, J. Yang, X. Xu, L. Zhang, Q. Nie, M. Xian, Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renew. Energ.* **34** (2009) 1–5.
 [12] N. Mulumba, I.H. Farag, Tubular photobioreactor for microalgae biodiesel production, *Int. J. Eng. Sci. Technol.* **4** (2012) 703–709.
 [13] A.B.M.S. Hossain, A. Salleh, A.N. Boyce, P. Chowdhury, M. Naquiddin, Biodiesel Fuel Production from Algae as Renewable Energy, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* **4** (2008) 250–254.
 [14] I. Rawat, R. Ranjith Kumar, T. Mutanda, F. Bux, Biodiesel from microalgae: A critical evaluation from laboratory to large scale production, *Appl. Energ.* **103** (2013) 444–467.
 [15] W. Becker, *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*, Cambridge University Press, Cambridge, 1994.
 [16] Y.K. Lee, H. Shen, in: A. Richmond (Ed.), *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phyco-*logy, Blackwell Science Ltd., Oxford, 2004, pp. 40–57.
 [17] A. Vonshak, in: A. Richmond (Ed.), *Handbook of microalgal mass culture*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1986, pp. 117–145.
 [18] Y. Chisti, Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* **25** (2007) 294–306.

- [19] H. Amaro, C. Guedes, X. Malcata, Advances and perspectives in using microalgae to produce biodiesel, *Appl. Eng.* **88** (2011) 3402–3410.
- [20] S.P. Mayfield, S.E. Franklin, R.A. Lerner, Expression and assembly of a fully active antibody in algae, *Proceed. Nat. Acad. Sci.* **100** (2003) 438–442.
- [21] A. Melis, Green alga hydrogen production: progress, challenges and prospects, *Int. J. Hydr. Energy* **27** (2002) 1217–1228.
- [22] S. Siripornadulsil, S. Traina, D.P.S. Verma, R.T. Sayre, Molecular mechanisms of proline mediated tolerance to toxic heavy metals in transgenic microalgae. *Plant Cell* **14** (2002) 2837–2847.
- [23] M. Tabatabaei, M. Tohidfar, G. Salehi Jouzani, M. Safarnejad, M. Pazouki, Biodiesel production from genetically engineered microalgae: Future of bioenergy in Iran, *Renew. Sustain. Energ. Rev.* **15** (2011) 1918–1927.
- [24] X. Zeng, M.K. Danquah, X.D. Chen, Y. Lu, Microalgae bioengineering: From CO₂ fixation to biofuel production, *Renew. Sustain. Energ. Rev.* **15** (2011) 3252–3260.
- [25] R. Radakovits, R.E. Jinkerson, A. Darzins, M.C. Posewitz, Genetic engineering of algae for enhanced biofuel production, *Eukaryotic Cell* **9** (2010) 486–501.
- [26] T.G. Dunahay, Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers, *Biotechniques* **15** (1993) 452–455.
- [27] P.I. Leonardi, C.A. Popovich, M.C. Damiani, Feedstocks for second-generation biodiesel: microalgae's biology and oil composition, in: economic effects of biofuel production, M.A. dos Santos Bernardes, Ed., InTech, Rijeka, Croatia, 2011. Available from: <http://www.intechopen.com/books/economic-effects-of-biofuel-production/feedstocks-for-second-generation-biodiesel-microalgae-s-biology-and-oil-composition>.
- [28] P. Schlagermann, G. Göttlicher, R. Dillschneider, R. Rosello-Sastre, C. Posten, Composition of algal oil and its potential as biofuel, *J. Combust.* (2012), doi: 10.1155/2012/285185.
- [29] M. J. Ramos, C. M. Fernández, A. Casas, L. Rodríguez, Á. Pérez, Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties, *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 261–268.
- [30] Y.-H. Chen, B.-Y. Huang, T.-H. Chiang, T.-C. Tang, Fuel properties of microalgae (*Chlorella protothecoides*) oil biodiesel and its blends with petroleum diesel, *Fuel* **94** (2012) 270–273.
- [31] M. Borowitzka, Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters, *J. Biotechnol.* **70** (1999) 313–321.
- [32] G. Murthy, in: A. Pandey, C. Larroche, S. Ricke, C.G. Dussap, E. Gnansounou (Eds.), *Biofuels: Alternative feedstocks and conversion processes*, Elsevier, Oxford, 2011, pp. 415–438.
- [33] X. Miao, Q. Wu, Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil, *Bioresour. Technol.* **97** (2006) 841–846.
- [34] H. Xu, X. Miao, Q. Wu, High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters, *J. Biotechnol.* **126** (2006) 499–507.
- [35] Y.K. Lee, in: A. Richmond (Ed.), *Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied phycology*, Blackwell Science Ltd., Oxford, 2004, pp. 116–125.
- [36] R.N. Singh, S. Sharma, Development of suitable photobioreactor for algae production—A review, *Renew. Sustain. Energ. Rev.* **16** (2012) 2347–2353.
- [37] C.U. Ugwu, H. Aoyagi, H. Uchiyama, Photobioreactors for mass cultivation of algae, *Bioresour. Technol.* **99** (2008) 4021–4028.
- [38] C.Y. Chen, K.L. Yeha, R. Aisyah, D.J. Lee, J.C. Chang, Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review, *Bioresour. Technol.* **102** (2011) 71–81.
- [39] E. Molina, F.G. Ación Fernández, Y. Chisti, Tubular photobioreactor design for algal cultures, *J. Biotechnol.* **92** (2001) 113–131.
- [40] B. Wang, C. Lan, M. Horsman, Closed photobioreactors for production of microalgal biomasses, *Biotechnol. Adv.* **30** (2012) 904–912.
- [41] M.R. Brown, S.W. Jeffrey, J.K. Volkman, G.A. Dunstan, Nutritional properties of microalgae for mariculture, *Aquaculture* **151** (1997) 315–331.
- [42] R. Abou-Shanab, I. Matter, S.N. Kim, Y.K. Oh, J. Choi, B.H. Jeon, Characterization and identification of lipid-producing microalgae species isolated from a freshwater lake, *Biomass Bioenerg.* **35** (2011) 3079–3085.
- [43] Y. Cheng, W. Zhou, C. Gao, K. Lan, Y. Gao, Q. Wu, Biodiesel production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tuber by heterotrophic microalgae *Chlorella protothecoides*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84** (2009) 777–781.
- [44] L. Gouveia, A. C. Oliveira, Microalgae as a raw material for biofuels production, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36** (2009) 269–274.
- [45] S. Kaur, M. Sarkar, R.B. Srivastava, H.K. Gogoi, M.C. Kalita, Fatty acid profiling and molecular characterization of some freshwater microalgae from India with potential for biodiesel production. *New Biotechnol.* **29** (2012) 332–344.
- [46] J.Y. Lee, C. Yoo, S.Y. Jun, C.Y. Ahn, H.M. Oh, Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresour. Technol.* **101** (2010) 75–77.
- [47] L. Rodolfi, G. Chini Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini, M. R. Tredici, Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor, *Biotechnol. Bioeng.* **102** (2008) 100–112.
- [48] D. Savić, J. Ćirić, B. Danilović, V. Veljković, Growth kinetics of lipid producing freshwater microalgae isolates, 22th Congress of chemists and technologists of Macedonia, Ohrid, Macedonia, 2012, Book of Abstracts, p. 123.
- [49] W. Xiong, X. Li, J. Xiang, Q. Wu, High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbio-diesel production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78** (2008) 29–36.

- [50] S. Mandal, N. Mallick, Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84** (2009) 281–291.
- [51] C. Yeesang, B. Cheirsilp, Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 3034–3040.
- [52] L.F. Wu, P.C. Chen, A.P. Huang, C.M. Lee, The feasibility of biodiesel production by microalgae using industrial wastewater, *Bioresource Technol.* **113** (2012) 14–18.
- [53] A. Singh, P.S. Nigam, J.D. Murphy, Renewable fuels from algae: an answer to debatable land based fuels, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 10–16.
- [54] A.L. Ahmad, N.H.M. Yasin, C.J.C. Derek, J.K. Lim, Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review, *Renew. Sustain. Energ. Rev.* **15** (2011) 584–593.
- [55] S.Y. Chiu, C.Y. Kao, M.T. Tsai, S.C. Ong, C.H. Chen, C.S. Lin, Lipid accumulation and CO₂ utilization of *Nannochloropsis oculata* in response to CO₂ aeration, *Bioresource Technol.* **100** (2009) 833–838.
- [56] M.G. De Moraes, J.A.V. Costa, Carbon dioxide fixation by *Chlorella kessleri*, *C. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina* sp. cultivated in flasks and vertical tubular photobioreactors, *Biotechnol. Lett.* **29** (2007) 1349–1352.
- [57] R. Halim, M. Danquah, P. Webley, Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review, *Biotechnol. Adv.* **30** (2012) 709–732.
- [58] A. Widjaja, C.C. Chien, Y.H. Ju, Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* **40** (2009) 13–20.
- [59] N. Uduman, Y. Qi, M.K. Danquah, G.M. Forde, A. Hoadley, Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels, *J. Renew. Sustain. Energ.* **2** (2010) 012701.
- [60] E. Molina Grima, E.H. Belarbi, F.G. Ación Fernández, A. Robles Medina, Y. Chisti, Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics, *Biotechnol. Adv.* **20** (2003) 491–515.
- [61] G.A. Dunstan, J.K. Volkman, S.M. Barrett, C.D. Garland, Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture, *J. Appl. Phycol.* **5** (1993) 71–83.
- [62] L. Brennan, P. Owende, Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products, *Renew. Sustain. Energ. Rev.* **14** (2010) 557–577.
- [63] E. Molina Grima, F.G. Ación Fernández, A. Robles Medina, in: A. Richmond (Ed.), *Downstream processing of cell-mass and products, handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*, Blackwell Science Ltd., Oxford, 2004, pp. 215–253.
- [64] R.M. Knuckey, M.R. Brown, R. Robert, D.M.F. Frampton, Production of microalgal concentrates by flocculation and their assessment as aquaculture feeds, *Aquacult. Eng.* **35** (2006) 300–313.
- [65] R. Divakaran, V.N.S. Pillai, Flocculation of algae using chitosan, *J. Appl. Phycol.* **14** (2002) 419–422.
- [66] R. Bosma, W.A. Van Spronsen, J. Tramper, R.H. Wijffels, Ultrasound, a new separation technique to harvest microalgae, *J. Appl. Phycol.* **15** (2003) 143–153.
- [67] Y.M. Chen, J.C. Liu, Y.H. Ju, Flotation removal of algae from water, *Colloids Surf., B.* **12** (1998) 49–55.
- [68] B. Wang, Y. Li, N. Wu, C. Lan, CO₂ bio-mitigation using microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79** (2008) 707–718.
- [69] J.K. Edzwald, Algae, bubbles, coagulants, and dissolved air flotation, *Water Sci. Technol.* **27** (1993) 67–81.
- [70] R. Munõz, B. Guieysse, Algal-bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: a review, *Water Res.* **40** (2006) 2799–2815.
- [71] M. Heasman, J. Diemar, W. O'Connor, T. Sushames, L. Foulkes, Development of extended shelf-life microalgae concentrate diets harvested by centrifugation for bivalve molluscs – a summary, *Aquacult. Res.* **31** (2000) 637–659.
- [72] I. Moreno-Garrido, Microalgae immobilization: Current techniques and uses, *Bioresource Technol.* **99** (2008) 3949–3964.
- [73] M.K. Lam, K.T. Lee, Immobilization as a feasible method to simplify the separation of microalgae from water for biodiesel production, *Chem. Eng. J.* **191** (2012) 263–268.
- [74] G. Cravotto, L. Boffa, S. Mantegna, P. Perego, M. Avogadro, P. Cintas, Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves, *Ultrason. Sonochem.* **15** (2008) 898–902.
- [75] S.J. Lee, B.D. Yoon, H.M. Oh, Rapid method for the determination of lipid from the green alga *Botryococcus braunii*, *Biotechnol. Tech.* **12** (1998) 553–556.
- [76] M.D. Macias-Sanchez, C. Mantell, M. Rodriguez, E.M. de la Ossa, L.M. Lubian, O. Montero, Supercritical fluid extraction of carotenoids and chlorophyll a from *Synechococcus* sp., *J. Supercrit. Fluids* **39** (2007) 323–329.
- [77] A. Sathish, R.C. Sims, Biodiesel from mixed culture algae via a wet lipid extraction procedure, *Bioresour. Technol.* **118** (2012) 643–647.
- [78] M.K. Lam, K.T. Lee, Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward, *Biotechnol. Adv.* **30** (2012) 673–690.
- [79] M. Hejazi, R. Wijffels, Milking of microalgae, *Trends Biotechnol.* **22** (2004) 189–194.
- [80] A.R. Medina, E. Molina Grima, A. Giménez Giménez, M. J. Ibañez González, Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids, *Biotechnol. Adv.* **16**(3) (1998) 517–580.
- [81] M. Veillette, A. Giroir-Fendler, N. Faucheux, M. Heitz, Biodiesel production from microalgae, *WIT Trans. Ecol. Environ.* **148** (2011) 465–473.
- [82] M. Cooney, G. Young, K. Nagle, Extraction of bio-oils from microalgae, *Sep. Purif. Rev.* **38** (2003) 291–325.
- [83] R. Halim, B. Gladman, M. Danquah, P. Webley, Oil extraction from microalgae for biodiesel production, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 178–185.
- [84] A. Taberero, E. Martín del Valle, M. Galán, Evaluating the industrial potential of biodiesel from a microalgae

- heterotrophic culture: Scale-up and economics, *Biochem. Eng. J.* **63** (2012) 104–115.
- [85] O.S. Stamenković, M.L. Lazić, Z.B. Todorović, V.B. Veljković, D.U. Skala, The effect of agitation intensity on alkali-catalyzed methanolysis of sunflower oil, *Bioresource Technol.* **98** (2007) 2688–2699.
- [86] O. Stamenković, Z. Todorović, M. Lazić, V. Veljković, D. Skala, Kinetics of sunflower oil methanolysis at low temperatures, *Bioresource Technol.* **99** (2008) 1131–1140.
- [87] A.V. Marjanović, O.S. Stamenković, Z.B. Todorović, M.L. Lazić, V.B. Veljković, Kinetics of the base-catalyzed sunflower oil ethanolysis, *Fuel* **89** (2010) 665–671.
- [88] J.M. Avramović, O.S. Stamenković, Z.B. Todorović, M.L. Lazić, V.B. Veljković, Empirical modeling of ultrasound assisted base-catalyzed sunflower oil methanolysis kinetics, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* **18** (2012) 115–127.
- [89] D. Darnoko, M. Cheryan, Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77** (2000) 1263–1267.
- [90] M.A. Kalam, H.H. Masjuki, Biodiesel from palm oil-an analysis of its properties and potential, *Biomass Bioenerg.* **23** (2002) 471–479.
- [91] K.T. Kucek, M.A.F. Cesar-Oliveira, H.M. Wilhelm, L.P. Ramos, Ethanolysis of refined soybean oil assisted by sodium and potassium hydroxides, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **84** (2007) 385–392.
- [92] D.Y.C. Leung, X. Wu, M.K.H. Leung, A review on biodiesel production using catalyzed transesterification, *Appl. Energ.* **87** (2010) 1083–1095.
- [93] E.A. Ehimen, Z.F. Sun, C.G. Carrington, Variables affecting the *in situ* transesterification of microalgae lipids, *Fuel* **89** (2010) 677–684.
- [94] C. Prommuak, P. Pavasant, A. T. Quitain, M. Goto, A. Shotipruk, Microalgal lipid extraction and evaluation of single-step biodiesel production, *Eng. J.* **16** (2012) 157–166.
- [95] M.B. Johnson, Z. Wen, Production of biodiesel fuel from the microalga *Schizochytrium limacinum* by direct transesterification of algal biomass, *Energ. Fuels* **23** (2009) 5179–5183.
- [96] V.B. Veljković, J.M. Avramović, O.S. Stamenković, Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: State of the art and the perspectives, *Renew. Sustain. Energ. Rev.* **16** (2012) 1193–1209.
- [97] L. Chen, T. Liu, W. Zhang, X. Chen, J. Wang, Biodiesel production from algae oil high in free fatty acids by two-step catalytic conversion, *Bioresour. Technol.* **111** (2012) 208–214.
- [98] M.R. Miladinović, I.Z. Lukić, O.S. Stamenković, V.B. Veljković, D.U. Skala, Heterogeneous base-catalyzed methanolysis of vegetable oils: State of art, *Hem. Ind.* **64** (2010) 63–80.
- [99] V.B. Veljković, J.M. Avramović, O.S. Stamenković, Biodiesel production by ultrasound-assisted transesterification: state of the art and the perspectives, *Renew. Sustain. Energy Rev.* **16** (2012) 1193–1209.
- [100] V.B. Veljković, O.S. Stamenković, Z.B. Todorović, M.L. Lazić, D.U. Skala, Kinetics of sunflower oil methanolysis catalyzed by calcium oxide, *Fuel* **88** (2009) 1554–1562.
- [101] E.S. Umdu, M. Tuncer, E. Seker, Transesterification of *Nannochloropsis oculata* microalga's lipid to biodiesel on Al₂O₃ supported CaO and MgO catalysts, *Bioresource Technol.* **100** (2009) 2828–2831.
- [102] A. Carrero, G. Vicente, R. Rodriguez, M. Linares, G.L. del Peso, Hierarchical zeolites as catalysts for biodiesel production from *Nannochloropsis* microalga oil, *Catal. Today* **167** (2011) 148–153.
- [103] P. Li, X. Miao, R. Li, J. Zhong, In situ biodiesel production from fast-growing and high oil content *Chlorella pyrenoidosa* in rice straw hydrolysate, *J. Biomed. Biotechnol.* (2011), doi:10.1155/2011/141207.
- [104] S. Shah, S. Sharma, M.N. Gupta, Enzymatic transesterification for biodiesel production, *Ind. J. Biochem. Biophys.* **40** (2003) 392–399.
- [105] M.K. Lam, K.T. Lee, A.R. Mohamed, Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review, *Biotechnol. Adv.* **28** (2010) 500–518.
- [106] J.M. Marchetti, V.U. Miguel, A.F. Errazu, Possible methods for biodiesel production, *Renew. Sust. Energ. Rev.* **11** (2007) 1300–1311.
- [107] W. Du, W. Li, T. Sun, X. Chen, D. Liu, Perspectives for biotechnological production of biodiesel and impacts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **79** (2008) 331–337.
- [108] J.-Q. Lai, Z.-L. Hu, P.-W. Wang, Z. Yang, Enzymatic production of microalgal biodiesel in ionic liquid [BMIm][PF₆], *Fuel* **95** (2012) 329–333.
- [109] X. Li, H. Xu, Q. Wu, Large-scale biodiesel production from microalga *C. protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.* **98** (2007) 764–771.
- [110] D.-T. Tran, K.-L. Yeh, C.-L. Chen, J.-S. Chang, Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris* ESP-31 for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase, *Bioresource Technol.* **108** (2012) 119–127.
- [111] S.B. Velasquez-Orta, J.G.M. Lee, A. Harvey, Alkaline *in situ* transesterification of *Chlorella vulgaris*, *Fuel* **94** (2012) 544–550.
- [112] R.M. Carvalho Junior, J.V.C. Vargas, L.P. Ramos, C.E.B. Marinao, J.C.L. Torrecs, Microalgae biodiesel *via in situ* methanolysis, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **86** (2011) 1418–1427.
- [113] P. D. Patil, H. Reddy, T. Muppaneni, A. Mannarswamy, T. Schuab, F.O. Holguin, P. Lammers, N. Nirmalakhandan, P. Cooke, S. Deng, Power dissipation in microwave-enhanced *in situ* transesterification of algal biomass to biodiesel, *Green Chem.* **14** (2012) 809–818.
- [114] P.D. Patil, V.G. Gude, A. Mannarswamy, S. Deng, P. Cooke, S. Munson-McGee, I. Rhodes, P. Lammers, N. Nirmalakhandan, Optimization of direct conversion of wet algae to biodiesel under supercritical methanol conditions, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 118–122.
- [115] R.B. Levine, T. Pinnarat, P.E. Savage, Biodiesel production from wet algal biomass through *in situ* lipid hydrolysis and supercritical transesterification, *Energ. Fuels* **24** (2010) 5235–5243.

- [116] L. Soh, J. Zimmerman, One-Pot Algal Biodiesel Production in Supercritical Carbon Dioxide (<http://www.supercriticalfluids.com/wp-content/uploads/AP-133-One-Pot-Algal-Biodiesel-Production-in-Supercritical-Carbon-Dioxide.pdf>).
- [117] R. Levine, P.E. Savage, Hydrothermal carbonization and supercritical ethanol in situ transesterification for the production of algal biodiesel, 2012 AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings, Pittsburgh, PA, 2012.
- [118] R.B. Levine, A. Bollas, P.E. Savage, Process improvements for the supercritical *in situ* transesterification of carbonized algal biomass, *Bioresource Technol.* **136** (2013) 556–564.
- [119] B.D. Wahlen, R.M. Willis, L.C. Seefeldt, Biodiesel production by simultaneous extraction and conversion of total lipids from microalgae, cyanobacteria and wild mixed-cultures, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 2724–2730.
- [120] P.D. Patil, V.G. Gude, A. Mannarswamy, P. Cooke, S. Munson-McGee, N. Nirmalakhandan, P. Lammers, S. Deng, Optimization of microwave-assisted transesterification of dry algal biomass using response surface methodology, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 1399–1405.
- [121] Y. Li, S. Lian, D. Tong, R. Song, W. Yang, Y. Fan, R. Qing, C. Hu, One-step production of biodiesel from *Nannochloropsis* sp. on solid base Mg–Zr catalyst, *Appl. Energ.* **88** (2011) 3313–3317.
- [122] J. Jones, C.-H. Lee, J. Wang, M. Poenie, Use of anion exchange resins for one-step processing of algae from harvest to biofuel, *Energies* **5** (2012) 2608–2625.
- [123] C.B. Hobuss, P.F. Rosales, D. Venzke, P.O. Souza, P.C. Gobbi, L.P. Gouvea, M.A.Z. Santos, E. Pinto, E. Jacob-Lopes, C.M.P. Pereira, Cultivation of algae in photobioreactor and obtention of biodiesel, *Braz. J. Pharmacogn.* **21** (2011) 361–364.
- [124] M. Koberg, M. Cohen, A. Ben-Amotz, A. Gedanken, Biodiesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation, *Bioresource Technol.* **102** (2011) 4265–4269.
- [125] R. Xu, Y. Mi, Simplifying the process of microalgal biodiesel production through *in situ* transesterification technology, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **88** (2011) 91–99.
- [126] V. Plata, V. Kafarov, N. Moreno, Optimization of third generation biofuels production: Biodiesel from microalgae oil by homogeneous transesterification, *Chem. Eng. Trans.* **21** (2010) 1201–1206.
- [127] M.J. Haas, K. Wagner, Simplifying biodiesel production: The direct or in situ transesterification of algal biomass, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **113** (2011) 1219–1229.
- [128] P.D. Patil, V.G. Gude, A. Mannarswamy, P. Cooke, N. Nirmalakhandan, P. Lammers, S. Deng, Comparison of direct transesterification of algal biomass under supercritical methanol and microwave irradiation conditions, *Fuel* **97** (2012) 822–831.
- [129] J. Hernando, P. Leton, M.P. Matia, J.L. Novella, J. Alvarez-Builla, Biodiesel and FAME synthesis assisted by microwaves: Homogeneous batch and flow processes, *Fuel* **86** (2007) 1641–1644.

SUMMARY

PRODUCTION OF BIODIESEL FROM MICROALGAE

Bojana R. Danilović, Jelena M. Avramović, Jovan T. Ćirić, Dragiša S. Savić, Vlada B. Veljković

Faculty of Technology, University of Niš, Leskovac, Bulevar oslobođenja 124, Serbia

(Review paper)

In recent years, more attention has been paid to the use of third generation feedstocks for the production of biodiesel. Microalgae have emerged as one of the most promising sources for biodiesel production. They are unicellular or colonial photosynthetic organisms, with permanently increasing role in industrial application in the production of not only chemicals and nutritional supplements, but also the biodiesel. The biodiesel productivity per hectare of cultivation area can be up to 100 times higher for microalgae than for oil crops. Also, microalgae can grow in a variety of environments that are often unsuitable for agricultural purposes. Microalgae oil content varies in different species and can reach up to 77% of dry biomass, while the oil productivity by the phototrophic cultivation of microalgae is up to 122 mg/l/d. Variations of the growth conditions and the implementation of the genetic engineering can induce the changes in the composition and productivity of microalgae oil. Biodiesel from microalgae can be produced in two ways: by transesterification of oil extracted from biomass or by direct transesterification of algal biomass (so called *in situ* transesterification). This paper reviews the current status of microalgae used for the production of biodiesel including their isolation, cultivation, harvesting and conversion to biodiesel. Because of high oil productivity, microalgae will play a significant role in future biodiesel production. The advantages of using microalgae as a source for biofuel production are increased efficiency and reduced cost of production. Also, microalgae do not require a lot of space for growing and do not have a negative impact on the global food and water supplies. Disadvantages of using microalgae are more difficult separation of biomass and the need for further research to develop standardized methods for microalgae cultivation and biodiesel production. Currently, microalgae are not yet sustainable option for the commercial production of biodiesel. First of all, the price of biodiesel from microalgae is still higher than the price of diesel, due to high production costs.

Keywords: Biodiesel • Microalgae • Cultivation • Extraction • *In situ* transesterification