

Универзитет у Београду

Технолошко-металуршки факултет

Невена Д. Луковић

Развој ензимског поступка за синтезу метил  
естара масних киселина

Докторска дисертација

Београд, 2014.

University of Belgrade

Faculty of Technology and Metallurgy

Nevena D. Lukovic

Optimization of enzyme production of fatty acid  
methyl esters

Doctoral disertation

Belgrade, 2014.

Ментор:

---

Др Зорица Кнежевић-Југовић,  
ванредни професор  
Технолошко-металуршког факултета  
Универзитета у Београду

Чланови комисије:

---

Др Дејан Безбрадица,  
ванредни професор  
Технолошко-металуршког факултета  
Универзитета у Београду

---

Др Душан Мијин,  
редовни професор  
Технолошко-металуршког факултета  
Универзитета у Београду

---

Др Љиљана Мојовић,  
редовни професор  
Технолошко-металуршког факултета  
Универзитета у Београду

---

Др Мирјана Антов,  
редовни професор  
Технолошког факултета  
Универзитета у Новом Саду

Датум одбране: \_\_\_\_\_

*Mojoj Tapu*

*Ова докторска дисертација рађена је на Катедри за Биохемијско инжењерство и биотехнологију Технолошко-металуришког факултета у Београду.*

*Највећу захвалност дугујем свом ментору проф. др Зорици Кнежевић-Југовић на предложеној теми и безрезервној подршци и помоћи коју ми је пружила током израде ове докторске дисертације.*

*Велику захвалност дугујем проф. др Дејану Безбрадици на веома активном учествовању у стварању и пре свега обради резултата ове тезе, као и другим сегментима научно-истраживачког рада.*

*Професору др Душану Мијину хвала на сарадњи и помоћи на коју сам увек могла да рачунам.*

*Искрено захваљујем проф. др Љиљани Мојовић на добронамерним сугестијама и корисним саветима који су значајно побољшали завршну верзију ове тезе.*

*Захваљујем проф. др Мирјани Антов на пријатној сарадњи и указаном поверењу.*

*Најсрдачније се захваљујем мојим колегиницама др Невени Прлаиновић и Соњи Јаковетић без чије колегијалне помоћи и подршке овај рад не би био овакав какав јесте.*

*Највећу захвалност дугујем мојој породици, мојим родитељима и мом Војину на непрекидној љубави, помоћи, подршци и охрабривању, без чега не бих била у могућности да израдим и напишем ову тезу.*

## Развој ензимског поступка за синтезу метил естара масних киселина

### ИЗВОД

У оквиру ове тезе испитивана је могућност ензимског поступка синтезе метил естара масних киселина (биодизела) из биљног уља, поступком трансестерификације. Испитано је каталитичко дејство липаза из различитих извора са аспекта трансестерификационе активности и стабилности у системима без органског растварача. Користиле су се комерцијалне липазе из различитих микроорганизама (*Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*) а потом је методом вишефакторних експерименталних планова (централни композициони ротатабилни план) испитан утицај различитих параметара: температуре, садржаја воде у систему, количине додатог ензима, моларног односа метанол/уље као и начина извођења процеса на принос метил естара масних киселина. Испитана је могућност примене различитих ацил акцептора и утврђено је да се као најбољи показао метил ацетат. Захваљујући примени овог ацил акцептора омогућена је оптимизација реакторског система. Испитали су се утицаји различитих процесних параметара и режима рада биореактора на продуктивност имобилисаног система. Други део рада се фокусирао на технике имобилизације. Анализирана је ковалентна имобилизација нативне липазе из *C. rugosa* и нативне липазе из *C. antarctica* на полимерним носачима које садрже епоксидне групе и афинитет добијеног имобилисаног ензима према супстрату. Испитана је ефикасност модификације комерцијалног носача Eupergit® С 250L помоћу цистеина и глутаралдехида ради добијања имобилисаног система веће стабилности. Утврђено је да се овако имобилисана липаза из *C. antarctica* може успешно користити као биокатализатор у синтези биодизела, при чему се применом ове липазе добијају приноси биодизела у рангу приноса које дају комерцијални препарати са имобилисаном липазом из *C. antarctica*.

Кључне речи: метил естри масних киселина, биодизел, липаза, трансестерификација, имобилизација ензима

Научна област: Технолошко инжењерство

УДК број: 577.152 : 547.392 : 66.095

# Optimization of enzyme production of fatty acid methyl esters

## ABSTRACT

This thesis deals with the transesterification of sunflower oil in the solvent-free system. The catalytic activity of lipases from different sources (*Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*) has been examined in terms of transesterification activity and stability. The optimal conditions for the methanolysis reaction have been determined using response surface methodology (RSM) leading to the high fatty acid methyl esters yield. The reaction temperature, the biocatalyst, the water concentration and the substrate molar ratio have been the investigated variables. After that, the possibility of different acyl acceptors has been investigated. Further results suggest that the use of methyl acetate as an acyl acceptor could significantly improve the immobilized system stability. This has been verified in industrially feasible reactor design. Different process parameters have been investigated as well as the operational stability of the immobilized lipase.

The second part of the thesis was focused on the development of the immobilized enzyme with the best catalytic properties. The covalent immobilization of native lipase from *C. rugosa* and native lipase from *C. antarctica* on polymer carriers containing epoxy groups have been analyzed. The efficiency of modified commercial carrier Eupergit<sup>®</sup> C 250L with cysteine and glutaraldehyde has been studied. It was found that immobilized lipase from *C. antarctica* can be successfully used as a biocatalyst in the biodiesel synthesis. The obtained yields are in the range of commercial available immobilized enzymes.

Key words: fatty acid methyl esters, biodiesel, lipases, transesterification, enzyme immobilization

Academic Expertise: Engineering technology

UDC number: 577.152 : 547.392 : 66.095

## САДРЖАЈ

УВОД.....	1
1. ТЕОРИЈСКИ ДЕО .....	4
1.1. Развој алтернативних горива.....	4
1.1.1. Употреба уља и деривата уља као биогорива.....	6
1.1.1.1. Мешање уља са дизел горивом .....	7
1.1.1.2. Микроемулзије.....	8
1.1.1.3. Пиролиза.....	8
1.2. Биодизел .....	10
1.2.1. Предности биодизела .....	10
1.2.2. Карактеристике биодизел горива.....	12
1.3. Хемијска синтеза биодизела.....	16
1.3.1. Базно катализована трансестерификација.....	17
1.3.2. Кисело катализована трансестерификација.....	19
1.3.3. Хемијска хетерогена катализа.....	20
1.3.4. Некатализована трансестерификација.....	21
1.4. Ензимска синтеза биодизела .....	21
1.4.1. Предности ензимски катализоване синтезе биодизела.....	21
1.4.2. Основна својства липаза .....	23
1.4.3. Специфичност.....	26
1.4.4. Структура и механизам деловања.....	28
1.4.5. Липазе као биокатализатори у синтези биодизела.....	31
1.4.5.1. Липаза из <i>Candida rugosa</i> .....	34
1.4.5.2. Липаза из <i>Rhizomucor miehei</i> .....	34
1.4.5.3. Липаза из <i>Candida antarctica</i> .....	36
1.5. Имобилизација ензима .....	38



---

1.5.1. Ковалентна имобилизација.....	43
1.5.1.1. Иммобилизација липазе модификоване увођењем амино групе.....	45
1.5.2. Претретман липаза .....	46
1.6. Фактори који утичу на ензимску трансестерификацију триглицерида .....	48
1.6.1.1. Избор сировине.....	48
1.6.2. Избор ацил акцептора .....	53
1.6.3. Температура .....	55
1.6.4. Садржај воде у реакционој смеси .....	56
1.6.5. Утицај растварача на ензимску синтезу .....	58
1.7. Конфигурација реактора и индустријска примена.....	60
1.7.1. Ензимски реактори .....	60
2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО .....	66
2.1. Материјали и методе .....	66
2.1.1. Материјали .....	66
2.1.2. Методе .....	67
2.1.2.1. Ензимска синтеза биодизела .....	67
2.1.2.2. Хроматографска метода анализе уља и биодизела .....	68
3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА.....	72
3.1. Испитивање утицаја врсте биокатализатора и начина извођења процеса на синтезу биодизела.....	72
3.2. Оптимизација ензимског поступка синтезе биодизела имобилисаном липазом из <i>Rhizomucor miehei</i> .....	74
3.3. Оптимизација ензимског поступка синтезе биодизела имобилисаном липазом из <i>Candida antarctica</i> .....	82
3.4. Утицај ацил акцептора на синтезу биодизела.....	90
3.5. Ензимска синтеза биодизела у реактору са пакованим слојем .....	95
3.6. Примена полиметакрилатних носача модификованих цистеином у имобилизацији липазе.....	101
3.6.1. Иммобилизација липазе из <i>S.rugosa</i> на модификовани и	

---

---

немодификовани Eupergit® C 250L .....	103
3.6.1.1. Одређивање термостабилности имобилисане липазе .....	106
3.6.1.2. Кинетика десорпције ензима са различитих носача .....	107
3.6.1.3. Иммобилизација модификоване липазе на модификовани и немодификовани Eupergit® C 250L .....	109
3.6.2. Иммобилизација липазе из <i>C. antarctica</i> на носач модификован цистеином .....	114
3.6.2.1. Примена имобилисане липазе из <i>C. antarctica</i> у синтези биодизела .....	118
4. ЗАКЉУЧАК .....	122
5. ЛИТЕРАТУРА .....	124
БИОГРАФИЈА АУТОРА .....	136
ИЗЈАВА О АУТОРСТВУ .....	137
ИЗЈАВА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ РАДА .....	138
ИЗЈАВА О КОРИШЋЕЊУ .....	139

---

# УВОД

Предмет и циљ истраживања ове докторске дисертације су развој ензимског поступка синтезе метил естара масних киселина (биодизела) из биљних уља, поступком трансестерификације. Биодизел је течна гориво, произведено из пољопривредних култура, које у потпуности може да замени фосилно гориво у моторима са унутрашњим сагоревањем. Биодизел је обновљив извор енергије и његовим коришћењем смањује се потреба за фосилним дизелом чиме се чувају резерве и умањује ризик од снабдевања. Он је биоразградив, није токсичан, не придоноси ефекту стаклене баште ( $\text{CO}_2$  неутралан), а његова примена доприноси смањењу емисије штетних супстанци у урбаним срединама. Биодизел не садржи сумпор, а при његовом сагоревању смањена је емисија чађи, бензена, толуена, као и штетних азотних једињења. Са еколошког аспекта биодизел гориво не загађује животну средину, јер се при сагоревању овог горива производи онолико угљен (IV)-оксида колико биљке, из којих је добијен, везују из атмосфере.

Стално повећање потрошње нафте у свету захтева проналажење нових извора енергије. Недостатак нафте на тржишту ће неминовно утицати на повећање њене цене и због тога је неопходно тражити замену за фосилна горива у новим одрживим изворима. Могућа решења за смањење зависности о нафти је увођење алтернативних горива. Постоји више врста горива која се тренутно истражују, као што су Биодизел има велику предност у односу на друге врсте горива зато што се може користити у већ постојећим возилима без икакве или са малим модификацијама постојећих мотора, што зависи од концентрације биогорива. Европске земље су препознале потребу за алтернативним горивима и издале су Директиву о промоцији коришћења биогорива и других обновљивих горива за транспорт. Директива је предвиђала да земље чланице ЕУ замене 5,75% фосилних горива алтернативним горивима до 31. децембра 2010. године. Ова Директива је допуњена директивом 2009/28/ ЕС која такође промовише коришћење енергије из обновљивих извора и има за циљ да до 2020. године, 20% утрошене енергије буде из обновљивих извора.

Најзаступљенији поступак за добијање биодизела у индустрији је хемијска

трансестерификација биљних уља метанолом у присуству алкалног (NaOH, KOH) или киселог катализатора (концентрована сумпорна киселина). Хемијски поступак за синтезу биодизела користи се у индустријским размерама већ деценијама, али су уочени извесни недостаци у оваквом начину производње: велики енергетски утрошци, стварање нуспродуката у споредним реакцијама, потреба за неутрализацијом катализатора и издвајање насталог глицерола из реакционе смеше. Током реакције метанолизе стварају се сапуни који се морају испирати водом и чије присуство знатно отежава сепарацију производа. Недостаци конвенционалног приступа катализе у хомогеним системима могу се превазићи на неколико начина као што су примена хетерогених катализатора (хидроксиди и оксиди земноалкалних метала), одвијање реакције трансестерификације под условима надкритичног флуида и коришћењем ензима као биокатализатора.

Предмет савремених истраживања је примена ензима, и то липаза, за трансестерификацију уља или масти метанолом у циљу добијања биодизела. Ензимски поступци имају неколико предности у односу на хемијске: благи реакциони услови, мањи трошкови за енергију, могућност примене нерафинисаних уља и масти јер се не стварају сапуни, олакшани поступци пречишћавања производа и, у већини случајева, добијање производа бољег квалитета. Наиме, слободне масне киселине могу се у потпуности превести у метил-естре, без формирања сапуна, и на тај начин повећати принос биодизела. Ова карактеристика ензима омогућава коришћење материјала са високим садржајем слободних масних киселина или високим садржајем воде, као што су нејестива уља, отпадна уља за кување и индустријска отпадна уља. Такође, коришћењем биокатализатора нема потребе за испирањем производа у завршној фази синтезе биодизела и његовог пречишћавања, па се смањује количина отпадне воде која представља озбиљан еколошки проблем.

Међутим, иако је постало јасно да се ради о веома перспективној технологији која ће у потпуности потиснути хемијску, још увек нису постигнути одговарајући капацитети производње због малих просторно-временских приноса реактора и мале стабилности ензима у присуству нижих алкохола. У циљу превазилажења

ових проблема настављају се истраживања у правцу стабилизације ензима имобилизацијом на различите носаче, али и оптимизацијом процесних параметара и начина одвијања процеса, нарочито режима додавања нижих алкохола и конфигурације биореактора. У овој докторској дисертацији анализираће се неколико аспекта побољшања ефикасности ензимски катализоване трансестерификације: оптимизација процесних параметара и начина извођења процеса, развој реакционог система без органског растварача, могућност примене других ацил-акцептора уместо метанола, могућност стабилизације ензима имобилизацијом на различите носаче и избор реакторског система.

# 1. ТЕОРИЈСКИ ДЕО

## 1.1. Развој алтернативних горива

Више је него јасно да ће светске потребе за нафтом у догледној будућности остати незадовољене имајућу у виду да потребе за енергијом у свету рапидно расту. Незахвално је прогнозировать када ће се светске резерве нафте исцрпети али су нека предвиђања да ће до тог дана доћи тек за неколико векова, а по најлошијим прогнозама већ за само 30-50 година.<sup>[1]</sup> То свакако зависи како од претпостављених резерви нафте тако и од пројектоване потрошње у будућности. Мањак енергије свакако може да буде компензован развојем нуклеарне енергије, соларне енергије, енергије ветра и хидроенергије, али поставља се питање шта ће заменити дизел гориво и бензин у моторима са унутрашњим сагоревањем.

Други аспект проблема везаног за коришћење нафте јесте зависност од земаља произвођача. Обновљиви извори енергије, пре свега алтернативна горива, представљају стратешки извор енергије посебно за земље које немају нафтне бушотине и нису директни произвођачи фосилног горива. На тај начин се смањује зависност од интернационалног нафтног картела који под својом контролом држе чланице ОПЕК-а (ОПЕС – Organization of the Petroleum Exporting Countries), и самим тим гради се независност од тржишних и економских осцилација. Производња алтернативних горива има позитиван утицај на привреду и на макро и на микро нивоу: запошљава се локално становништво, доприноси се економском развоју руралних средина, подстиче се локална пољопривреда, користе се јефтине отпадне сировине. Да би биогориво у погледу цене било конкурентно дизел гориву неопходе су афирмативне акције државе, пре свега у погледу политике субвенција и пореских олакшица.

Глобални проблем коришћења фосилних горива је количина издувних гасова која настаје сагоревањем горива у моторима. Скоро 98% емисије угљеника настаје сагоревањем фосилног горива.<sup>[2]</sup> Велики проблем представља угљен (IV)-оксид који учествује са скоро 50% у формирању ефекта стаклене баште. Континуално загађивање животне средине настаје од велике количине издувних гасова, пре свега несагорелих угљоводоника, угљен (II)-оксида, оксида азота, сумпора и олова. По дефиницији, биогориво представља гориво за саобраћај у течном или

гасовитом облику које је произведено од биомасе.<sup>[3]</sup> Као обновљив извор енергије, биомаса потенцијално представља сировину чији је извор неисцрпан. Најатрактивнија биогорива су биоетанол, биометанол, биодизел, биогаз и биоводоник.

*Биоетанол* је алтернативно гориво на бази алкохола, етанола, добијен прерадом скробних и шећерних сировина. Главне сировине за производњу биоетанола су шећерна трска (Бразил), кукуруз (Америка) и шећерна репа (Европа). Поред ових сировина, биоетанол може да се добије прерадом лигноцелулозних материјала, који су јефтинији од сировина које садрже шећер, али је сам поступак производње компликованији и скупљи у односу на скробну и шећерну биомасу и представља недостатак ових сировина.<sup>[4]</sup> Биоетанол се може користити као додатак бензину или као чисто гориво, када је неопходно извршити модификације на мотору. Замена класичног горива са биоетанолом од 100% може да смањи емисију CO<sub>2</sub> за чак 50 до 60%. Такође, додатак биоетанола гориву повећава и октански број такве смеше, што омогућава мирнији рад мотора.

*Биогаз* настаје као последица разлагања биолошког отпада тј. отпада биолошког порекла, и представља смешу метана (50-65%) и угљен (IV)-оксид (30-45%).<sup>[5]</sup> Биогаз настаје процесом анаеробне разградње отпада анаеробним бактеријама. Процес којим анаеробне бактерије разлажу органску материју на метан, угљен (IV)-оксид и муљ богат хранљивим метаријама обухвата низ реакција које захтевају синергистичко деловање више микроорганизама. Може се користити као извор струје или као гориво у моторима са унутрашњим сагоревањем.

*Биометанол* припада другој генерацији биогорива јер се добија прерадом пољопривредног и шумског отпада. Предност горива друге генерације је превасходно у томе што не користе потенцијалне изворе хране као полазну сировину. 10-20% Биометанола помешаног са бензином може се користити у моторима без потребе за његовом изменом. Мана биометанола као и биоетанола је низак притисак испаравања, мала густина и некомпатибилност биоалкохола са материјалима у мотору.

*Водоник* се може добити термохемијским и електрохемијским поступцима али је биолошка производња водоника еколошки прихватљивија и захтева мањи утрошак енергије (биоводоник). Постоје три врсте микроорганизама који се

користе за биолошку синтезу водоника: цијанобактерије, анаеробне бактерије и ферментативне бактерије. Цијанобактерије у присуству светлости, путем фотосинтезе, директно разлажу воду на водоник и кисеоник. Анаеробне бактерије користе органску материју као једини извор електрона и енергије, и претварају их у водоник. Постоји заправо технологија за биолошку синтезу биоводоника као што су директна и индиректна биофотолиза, фото ферментација и друге.

Од свих биогорива, највећу пажњу привлачи биодизел пре свега због сличности са класични дизелом у погледу хемијске структуре и садржаја енергије. Биодизел има велику предност зато што се може користити у већ постојећим возилима без икакве промене на моторима. До сада се користио као додатак дизелу као транспортном гориву у низу земаља као што су Немачка, Италија, Малезија.

### 1.1.1. Употреба уља и деривата уља као биогорива

Првобитни експеримент са коришћењем алтернативних горива је вршио сам Рудолф Дизел (Rudolf Diesel) почетком 20. века где је као замену за фосилно гориво користио уље од кикирикија.<sup>[6]</sup> Утврђено је да се уља могу користити као погонско гориво без потребе за изменом мотора. Биљна уља су широко распрострањена, доступна и обновљива. За разлику од угљоводоничних тј. фосилних горива, садржај сумпора у биљним уљима је скоро нула па је на тај начин смањено могуће загађење животне средине сумпорном киселином и сумпорним оксидима који директно утичу на стварање киселих киша. Уља не загађују животну средину, јер се при сагоревању овог горива производи онолико угљен-диоксида колико биљке из којих је добијен, везују из атмосфере. Међутим, директна употреба биљних уља се генерално показала као незадовољавајућа и непрактична за употребу у дизел моторима са индиректним или директним убризгавањем горива.<sup>[6, 7]</sup> Вискозитет биљних уља, који је знатно већи од дизел горива, садржај слободних масних киселина, као и полимеризација и оксидација уља током складиштења и сагоревања су само неки од најочигледнијих проблема који веома лако доводе до зачепљења мотора. Да би била компатибилна са постојећим моторима уља и масти се морају превести у своје деривате. Тренутно су актуелна четири могућа правца: мешање уља са дизел горивом (разблаживање),



пиролиза, стварање микроемулзија и трансестерификација.

#### 1.1.1.1. Мешање уља са дизел горивом

Течна природа биљних уља и лака преносивост, висок садржај топлоте (80% у односу на фосилно гориво), доступност и обновљивост су главне предности уља као горива. Али, као што је већ наведено, биљна уља имају мане које их не чине добрим супституентом за фосилна горива. Вискозност уља је и преко три пута већа од вискозности дизела, температура паљења уља је веома висока, изнад 200°C (у односу на дизел горива од 52 до 96°C). Велика вискозност уља омета процес убризгавања, и доприноси лошој атомизацији горива. Неефикасно мешање уља са ваздухом доводи до непотпуног сагоревања. Комбинација велике вискозности и мале испарљивости уља проузрокује лош старт мотора при хладном времену и кашњење паљења.

Разблаживање биљних уља се постиже мешањем уља са дизел горивом или етанолом. На тај начин се покушава да се превазиђу проблеми који се јављају при коришћењу „неразблаженог” уља. Првобитни експерименти су вршени са 95% коришћеног јестивог уља и 5 % дизела.<sup>[8]</sup> Проблем је била контаминација уља за подмазивање као последица пораста вискозитета смеше због полимеризације незасићених масних киселина. Зијевски (Ziejewski) и сарадници су разблаживали сунцокретово уље са дизелом у односу 1:3, смањујући на тај начин вискозитет на 4,88 cSt на 40°C (према ASTM максимално дозвољена вредност је 4,0 cSt на 40°C).<sup>[9]</sup> Закључили су да није препоручљиво користити смешу за дуготрајну употребу у моторима са директним убризгавањем горива јер се стварају насlage угљеника које блокирају и зачепљују инјектор, и отежавају процес сагоревања. Шлаутман (Schlautman) и сарадници су тестом издржљивости анализирали мешавину од 75% нерафинисаног сојиног уља и 25% дизел горива у моторима са директним убризгавањем горива. Тест се завршио након 90 часова услед пораста вискозитета уља за подмазивање од чак 670%.<sup>[10]</sup>

### 1.1.1.2. Микроемулзије

Микроемулзије су по дефиницији стабилни колоидни системи оптички изотропних флуида, који се састоје од водене фазе, уљане фазе и површински активних материја (*mj.* сурфактаната).<sup>[11]</sup> Пречник капи дисперговане фазе микроемулзија износи од 10 - 100 nm. Микроемулзије које се користе као горива могу бити системи уља, естара и сурфактаната или уља, алкохола и сурфактаната, са или без присуства дизел горива. Микроемулзије могу да побољшају распршивање горива експлозивним испаравањем компонентата у мицелама које имају ниске температуре кључања. Због садржаја алкохола, микроемулзије имају мању топлотну моћ али имају већи топлоту испаравања и тенденцију да хладе комору за сагоревање што смањује могућност зачепљивања инјектора.<sup>[6, 12, 13]</sup> Зијевски и сарадници су тестирали микроемулзију сачињену од 53% сунцокретовог уља, 13,3% етанола и 33,4% 1-бутанола. Вискозитет овакве нејонске емулзије је износио 63,1 cSt на 40°C, цетански број 25 и садржај пепела мањи од 0,01%. Са повећањем концентрације 1-бутанола смањила се вискозност и остварено је боље распршивање горива. Овакав систем је прошао 200 часова ЕМА теста издржљивости (ЕМА-Engine Manufacturers Association/званична анализа рада мотора) али је опет примећено стварање наслага угљеника, непотпуно сагоревање горива и повећање вискозитета уља за подмазивање.<sup>[9]</sup> Са истим проблемима су се суочили и Геринг и Фрај (Goering и Fry) који су као гориво користили 50% дизел горива, 25% рафинисаног уља од соје, 5% етанола и 20% 1-бутанола.<sup>[14]</sup>

### 1.1.1.3. Пиролиза

Пиролиза или крековање је термичка разградња једињења без присуства кисеоника или у присуству знатно мање количине кисеоника која би омогућила комплетно сагоревање.<sup>[15]</sup> Хемизам пиролизе је тешко категорисати и релативно тешко испитати због бројних реакција које се истовремено одвијају. Топлотном деградацијом триглицерида настаје смеша алкана, алкена, алкандиена, ароматичних једињења и карбоксилних киселина, при чему састав у многоме

зависи од врсте биљног уља.<sup>[7]</sup> Течне фракције пиролизе у многама су сличне дизел гориву. Пиролизовано сојино уље садржи 79% угљеника и 11,88% водоника и у односу на уље има мањи вискозитет и већи цетански број.<sup>[16]</sup> Пиролизована биљна уља генерално садрже дозвољене количине сумпора, воде и талога али и недозвољено велике количине пепела, стварају наслагe карбонских остатака и имају лоше флуидне карактеристике на ниским температурама.<sup>[7]</sup>

## 1.2. Биодизел

Биодизел је течно биогориво, произведено из пољопривредних култура, као обновљивих ресурса, које у потпуности могу да замене фосилно гориво у моторима са унутрашњим сагоревањем. Биодизел се добија из биљних уља (соје, уљане репице, сунцокрета, палме), као и отпадних уља и масти, процесом трансестерификације, уз присуство катализатора. Може се користити независно или у мешавини са дизел горивом добијеним рафинацијом сирове нафте и то у било ком односу. У зависности од удела биогорива у мешавини, биодизел има ознаку В100 (чист, 100% биодизел), В20 (20% биодизел и 80% фосилни дизел), В5 (5% биодизел и 95% фосилни дизел). Биодизел не садржи сумпор, а при његовом сагоревању смањена је емисија чађи, бензола, толуола, као и штетних азотних једињења, нетоксичан је и биодеградабилан.<sup>[17, 18]</sup>

### 1.2.1. Предности биодизела

#### 1. Доступност и обновљивост биодизела

Биодизел је практично једино алтернативно гориво које се може користити, самостално или као смеша са конвенционалним дизелом, без потребе за мењањем мотора. Најчешће коришћена смеша садржи 20% биодизела и 80% конвенционалног дизела (ознака В20). Са техничког аспекта, транспорт, складиштење и руковање биодизелом је знатно мање ризично него са класичним горивом. Биодизел је безбедан за употребу и транспорт јер има знатно већу тачку паљења него дизел гориво: тачка паљења биодизела износи око 150°C док је тачка паљења дизел горива 52°C. Обзиром да биодизел под нормалним околностима није експлозиван може се складиштити где и класично гориво.<sup>[19, 20]</sup> Усвојена је фраза да је „биодизел токсичан колико и кухињска со и биоразградив као шећер”. Биодизел се може произвести из домаћих, локалних, уљарица: соје, уљане репице, сунцокрета, палминог уља и сл.<sup>[21, 22]</sup> Такође, као сировина за синтезу биодизела може се користити и отпадно уље из домаћинстава или индустрија, дакле, отпадне сировине којих има у изобиљу.<sup>[23, 24, 25]</sup>

## 2. Смањено загађење животне средине

Тренутно, главни климатски проблем у свету је глобално загревање проузроковано емисијом  $\text{CO}_2$ . Са еколошког аспекта, биодизел гориво не загађује животну средину, јер се при сагоревању овог горива производи онолико угљен (IV)-оксид колико биљке, из којих је добијен, везују из атмосфере у току фотосинтезе. Обзиром да се биодизел производи из обновљивих сировина, његова синтеза представља пожељан начин да се обезбеди гориво, а да се сачува животна средина од емисије нежељених гасова. Биодизел гориво садржи значајну количину кисеоника (11%), смањену количину угљеника (77%), док је садржај водоника приближно исти као и код дизел горива.<sup>[26]</sup> Биодизел гориво углавном садржи веома мале количине фосфора и сумпора па су стога емисије сумпор-оксида скоро занемарљиве. Емисија гасова сагоревањем биодизела нижа је у односу на емисију гасова сагоревањем дизел горива: емисија  $\text{CO}_2$  и  $\text{SO}_2$  је смањена за 100%, чађи за 40-60%,  $\text{CO}$  за 10-15%, угљеводоника за 10-50% и полицикличних ароматичних угљеводоника од 13-90%.<sup>[27]</sup>

## 3. Енергетска ефикасност биодизела

Биодизел гориво садржи око 12% мање енергије него дизел гориво. Док биодизел садржи око 37 MJ/kg горива, дизел садржи око 42 MJ/kg. Како је и специфична тежина метил естара већа у односу на дизел гориво за око 6% неминовно је и повећање потрошње горива. Доказано је да су метил естри по хемијској стурктури хомогенија смеша него угљеводоници присутни у дизел гориву. То је и разлог што метил естри релативно брже сагоревају у односу на дизел гориво.<sup>[27]</sup> Биодизел садржи око 10% кисеоника због чега је његово сагоревање у моторима потпуно, па је стога смањење енергије биодизела делимично компензовано са повећањем ефикасности сагоревања биодизела.<sup>[7]</sup> Због негативног утицаја издувних гасова на животну средину, тежи се смањењу сумпора у дизел Д2 гориву. Такво гориво губи способност подмазивања мотора које по својој функцији треба да обавља гориво. Међутим, биодизел може да допринесе побољшању својства подмазивања пошто има много боља лубрикативна својста у односу на дизел (посебно дизел са ниским садржајем сумпора). Ово је свакако веома важно да би се смањило хабање у мотору и у систему за убризгавање.

#### 4. Биоразградивост биодизела

Велика предност биодизела, са еколошког аспекта, јесте његова биоразградивост. Различите студије су показале да је биодизел разградив и до 4 пута брже него дизел гориво.<sup>[28, 29, 30, 31]</sup> Паскалино (Pasqualino) и сарадници су анализирали разградњу дизел и биодизел горива: док биодизел оствари 77-98% разградње за 21 дан, у истом периоду дизел гориво се разгради од 11-28%.<sup>[32]</sup> Садржај кисеоника у биогориву побољшава процес деградације, док већи удео ароматичних једињења велике молекулске масе код дизел горива тај процес успоравају. Интересантно је и да мешање биодизела са дизел горивом убрзава биолошку разградњу дизел горива, односно биолошку разградњу такве смеше. Наиме, смеша од 20% биодизела и 80% дизел горива се разграђује два пута брже него само дизел гориво D2.<sup>[33]</sup>

### 1.2.2. Карактеристике биодизел горива

Успешно увођење и комерцијализација биодизела у многим земљама широм света праћена је развојем стандарда који обезбеђују висок квалитет горива и пружају сигурност потенцијалном кориснику. Сви параметри горива су дефинисани Америчким ASTM D 6751 (American Society for Testing and Materials)<sup>[34]</sup> и Европским EN 14214 (European Standard for Biodiesel)<sup>[35]</sup> стандардом, при чему је већина параметара у оба стандарда веома слична. Највећа разлика између ова два стандарда се огледа у методама испитивања и намени горива. Наиме, европски стандард EN 14214 (Табела 1.1.) одређује спецификације и методе испитивања за биодизел који се користи као аутомобилско гориво за дизел моторе, док амерички стандард ASTM D 6751 дефинише параметре за биодизел (100%) који се користи као мешавина са дизел горивом. Да би дао гаранцију кориснику, произведени биодизел мора да испуни и ASTM D 6751 и EN 14214 тако да се може директно користити у постојећим моторима, или као мешавина са дизелом у циљу смањења емисије штетних гасова. Неки од најважнијих параметара су садржај метил естара, густина, кинематски вискозитет, киселински број, цетански број и тачка паљења.

Табела 1.1. Европски стандард квалитета биодизел горива EN 14214

Параметри	Метода	Дозвољени		Јединице
		минимум	максимум	
Садржај естара	DIN EN 14103	96.5	-	% (m/m)
Густина на 5°C	DIN EN ISO 12185	860	900	kg/m <sup>3</sup>
Вискозитет (40°C)	DIN EN ISO 3104	3,5	5,0	mm <sup>2</sup> /s
Тачка паљења	DIN EN ISO 3679	120	-	°C
Филтрабилност (CFPP)	DIN EN 116	-	-	°C
Садржај сумпора	DIN EN ISO 20884	-	10	mg/kg
Садржај органске материје	DIN EN ISO 10370	-	0,3	% (m/m)
Садржај пепела	ISO 3987	-	0,02	% (m/m)
Садржај воде	DIN EN ISO 12937	-	500	mg/kg
Корозија бакарне траке	DIN EN ISO 2160	1	1	
Оксидативна стабилност (на 100°C)	DIN EN 14112	6	-	h
Киселински број	DIN EN 14104	-	0,5	mgKOH/g
Јодни број	DIN EN 14111	-	120	g I/100g
Садржај метанола		-	0,2	% (m/m)
Садржај слободног глицерола		-	0,02	% (m/m)
Садржај моноглицерида		-	0,8	% (m/m)
Садржај диглицерида	DIN EN 14105	-	0,2	% (m/m)
Садржај триглицерида		-	0,2	% (m/m)
Садржај фосфора	DIN EN 14107	-	10	-
Садржај укупног глицерола		-	0,25	% (m/m)
Метали групе I (Na + K)		-	5	-
Метали групе II (Ca + Mg)	DIN EN 14538	-	5	-

Садржај метил естара је одређен Европском директивом UNE-EN 14103, по којој је неопходан минимум од 96,5% метил естара у биодизел гориву.

Вискозитет је важна карактеристика горива која директно утиче на систем за убризгавање у мотору. Већи вискозитет биодизела у односу на фосилна горива је последица велике моларне масе и хемијске структуре (уља имају моларне масе у опсегу од 600 до 900, што је три и више пута већа вредност у односу на фосилно гориво). Већа вредност вискозитета горива проузрокује већи отпор у раду пумпе,

што има за последицу и веће притиске и смањења запремине инјектора, посебно на ниским температурама. Висок вискозитет заједно са високим киселинским бројем указује на појаву процеса деградације горива.

Густина, тј. специфична маса је још један важан параметар квалитета биодизел горива. Убризгавање горива у мотору ради на принципу мерења запремине, па већа густина биодизела резултира у испоруци веће масе горива.<sup>[36]</sup> Специфична маса биодизела се креће у опсегу  $860\text{-}900\text{ kg/m}^3$  на  $15^\circ\text{C}$ .

Садржај метанола у гориву не сме да пређе  $0,2\%$  (EN 14214). Ово је важан параметар за квалитет горива јер висок садржај метанола представља ризик за складиштење и транспорт горива због ниске тачке паљења метанола. Присутан метанол у смеси значајно смањује тачку паљења што доприноси лошем раду мотора. Такође метанол има негативан утицај на пумпе, вентиле и предмете направљене од гуме.

Киселински број указује на количину киселина и слободних масних киселина у гориву. Он се изражава као количина КОН (изражена у mg) неопходна да се неутралише 1g слободних масних киселина и по европској норми максимална дозвољена вредност му је  $0,5\text{ mg/g}$ . Киселински број расте са старошћу горива и уколико је већи од дозвољене вредности, такво гориво ће у мотору стварати наслаге што ће утицати на смањење века трајања мотора.

Температура паљења је мера запаљивости горива, и на тај начин, важан параметар за процену опасности током транспорта и складиштења горива. Температура паљења биодизела је већа од  $150^\circ\text{C}$ .

Цетански број је јединица мере за одређивање степена запаљивости тј. топлотне моћи произведеног биодизела. Одређује се експериментално у адекватним дизел моторима тако што се упоређује запаљивост анализираног дизел горива са запаљивошћу смеше засићеног угљоводоника цетана (n-хексадекан) и ароматичног једињења  $\alpha$ -метил нафталена. Гориво које је запаљиво као чист цетан означава се цетанским бројем 100, а гориво запаљиво као чист  $\alpha$ -метил нафталин означава се цетанским бројем 0. Што је већи цетански број то је боља способност паљења горива. Уколико је пак превисок, до сагоревања може доћи пре него што се гориво и ваздух правилно измешају, дакле долази до непотпуног сагоревања и појаве дима у гасовима сагоревања. Европски стандард предвиђа

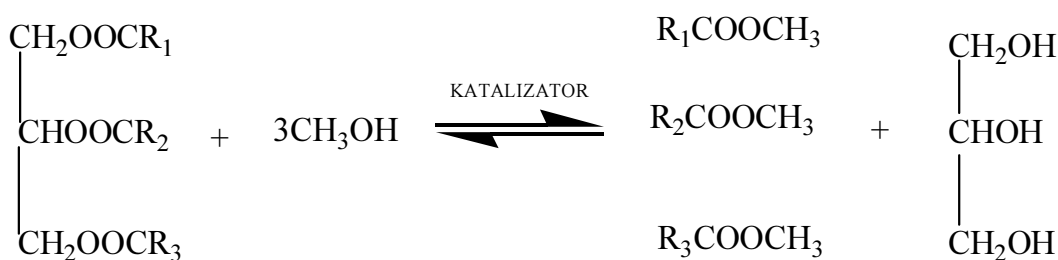


минимални цетански број 51.

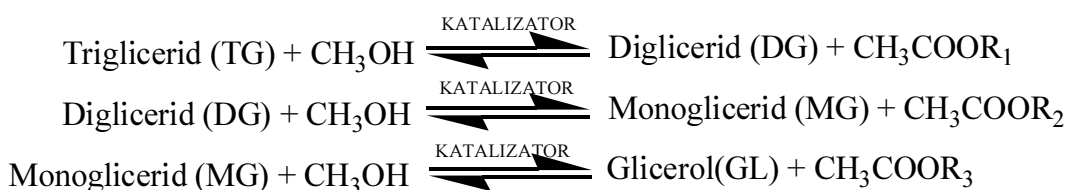
Сви горе наведени параметри указују на квалитет биодизела добијен било хомогеном или хетерогеном катализом, хемијски или ензимски. Може се сматрати да је садржај метил естара најважнија карактеристика јер његова вредност диктира и вредности других параметара. То значи да уколико је испуњен стандард за метил естре, највероватније ће и остали параметри бити задовољени. То може бити и разлог зашто се у литератури теже налазе подаци о потпуној карактеризацији горива, већ се као уобичајени показатељ квалитета горива користи садржај метил естара.

### 1.3. Хемијска синтеза биодизела

Најчешће примењиван поступак синтезе метил естара масних киселина (МЕМК), односно биодизела, је процес трансестерификације. Трансестерификација је катализован процес, а полазне сировине су најчешће биљно уље и метанол (или неки други алкохол) који у присуству базног, киселог или биокатализатора дају биодизел. По стехиометријској једначини, један мол триглицерида реагује са три мола алкохола при чему настају три мола естра масних киселина и један мол глицерола. Трансестерификација је тростепена реакција у којој се као интермедијери формирају моно- и диглицериди (Слика 1.1.).



a)



b)

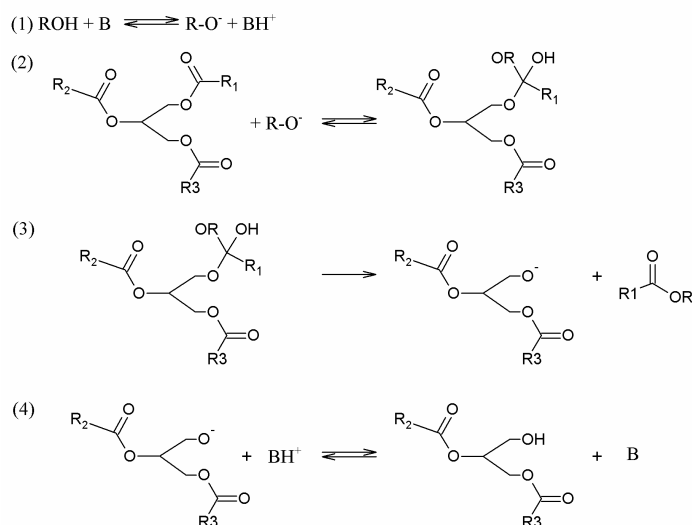
Слика 1.1. Метанолиза триглицерида: а) укупна реакција и б) три узастопне и реверзибилне реакције ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ -алкил групе масних киселина)

У сваком степену реагује по један мол метанола, а настаје један мол естра. Ово је повратна реакција која се обично одвија у присуству вишка алкохола како би се равнотежа реакције померила у правцу стварања естара.<sup>[37, 38]</sup> У реакцији трансестерификације користе се примарни и секундарни монохидроксилни алифатични алкохоли дужине од 1-8 угљеникових атома: метанол, етанол,

пропанол, бутанол и пентанол. Најчешће се користе метанол и етанол, посебно метанол, због ниске цене и погодних физичких и хемијских карактеристика (поларан молекул са кратким ланцем).<sup>[6]</sup> Механизам и брзина реакције, као и принос метил естара зависе од квалитета извора триглицерида, присуства и врсте катализатора и примењених реакционих услова. У зависности да ли се реакција одиграва са или без присуства катализатора, трансестерификација може бити некатализована или катализована.<sup>[38, 39]</sup>

### 1.3.1. Базно катализована трансестерификација

Као базни катализатори најчешће се користе хидроксида (натријум-хидроксид и калијум-хидроксид),<sup>[40, 41, 42]</sup> карбонати,<sup>[43]</sup> као и одговарајући натријум и калијум алкоксида (нпр. натријум-метоксид, натријум-етоксид).<sup>[11, 44]</sup> Механизам базно катализоване трансестерификације је означен као тростепени где се као интермедијари формирају моно- и диглицериди. У првом кораку, у реакцији базе са алкохолом настаје алкоксидни анјон који са карбонилном групом триглицерида формира тетраедарски интермедијер из ког, у другом кораку, настаје алкил естар и одговарајући анјон диглицерида. Молекул базе се регенерише депротонавањем у реакцији са анјоном диглицерида и започиње други каталитички циклус. Ди- и моноглицериди реагују на исти начин дајући алкил естре и глицерол као финални и споредни производ трансестерификације.



Слика 1.2. Механизам базно катализоване реакције трансестерификације

Алкоксиди алкалних метала су најефикаснији базни катализатори јер дају високе приносе естара (98%) у кратком временском периоду (30 минута), чак и када се користе у малим концентрацијама.<sup>[45]</sup> Хидроксиди алкалних метала су јефтинији и приступачнији, али мање активни. Ипак, они су добра алтернатива пошто се самим повећањем концентрације катализатора за само 1 до 2% могу остварити високе конверзије триглицерида. Генерално, у реакцији базно катализоване трансестерификације са 0,5-1% катализатора, на температури од 60-70°C, оставарује се принос естара од 94-99%.<sup>[46]</sup> Базно катализована трансестерификација се одиграва брже неко кисело катализована (око 4000 пута) и такође је мање корозивна на индустријску опрему те је стога комерцијално најчешће коришћена метода.

Иако се остварују високи приноси за кратко време јавља се неколико недостатака у коришћењу базних катализатора. Сам процес захтева велики утрошак енергије, док је уклањање глицерола и алкалног катализатора из реакционе смеше компликовано. Стварају се велике количине отпадне воде која мора бити додатно третирана. Базно катализована трансестерификација се слабо одвија у присуству воде и слободних масних киселина у реакционој смеси, те се најбољи приноси остварују када се користе биљна уља велике чистоће. Наиме, присуство воде утиче и на реакцију сапонификације. Исто тако, слободне масне киселине, присутне у биљном уљу, лако реагују са хидроксидима при чему настају сапуни и додатне количине отпадне воде. Тако се смањује активност катализатора, повећава вискозност реакционе смеше, формирају стабилне емулзије, и све то доприноси отежаној сепарацији насталог производа.<sup>[37, 47]</sup> Најбољи резултати се остварују када се користи уље са мање од 0,5% слободних масних киселина<sup>[6]</sup> и када је концентрација воде мања од 0,1%.<sup>[48]</sup> Уколико се рецимо користе отпадна уља где је концентрација слободних масних киселина већа од 2% препоручљиво је извршити претретман естерификације алкохолом помоћу сумпорне киселине, а затим такав супстрат подвргнути базној трансестерификацији.<sup>[49]</sup>

### 1.3.2. Кисело катализована трансестерификација

Једна од предности киселих катализатора у односу на базне јесте њихова мала осетљивост на присуство слободних масних киселина. Као што је већ речено, примена киселина као катализатора је неопходна када се као сировине користе уља која имају повећан садржај масних киселина, односно када се користе отпадна или нерафинисана уља. Најчешће се користе различите минералне киселине ( $H_2SO_4$ ,  $H_3PO_4$ ,  $HCl$ ), као и неке органске киселине (сулфонска киселина). Реакција је, у поређењу са базно катализованом реакцијом, спора и потребно је око 50-70 сати да би се остварила жељена конверзија триглицерида. Генерално, кисело катализоване реакције се одвијају при високим моларним односима алкохол-уље, ниским до умереним температурама и притиску. За ефикасан процес трансестерификације довољан је 1 мас % катализатора да би се за 50 часова остварила конверзија од скоро 99%.<sup>[50]</sup> Фридман (Freedman) и сарадници су постигли потпуну конверзију за 20 часова на  $65^\circ C$  када су користили 1 мас % катализатора и моларни однос алкохол/уље 30:1.<sup>[44]</sup> Друга група аутора је постигла 100% конверзију кукурузног уља при моларном односу метанол/уље 6:1, на  $80^\circ C$  за 2 сата у присуству диметил етра.<sup>[51]</sup> Мада се постижу високи приноси, због своје велике корозивности, киселине се као катализатори ретко користе у индустријским размерама. Ипак, кисела катализа је препоручен процес када почетне сировине имају висок садржај слободних масних киселина. Оптимално је да се кисели катализатори користе у комбинацији са базним катализаторима (две фазе). Овакав поступак би омогућио коришћење јефтиних сировина као што је отпадно уље. У првом стадијуму се користе кисели катализатори како би слободне масне киселине превели у метил естре, а у другом стадијуму би базни катализатори извршили конверзију преосталих триглицерида. Сам процес пречишћавања финалног производа је сличан као у случају базне трансестерификације: најпре се уклања вишак метанола (дестилационе колоне), затим се неутралише катализатор уз испирање органске фазе да би се на крају пречистио добијени биодизел и глицерол у неколико дестилационих колона.<sup>[50]</sup>

### 1.3.3. Хемијска хетерогена катализа

Тренутно, скоро сви комерцијални погони за синтезу биодизела користе хомогене алкалне катализаторе. Главни недостатак алкалних, као и киселих хомогених катализатора јесте чињеница да се они не могу поново користити. Поред тога, у оваквим реакцијама неизбежно је стварање нус производа (сапуна), док сам катализатор остаје у естарској фракцији. То подразумева додатне фазе прања при чему се генерише велика количина отпадне воде потребне да се одвоји и пречисти производ. Самим тим поскупљују трошкови производње а отпадна вода представља еколошки проблем. Употребом катализатора нерастворних у реакционој смеши могу се елиминисати додатни оперативни трошкови везани за споменуте фазе одвајања и пречишћавања и самим тим се поједностављује процес. Хетерогени катализатор може да се користи у реактору са пакованим слојем што доприноси једноставнијем, сигурнијем и еколошки прихватљивијем процесу производње. Такав катализатор се може вишеструко употребити, и самим тим смањити цену биодизел горива. Такође, треба имати виду да је мања потрошња хетерогених катализатора у реакцији у односу на хомогене: за производњу 8000 тона биодизела неопходно је уторшити 88 тона натријум-хидроксида, док је потребно само 5,6 тона магнезијум-оксида за производњу чак 100.000 тона биодизела.<sup>[52]</sup> Најчешће се као хетерогени катализатори користе: оксиди (CaO, MgO), хидроксиди алкалних метала (Ba(OH)<sub>2</sub>), карбонати алкалних и земноалакалних метала (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CaCO<sub>3</sub>, ZnCO<sub>3</sub>), зеолити, јоноизмењивачке смоле, Mg-Al хидроталцити, импрегниране соли алкалних метала.<sup>[53, 54, 55, 56]</sup> Хетерогени катализатори се као и хомогени деле на базне и киселе. Доказано је да јача базност катализатора и постојање више активних места побољшавају његове карактеристике у реакцији трансестерификације. Сам механизам базне хетерогене катализације је сличан хомогеној базној катализи. Приноси у мноме зависе од реакционих услова: температуре, полазне сировине, моларног односа алкохол: уље као и од карактеристика самог катализатора односно, активног центра, температуре калцинације, носача катализатора и његове концентрације.

### 1.3.4. Некатализована трансестерификација

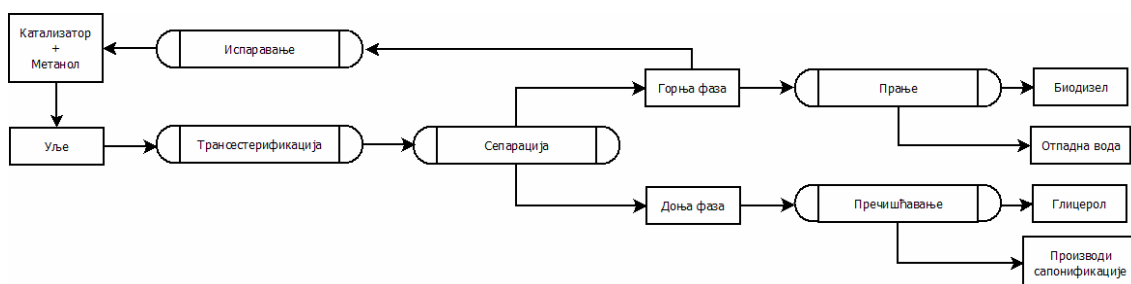
Реакције естерификације и трансестерификације такође могу да се одиграју и без присуства катализатора. Некатализована трансестерификација се одиграва при високим вредностима температуре и притиска, изнад критичних вредности за алкохоле (метанол), па се назива и наткритична катализа. [57, 58] Зна се да нерастворљивост триглицерида у алкохолу кратког ланца смањује стопу трансестерификације. То наине значи, да се трансестерификација не одвија у довољном степену, уколико се, макар у почетном стадијуму, смеша не хомогенизује.<sup>[59]</sup> Особине алкохола, који се користи у процесу трансестерификације, под наткритичним условима, су већа дифузивност, мала вискозност и већа густина што омогућава бољу растворљивост алкохола у уљу и брзо одигравање реакције трансестерификације. При таквим наткритичним условима алкохол (метанол) се понаша не само као реактант него и као кисели катализатор.<sup>[50]</sup> Оптимални притисак и температура за трансестерификацију уља уљане репице износе 350 °C и 43 МРа, и сама реакција се заврши за мање од 10 минута.<sup>[60]</sup> На тим условима се уједно одиграва и реакција естерификације слободних масних киселина, а на саму брзину реакције не утиче вода, што значи да се за овако катализован процес могу користити и непречишћена и отпадна уља са високим садржајем слободних масних киселина и високим садржајем воде.

## 1.4. Ензимска синтеза биодизела

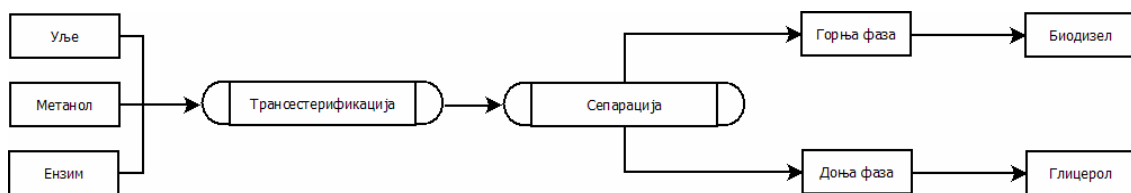
### 1.4.1. Предности ензимски катализоване синтезе биодизела

Најзаступљенији метод за синтезу биодизела тренутно је алкално катализована реакција трансестерификације, превасходно због ниске цене катализатора и високе конверзије постигнуте за кратко време. Међутим, овакав начин производње има неколико недостатака као што су велики утрошци енергије (пошто се реакција најчешће одвија на повишеном притиску и температури), стварање нуспродуката у споредним реакцијама, потреба за неутрализацијом катализатора и издвајање глицерола из реакционе смеше. Као

што је већ речено, током реакције метанолизе стварају се сапуни који се морају испирати водом и чије присуство отежава сепарацију. Ензимски поступак добијања биодизела је једноставнији и економичнији од хомогено-катализованог процеса (Слика 1.3. и Слика 1.4.). Основне предности ензимских у односу на хемијске поступке су благи реакциони услови (температуре од 30°C до 60°C) издвајање глицерола без додатног пречишћавања и без стварања хемијског отпада (Табела 1.2.). Липазе имају ту предност јер могу да естерификују слободне масне киселине присутне у уљима тако да су захтеви за чистоћом полазних сировина знатно мањи. Применом ензима као катализатора у реакцији трансестерификације не настају сапуни као споредни производи чиме се значајно олакшавају поступци пречишћавања и тиме добија биодизел бољег квалитета. Тако, коришћењем биокатализатора нема потребе за испирањем производа у завршној фази синтезе биодизела и његовог пречишћавања, па се смањује количина отпадне воде која представља озбиљан еколошки проблем.



Слика 1.3. Алкални поступак синтезе биодизела



Слика 1.4. Ензимски поступак синтезе биодизела

Поред очигледних предности, ензимски поступци још увек нису конкурентни хемијским поступцима. Основна препрека за увођење ензимских поступака производње је висока цена ензима, мала активности и стабилност у присуству поларних алкохола као што су метанол и етанол. Мада је дискутабилно који су процеси економичнији, напред наведене предности иду у прилог ензимском



поступку производње.

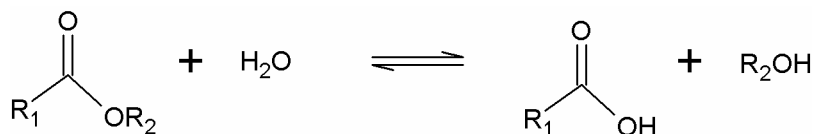
Табела 1.2. Поређење различитих метода трансестерификације

Параметри	Базна катализа	Кисела катализа	Ензимска катализа
Температура, °C	60-70	55-80	30-40
Садржај слободних масних киселина у уљу	Производи сапонификације	Естри	Метил естри
Садржај воде у уљу	Омета реакцију	Омета реакцију	Без утицаја
Принос	Висок	Висок	Висок
Уклањање глицерола	Отежано	Отежано	Једноставно
Пречишћавање метил естара	Вишеструко испирање	Вишеструко испирање	Једноставно Релативно
Цена катализатора	Ниска	Ниска	висока
Време реакције	Кратко	Кратко (9h)	Дуго (36h)

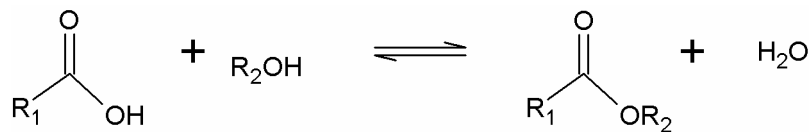
#### 1.4.2. Основна својства липаза

Липазе (триацилглицерол хидролазе, ЕС 3.1.1.3.) су ензими који катализују хидролизу естарске везе у молекулу триглицерида при чему настају слободне масне киселине, ди- и моноглицериди и глицерол.<sup>[61]</sup> Иако је њихова природна функција катализовање хидролизе естарске везе, оне могу и да катализују реакцију између хидроксилне групе алкохола и карбоксилне групе карбоксилних киселина, односно естерификовање. Баш захваљујући чињеници да могу катализовати и хидролизу и естерификацију, врло често се користе у реакцијама трансестерификације (Слика 1.5.).<sup>[62, 63]</sup>

##### 1. Хидролиза

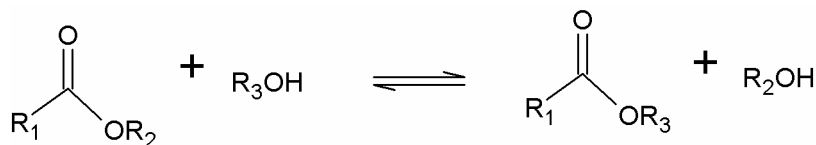


## 2. Естерификација

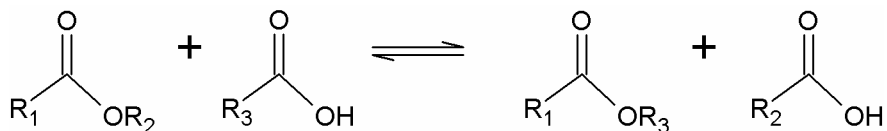


## 3. Трансестерификација

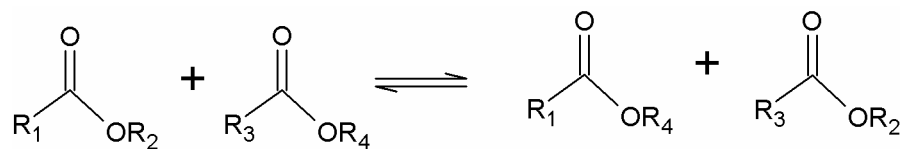
## a. Алкохолиза



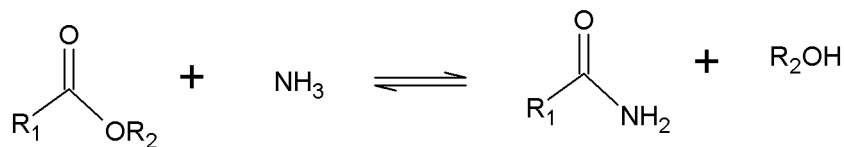
## b. Ацидолиза



## 4. Интересестерификација



## 5. Аминолиза



Слика 1.5. Реакције катализоване липазама

Липазе су веома распрострањене у природи јер имају важну улогу у метаболизму липида. Могу бити биљног, животињског и микробиолошког порекла. У организму људи и животиња налазе се у панкреасу, желуцу и јетри где учествују у хидролизи триглицерида. Липазе се налазе и у биљном свету, обично

у семењу, плодовима и подземним деловима биљака. Тренутно, највећи биолошки потенцијал имају липазе микробиолошког порекла, због низа предности у односу на липазе анималног и биљног порекла. Коришћењем микроорганизама могуће је постићи веће приносе ензима, могућ је брз раст микроорганизама на јефтиним хранљивим подлогама а сам принос не зависи од потенцијалних сезонских варирања. Захваљујући генетском инжењерингу, могућа је манипулација производног микроорганизма тако да се побољша каталитички потенцијал липаза и да се „искроје“ за специфичну примену и одређене реакционе услове.<sup>[64, 65, 66]</sup> Липазе које се добијају из квасца и плесни као што су *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginose* и *Rhizomucor miehei* највише се користе због релативно ниске цене и приступачности.<sup>[17, 67]</sup>

Предност примене липаза као катализатора у великом броју реакција су благи реакциони услови, усмереност реакције, знатно мањи утрошак енергије и добијање производа бољег квалитета са већим приносом уз знатно мање загађивање животне средине. Такође, производи добијени ензимским путем су чистији, са мање примеса, што је веома важно у каснијим фазама пречишћавања посебно у прехранбеној и фармaceutској индустрији. Производи се сматрају природним и еколошким уколико се у њиховој производњи додају адитиви добијени ензимским путем.

У укупној светској производњи ензима липазе су на трећем месту, иза протеаза и ензима који катализују хидролизу угљених хидрата.<sup>[68]</sup> Употреба липаза може да се подели у две категорије: као катализатор у индустријској производњи или као састојак производа. Развијене гране индустрије у којима липазе имају значајну улогу су индустрија масти и уља, прехранбена индустрија (модификовање арома појединих намирница), кожарска индустрија (одмашћивање коже), козметичка индустрија, млечна индустрија (хидролиза млечне масти)<sup>[69, 70]</sup> (Табела 1.3.). Захваљујући стереоселективном дејству липаза, и њиховој могућности да раздвајају рацемске смеше оптичких изомера, све више се употребљавају у фармацеутској индустрији, индустрији пестицида и хербицида.<sup>[71, 72]</sup> Највећи комерцијални значај липазе имају у индустрији детергената где представљају састојак индустријског производа, а не катализатор

у процесу производње. Липазе се додају у детергенте да би уклониле масне мрље тако што их разлажу на хидрофилнија једињења-диглицериде, моноглицериде, масне киселине и глицерол.

Табела 1.3. Примери индустријске примене липаза

Индустрија	Производ	Дејство
Прехрамбена	Еквивалент какаоо бутера	Трансестрификација
	Замена за млеко	
	Моно/диглицериди	
	Сир	
	Ароматични естри	Естерификација
	Пекарски производи	Побољшање ароме
Козметичка	Естри масних киселина, емулзије	Емолијент
Кожна	Одмашћивање	Разлагање липида
Папирна	Папирни производи	Разлагање липида
Детерџенти	Уклањање флека	Разлагање липида
Органске синтезе	Оптички чиста једињења	Енантиселективност

### 1.4.3. Специфичност

Селективност је важно својство липаза на којој се заснива њихова практична примена јер је правилним избором липазе могуће усмерено одвијање реакције и добијање чистог производа у великом приносу. Липазе поседују више врста специфичности и то: специфичност у односу на естар, позициону специфичности, специфичност у односу на масне киселине и стереохемијску специфичност.<sup>[73]</sup>

Специфичност у односу на естар подразумева различиту брзину хидролизе три-, ди-, моноглицерида, естара холестерола, метил- и других естара. У зависности да ли хидролизују само примарну или и секундарну везу у молекулу триглицерида, липазе се деле на позиционо специфичне и позиционо неспецифичне. Позиционо специфичне или *sn*-1,3 специфичне липазе делују само на примарну естарску везу у молекулу триглицерида и у ту групу спадају липазе

из: *Rhizomucor miehei*, *Mucor javanicus*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* и друге. Позиционо неспецифичне липазе хидролизују примарну и секундарну везу у молекулу триацилглицерола приближно истом брзином и у ту групу спадају липазе из: *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum* и друге. Ипак, ова подела је прилично уопштена јер се специфичност липаза може кретати од строге специфичности, преко врло слабе до потпуне неспецифичности.

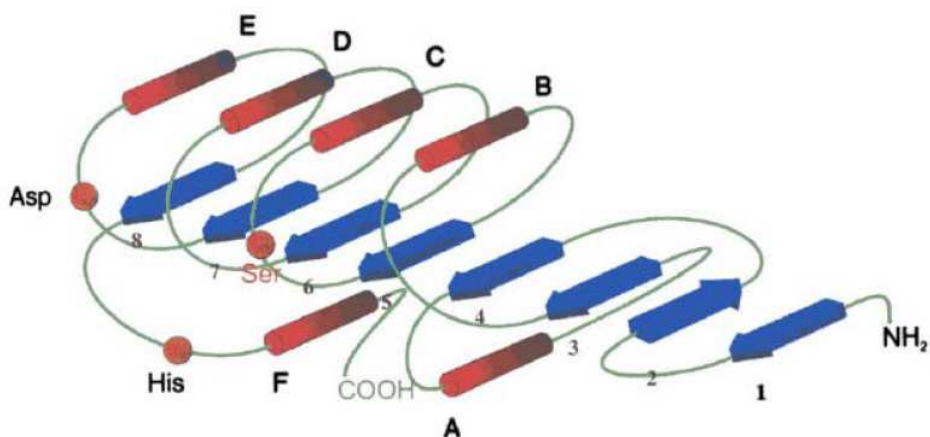
За синтезу естара од великог значаја је специфичност липаза у односу на масне киселине на које делује. Сматра се да дужина ланца масне киселине највише утиче на брзину реакције. Пошто и физичко стање масти јако утиче на брзину хидролизе, треба водити рачуна о томе да су триглицерида који се састоје из нижих засићених или више незасићених масних киселина у течном стању, док су триацилглицероли виших засићених масних киселина на уобичајеним температурама испитивања (30 – 40 °C) у чврстом стању. Да би разумели молекуларне основе специфичности према супстрату, Шмит (Schmid) и сарадници су анализирали и упоређивали специфичност према ацил групи за 6 различитих липаза. Утврђено је да липазе имају активни центар за који се везују хидрофобне масне киселине и да је он исти за све липазе али се разлике јављају у геометрији активног центра. Липазе су тако подељене у три групе: 1) липазе са хидрофобним потпуно отвореним активним центром (липазе из *Rhizomucor* и *Rhizopus* sp.), 2) липаза са активним центром у облику тунела (липаза из *Candida rugosa*) и 3) липазе са активним центром у облику левка (липаза из *C. antarctica*, *Pseudomonas* sp., панкреасна липаза и кутиназа).<sup>[74]</sup> У зависности од порекла (биљне, животињске и микробне) липазе показују различиту специфичност према масним киселинама. Тако панкреасна липаза знатно брже хидролизује масне киселине са мањим бројем угљеникових атома, као и липаза из *R. miehei*, док са друге стране липаза из *Rhizopus arrhizus* показује незнатно већи афинитет према масним киселинама са већим бројем угљеникових атома.<sup>[71, 75]</sup>

Оптичка или стереохемијска специфичност се огледа у томе да ензим делује само на један од два могућа стереохемијска облика супстрата. Ову врсту специфичности показују липазе из *Candida rugosa*, *Pseudomonas aeruginosa* и панкреасна липаза.<sup>[76, 77]</sup> На овом својству се заснива њихова примена за раздвајање рацемских смеша и ради добијања физиолошки активних једињења,

финих хемикалија и фармацеутика.<sup>[67]</sup>

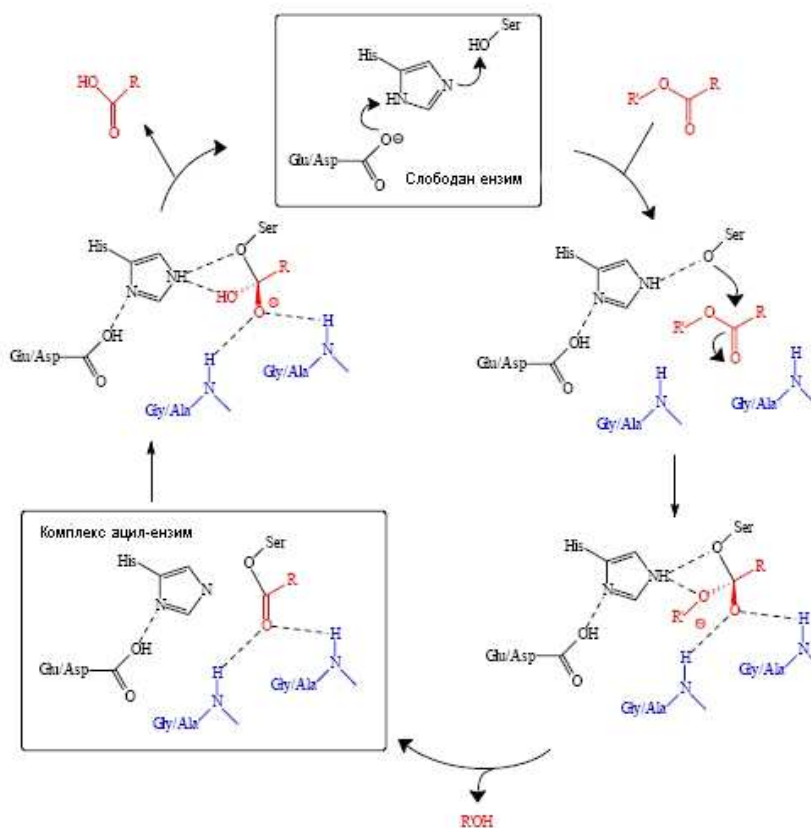
#### 1.4.4. Структура и механизам деловања

Развојем савремених физичко-хемијских метода одређена је структура већине липаза и структура самог активног центра ензима. Примарна структура липаза је одређена секвенционалном анализом самог протеина или одговарајућег гена. Број аминокиселинских остатака у молекулу липазе варира у врло широком опсегу, између 270 и 640.<sup>[78]</sup> Развој метода рендгенске кристалографије је омогућио одређивање секундарне и терцијарне структуре протеина, тако да је током прве половине деведесетих година прошлог века дошло до потпуног расветљавања конформације неколико десетина липаза различитог порекла.<sup>[77]</sup> Показало се да се активни центар ензима налази у унутрашњости молекула и да је заклоњен пептидним ланцем. Из до сада познатих структура произилази да активни центар већине липаза чине остаци три аминокиселине: серина, аспарагина или глутамина, и хистидина.<sup>[73]</sup> За остатке хистидина су водоничним везама везани остаци серина и остаци карбоксилне групе неке од киселина глутамина или аспарагина. Такав просторни распоред омогућава остацима серина да нападну карбонилну групу молекула супстрата. Положај у примарној структури ова три аминокиселинска остатка у липазама различитог порекла драстично се разликује, али захваљујући различитим конформацијама они се налазе на повољном растојању за формирање активног центра.<sup>[79]</sup> Све липазе могу да се сврстају у  $\alpha/\beta$  хидролазе које имају централни хидрофобни део молекула који се састоји од листова  $\beta$ -набране структуре које окружују два слоја амфифилних  $\alpha$ -спирала.<sup>[80]</sup> Број листова  $\beta$ -набране структуре варира у зависности од порекла липазе, али их најчешће има осам (Слика 1.6.).



Слика 1.6. Приказ  $\alpha/\beta$  хидролазе;  $\beta$ -набране структуре су означене плавом бојом,  $\alpha$ -хеликси су представљени црвеним цилиндрима (приказана је и каталитичка тријада Asp-His-Ser)<sup>[81]</sup>

Реакциони систем за деловање липаза је двофазни систем који се састоји из супстрата нерастворног у води и воде. Липазе имају карактеристичан механизам деловања јер су активне на граници фаза уље-вода. Наиме, активни центар липазе се налази у унутрашњости молекула, заклоњен пептидним ланцем (у форми  $\alpha$ -хеликса) који у воденом раствору заклања активни центар. Такав положај онемогућава молекулу супстрата да се веже за ензим, што доводи до тога да су липазе углавном неактивне у воденим растворима. Овај пептидни ланац је различитог састава, дужине и облика код липаза различитог порекла, али је за све карактеристично да има амфифилна својства. У воденој средини, када пептидни ланац покрива активни центар, поларне групе су окренуте ка медијуму, док се неполарни аминокиселински остаци овог ланца везују за неполарне групе у оквиру активног центра. Међутим, када се липаза адсорбује на граничној површини између водене и неполарне фазе, долази до промене просторног распореда молекула због померања хидрофобних делова пептидног ланца ка неполарној фази. Молекул липазе заузима такозвану „отворену конформацију” при којој је активни центар доступан молекулима супстрата и омогућава се стварање комплекса ензим-супстрат



Слика 1.7. Механизам реакције естерификације катализоване липазама<sup>[82]</sup>

Реакције катализоване липазама се одигравају у неколико фаза (Слика 1.7.). Први корак је формирање оксианјона, елиминацијом протона са молекула серина на хистидин, који напада карбонилни угљеник у молекулу супстрата. Тетраедарски интермедијер који се формира носи негативно наелектрисање на кисеонику и стабилизован је водоничним везама са суседним аминокиселинама. Након тога, електрони са атома кисеоника прелазе на карбонилни угљеников атом, а протон са хистидина прелази на кисеоник и формира молекул воде који напушта активни центар као први производ реакције. Формирани естар серина сада реагује са молекулом супстрата који се по уласку у активни центар активира. Базни атом азота из имидазоловог прстена хистидина издваја водоник из молекула супстрата и преводи овај молекул у нуклеофилни облик-анјон. Овај анјон напада карбонилни угљеников атом при чему настаје други тетраедарски интермедијарни оксианјон који је стабилисан успостављањем водоничних веза. Битну улогу овде има и остатак



аспарагинске киселине јер њена негативно наелектрисана карбоксилна група стабилизује прелазно стање привлачењем позитивног наелектрисања са хистидина. Након тога, електронски пар са кисеоника прелази на карбонилни угљеник и издваја се други производ реакције.

#### 1.4.5. Липазе као биокатализатори у синтези биодизела

У синтези биодизела се као биокатализатор до сада примењивао велики број липаза различитог порекла (Табела 1.4.).

Табела 1.4. Преглед липаза, уља и реакционих система у литератури који су се користили у синтези биодизела

Липаза	Уље	Ацил акцептор	Растварач	Време	Принос	Реф.
	Отпадно палмино уље	Метанол	<i>t</i> -бутанол	4h	79.1%	[23]
<i>Candida antarctica</i> В						
<i>Thermomyces</i>			<i>n</i> -хексан/без		70%-	
<i>lanuginosa</i>	Сојино уље	Етанол	растварача	10h	100%	[83]
			Без			
<i>Candida rugosa</i>	Уље од <i>Jatropha</i>	Етанол	растварача	8h	98%	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>						
<i>Mucor javanicus</i>						
<i>Pseudomonas cepacia</i>						[22]
	Уље семена памука	Метанол	<i>t</i> -бутанол	24h	97%	[84]
<i>Candida antarctica</i>			Без		68%-	
<i>Rhizomucor miehei</i>	Сојино уље	Метанол	растварача	12h	95%	
<i>Penicilium cyclopium</i>						[85]
		Метил ацетат	Без растварача			
<i>Candida antarctica</i> В	Сојино уље			14h	92%	[86]
<i>Thermomyces</i>			Без		90%-	
<i>lanuginosa</i>	Сунцокретово уље Сојино уље	Метанол	растварача	24h	97%	

	Отпадно уље					[87]
<i>Candida antarctica</i>	Сунцокретово уље	Метил ацетат	Без растварача	12h	>95%	[88]
<i>Candida antarctica</i>	Уље семена памука	Метанол, пропанол, бутанол, амил алкохол	Без растварача	7h	91,5%	[89]
<i>Candida antarctica</i>	Уље уљане репице	Метанол	Без растварача	24h	91,1%	[90]
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Уље уљане репице	Метанол	<i>t</i> -бутанол	12h	95%	[91]
<i>Candida antarctica</i>	Уље од <i>Jatropha</i> Карања уље Сунцокретово уље	Етил ацетат	Без растварача	12h	>90%	[92]
<i>Rhizomucor miehei</i>	Сунцокретово уље	Метанол	<i>n</i> -хексан	24h	>80%	
<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Сунцокретово уље	Метанол	Без растварача	24h	>90%	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>						[93]
<i>Candida sp. 99-125</i>	Отпадно уље	Метанол	<i>n</i> -хексан	10h	91,08%	[94]
<i>Penicillium expansum</i>	Отпадно уље	Метанол	<i>t</i> -амил алкохол	24h	92,80%	[95]
<i>Bacillus subtilis</i>	Отпадно уље	Метанол	Без растварача	72h	>90%	[96]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Уље од <i>Jatropha</i>	Метанол	<i>t</i> -бутанол	48h	94%	[97]
<i>Criptomococcus SP-2</i>	Пиринчано уље	Метанол	Без растварача	120h	80,20%	[98]
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Сојино уље	Метанол	Без растварача	90h	>80%	[99]

Данас су развијени ефикасни поступци синтезе биодизела коришћењем слободно суспендоване или имобилисане липазе, у систему са или без органског растварача. У досадашњим истраживањима коришћене су интра- и екстраћелијске липазе које производе различити микроорганизми као што су: *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginous*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* и *Pseudomonas cepacia*.<sup>[1, 46, 99, 100]</sup> Најчешће коришћена је липаза из *C. antarctica*. Она катализује реакције трансестерификације различитих уља и ацил акцептора (алкохола или естара) при чему показује велику стабилност у органским растварачима и широку специфичност према супстрату. Липазе из рода *Pseudomonas* такође имају низ предности поготово у системима са вишком метанола. Кајдеј (Kaieda) и сарадници су доказали да липаза из рода *Pseudomonas* показује изразито већу резистентност према метанолу него липазе из *Rhizopus oryzae*, *P. roqueforti*, *C. lipolytica* па чак већу и од липазе из *C. antarctica*, што је чини атрактивном за употребу као биокатализатор у реакцијама метанолизе.<sup>[99]</sup> Висок принос од преко 90% је остварен у реакцији трансестерификације са имобилисаном липазом из *Pseudomonas fluorescens* у систему без органског растварача са моларним односом метанола 4,5 у односу на уље.<sup>[93]</sup> И други ензими су се показали као добри катализатори: *Cryptococcus* spp. S-2 је ефикасно катализовао метанолизу биљног уља у систему без органског растварача у једноступеном систему додавања метанола.<sup>[98]</sup> Због ниске цене и приступачности најчешће се користе липазе произведене из квасаца и гљива, мада се веома успешно, због њихове изразите резистентности према метанолу успешно користе бактеријске липазе из *Pseudomonas* sp. *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*.<sup>[67, 101, 102]</sup> Генерално, главна карактеристика липаза које се користе у синтези биодизела је да не буде стереоспецифична тако да могу да катализују превођење три-, ди- и моноглицерида у одговарајуће естре. Такође, битан је и услов да могу да катализују реакцију естерификације слободних масних киселина. Испитивања су показала да за коришћење у великим реакторским системима предности имају комерцијално досупне липазе (Lipozyme, Novozyme), док нативне као што је претходно наведени *Pseudomonas* захтевају додатни поступак имобилизације.

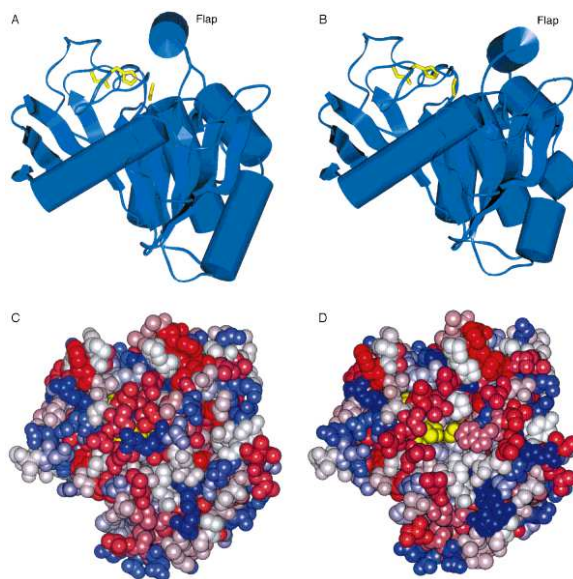
#### 1.4.5.1. Липаза из *Candida rugosa*

Липазе добијене из различитих сојева рода *Candida rugosa* су једне од најчешће коришћених ензима за биокаталитичке реакције. Овај ензим има примену као биокатализатор у многобројним реакцијама хидролизе, алкохолизе, естерификације и трансестерификације. Постоји неколико изоензима који катализују исту реакцију, али се међусобно разликују по активности, рН и температурном оптимуму, док им је примарна структура иста. За липазу из *C. rugosa* је карактеристично да је она заправо гликопротеид, односно поред протеинске, садржи и угљенохидратну фракцију. Као и већина липаза, липаза из *C. rugosa* се сврстава у  $\alpha/\beta$  хидролазе, односно има централни хидрофобни део молекула који се састоји од осам листова  $\beta$ -набране структуре које окружују два слоја амфибилних  $\alpha$ -спирала.<sup>[79]</sup> Поклопац који се састоји од два кратка  $\alpha$ -хеликса заклања активни центар у воденој средини. Поклопац има амфибилни карактер и његова хидрофобна страна окренута је ка унутрашњости молекула при чему долази до интеракција са хидрофобним остацима који окружују активни центар. Горња страна је изразито хидрофилна и формира део молекула који је изложен растварачу. Поклопац чине аминокиселински остаци у региону од 66.-92. аминокиселине, који пролазе кроз значајна премештања када липаза прелази у своју отворену, активну конформацију при чему је, тада, ка молекулима супстрата, отворена слободна каталитичка тријада: серин у положају 209, хистидин у положају 449 и глутаминска киселина у положају 341. Активни центар има облик тунела и дужине је 2,2 nm и ширине 0,4 nm.<sup>[103]</sup> Димензије и облик тунела условљавају и специфичност ове липазе према масним киселинама, са аспекта дужине молекула супстрата.<sup>[104, 105, 106]</sup> У великом броју истраживања установљено је да липаза из *C. rugosa* има већи афинитет према краћим масним киселинама у реакцији естерификације.<sup>[80]</sup>

#### 1.4.5.2. Липаза из *Rhizomucor miehei*

Овај екстраћелијски ензим је први пут описан и изолован 1973. године. Пар година касније је нашао своју примену у области индустријске,

прехранбене биотрансформације.<sup>[107]</sup> Изолована су и детерминисана два облика, који се међусобно разликују само у делимичној деглиоксилацији, наиме изоензим Б представља делимично деглиоксилиран изоензим А. Липаза из *Rhizomucor miehei* је била прва липаза чија је структура била позната, и убрзо је извршена експресија гена за производњу ензима у домаћину *Aspergillus oryzae*.<sup>[108, 109]</sup>



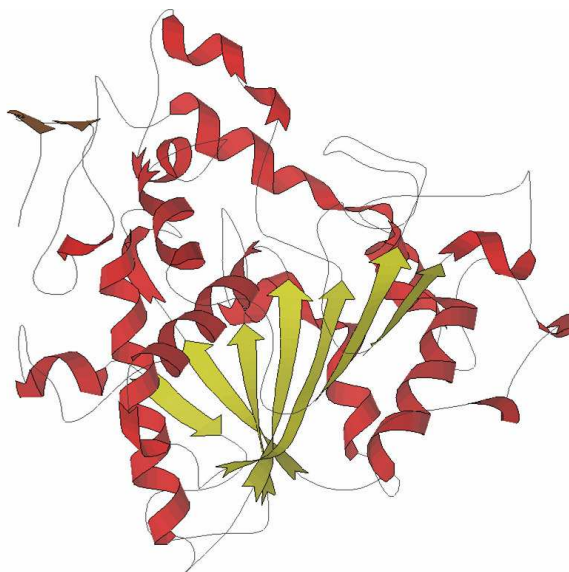
Слика 1.8. Структура липазе из *R. miehei* у затвореној (А и С) и отвореној форми (В и D), каталитичка тријада је обојена жутим бојом (Извор<sup>[74]</sup>)

Моларна маса липазе из *Rhizomucor miehei* износи 31kDa, док је изоелектрична тачка на 3,8. Ензим садржи 269 аминокиселинска остатка, док каталитичку тријаду чине остаци серина (144), хистидина (257) и аспартамске киселине (203) (Слика 1.8.). Активни серин се налази заклоњен пептидним ланцем који се састоји од аминокиселина у региону од 83.-94. аминокиселине, при чему кључну улогу у активацији имају остаци аргинина и аспарагинске киселине у положајима 86 и 91. Када се нађе на граници фаза, остаци аспарагинске киселине се везују са одређеним групама активног центра што доводи до померања поклопца. Молекули стабилизују и три дисулфидне везе (остаци 29-268, 40-43, 235-244).<sup>[107]</sup> Липаза из *Rhizomucor miehei* због конфигурације самог активног центра показује велики афинитет према ацил-донорима дугог ланца. Комерцијално, липаза из *R. miehei* се продаје слободна под називом Palatase

2000L (Novozyme) или имобилисана на јоноизмењивачки носач фенол-формаледехидни полимер Duolite ES 562, под називом Lipozyme RM IM (Novozyme).

#### 1.4.5.3. Липаза из *Candida antarctica*

Липаза из *Candida antarctica* је, као што и само име указује, изолована из стално залеђеног језера Ванда на Антарктику. Убрзо затим су откривени узорци и на другим природним локалитетима у Јапану. Изолована су и детерминисана два облика: липаза А (CAL A) и липаза Б (CAL B). Ове две изоформе липазе се значајно разликују при чему је CAL B веома добро окарактерисан ензим који налази примену као катализатор у великом броју различитих органских реакција. Иако је CAL A веома успешно примењена у неколико специфичних случајева, овај ензим није у потпуности истражен. Липаза CAL A има молекулку масу од 45 kDa, рН оптимум је на 7 а изоелектрична тачка на 7,5. Изоензим А из *C. antarctica* има изразито слабу активност (у поређењу са изоензимом Б) али због своје велике термостабилности (температуре веће од 90°C) и стереоспецифичности и даље привлачи велику пажњу. Он има потенцијал да методама генетског инжењерства побољша своје каталитичка својства док задржава своје повољне термичка својства.<sup>[110]</sup>



Слика 1.9. Модел *C. antarctica* липазе Б,  $\alpha$ -хеликси су означени црвеном бојом,  $\beta$ -влакна жутом (Извор <sup>[81]</sup>)

Изоензим Б из *C. antarctica* садржи 317 аминокиселинска остатка са димензијама 3x4x5 nm.<sup>[111]</sup> Изоензим Б из *C. antarctica* дели заједничку каталитичку тријаду Ser-Asp-His са другим липазама, али за разлику од других липаза не подлеже активацији на граници фаза. Оптималан рН је 7, међутим, ензим је стабилан у области рН 3,5-9,5, и показује необичан рН профил са широким изоелектричним опсегом у области од рН 4 до 8.<sup>[112, 113]</sup> За липазу из *C. antarctica* је карактеристично да пептидни ланац који у одређеној мери заклања активни центар, не подлеже активацији на граници фаза (Слика 1.9.). Применом метода рендгенске кристалографије утврђено је да има два отвора у коме се налази каталитичка тријада при чему је један домаћин ацил групе а други нуклеофила.<sup>[114]</sup> Утврђено је да су канали дубоки и уски што и објашњава селективност и специфичност ензима. Наиме, овај ензим има велики афинитет према масним киселинама кратког и средњег ланца, а афинитет опада са повећањем броја угљеникових атома преко 14.<sup>[115]</sup> Сужење отвора доводи до отежаног везивања већих ацил-донора као и терцијарних алкохола, док се примарни и неки секундарни алкохоли, као што је 2-пропанол, лако везују.

Да би се побољшала ефикасност липаза из *C. antarctica* у индустријским поступцима, извршена је експресија у домаћину *Aspergillus oryzae*. Ова липаза се обично имобилише на акрилну смолу и као такав производ се комерцијално производи под називом Novozyme 435. Разлике у температурним оптимумима за слободну липазу и комерцијално имобилисану су значајне и варирају у опсегу од 40 °C у воденим растворима за слободан ензим до 100°C за имобилисан ензим. У индустријским условима, оптимална радна температура за ензим ће бити она где је успостављена равнотежа између продуктивности и стабилности ензима. У случају реакција где супстрати имају изразито негативно дејство на ензим, као што је метанол у синтези биодизела, радна температура ће вероватно бити нижа, око 30 °C. За процесе који укључују само хидрофобне реактанте, као што је случај у синтези естара воска, радна температура ће вероватно износити чак 70-80 °C (поготово ако се уклања водена фаза).

## 1.5. Имобилизација ензима

Једна од главних препрека за примену ензима у синтези биодизела је висока цена биокатализатора. Када се идентификује ензим оптималан као катализатор за одређену реакцију (у конкретном случају за синтезу биодизела) његова примена је често отежана, пре свега због мале оперативне стабилности ензима под условима процеса, као и отежаног рециклирања ензима и пречишћавања финалног производа. Да би ензими били атрактивни и за индустријску примену, неопходна је њихова имобилизација. Циљ имобилизације је да се побољшају својства ензима, термостабилност и активност у неводеним срединама и да се олакша контрола технолошког процеса. Поновно коришћење имобилисаних ензима у великој мери смањује цену финалног производа, па је избор одговарајућег носача и методе имобилизације важан корак ка приближавању ензимских поступака производње биодизела хемијским.

По дефиницији, имобилизација ензима је локализовање или хемијско везивање ензима у одређеном простору при чему ензим задржава каталитичку активност.<sup>[116]</sup> Предности имобилисаних ензима су бројне, пре свега:

- повећана је оперативна стабилност биокатализатора,
- олакшано је издвајање биокатализатора из реакционе смеше и самим тим је олакшана контрола процеса пошто се једноставним уклањањем биокатализатора реакција завршава,
- спречена је контаминација финалног производа протеинима,
- лакше спречавање микробиолошке контаминације,
- омогућено је континуално вођење реакције,
- могуће су модификације каталитичких карактеристика ензима и
- снижавање цене производног поступка.

Постоји велики број носача који се користе за имобилизацију ензима а њихов избор зависи од неколико фактора: термичке стабилности, хемијске постојаности, механичке чврстоће, врсте ензима, врсте реакционог система,



капацитета носача и цене.<sup>[117]</sup> Генерално, имобилизација ензима је праћена променом активности ензима, променом температурног и рН оптимума и променом стабилности. Продуктивност имобилисаног система се дефинише кроз два параметра: активност и стабилност биокатализатора. Често се губитак ензимске активности након имобилизације компензује повећаном стабилношћу имобилисаног система. Иако до сада постоји на хиљаде протокола за имобилизацију ензима који су документовани у радовима, општа, широко прихватљива метода за имобилизацију ензима још треба да буде откривена. Избор методе имобилисања, као и материјала који ће се користити као носач, зависи од карактеристика које су важне у жељеном поступку.

Методе за имобилизацију су многобројне али се могу грубо поделити на:

1. метода адсорпције на чврстом носачу,
2. инклузија или енкапсулација матрицом носача,
3. ковалентна имобилизација ензима на чврсте носаче и
4. смештање ензима иза или у полупропустљиву мембрану.

У Табели 1.5. су приказане различите методе имобилизације.

Најчешће коришћен метод имобилизације је *адсорпција* која се заснива на слабир привлачним силама између молекула ензима и носача (дипол-дипол, дисперзионе силе, електростатичке интеракције, водоничне везе и хидрофобни ефекат). Поступак је једноставан, не захтева присуство токсичних и скуних хемикалија, реакциони услови су благи и сама метода је јефтина. У већини случајева, активност и специфичност имобилисаног ензима је сачувана. Као носачи за адсорпцију липаза се користе многи природни и синтетски материјали: целит,<sup>[93, 118]</sup> текстилне мембране, зеолит,<sup>[119]</sup> полиетилен, полипропилен,<sup>[120]</sup> силика гел,<sup>[121]</sup> сефароза, сефадекс, целулоза.<sup>[122]</sup> Природа носача у многоме одређује карактеристике ензима као што су активност, селективност, стабилност.<sup>[123]</sup> Јанг (Yang) и сарадници су испитивали утицај величина пора код неполарних и слабо поларних носача на степен имобилизације. Доказано је да се са порастом величине пора носача повећава и активност липаза. Такође је доказано да је активност липаза већа имобилизацијом на неполарне носаче, односно када се користе хидрофобни

носачи.<sup>[124]</sup> Наиме, при ниским јонским јачинама, хидрофобни део пептидног ланца који заклања активни центар ензима се адсорбује на хидрофобне носаче остављајући стабилизовану отворену форму ензима. Тако су Шах и Гупта (Shah и Gupta) доказали да су у реакцији синтезе биодизела бољи резултати остварени са имобилисаном липазом из *Pseudomonas cepacia* на целит, него са слободном липазом и генерално је уочено да имобилисани ензими показују боље каталитичке перформансе у неводним системима.<sup>[22]</sup> Међутим, у истом експерименту, активност имобилисане липазе је опала после само 4 циклуса. Једна од основних недостатака ове методе је што се молекули ензима (пошто су за носач везани слабир привлачним силама) могу лако десорбовати са чврстог носача. То доводи до неминовног губитка каталитичке активности биокатализатора која није изазвана његовом инактивацијом. На тај начин се заправо губе скупи биокатализатори а сам производ може да се контаминира протеинима. Ово је уједно и главни разлог зашто адсорпција ензима на чврстим носачима није нашла широку индустријску примену.

Табела 1.5. Преглед различитих метода имобилизације липаза у литератури које су се користиле у синтези биодизела

Метода имобилизације	Носач	Избор липазе	Уље	Ацил акцептор	Принос	Реф.
Адсорпција	Неоргански носач, Celit	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Уље од <i>Jatorpha</i>	Етанол	98%	[22]
Адсорпција	Памучне мембране	<i>Candida sp.</i> 99-125	Отпадно уље	Метанол	92%	[125]
Адсорпција	Хидроталцит и зеолит	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Отпадно уље	Метанол	92,80%	[25]
Адсорпција	Неполарне смоле	<i>Candida sp.</i> 99-125	Сојино уље	Метанол	97,30%	[124]
Адсорпција	Тоуоните 200-М	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Уље шафранике	Метанол		[126]
Адсорпција	Полипропиленски носачи, Accurel MP 100	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Махуа уље	Етанол	96%	[127]

Умрежавање ензима (CLEAs)	Нема	<i>Pseudomonas</i> <i>cepacia</i>	Махиа уље	Етанол	92%	[127]
Обухватње ензима носачем	Хидрофобни сол-гел носачи	<i>Pseudomonas</i> <i>cepacia</i>	Сојино уље	Метанол, етанол	65%	[102]
Обухватње ензима носачем	Силикатне сол-гел матрице	<i>Pseudomonas</i> <i>cepacia</i>	Отпадна масноћа	Метанол, етанол	87-95%	[128]
Адсорпција	Маркопорозан полипропилен	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> <i>Pseudomonas</i> <i>cepacia</i>	Сојино уље	Метанол	98%	[129]
Обухватње ензима носачем	Силикатне сол-гел матрице	<i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i>	Отпадна масноћа	Етанол	96%	[130]
Инкапсулација	Силика аерогел	<i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i> <i>Candida</i> <i>antarctica</i>	Сунцокретово уље	Метил ацетат		[131]
Ковалентно везивање	Макропорозне смоле	<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i>	Сојино уље	Етанол	75%- 100%	[132]
Ковалентно везивање	Силика ПВА композити	<i>Burkholderia</i> <i>cepacia</i>	Бабасу уље	Етанол	98%	[133]
Ковалентно везивање	Микропорозне полимерне матрице	<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosus</i>	Сунцокретово уље Сојино уље Отпадно уље	Метанол	63,80% 55,50% 50,90%	[134]
Ковалентно везивање	Активиран хитин	<i>Candida</i> <i>rugosa</i>	Бутерна киселина	Бутанол	187	[135]
Ковалентно везивање	Магнетне нано- честице	<i>Thermomyces</i> <i>lanuginosa</i>	Сојино уље	Метанол	94%	[136]
Ковалентно везивање	Силика ПВА композити	<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i>	Палмино уље	Етанол	98%	[137]

*Обухватање ензима носачем* представља смештање ензима унутар полимерне матрице, односно унутар или иза полупропустиљиве мембране. Овако

имобилисани ензими су стабилнији од физички адсорбованих ензима на носаче. Порозна природа матрице треба да буде таква да омогућава задржавање ензима унутар матрице, док молекули супстрата и производа могу несметано да дифундују. Обухватање ензима носачем се изводи једноставним поступцима и то на два начина. При поступак је додавање ензима у раствор мономера који се затим полимеризује стварајући полимерни гел унутар кога остаје „заробљен ензим” и други начин где се ензим додаје у готов раствор полимера. Документовани су бројни поступци имобилизације липаза са применом у реакцији синтезе биодизела. Манијер и Леџер (Maunier и Legger) су развили поступак за имобилизацију липазе из *S. antarctica* на сол-гел дијатомејску земљу.<sup>[138]</sup> Мада је количина везаног ензима, као и активност, била велика остварена је мала конверзија. Принос естара у реакцији између триолеина и метанола је износила тек 60%. Разлог за овако низак степен конверзије је отежана дифузија молекула супстрата до ензима унутар полимерне матрице као и могућност испирања ензима из гела, што је и највећи недостатак ове методе. Међутим, недавни напредак у производњи синтетских материјала је омогућио развој ефикасног биореакторског система за континуирану синтезу биодизела користећи имобилисану липазу. Наиме, Хсу (Hsu) и сарадници су развили оригинални поступак за имобилизацију липазе из *P. serasia* на силикатни сол-гел матрикс (IM PS 30).<sup>[128]</sup> Овако имобилисана липаза је показала изузетну стабилности под условима који би иначе довели до денатурације ензима. Бољи приноси и већа стабилност је остварена у поређењу са комерцијално имобилисаном липазом из *S. antarctica* на макропорозне носаче и са липазом из *P. serasia* физички адсорбоване на силикату. Користећи овакав имобилисани систем остварена је конверзија сојиног уља од 95% након 48 сати.<sup>[128, 130]</sup>

*Инкапсулација ензима* је затварање ензима унутар чврсте полупропустљиве мембране, у својеврстан вид „кавеза”, која омогућава пропуштање супстрата и производа реакције док ензим остаје заробљен. Могу се користити различити природни полимери као што су алгинат, хитозан, карагенан, затим синтетски полимери, полиуретански полимери, акрилни полимери, хидрогелови, гелови на бази микроемулзија.<sup>[139]</sup> Постоји пуно техника за инкапсулацију ензима од којих је тек неколицина нашла примену у синтези биодизела. За синтезу

биодизела коришћене су липазе из *Burkholderia cepacia* и *S. antarctica* инкапсулиране у силика аерогеловима при чему је мембрана ојачана кварцним силицијумским влакнима, а затим осушена под наткритичним условима.<sup>[131]</sup> Под оптималним условима остварена је конверзија од 65%, док је оперативна стабилност липазе била веома висока. Међутим, са повећањем концентрације супстрата долази до отежане дифузије и супстрата и производа. Једно од решења је да се произведе инкапсулиран ензим мањих димензија како би се спречили проблеми везани за пренос масе.<sup>[117]</sup>

### 1.5.1. Ковалентна имобилизација

Ковалентно везивање ензима на чврсте носаче се заснива на стварању најмање једне хемијске (ковалентне) везе између функционалних група ензима и чврстих носача. Ензим се за носач везује преко својих аминокиселина ( $\alpha$ - и  $\epsilon$ -лизин), карбоксилних група, сулфхидрилних група остатака цистеина, имидазолних група, хидроксилних група и фенолног језгра тирозина. Као чврсти носачи користи се велики број неорганских материјала (стакло, керамика, алуминосиликати, оксиди метала, магнезијум силикати), природних полимера (целулоза, хитин, агароза, скроб и други полисахариди) као и синтетичких полимера и кополимера (полимера на бази деривата акрилне киселине, полиамиди, полиуретани, деривати на бази поливинил алкохола и други). Пошто сами носачи немају реактивне групе које би могле ковалентно да се вежу за ензим неопходно је најпре да се носачи активирају. Под активирањем носача се подразумева хемијска реакција између носача и активатора при чему се на површини носача стварају нове групе (обично електрофилне) које имају велику реактивност према функционалним групама у молекулу ензима (обично нуклеофилне). Ковалентна имобилизација се зато најчешће састоји из две фазе: активирање и модификација носача и везивање ензима за активирани носач. Веома је битно да се ензими за носач везују само преко функционалних група које нису од суштинског значаја за њихову каталитичку активност.<sup>[140, 141]</sup> Који ће се метод активације користити зависи пре свега од избора носача, односно од функционалних група присутних на носачу.<sup>[116]</sup>

За носаче који имају *карбоксилну* групу ензим се везује преко аминоксидне групе формирајући пептидну везу уз обавезно присуство карбодиимида као активирајућег агенса карбоксилне групе. Ковалентна имобилизација преко карбоксилне групе се често користи за имобилизацију ензима на носаче који су полимери акрилне киселине. Овакав метод омогућава релативно благе услове за ковалентну имобилизацију ензима.

Полимери који садрже *амино* групу се могу активирати диазотовањем, односно увођењем диазо група. Ензими се у том случају лако везују преко својих  $\alpha$ - или  $\varepsilon$ -амино група а ређе преко сулфхидрилне, хидрокси или карбокси групе. Једна од најчешће коришћених метода за активирање носача са аминоксидном групом је активирање глутаралдехидом. Реакцијом са глутаралдехидом се на носаче уводи карбонилна група која реагује са аминоксидном групом на молекулу ензима при чему настаје Шифова база.

Природни *полисахридни* носачи, односно носачи са *хидроксилним* групама, активирају се у реакцији бромцијана са две суседне хидроксилне групе при чему настају реактивни имидокарбонати. Након тога, ензим се преко аминоксидне групе лизинског остатка везује за активирањем носач при чему настају изокарбамиди и уретани. Овим поступком се углавном активирају природни полисахариди на бази декстрана и агарозе и целулоза, а главни недостатак ове методе је што се веза између ензима и носача остварује у непосредној близини површине носача што може отежати приступ супстрата велике моларне масе ензиму.<sup>[80]</sup>

Носачи са *хидроксилним* групама могу се активирати и са једињењима са активним атомом халогена од којих се најчешће користе хлортриазини. Активација хлортриазинима се заснива на њиховој реакцији са хидроксилном или аминоксидном групом полимера у алкалној средини уз присуство органског растварача. Након ове реакције ензим се лако везује за носач. Поред хлортриазина често се за активацију носача са хидроксилним групама користи трезил-хлорид. Ова метода је погодна јер се користи под благим реакционим условима.

Све већу пажњу добијају носачи за имобилизацију који садрже *епокси* групе. Ове групе могу да реагују са различитим нуклеофилним групама

аминикиселинских остатака (амино, хидроксилним, или сулфхидрилним групама) при веома благим условима: неутралне рН и температуре у распону од 5 °С до 25 °С.<sup>[142, 143]</sup> На тај начин формира се велики број чврстих веза, а постиже се и значајан пораст стабилности као последица стварања више веза. Често је активност ензима, липазе, смањена услед стварања нежељених интеракција између ензима и носача услед њихове мале удаљености. У таквим случајевима носачи за имобилизацију са епоксидним групама су у предности над осталим пошто се могу лако модификовати другим активирајућим агенсима попут глутаралдехида.<sup>[144]</sup>

#### 1.5.1.1. Имобилизација липазе модификоване увођењем аминок групе

При имобилизацији ензима, један од основних циљева је очување његове активности као и повећање његове стабилности. Примењиване су различите методе како би се постигла што успешнија имобилизација. Поред модификације носача, могуће је извршити и модификацију самог ензима. Један од начина на који се може модификовати ензим ради постизања боље имобилизације, јесте његова аминација, односно увођење аминок група на ензим. Ензим се за носач може везати преко аминок група, а повећањем броја ових група, ензим ће се ефикасније везати. Додавањем аминок група неминовно долази до нарушавања нативне конформације ензима, а самим тим и до промене његове активности. С друге стране, аминацијом ензима може се добити ензим који поседује већу стабилност, што за истраживаче на крају и представља услов успешне аминације.

Модификација ензима се заснива на обогаћивању површине ензима реактивним групама, у овом случају аминок групама, које обезбеђују стварање више ковалентних веза са носачем при имобилизацији. При оваквој имобилизацији, потребно је да и носач има довољан број реактивних група, како би аминација ензима имала ефекта. Хемијска аминација се може извести активирањем површинских карбоксилних група (крајњих карбоксилних група Asp и Glu) са 1-етил-3-(диметил аминок-пропил) карбодимидом (ЕДАК) у присуству етилендиамида (ЕДА).<sup>[145]</sup> Ово је позната реакција и она омогућује

формирање амидне везе између активираних карбоксилних група ензима и аминокиселинских група ЕДА, док једна примарна аминокиселинска група остаје слободна. Ове нове примарне аминокиселинске групе дају рК вредност око 9,2, самим тим реактивније су од  $\epsilon$ -амино група остатка лизина на површини ензима. Процент модификованих карбоксилних група се лако може контролисати помоћу концентрације ЕДАК-а, који се користи у реакцији.

Методe за имобилизацију су веома специфичне и треба да буду оптимизоване за сваки специфичан систем. Тако је у синтези биодизела коришћена липаза из *Thermomyces lanuginosus* која је модификована увођењем аминокиселинске групе а затим ковалентно имобилисана на агарозу.<sup>[83]</sup> Имобилисана липаза се показала као веома стабилан и активан биокатализатор у реакцији трансестерификације чак и у присуству вишка метанола. Коришћење овако имобилисаних липаза повећане стабилности, омогућава ензимским поступцима да постану конкурентни хемијским захваљујући смањењу трошкова ензима. Липазе из *Thermomyces lanuginosus* и *Pseudomonas fluorescens* су ковалентно имобилисане на комерцијални носач Toyopearl AF-Amino-650. Као активирајући агенси су коришћени глутаралдехид, глицидол (садржи епоксидну и алкохолну функционалну групу) и епихлор-хидрин (садржи епоксидну групу) при чему су најбољи резултати остварени са глициолом и епихлор-хидрином.<sup>[146]</sup>

### 1.5.2. Претретман липаза

Претретман липаза има за циљ да се побољшају активност и стабилност ензима, и што је посебно важно да се у реакцијама синтезе биодизела, побољша толеранција на метанол. Истраживања су показала да када имобилисан ензим има добар претретман повећава се његова резистентност на метанол а тиме и омогућава вишекратна поновна употреба ензима посебно у индустријским условима. Реагенси за претретман се могу класификовати као: 1) супстрати или њихови аналози, 2) органски растварачи, 3) соли, 4) ензимски лиопротектанти.<sup>[147]</sup> Сви третмани са различитим реагенсима имају исти циљ: одржавање конформације ензима у активном облику тако што се активни



центар мења из затворене у отворену структуру. Најчешће се претретман врши са самим супстратом или његовим аналозима. Они имају улогу повећања активности ензима у органским растварачима путем молекулског утискивања (molecular imprinting). Формирани комплекс ензим-импринтер одржава ензим у активној конформацији и на тај начин се задржава већа активност ензима у неводним срединама у поређењу са ензимом који није прошао такав третман.<sup>[148]</sup> Имобилисана липаза *Candida spp.* 99-125 је третирана раствором метанола концентрације 10-20%, и овакав претретман је повећао ензимску активност и толеранцију према метанолу и у тростепеном, али и у једностепеном поступку додавања метанола. Међутим до промена није дошло када су се као реагенси користили други алкохоли кратког ланца: *n*-пропил алкохол, 1-бутанол, 2-пропанол, 2-метил-2-пропанол и 2-метил-1-пропанол. Активност липазе, толеранција на метанол и оперативна стабилност је драстично побољшана када је липаза третирана 1mM раствором CaCl<sub>2</sub> и MgCl<sub>2</sub>. Претпоставља се да се соли инкорпорирају са протеином при чему се формирају стабилнији молекули који одолевају конформационим променама изазваним великом концентрацијом метанола.<sup>[147]</sup> Битно је нагласити да липазе различитог порекла имају различите карактеристике и да једна метода можда неће бити универзална за све. Комерцијално имобилисана липаза из *C. antarctica* (Novozyme 435) је третирана алкохолима као што су 1-бутанол, 2-пропанол и 2-метил-2-пропанол. Активност овако третиране комерцијалне липазе се повећала десет пута у односу на ензим који није био подвргнут никаквом третману, а принос метил естара је од 7 до 10 пута већи.<sup>[149]</sup> Самукава (Samukawa) и сарадници су постигли принос биодизела од 97% након 3,5 сати са преинкубираном липазом Novozyme 435. Брзина реакције је била већа када је ензим најпре третиран метил-олеатом 30 минута а затим у сојином уљу 12 сати.<sup>[150]</sup> Јасно је да ови поступци могу значајно да повећају продуктивност индустријских ензимских препарата и да ензимске поступке синтезе биодизела учине економски изводљивим.

## 1.6. Фактори који утичу на ензимску трансестерификацију триглицерида

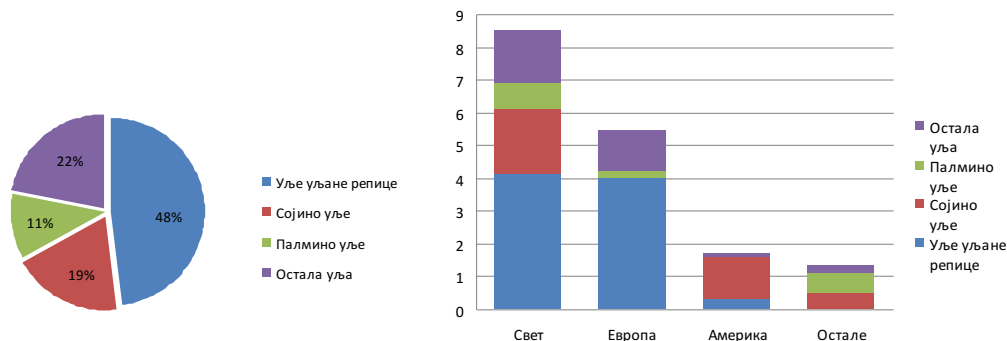
Велики број различитих фактора, чије је дејство најчешће комбиновано, утиче на кинетику ензимски катализоване трансестерификације и на принос биодизела: реакциона температура, избор ацил акцептора, моларни однос ацил акцептор и уље, садржај воде у систему, присуство органског растварача. Оптимали параметри за ензимску трансестерификацију зависе и од порекла и врсте липазе, избора уља и типа реактора.

### 1.6.1. Избор сировине

Постоји више могућих сировина са потенцијалом да се користе за синтезу биодизела. Генерално, све сировине се могу поделити на: 1) биљна уља као што је сунцокретово уље,<sup>[92, 134]</sup> сојино уље,<sup>[85, 132]</sup> уље уљане репице,<sup>[90, 91]</sup> Јатропа уље (*Jatropha*),<sup>[22, 151]</sup> уље од семена памука;<sup>[84]</sup> 2) животињске масти (лој, сало);<sup>[152, 153]</sup> 3) отпадна уља из домаћинства и индустрије.<sup>[154, 155]</sup>

Постоји тенденција да се као сировине за синтезу биодизела користе животињске масти и уља настале као споредни производ у индустрији меса и рибе. До сада су коришћени говеђи лој, сало и рибље уље (туна). Животињске масти су богате засићеним масним киселинама и као такве нису погодне за синтезу биодизела. Естри синтетисани из животињских масти имају високе тачке топљења и када се користе као потенцијално гориво захтевају додавање значајне количине средства против мржњења. Рибље уље има велики проценат полинезасићених масних киселина, због чега има висок јодни број и лако подлеже оксидацији. Узимајући у обзир овај недостатак као и ограничене залихе животињских масти, њихова примена у синтези биодизела има мали значај. Са друге стране, биљна уља су обновљиви и практично неисцрпни извори енергије. Генерално, фактори као што су географски положај, састав тла, клима и економија у великој мери одређују које биљно уље је за одређену државу идеално за производњу биодизела. У Сједињеним Америчким Државама главна сировина је

сојино уље, у Европи је уље уљане репице, док је пак у тропским земљама главна сировина палмино уље.<sup>[7, 156, 157]</sup> На Слици 1.10. приказана је светска производња биодизела од различитих сировина за 2007.<sup>[33]</sup>



Слика 1.10. Светска потрошња биљних уља за синтезу биодизела

Важно је знати да квалитет и својства биодизела у великој мери зависе од састава масних киселина уља коришћеног за синтезу (састав масних киселина различитих уља дат је у Табели 1.6.). Биодизел произведен од уља која имају висок садржај незасићених масних киселина има веће вредности тачке течења и тачке маглења. Такво гориво има добре перформансе и на хладном и на топлом времену. Ипак, такво гориво је слабијег квалитета пошто има мањи цетански број и нижу температуру сагоревања. С друге стране, гориво произведено од уља са масним киселинама дугог ланца (преко 18 угљеникових атома) има велики цетански број и температуру паљења али ниску тачку течења и маглења и већи вискозитет те имају лоше перформансе при хладном времену.<sup>[156, 158]</sup> Један од главних критеријума за квалитет биодизела је и стабилност током складиштења која опет зависи од састава масних киселина. Деривати биљних уља имају тенденцију да деградирају као последица оксидације. Њихов степен незасићености их чини подложним на топлотне и/или оксидативне полимеризације што може довести до формирања нерастворних производа у гориву који узрокују проблеме у моторима, посебно у систему за убризгавање горива.<sup>[38]</sup> Избор уља за синтезу треба заправо да буде компромис између дужине ланца масних киселина и њихове засићености.

Табела 1.6. Састав масних киселина у биљним уљима

Уље	С 16:0	С 16:1	С 18:0	С 18:1	С 18:2	С 18:3	С 20:0	С 20:1	Остале	Однос ЗМК/НМК
Балем	6,5	0,5	1,4	70,7	20			3,5	0,9	7,9/91,2
Борач	12,9	0,2	4,3	19,1	39	18,7	0,3		2	17,5/82,5
Кукуруз	11,7		1,9	25,2	60,5	0,5	0,2			13,8/86,2
Семе памука	28,3		0,9	13,3	57,5					29,2/70,8
Јатроpha уље	16,4	1	6,2	37	39,2		0,2			22,8/77,2
Маслине	11,8	1,5	2,7	74,1	8,5	0,7	0,4	0,3		14,9/85,1
Палме	42,6	0,3	4,4	40,5	10,1	0,2			1,9	47/51,1
Уљана репица	3,5		0,9	64,4	22,3	8,2			0,7	4,4/94,9
Соја	11,4		4,4	20,8	53,8	9,3	0,3			16,1/83,9
Сунцокрет	7,1		4,7	25,5	62,4		0,3			12,1/87,9

\*ЗМК-сума засићених масних киселина, НМК-сума незасићених масних киселина

Као што је већ речено, најчешће коришћена биљна уља за синтезу биодизела су сунцокретово уље, сојино, уље уљане репице и палме.

Према Лиу (Liu) и сарадницима, садржај уља у зрну **соје** варира од 12 до 30% (типичан садржај уља на суву материју је 20%). Масенокиселински састав (у односу на укупан садржај уља) значајно варира: палмитинска киселина 4-23%, стеаринска киселина 3-30%, олеинска киселина 25-86%, линолеинска киселина 25-60%, линолна 1-15%. Нерафинисано уље садржи мање количине фосфолипида, слободних масних киселина и метала у траговима. Уље соје је основна сировина за добијање биодизела у Америци.

**Уље палме** је највише коришћена сировина за добијање биодизела у азијским земљама. Палмино дрво је посебно атрактивна алтернативна сировина због велике продуктивности (610 галона уља по хектару).<sup>[159]</sup> Палмино уље се добија из уља плода и то из мезокарпа и из коштица. Ова два уља имају поприлично различити састав: уље из мезокарпа садржи претежно палмитинску (44,0%) и олеинску киселину (39,2%), док је уље из коштице богато лауринском

(48,3%), миристинском (15,6%) и олеинском киселином (15,1%).

**Уље уљане репице** је веома погодно за добијање биодизела због високог садржаја олеинске киселине. Добија се пресовањем из семена разних врста биљке Brassica. Садржај уља у целом семену износи 38-45%, садржај уља у језгру је 40-46%, садржај протеина у целом семену је 18-20%, а садржај протеина у језгру износи 19-21%. Већину масних киселина у уљу уљане репице чине незасићене масне киселине (62%), вишеструко незасићене масне киселине (30%) и засићене масне киселине (8%). Због великог садржаја масних киселина са дугим ланцем репичино уље има већу молекулску масу од већине уља и самим тим, нижи сапонифакциони број и већи вискозитет.

**Сунцокретово уље** се добија из семена биљке *Helianthus annuus* која садржи 35-51% уља и 19-30% протеина. Иако има велики значај у људској исхрани, сунцокретово уље је друга најзаступљенија сировина у производњи биодизела. Сунцокретово уље је пожељан супстрат за трансестерификацију због повећане оксидативне стабилности формираних алкил естера. Естри сунцокретовог уља заправо стварају мање наслага на инјекторима него дизел гориво. Уље сунцокрета стандардног (линолног) типа карактерише висок садржај незасићених масних киселина: линолне (C18:2) и олеинске (C18:1), као и низак садржај засићених масних киселина: палмитинске (16:0) и стеаринске (C18:0). Од два типа сунцокретовог уља (линолног и олеинског) за производњу биодизела боље је користити олеински тип уља. Наиме, метил-естри добијени из уља са нижим јодним бројем имају већи цетански број, а и такође емисија штетних гасова биодизела је мања код уља са нижим јодним бројем.<sup>[27]</sup> Имајући у виду све оштрије еколошке критеријуме ове карактеристике ће свакако утицати на избор уља.

Да би производња биодизела била економски исплатива неопходно је да се развије производња базирана на коришћењу отпадних и коришћених уља. С обзиром да је цена јестивог уља веома висока тежи се коришћењу отпадног уља као полазне сировине јер на тај начин и цена финалног производа постаје приступачнија.<sup>[23, 24, 25]</sup> Такође, тако се избегава стална конкуренција са прехранбеном индустријом. Осим ниске цене, предност коришћења отпадних уља је што се на тај начин решава и велики еколошки проблем њиховог одлагања. Ова

уља су, међутим, нижег квалитета од рафинисаних биљних уља посебно због садржаја слободних масних киселина, што може бити велики проблем за алкално катализовану трансестрификацију. Отпадно уље садржи и друге супстанце које су настале термичком деградацијом уља које могу да утичу на активност катализатора али се могу уклонити једноставном филтрацијом. Отпадна уља садрже веће количине засићених масних киселина, што лоше утиче на карактеристике горива при хладном времену.<sup>[158]</sup> Чароенчитракол и Тиенметагкон (Charoenchaitrakool и Thienmethangkoon) су испитивали оптималне услове за производњу биодизела из отпадног уља користећи двостепени поступак: кисела трансестрификација праћена алкалном.<sup>[160]</sup> Овакав поступак уз предности има и бројне мане: велика корозивност, немогућност поновне употребе катализатора, стварање велике количине отпадних вода. Стога је, више него игде, пожељна употреба ензима, липаза, као биокатализатора за естерификовање материјала које је богато водом и слободним масним киселинама.

Међутим, количина отпадних уља није довољна да задовољи захтеве. Оптимално решење је да се користе нејестива уља која се не могу користити за људску потрошњу због присуства неких антинутритивних фактора или токсичних компоненти. Најпогодније је користити оне уљарице које имају велики принос по хектару и богата су уљем, ниске трошкове производње и могу да расту на ниско квалитетном земљишту, односно земљишту без пољопривредних вредности.<sup>[22, 161, 162]</sup>

*Jatropha curcas* је нативно дрво из Америке, мада се може наћи у тропским и суптропским областима. Јатропа семе је богато уљем али је токсично за људску употребу. Семе биљке садржи од 30-50% уља по маси, а само језгро од 45-60%. Главне масне киселине које се налазе у уљу Јатропа су олеинска и линолна. Својства овог уља га чине погодним за производњу алкил естара, пошто је вискозност естара већа од вискозности почетног материјала.

Рицинусово уље је јединствен комерцијални ресурс који је богат рицинолеичном киселином (преко 90%). Рицинусово уље се добија из семена биљке *Ricinus communis* при чему је принос око 50%. То је нејестиво уље, хемијски стабилно и потпуно биоразградиво. Највећи произвођачи су Индија и Бразил.

Алтернативна сировина за производњу биодизела је нејестиво уље екстраховано

из дрвета бабасу (*Orbinya martiana*), палминог дрвета које је веома распрострањено у тропским областима. Уље је богато лауринском киселином, а велика предност ове биљке је и да остатак семена, односно дрвета има примену у различитим индустријама.

### 1.6.2. Избор ацил акцептора

У реакцији трансестерификације се могу користити алкохоли краћег (метанол, етанол) и дужег ланца (пропанол, бутанол, пентанол) као и алкохоли разгранатог ланца (2-пропанол, 3-метил-1-бутанол).<sup>[1, 18]</sup> Међутим, иако естри виших алкохола имају боља нискотемпературна својства, виша цена и сложенији процес производње их чини некомпетитивним за индустријску производњу биодизела. Најчешће коришћен алкохол за трансестерификацију је метанол. Да би се смањила дифузиона ограничења и повећала брзина реакције потребно је додати алкохол у вишку у односу на стехиометријски потребну количину (3:1). Показано је у литератури да се велики број липаза инактивира при концентрацијама метанола које су за 33-50% веће од стехиометријске потребне количине за реакцију трансестерификације.<sup>[84, 89, 163]</sup> Да би се остварили што бољи приноси, потребно је знати оптимални однос метанол/уље за различите врсте липаза јер при већем моларном односу од оптималног долази до смањења приноса биодизела. Наиме, у типичој реакцији метанолизе, услед слабе растворљивости метанола у уљу, реакциона смеша се састоји од две фазе. У контакту са нерастворним капљицама алкохола, које постоје у уљу, алкохол се адсорбује на имобилисан ензим, блокира приступ триглицерида, а такође и нарушава микроводени слој ензима, због чега се смањује активност ензима, долази до његове инактивације и смањења приноса метил естра масних киселина. Да би се минимизирала инактивација ензима, у систему без органског растварача, развијен је поступак постепеног додавања метанола у току реакције у складу са динамиком његове потрошње тако да се одржава његова концентрација на одређеном нивоу при којој је смањена инхибиција ензима. Најчешће коришћен поступак је тростепено додавање метанола, у складу са динамиком реакције, што омогућава конверзију од чак 98,4% након 48 сати.<sup>[164]</sup> Неколико других студија је потврдило да је

тростепено додавање метанола супериорније него једностепено.<sup>[165, 166, 167]</sup> Група истраживача је вршила метанолизу биљних уља имобилисаном липазом из *S. antarctica* користећи двостепени,<sup>[168]</sup> односно тростепени<sup>[164]</sup> поступак додавања метанола са постигнутим приносом од 95% и 98,4%. Међутим, оперативна стабилност ензима у поновљеним циклусима је релативно мала. То значи да је стабилност биокатализатора и могућност његовог поновног коришћења, а то су уједно и важни параметри који указују на економску оправданост процеса, релативно мала.

Како је главни циљ употребе биодизела смањење емисије гасова стаклене баште и смањење зависности од фосилних горива, такође је веома важно и да се процени који алкохол ће се користити. Највећи део метанола се данас добија из фосилних извора (природни гас или угаљ), док етанол има извесне еколошке предности пошто се синтетише из обновљивих сировина. Етанол је алкохол избора за земље које је Бразил које имају велике количине етанола у вишку који настаје као нуспроизвод ферментације шећерне трске у поступку производње сахарозе. Као и са метанолом остварују се високи приноси али су реакциони услови блажи када се користи метанол: 60°C за метанол и 75°C за етанол. И реакционо време је краће што је последица физичких и хемијских карактеристика метанола: поларни молекул кратког ланца. У реакцији алкохолизе рициносовог уља исти степен конверзије је остварен за 1 сат када се користио метанол, односно за 5 сати када се користио етанол.<sup>[169]</sup> Бројни истраживачи су фокусирали своја истраживања на алкоhole разгранатог и дугог ланца. Експерименти су показали да се са повећањем броја угљеникових атома повећава и цетански број као и топлотна моћ горива. Естри масних киселина разгранатих алкохола могу се користити као адитиви за горива пошто снижавају температуру магљења и температуру течења.<sup>[92, 170]</sup> Међутим, алкохоли веће моларне масе имају мањи поларитет а самим тим је отежано њихово одвајање од алкил естра након завршене реакције. За разлику од њих, метил-естри масних киселина имају повољнија својства у погледу немешљивости са глицеролом чиме се олакшава пречишћавање финалног производа.

Најновије студије фокусирају своје истраживање на коришћење метил- и етил-ацетата као ацил акцептора у синтези биодизела. Показано је да метил-



ацетат нема негативан утицај на активност липазе. Употреба метил-ацетата такође елиминише ризик од деактивације ензима глицеролом, јер се глицерол не производи у реакцији. Наиме, нуспродукт метанолизе, глицерол, је хидрофобан и лако се адсорбује на површину имобилисане липазе, што такође утиче на њену активност и оперативну стабилност.<sup>[86]</sup> Нуспроизвод реакције са метил-ацетатом, триацетин, има већу вредност од глицерола. Може се користити као адитив за гориво, који смањује детонације горива у мотору и побољшава нискотемпературне карактеристике горива.<sup>[171]</sup> Како метил-ацетат нема негативно дејство на стабилност липазе није потребно његово постепено додавање. То у великој мери смањује време реакције и поједностављује поступак. Показано је и да је оперативна стабилност побољшана употребом метил-, односно етил-ацетата. Ду (Du) и сарадници су остварили конверзију од 92% при трансестерификацији сојиног уља метил-ацетатом са Novozyme 435 и није примећен пад активности липазе ни након 100 циклуса. Етил-ацетат се користио као ацил акцептор за конверзију *Jatropha* и сунцокретовог уља при чему је исто Novozyme 435 био биокатализатор. Оперативна стабилност липазе је остала непромењена након 12 циклуса, док је, када се користио етанол, липаза губила своју активност после 6 циклуса.<sup>[92]</sup>

### 1.6.3. Температура

Значајан параметар ензимске трансестерификације је температура. Оптимална температура за биохемијску синтезу зависи од врсте и начина извођења процеса, као и од избора биокатализатора. Сваки ензим има оптималну температуру на којој је његова активност максимална и то је његова карактеристична вредност при датим условима. Температура утиче и на брзину денатурације, затим на брзину разлагања комплекса ензим-супстрат, као и на топлоту јонизације. Са порастом температуре, брзина ензимске реакције расте до оптималне температуре на којој реакција достиже максималну брзину. Даљи пораст температуре изазива смањење брзине реакције што је последица термалне денатурације ензима. Као и код хемијских реакција, брзина многих ензимских реакција се повећава два до три пута при порасту температуре за 10°C све до

температурног оптимума, и обратно, при снижењу брзине за око 10°C брзина ензимске реакције опада у просеку око два пута.<sup>[116]</sup>

Температура ензимске трансестерификације најчешће варира у распону од 20 °C до 60 °C. Оптимална температура за метанолизу сунцокретовог уља када се као катализатор користи липаза из *T. lanuginose* је 50 °C, али када се у истој реакцији користи липаза из *R. miehei* оптимална температура је нижа од 40 °C.<sup>[93]</sup> Утицај температуре на принос реакције испитиван је у систему са липазом из *P. fluorescens*. Трансестерификација олеинске киселине 1-пропанолом вршена је на температурама од 40 °C до 70 °C, а као катализатор коришћена је слободна и имобилисана липаза из *P. fluorescens*. У случају када је коришћена имобилисана липаза, степен конверзије од 97% достигнут је већ после 5 сати на температурама од 50 °C и 60 °C. Температура од 40 °C за имобилисану липазу била је испод њеног температурног оптимума и реакција се одвијала знатно спорије: остварен је 80% степен конверзије након 25 сати трајања реакције. На температури од 70°C степен конверзије није достигао ни 50% после 25 сати.<sup>[126]</sup> Коришћењем слободне липазе из *P. fluorescens* уочено је да се реакције спорије одигравају са мањим степеном конверзије, при чему су приноси били највећи на 60, нешто нижи приноси су остварени на 50 °C, и на 40 °C, док је температура од 70 °C утицала негативно на ензим. На тој температури остварени степен конверзије био је испод 10% после 25 сати трајања реакције. И овде је доказано да се имобилизацијом температурни оптимум ензима помера ка вишим вредностима у односу на слободне ензиме. Имобилизација обезбеђује крући ослонац за молекул липазе, што је довело до померања температурног оптимума и пораста брзине реакције.<sup>[17]</sup>

#### 1.6.4. Садржај воде у реакционој смеши

Један од кључних фактора ензимске синтезе естара је и садржај воде у систему. Контрола садржаја воде је веома важна из неколико разлога: а) делује као „лубрикант“ одржавањем ензима у активној конформацији; б) учествује у многим механизмима који узрокују инактивацију ензима; в) подстиче агрегацију честица ензима; г) при високом садржају воде може доћи до дифузионих ограничења супстрата; д) може да промовише повратну реакцију хидролизе

смањујући на тај начин принос биодизела. Одређена мала концентрација воде у реакционом систему је неопходна због одржавања тродимензионалне структуре ензима. Липазе имају јединствено својство да катализују реакцију на граничној површини између водене и уљане фазе. Активација ензима укључује откривање активног центра у току конформацијских промена молекула које се дешавају на граничној површини уље – вода. Генерално, активност липазе зависи од расположиве међуфазне површине, која се повећава са повећањем количине воде. Са друге стране, повећана концентрација воде у систему помера равнотежу повратне реакције у правцу реакције хидролизе. Уколико је садржај воде у систему већи од оптималног за дату реакцију, брзина трансестерификације ће бити много мања од повратне реакције хидролизе естара.<sup>[172]</sup> Бројна истраживања су показала да додавање мале количине воде у систем поспешује реакцију синтезе метил естара, односно биодизела. Шах и Гупта (Shah и Gupta) су показали да повећање садржаја воде у систему до 5% повећава принос на 97% у односу на 70% када није било додате воде у систему.<sup>[22]</sup> Каједа (Kaieda) и сарадници су тестирали утицај садржаја воде на реакцију метанолизе сојиног уља користећи три различита биокатализатора: слободне липазе из *C. rugosa*, *P. cerasica* и *P. fluorescens*. У потпуно безводној реакционој смеси ензим је показао веома малу активност и без приноса. Са повећањем концентрације воде расла је и брзина ензимске реакције са сва три ензима.<sup>[99]</sup> Утврђено је да је за *Candida spp.* оптимална концентрација воде у реакцији трансестрификације 10 до 20% у односу на масу уља. Многа истраживања су показала да је ензимско добијање биодизела помоћу имобилисаних липаза могуће и без присуства воде. Тако имобилисана липаза из *C. antarctica* (CAL-B) захтева мању хидратацију. Тамалампуди (Tamalampudi) и сарадници су користећи исту липазу закључили да са порастом количине воде у систему опада принос биодизела, а да би највећи принос од 75% био остварен у систему без додате воде.<sup>[151]</sup> Оптимална количина воде је компромис између повећања ензимске активности повећањем међуфазне површине и минимизирања повратне реакције хидролизе. Очигледно је да треба водити рачуна о садржају воде у систему и експериментално одредити оптималну концентрацију у сваком појединачном случају.

### 1.6.5. Утицај растварача на ензимску синтезу

Од великог броја неконвенционалних медијума у којима се одигравају ензимске реакције, већина ензимских реакција трансестерификације се изводи у органским растварачима. Органски растварачи се користе да би се растворили реактанти, да се омогући одвијање трансестерификације уместо хидролизе (вишак воде може да допринесе десорпцији ензима са носача), као и да се побољша пренос масе у току реакције.<sup>[173]</sup>

У свим биокаталитичким системима са растварачем, природа растварача у великој мери утиче на активност и стабилност ензима. Тенденција растварача да инактивира ензим не зависи само од његове хидрофобности, изражене преко  $\log P$ , него и од других физичко-хемијских карактеристика растварача као што је молекуларна геометрија.<sup>[174]</sup>  $\log P$  је параметар који представља логаритам расподеле органског растварача у двофазном систему 1-октанол/вода. У највећем броју случајева,  $\log P$  омогућава добру предикцију каталитичке активности у органском растварачу. Хидрофилни растварачи са вредностима  $\log P < 2$ , као што су 2-метил-2-пропанол, често доводе до деактивације ензима, док неполярни растварачи са  $\log P > 4$  (хептан) су компатибилни са ензимима. Резултати коришћења растварача са средњим вредностима  $\log P(2-4)$  доста варирају и зависе у великој мери од сваког појединачног случаја. Поларни растварачи нису погодни за биокаталитичке процесе пошто поларни молекул растварача нарушава микроводени слој ензима и на тај начин утиче на нативну структуру ензима, доводећи до денатурације. Ни (Nie) и сарадници су показали да се најбољи приноси, када је коришћена *C. antarctica* имобилисана на акрилној смоли, остварују када се као растварач користи хексан, док су најмањи приноси остварени у систему са поларним растварачима, као што је ацетон.<sup>[125]</sup> Високи приноси су остварени и у реакцији трансестерификације са имобилисаном липазом из *Pseudomonas fluorescens*, при чему се као растварач користио 1, 4-диоксан.<sup>[126]</sup> 2-метил-2-пропанол се често користи као растварач у ензимској синтези биодизела. Присуство 2-метил-2-пропанола значајно смањује негативне ефекте метанола и глицерола на ензим, захваљујући способности да раствара и метанол и глицерол. Ли (Li) и сарадници су као растварач користили 2-метил-2-

пропанола у реакцији трансестерификације уља из уљане репице. Користећи комерцијалне препарате Lipozyme TI LM (липаза из *Thermomyces lanuginosus* имобилисан на силика гелу) и Novozyme 435 (липаза из *C. antarctica* имобилисана на акрилној смоли) као катализаторе под оптималним условима реакције су остварили принос од 95%.<sup>[91]</sup> 2-метил-2-пропанола је као растварач коришћен у ензимској производњи биодизела из памучног уља са липазом из *C. antarctica* и то у шаржном и у реактору са пакованим слојем. У оба случаја остварен је принос од преко 90%.<sup>[84]</sup>

Упркос обећавајућим резултатима, употребу растварача треба избегавати због њихове токсичности, запаљивости и штетног утицаја на животну средину. Са економске тачке гледишта, употреба органских растварача је неповољна због неопходности њиховог уклањања из финалног производа што додатно повећава трошкове производње. Стога су, да би ензимски процеси били конкурентни хемијским, развијени системи без органског растварача. Такви системи имају низ предности у односу на системе са органским растварачем, пре свега у погледу смањења трошкова и поједностављивања процесне контроле.<sup>[89, 175]</sup>

Највећи проблем имплементирања липаза у синтези биодизела у систему без органског растварача је релативно слаба активност ензима у присуству вишка алкохола. Да би се минимизирала инактивација ензима, у систему без органског растварача, развијен је поступак постепеног додавања метанола у току реакције у складу са динамиком његове потрошње тако да се одржава његова концентрација на одређеном нивоу при којој је смањена инхибиција ензима. Други приступ побољшавања перформанси липаза у систему без органског растварача, када се као реактанти користе изразито поларна једињења (метанол), јесте регенерација биокатализатора испирањем са C3-C5 алкохолима. Липаза из *C. antarctica*, деактивирана вишком метанола у реакцији трансестерификације, је повратила 56%, односно 75% своје првобитне активности након испирања са 2-бутанолом, односно 2-метил-2-пропанола.<sup>[149]</sup> Самукава (Samukawa) и сарадници су показали да се метанолиза знатно брже одиграла када се ензим Novozyme 435 пре реакције инкубира у метил олеату 30 минута, а затим у сојином уљу 12 сати.<sup>[150]</sup>

## 1.7. Конфигурација реактора и индустријска примена

### 1.7.1 Ензимски реактори

Важан аспект имплементације липаза у индустријску производњу биодизела је развој ефикасног реакторског система. Постоје неколико различитих ензимских реактора као што су: а) шаржни реактор, б) мембрански реактор, в) континуални реактор са пакованим слојем, г) проточни реактор са идеалним мешањем, д) континуални мембрански реактор, е) континуални реактор са флуидизованим слојем. Постоји неколико важних фактора који одређују избор реактора за одређени процес. У принципу, избор зависи од цене финалног производа на коју утичу: цене супстрата, трошкови процесне обраде, радне снаге, режијски трошкови, амортизација. Други фактори битни за избор реактора су избор ензима (слободан или имобилисан), кинетика реакције, физичке и хемијске карактеристике носача, њихова робусност, величина честице и сл. И не мање битно, избор реактора зависи од захтеваних параметара реакције: контрола рН, контрола температуре, аерација подлоге или уклањање гасова, стабилност и продуктивност ензима.

#### **Шаржни реактор**

На лабораторијском нивоу најчешће коришћени су шаржни реактори. Предност ових система је лако руковање и контрола процеса, као и једноставна конфигурација реактора. Шаржни реактор се најчешће састоји из резервоара опремљеног системом за мешање, у коме ензим и супстрат имају исто време задржавања, мада у неким случајевима постоји потреба за даљим додавањем ензима или подлоге (доливни шаржни реактор, тзв. fed batch). Оперативни трошкови шаржних реактора су пак већи него у случају континуалних процеса због сталне потребе за пражњењем и пуњењем реактора, што је додатни период у ком сам реактор није продуктиван. Шаржни реактор са мешањем се може користити за реакције са слободним ензимима уколико нема бојазни да ће се контаминирати производ, односно, уколико последице контаминирања производа нису озбиљне. Проблем са коришћењем шаржног реактора су серијска варирања од шарже до шарже, пре свега због промена у реакцији током времена, као и

проблеми при повећавању размера процеса (тзв. scale-up). Због тога су шаржни реактори идеални за производњу мале количине скувих производа, за производњу где је неопходно прецизно праћење параметара нпр. температуре и рН, за споре реакције, за реакције великог вискозитета. Постоји много публикација о ензимској трансестерификацији у шаржном реактору, али се веома мало број радова бави проблематиком увећања размера таквих система.<sup>[176, 177]</sup>

### **Мембрански реактори**

Главни захтев који мембрански реактор треба да испуни је постојање полупропустиљиве (семипермеабилне) мембране која омогућава слободан пролаз молекулама супстрата и производа, а задржава молекуле ензима. Пример такве мембране је мембрана за дијализу која уклања молекуле мале молекулске масе из протеинских препарата. Мембрански реактор може да се користи или у шаржном или у континуланом режиму рада, а предност му је што омогућава једноставно одвајање ензима од производа реакције. Обично се користе за слободне ензиме избегавајући на тај начин трошкове и потенцијалне проблеме везане за имобилизацију ензима, као и проблеме везане за дифузиона ограничења имобилисаних ензима. Основна мана мембранских ректора је цена мембрана и потреба да се мења у регуларним временским интервалима.

### **Континуални реактори**

У континуалним реакторским системима, просечно време задржавања супстрата у реактору је далеко краће од времена задржавања молекула имобилисаног ензима. То резултира повећаном продуктивношћу по маси ензима у поређењу са шаржним реактором. Овакав тип реактора омогућава коришћење супстрата мале растворљивости тако што се користе велике запремине смеше која садржи ниску концентрацију супстрата. Постоје два различита система за проточни реактор:

а) проточни реактор са идеалним мешањем (у коме се улазни ток потпуно и практично тренутна меша са садржајем целог реактора при чему је ензим у контакту са малом концентрацијом супстрата и великом концентрацијом продукта)  
и

б) континуални реактор са пакованим слојем (где нема мешања, а ензим је у контакту са великом концентрацијом супстрата и малом концентрацијом продуката).

По својим карактеристикама, између ова два типа реактора се налази реактор са флуидизованим слојем.

Реактор са пакованим слојем се често употребљава за ензимске реакције великих размера. Такви реактори омогућавају континуалну производњу са високим процентом ефикасности и смањују денатурацију ензима смицајним силама које су честе код реактора са идеалним мешањем. Реактори са пакованим слојем су погодни за дуготрајне и индустријске процесе јер омогућавају поновну употребу ензима без потребе за његовим претходним издвајањем. Као што је већ речено, главна предност реактора са пакованим слојем у односу на шаржни и реактор са флуидизованим слојем је већи принос по маси ензима. На лабораторијском нивоу, основна конструкција ових реактора је стаклена колона напуњена имобилисаном липазом при чему је реакциона смеша термостатирана и перисталтичком пумпом се уводи у паковани слој катализатора и то: силазним током, улазним током или рециркулационим током. За индустријску примену, бољи је улазни ток јер он не доводи до збијања имобилисаног ензима у пакованом слоју.

Да би се унапредила синтеза биодизела у реактору са пакованим слојем, неопходно је утврдити оптималне радне и хидродинамичке параметре који максимизирају принос биодизела. Чен (Chen) и сарадници су развили ефикасан систем за континуалну производњу биодизела метанолизом отпадног уља имобилисаном липазом из *C. antarctica* у каскадном тростепеном реактору са пакованим слојем.<sup>[94]</sup> Они су испитали утицај липазе, растварача, воде, температуре, оперативне стабилности и протока на синтезу биодизела. Због слабе растворљивости метанола у уљу неопходно је да се реакција изводи у присуству растварача, хексана. Растварач побољшава пренос супстрата и производа, и смањује токсични утицај метанола на ензим смањивањем концентрације метанола. Кључни параметар реактора са пакованим слојем су количина ензима и проток. Утицај протока на ефикасност ензимског система није једноставан. Када је проток мали, тј. дуже време задржавања, метанол је у дужем контакту са липазом што може проузроковати смањење активности ензима услед денатурације. С друге



стране, при већим брзинама протицања, смањује се време контакта липазе и супстрата што доприноси томе да супстрат није у стању да се веже за активни центар ензима, и долази до неминовног пада приноса биодизела. У претходно наведеној студији, оптимални услови реакције су били 25:15:10:100 за масени однос липаза/хексан/вода/уље, температура од 45 °C и брзина протока 1,2 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. Достигнут је принос од 91,08%, али је након 100 сати рада смањен на 76,74%. Постоје два могућа разлога за тако лошу стабилност: адсорбција глицерола на површини имобилисане липазе или негативан утицај метанола на липазу. Да би се постигла боља стабилност неопходно је уклањати глицерол у току процеса. Друго решење је да се користе други растварачи пошто је глицерол нерастворан у хексану, тако да остаје у реактору адсорбован на имобилисан ензим, неминовно доводећи до смањења ензимске активности. Северак (Severac) је за производњу биодизела из сунцокретовог уља богатог олеинском киселином као растварач користио *tert*-бутанол. Почетне концентрације супстрата и њихов однос су оптимизовани користећи Novozyme 435 као биокатализатор. Кључна тачка контроле јесте расподела поларних молекула између реакционне смеше и имобилисаног ензима. Пошто има способност да раствара и поларне и неполарне молекуле, 2-метил-2-пропанола се показао као савршен избор за овакву производњу. Најбољи резултати су добијени за почетну концентрацију уља од 500 mM и моларни однос уље/2-метил-2-пропанола 1:5. Процењена је продуктивности од 13,8 тона биодизела годишње по килограму Novozyme 435, са приносом од 96,5%. Важно је приметити да нема губитка активности ни након 50 дана (преко 1200 часова), тако да је овај поступак ефикасан за синтезу биодизела.<sup>[178]</sup>

Сличан реактор са пакованим слојем за континуалну синтезу биодизела је оптимизовао и Халим (Halim) са сарадницима користећи 2-метил-2-пропанола као растварач. Са Novozyme 435 као катализатором остварен је принос од преко 80% а оперативна стабилност је била преко 120 сати. Испитан је и утицај преноса масе у таквом систему. При малим брзинама протока, реакцију одређује пренос масе, док је при великим брзинама реакција кинетички контролисана.

Као што је већ речено, због ограничења услед преноса масе, реактор са пакованим слојем није добар избор за ензиматску производњу биодизела у

систему без органског растварача.<sup>[179]</sup> Код таквих система јавља се неколико проблема: због велике вискозности супстрата у реактору се јавља значајан пад притиска. Да би се пад притиска минимизирао мора да се ради при ниским брзинама протока, мора да се повећа величина носача или се мора додати растварач. Уколико се повећа пречник честица носача, опада пад притиска али се смањује брзина преноса масе, што утиче на принос реакције. Упркос овим очигледним ограничењима развијено је неколико реакторских система за реакције без органског растварача.<sup>[188, 165, 180, 181]</sup> Употреба растварача заправо повећава трошкове производње, пошто растварач мора бити уклоњен и пречишћен за поновну употребу. Шимада (Shimada) и сарадници су развили континуални процес метанолизе биљног уља у реактору са пакованим слојем са липазом из *S. antarctica*. Пошто је утицај метанола у систему без растварача штетнији на активност липазе, као и у шаржним системима, неопходно је постепено додавање метанола. Такође, глицерол се уклањао из реакционе смеше седиментацијом. Принос је износио преко 90%, и тростепено додавање метанола је коришћено 100 дана.<sup>[165]</sup> Интересантан је приступ који су искористили Хајар (Hajar) и сарадници.<sup>[180]</sup> Паковање за реактор је била комерцијално имобилисана липаза заједно са ситним комадима луфа сунђера (*Luffa cylindrica*). Овај лигноцелулозни материјал се због своје високе порозности, мале густине, и велике густине пора често користи у реакцијама са имобилисаним ћелијама или ензимима.<sup>[182]</sup> Луфа се користи из неколико разлога: спречава збијање ензима посебно када се користе вискозни супстрати, захваљујући својој порозности олакшава пролаз уља кроз реактор, спречава нагомилавање глицерола и омогућава боље распоређивање ензима у реактору. И овде је коришћено постепено додавање метанола у реакцију у три корака: на почетку реакције, после 24h и после 48h. Остварен принос у оваквом реактору је износио преко 90% и остао је стабилан и након 400h. У овом експерименту је испитан утицај брзине протицања на принос реакције помоћу статистичке обраде података и методе одзивних површина. Динамика протицања флуида и оперативни параметри су посебно битни када се користи систем без органског растварача. Опет се јавља иста проблематика, при малим протоцима, смањује се пренос масе уља на површину липазе. Због недовољне брзине протока хидрофилни слој метанола и глицерола се формира око ензима. Повећањем

протока, повећава се изложеност липазе супстрату и повећава се принос биодизела.

Правилним избором реакторске конфигурације и услова рада, имобилисани ензими пружају одличну перспективу за постизање високе вредности конверзије, побољшане стабилности ензима, а тиме и продужено оперативно време и исплативе индустријске ензимске процесе.

Веома занимљива и важна студија је спроведена од стране Сотоф (Sotof) и сарадника. Они су извели симулацију процеса и економску процену фабрике за ензимску производњу биодизела.<sup>[183, 184]</sup> До данас постоји само једна фабрика у свету која користи ензимски процес трансестерификације за синтезу биодизела. Из тог разлога су овакве студије од великог значаја за правилнау процену индустријског потенцијала одређеног процеса. Испитивано је неколико важних и релевантних сценарија: ензимска производња биодизела из уља уљане репице и метанола у систему без и са растварачем. Пројектоване су две производне линије различитог капацитета, 8 и 200 милиона килограма биодизела по години, и са различитом ценом ензима: тренутна цена 762,7 €/kg ензима и пројектована цена у будућности 7,627 €/kg ензима. Потрошња ензима је израчуната на основу очекиване продуктивности. Симулација процеса је вршена у програмима Aspen Plus и Aspen Icarus Process Evaluator. На основу симулација, процес без органског растварача са тренутном ценом ензима је одржив за производни капацитет од 200 милиона килограма/години. Такође, једина реална опција је континуални процес са постепеним додавањем метанола. Велики удео у процесу има и рационално коришћење нус производа, односно, продаја глицерола. За процес без органског растварача претпостављена је следећа расподела трошкова сировина: 50% одлази на цену ензима, 47% на цену уља и 3% на цену метанола. Утицај цене ензима је мањи када се ради са органским растварачем због бољих перформанси ензима у таквом систему. Процењена је цена производа од 0,73-1,49 €/kg биодизела са садашњом ценом ензима, односно, 0,05-0,74 €/kg биодизела са пројектованом ценом ензима у будућности у систему без органског растварача.

## 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ДЕО

### 2.1. Материјали и методе

#### 2.1.1. Материјали

Као биокатализатор за ензимску синтезу естара коришћени су следећи ензимски препарати:

- липаза из *Candida rugosa* (Sigma, САД),
- липаза из *Rhizomucor miehei* (Novozyme, Данска),
- липаза из *Candida antarctica* (Sigma, САД) и
- нативна липаза из *Candida antarctica*

За реакцију синтезе биодизела коришћени су:

- јестиво рафинисано сунцокретово уље (Сунце, Србија),
- метанол 98,9% (Lachema, Чешка),
- 2-пропанол (Lachema, Чешка),
- 1-бутанол (Lachema, Чешка),
- метил-ацетат (Lachema, Чешка),
- етил-ацетат (Lachema, Чешка),
- хексан 99% (Merck, Немачка).

За имобилизацију ензима коришћен је комерцијални носач Eupergit<sup>®</sup>С 250L (Sigma-Aldrich, St. Louis, САД).

За активирање носача коришћени су

- >99% цистеин (Acros Organics, New Jersey, САД),
- 25% глутаралдехид (Sigma-Aldrich, St. Louis, САД),
- етилендиамин (ЕДА) (Sigma-Aldrich, St. Louis, САД).

За одређивање активности ензима коришћени су

- 99,5% изопропанол (Центрохем, Стара Пазова, Србија),
- 4-нитрофенил-палмитат (Alfa Aesar, Немачка).

Инструменти коришћени при извођењу експеримената:

- термостатирано водено купатило са мешањем (Mettmert, Немачка),
- рН метар, Ino Lab рН 720,
- UV-спектрофотометар, Ultrospec™3300 pro, (Biochrom Ltd, Cambridge, ВБ),
- Магнетна мешалица, Heidolph MR 3001,
- Инфрацрвени спектрометар (Bomem MB 100),
- Вортекс, Реакс 7000, (Heidolph) и
- Гасни хроматограф, (Varian 3400, Немачка).

## 2.1.2. Методе

### 2.1.2.1. Ензимска синтеза биодизела

У овом раду је примењена ензимска трансестерификација са тростепеним додавањем метанола са имобилисаном липазом из *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*. Метода која је изабрана за овај експеримент се заснива на тростепеном додавању метанола у реакциону смешу да би се избегла евентуална инактивација ензима. Реакција је извођена у балонима од 100 cm<sup>3</sup>. Узорци су припремани тако што се одмери 5,0 g уља и одговарајућа количина ензима, воде и прва порција метанола у складу са експерименталним планом (Табела 3.2). Реакција се одвија у воденом купатилу уз стално мешање (тресилица) на одговарајућој температури. У свим експериментима број обртаја тресилице је био константан и износио је 150 o min<sup>-1</sup>. Након 10 сати од почетка реакције додаје се друга порција метанола, а након 25 сати и трећа порција. Након 50 сати реакција се завршава. Смеша се профилира ради уклањања липазе, а затим се пренесе у левак за одвајање где се испира хексаном и дестилованом водом. Доњи слој глицерола, и метанол се уклони а горњи слој се сачува за даљу анализу.

### **Ензиматска трансестерификација: одабир ацил-акцептора**

У циљу одабира најбољег ацил-акцептора за реакцију синтезе коришћени су: метанол, 2-пропанол, 1-бутанол и метил ацетат. Метода која је изабрана за овај експеримент заснива се на вишестепеном додавању ацил-акцептора по предходно утврђеној динамици. Реакција је извођена у балонима од 100 cm<sup>3</sup>.

### 2.1.2.2. Хроматографска метода анализе уља и биодизела

Анализа метил-естара масних киселина у погледу састава и садржаја извршена је методом гасне хроматографије на апарату VARIAN, модел 3400, са пламенојонозујућим детектором. Коришћена је капиларна колоне са пуњењем од силицијум-диоксида, DB1, димензија  $30\text{m} \times 0,32\text{mm} \times 0,1\mu\text{m}$ . Температурни режим је био следећи: температура колоне је најпре одржавана на  $150\text{ }^\circ\text{C}$  у трајању од 2 минута, а затим загревана до  $190\text{ }^\circ\text{C}$  брзином од  $4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  и таква се одржавала 3 минута. Након тога је температура колоне повећана на  $250\text{ }^\circ\text{C}$  брзином од  $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  и одржавала се 5 минута, а потом је повећана на  $300\text{ }^\circ\text{C}$  брзином од  $4\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$  и одржавала се 2 минута. Температура инјектора је износила  $320\text{ }^\circ\text{C}$ , а детектора  $330\text{ }^\circ\text{C}$ . Протоци азота, водоника и ваздуха су износили:  $25\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$ ,  $25\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$  и  $250\text{ cm}^3\text{ min}^{-1}$ . Као интерни стандард је коришћен метил-миристант.

Вредност концентрације метил-естра добија се помоћу следеће формуле:

$$c(\text{m.e.}) = (P/P_s) * c_s(\text{m.e.}) \quad (1)$$

где су:

$c(\text{me})$  - концентрација жељеног метил естра у узорку

$c_s(\text{me})$  - концентрација истог метил естра у стандарду

$P$  - површина жељеног метил естра на добијеном хроматограму узорка

$P_s$  - површина истог метил естра на добијеном хроматограму стандарда

### 2.1.2.3. Активација носача

Да би се носач, Eupergit<sup>®</sup>C 250L, активирао помоћу цистеина, одмери се 2,0 g носача и дода  $20\text{ cm}^3$  1M раствора цистеина. По додавању раствора, носач се оставља на тресилици да се термостатира на  $25\text{ }^\circ\text{C}$  током 48 сати. Потом се носач испира, како би се уклонио невезани цистеин. На 20 g носача, додаје се  $33,6\text{ cm}^3$  25% раствора глутаралдехида и  $22,4\text{ cm}^3$  0,2M фосфатног пуфера чији је pH 7, а потом се термостатира на тресилици наредна 24 часа.

Да би се носач, Eupergit® C 250L, активирао помоћу етилендиамина (EDA), 1 g носача се третира са 10 cm<sup>3</sup> раствора који садржи 1M етилендиамина (EDA) на 60 °C при рН 10 током 4 часа. Активирани носач се испере пуфером и даље активира глутаралдехидом на већ описан начин.

Након термостатирања, раствор са носачем се филтрира на Бихнеровом левку и испира да би се уклонио невезани глутаралдехид. Раствор је потребно дуго испирати, како би се испрала жута боја раствора која потиче од глутаралдехида.

#### 2.1.2.4. Имобилизације липазе на Eupergit® C 250L

Немодификовани Eupergit® C 250L, масе 700 mg, додаје се у претходно припремљену суспензију ензима у натријум-фосфатном пуферу. Овај раствор се припреми тако што се одмери 200 mg липазе и раствори у 10 cm<sup>3</sup> фосфатног пуфера (25 mM и 0,5 M).

#### 2.1.2.5. Имобилизација липазе на Eupergit® C 250L модификован цистеином и глутаралдехидом за синтезу биодизела

Модификован Eupergit® C 250L цистеином и глутаралдехидом, масе 1,5 g додаје се у припремљену суспензију липазе у фосфатном пуферу. Како би се касније испитала ефикасност различитих метода имобилизације и носача за имобилизацију, користе се узорци које смо добили додавањем липазе у фосфатни пуфер при различитим рН. Овде су коришћени натријум-фосфатни пуфер при концентрацији 25 mM и рН 7 или рН 10. Суспензија се припрема додавањем 5 ензима у 10 cm<sup>3</sup> пуфера и инкубира 20h на 25 °C.

Модификовани Eupergit® C 250L етилендиамином и глутаралдехидом, масе 1g додаје се у припремљену суспензију липазе у фосфатном пуфер. Како би се касније испитала ефикасност различитих метода имобилизације и носача за имобилизацију, користе се узорци које смо добили додавањем липазе у фосфатни пуфер при различитим рН. И овде су коришћени натријум-фосфатни пуфер при концентрацији 25 mM и рН 7 или рН 10. Суспензија се припрема додавањем

3,34 cm<sup>3</sup> ензима у пуфера и инкубира 20 h на 25 °C.

#### 2.1.2.6. Испитивање десорпције ензима са носача

Одмерава се по 150 mg имобилизата у два ерленмајера. У први ерленмајер се додаје 5 cm<sup>3</sup> 0,1M воденог раствора глицина, а у други ерленмајер се додаје 5 cm<sup>3</sup> 50 mM раствора CaCl<sub>2</sub> у 15%-ном (v/v) етанолу. Имобилисани ензими се инкубирају у овим растворима 1 h, а потом се мери активност ензима.

#### 2.1.2.7. Испитивање липолитичке активности

За испитивање липолитичке активности у свим експериментима коришћена је метода која се заснива на спектрофотометријском одређивању концентрације *p*-нитрофенола који настаје у реакцији хидролизе *p*-нитрофенил-палмитата. Ова реакција је катализована липазом.

Припреми се 90 cm<sup>3</sup> 50 mM фосфатног пуфера, чији је рН 8. У 10 cm<sup>3</sup> 2-пропанола додаје се 30 *p*-нитрофенил-палмитата, а потом се 10 секунди држи у ултразвучном купатилу. Ова два раствора се сједине и термостатирају 30 минута на 37 °C. Овај раствор даље се користи као супстрат. У кивете се сипа 3 cm<sup>3</sup> супстрата а потом се додаје 20 μl ензимског препарата и мери се апсорбанца на 410 nm ( $\epsilon = 1500 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Реакциона смеша се меша на магнетној мешалици. Активност је мерена праћењем промене апсорбанције у току прва 3 минута реакције на 410 nm. Јединица ензимске активности (IU) је дефинисана као количина ензима која ослобађа 1 μmol *p*-нитрофенола по минути при описаним условима ( $A = \epsilon \cdot c \cdot l$ ).

#### 2.1.2.8. Одређивање садржаја протеина методом по Бредфорду<sup>[185]</sup>

Одређивање садржаја протеина овом техником се базира на промени максимума апсорпције киселог раствора Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G 250) боје са 465 nm на 595 nm при везивању за протеине. Анјонски (плави) облик боје стабилизује хидрофобне и јонске интеракције са протеином, што проузрокује видљиву промену боје. Боја се мења из црвено-смеђе у плаву. Боја првенствено реагује са остацима аргинина, али реагује и са остацима хистидина, лизина, тирозина, триптофана и фенилаланина. Осетљивост метода је око 5 - 200 μg



протеина, у зависности од квалитета боје, а линеарна зависност је у опсегу од 0 - 2000  $\mu\text{g}$  протеина.

Припрема реагенса:

Одмери се 100 mg СВВ G 250 у нормални суд од 1  $\text{dm}^3$ . У њега се дода 100  $\text{cm}^3$  85% ортофосфорне киселине 50  $\text{cm}^3$  95% метанола, око 300  $\text{cm}^3$  дестиловане воде и меша 2 часа на собној температури. Нормални суд се затим одложи на тамно место преко ноћи. Сутрадан се допуни водом до запремине 1  $\text{dm}^3$  и профилира кроз груби филтер папир у тамну боцу. Реагенс је стабилан више месеци. Чува се на тамном и хладном месту.

Процедура:

Одмери се 5  $\text{cm}^3$  Брадфордовога реагенса и 1  $\text{cm}^3$  раствора ензима у епрувету. Дорбро промућкати и оставити 5 минута да се развије плава боја. Након тога се мери апсорбанца на 595 nm.

Одређивање стандардне криве:

Пре сваке серије експеримената одређена је стандардна крива. Као стандард коришћен је препарат липазе. Стандардни раствор у опсегу 0,1 до 0,5  $\text{mg cm}^{-3}$  добијени су разблаживањем основног раствора концентрације, а садржај протеина у растворима познате концентрације одређиван је по већ описаној процедури.

#### 2.1.2.9. Фуријеова трансформацијска инфрацрвена спектроскопија (FT-IR)

За FT-IR анализе коришћено је 2 mg који се помеша и спраши са 148 mg калијум-бромидом. Смеша се затим компримује у таблете под притиском од 11 t, у трајању од око 2 min. Добијени спектри су у распону таласног броја од 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , и на резолуцији спектра од 4  $\text{cm}^{-1}$ .

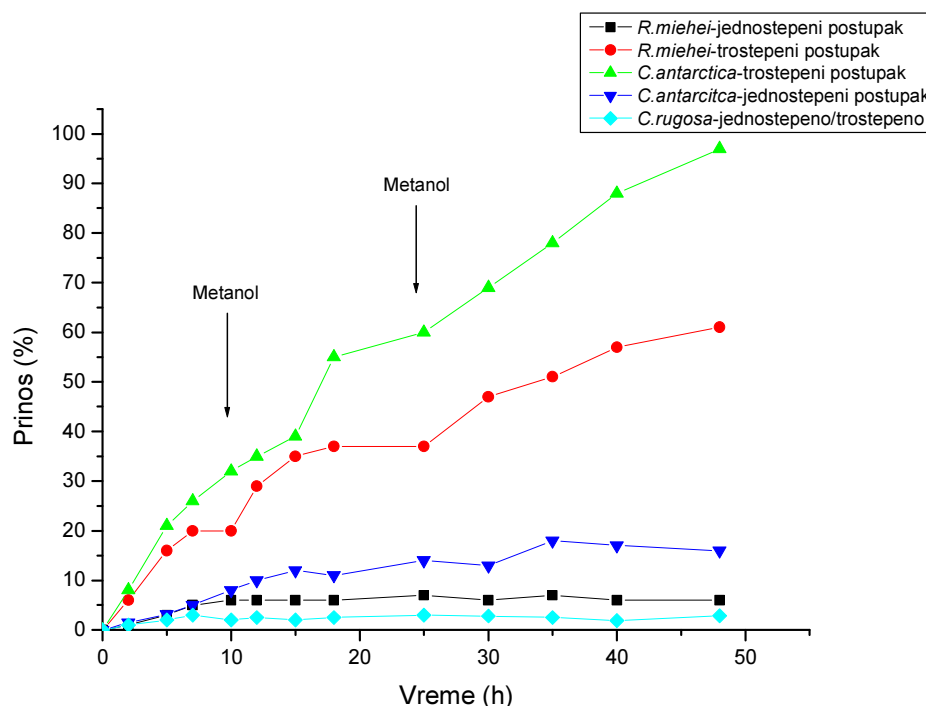
### 3. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Основни циљ истраживања је био развој технолошки једноставног и енергетски ефикасног ензимског поступка добијања биодизела нешкодљивог за околину. За остваривање тог циља су се користила два приступа. Један је развој биокаталитичког процеса што подразумева оптимизацију процесних параметара и примену алтернативних поступака у циљу превазилажења актуелних проблема (примена скувих и токсичних органских растварача и емулгатора као и мала стабилности липазе у присуству нижих алкохола). Други приступ је развој и дизајн имобилисаних система са комерцијалним јефтинијим липазама чиме се омогућава њихово издвајање из реакционе смеше по завршетку реакције и њихово вишеструко коришћење у шаржним и континуалним поступцима.

#### 3.1. Испитивање утицаја врсте биокатализатора и начина извођења процеса на синтезу биодизела

Први корак је био одабир одговарајућег катализатора. Као биокатализатори у реакцији метанолизе сунцокретовог уља у систему без органског растварача коришћена су три ензима: липаза из *Candida rugosa*, комерцијално имобилисана липаза из *Rhizomucor miehei* на макропорозном јоноизмењивачу и имобилисана липаза из *Candida antarctica* на акрилној смоли. Испитани су утицаји температуре, количине воде, количине додатог ензима, моларног односа метанол/уље као и начина извођења процеса на принос метил-естара масних киселина. Наиме, да би се извела потпуна конверзија једног мола сунцокретовог уља до метил-естара масних киселина потребно је најмање три мола метанола. Међутим, при великој почетној концентрацији метанола може доћи до иреверзибилне инхибиције липазе. Стога је оптимизован поступак тростепеног додавања метанола у реакциону смешу у складу са динамиком потрошње, да би се спречила инактивација ензима у вишку метанола. Како брзина реакције и потрошња метанола зависе од врсте имобилисаног ензима, тростепени поступак је испитан са сва три ензима. На Слици 3.1. је приказан утицај начина извођења процеса на принос биодизела.

Добијени резултати су показали да, иако су остварени различити приноси са три различите липазе, динамика потрошње метанола остаје иста, односно, добијени су значајно већи приноси када се користи тростепени поступак. Прва количина метанола (по 1/3 минимално неопходне количине) у систем је додата на почетку реакције, друга количина након 10 h и трећа након 25 h док је цела реакција трајала 50 h.



Слика 3.1. Утицај начина извођења процеса и врсте биокатализатора на принос биодизела

Најмањи принос, испод 10%, је добијен када се као катализатор користила липаза из *C. rugosa*, и код једноступеног и код троступеног поступка. Ова липаза има малу стабилност и активност у метанолу и стога се није показала као добар избор за синтезу биодизела. Ови резултати су у скаладу и са другим истраживањима где коришћењем липазе из *C. rugosa* нису добијени задовољавајући резултати.<sup>[22]</sup> Оптимизација процеса је даље вршена користећи комерцијалну имобилисану липазу из *R. miehei* и липазу из *C. antarctica*. Како су прелиминарни експерименти били намењени за почетну процену активности датих липаза, они су вршени под реакционим условима који можда и нису били

оптимални за дате ензиме. Да би се извршила оптимизација процесних параметара могућа су два присутпа. Први је конвенционалан метод где се варира један фактор при константним вредностима осталих фактора. Овакав приступ осим што је дуготрајан, не пружа нам корисне информације о међусобној интеракцији различитих фактора, и често не гарантује одређивање оптималних услова реакције. Статистичким методама планирања експеримената смањује се број неопходних експеримената чиме се неминовно смањују трошкови истраживања, док се истовремено добијају информације о интеракцијама између варијабли у посматраном опсегу.

### 3.2. Оптимизација ензимског поступка синтезе биодизела имобилисаном липазом из *Rhizomucor miehei*

Најпре је извршена је оптимизација процеса ензимске синтезе метил-естара липазом из *R. miehei* коришћењем ротатабилног композиционог експерименталног плана. За обраду података коришћена је методологија одзивних површина. Изведено је 30 експеримената, при чему је испитан утицај 4 фактора на 5 нивоа. Испитивани фактори су температура  $X_1$  (25-65 °C), концентрација ензима  $X_2$  (1-5%), почетна концентрација воде  $X_3$  (0-10%) и моларни однос метанол/уље  $X_4$  (3-9). Кодирани и стварне вредности фактора дате су у табели 3.1. Примењени експериментални план и резултати изведених експеримената су приказани у табели 3.2.

Табела 3.1. Кодирани и стварне вредности параметра у примењеном експерименталном плану

Фактори	-2	-1	0	1	2
Температура $X_1$ , (°C)	25	35	45	55	65
Концентрација ензима $X_2$ (%)	1	2	3	4	5
Концентрација воде $X_3$ (%)	0	2,5	5	7,5	10
Моларни однос супстрата $X_4$	3	4,5	6	7,5	9

Табела 3.2. Експериментални план за испитивање утицаја 4 фактора на пет нивоа вредности методом одзивних површина

Бр. ек	Температура, °C	Конц. ензима, %	Конц воде, %	Моларни однос супстрата, $n_{\text{methanol}}/n_{\text{oil}}$	Брзина ензимске реакције, $\text{mmol h}^{-1}$	Брзина ензимске реакције по количини ензима, $\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$
1	35 (-1)*	2 (-1)	2.5(-1)	4.5 (-1)	0.0882	0,147
2	55 (1)	2 (-1)	2.5(-1)	4,5 (-1)	0.0517	0,0862
3	35 (-1)	4 (1)	2.5(-1)	4,5 (-1)	0.156	0,130
4	55 (1)	4 (1)	2.5(-1)	4,5 (-1)	0.139	0,115
5	35 (-1)	2 (-1)	7.5(1)	4,5 (-1)	0.110	0,183
6	55 (1)	2 (-1)	7.5(1)	4,5 (-1)	0.0369	0,0615
7	35 (-1)	4 (1)	7.5(1)	4,5 (-1)	0.131	0,109
8	55 (1)	4 (1)	7.5(1)	4,5 (-1)	0.0636	0,0530
9	35 (-1)	2 (-1)	2.5(-1)	7,5 (1)	0.0535	0,0891
10	55 (1)	2 (-1)	2.5(-1)	7,5 (1)	0.139	0,231
11	35 (-1)	4 (1)	2.5(-1)	7,5 (1)	0.109	0,0906
12	55 (1)	4 (1)	2.5(-1)	7,5 (1)	0.0617	0,0514
13	35 (-1)	2 (-1)	7.5(1)	7,5 (1)	0.0603	0,101
14	55 (1)	2 (-1)	7.5(1)	7,5 (1)	0.0316	0,0527
15	35 (-1)	4 (1)	7.5(1)	7,5 (1)	0.132	0,110
16	55 (1)	4 (1)	7.5(1)	7,5 (1)	0.0496	0,0413
17	25 (-2)	3 (0)	5(0)	6 (0)	0.152	0,169
18	65 (2)	3 (0)	5(0)	6 (0)	0.0746	0,0828
19	45 (0)	1 (-2)	5(0)	6 (0)	0.0318	0,106
20	45 (0)	5 (2)	5(0)	6 (0)	0.169	0,113
21	45 (0)	3 (0)	0(-2)	6 (0)	0.183	0,203
22	45 (0)	3 (0)	10(2)	6 (0)	0.0617	0,0685
23	45 (0)	3 (0)	5(0)	3 (-2)	0.0474	0,0527
24	45 (0)	3 (0)	5(0)	9 (2)	0.0966	0,107
25	45 (0)	3 (0)	5(0)	6(0)	0.0474	0,0527
26*	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	0.0515	0,0573
27*	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	0.0318	0,0353

28*	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	0.0978	0,109
29*	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	0.0431	0,0480
30*	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	0.0882	0,0980

\* Централна тачка

Испитана је могућност математичког описивања добијених резултата регресионим моделом другог реда који укључује интеракцију између фактора :

$$y = b_0 + \sum b_i x_i + \sum b_{ii} x_{ii}^2 + \sum b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

где је  $y$  одзивна величина (брзина ензимске реакције, односно брзина ензимске реакције по количини ензима),  $x_i$  и  $x_j$  независне променљиве (фактори),  $b_0$ ,  $b_i$ ,  $b_{ii}$ ,  $b_{ij}$  регресиони коефицијенти модела (линеарни, квадратни и интерактивни).

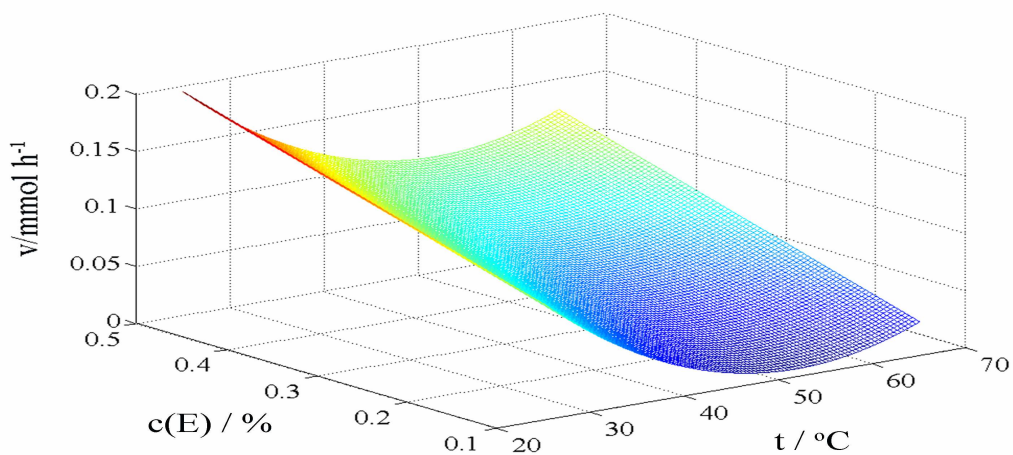
На основу експерименталних резултата за анализу метанолизе сунцокретовог уља имобилисаном липазом из *R. miehei* добијена су два модела. Први представља утицај појединачних фактора, као и њиховог комбинованог утицаја, на брзину реакције. Други модел, утицај фактора на брзину ензимске реакције по количине ензима, нам омогућава да оптимизујемо економску ефикасност процеса, пошто цена ензима представља значајан део укупних трошкова процеса.

За анализу утицаја различитих фактора на брзину ензимске реакције, на основу композиционог ротативбилног експерименталног плана, добијен је модел другог реда, са три сигнификантна параметра, без међусобне интеракције.

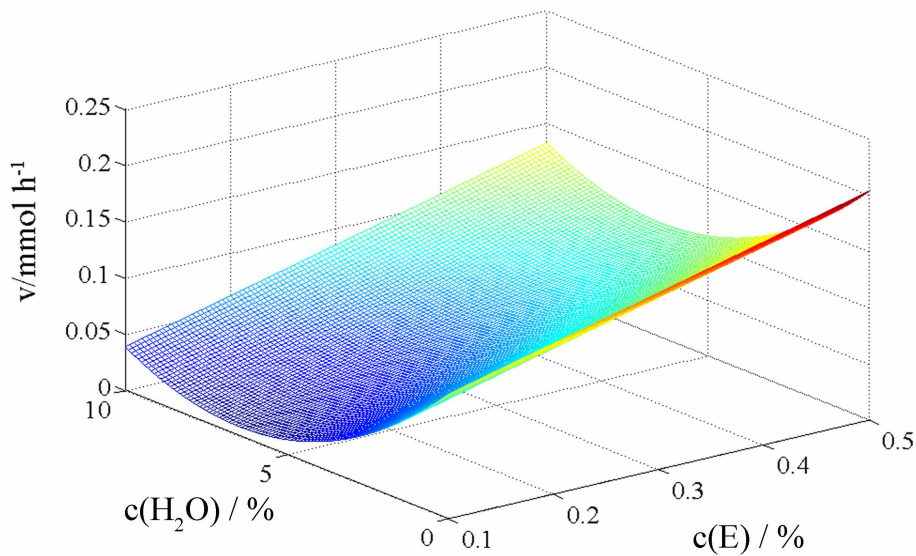
$$y_1 = 0,0596 - 0,0180 x_1 + 0,0233 x_2 - 0,0181 x_3 + 0,0131 x_1^2 + 0,0154 x_3^2 \quad (2)$$

где је  $y_1$  ( $\text{mmol h}^{-1}$ ) брзина ензимске реакције.

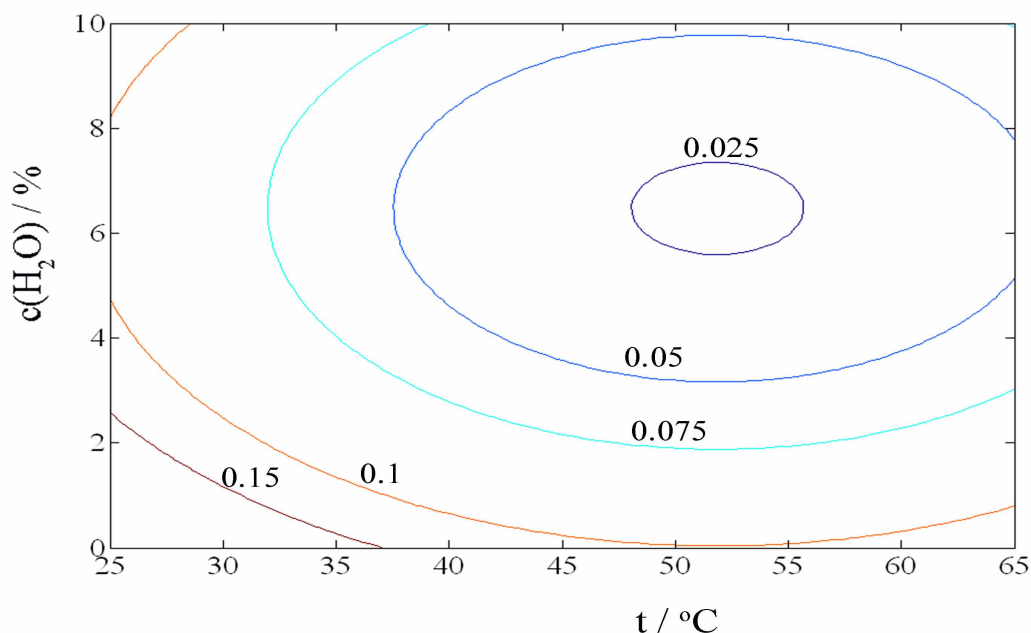
Статистичка анализа показује да је најзначајнији параметар количина ензима у реакционој смеси. Следећи највећи линеарни ефекат имају температура и количина воде. Моларни однос метанол/уље није значајније утицао на производњу биодизела. Утицаји парова фактора на принос естара су илустровани тродимензионалним дијаграмима и контурним приказима (пројекцијама одзивних површина).



Слика 3. 2. Одзивне површине концентрације ензима и температуре на брзину ензимске реакције (концентрација воде 5%, моларни однос метанол/уље 6)



Слика 3.3. Одзивне површине почетне концентрације воде и концентрације ензима на брзину ензимске реакције (моларно однос метанол/уље 6, температура 45%)



Слика 3.4. Пројекција одзивне површине брзине ензимске реакције при различитим вредностима почетне концентрације воде и температуре (моларни однос метанол/уље 6, концентрација ензима 3%)

У целом испитиваном опсегу, са порастом количине ензима расте принос трансестерификације (Слика 3.2. и Слика 3.3.). С друге стране, утицај температуре и количине додате воде су описани квадратним једначинама са минимумом вредности. Наиме, повишена температура је имала негативан утицај на брзину ензимске реакције, као и повећана концентрација воде. Највећи принос је остварен на нижим температурама, док су мале почетне концентрације воде имале позитиван утицај на брзину ензимске реакције. Минимална брзина синтезе биодизела је остварена на 52 °C и 6,7% додате воде на масу уља, док су високе стопе остварене при високим садржајем воде али на ниским температурама или при ниским садржајем воде и високим температурама (Слика 3.4.). Утицај температуре на реакцију синтезе биодизела је испитиван у широком опсегу од 25 °C до 65 °C. Изглед одзивне површине указује да повећање температуре прво доводи до наглог смањења приноса тј. брзине синтезе биодизела до 45 °C, да би даље повећање температуре резултирало благим повећањем брзине ензимске



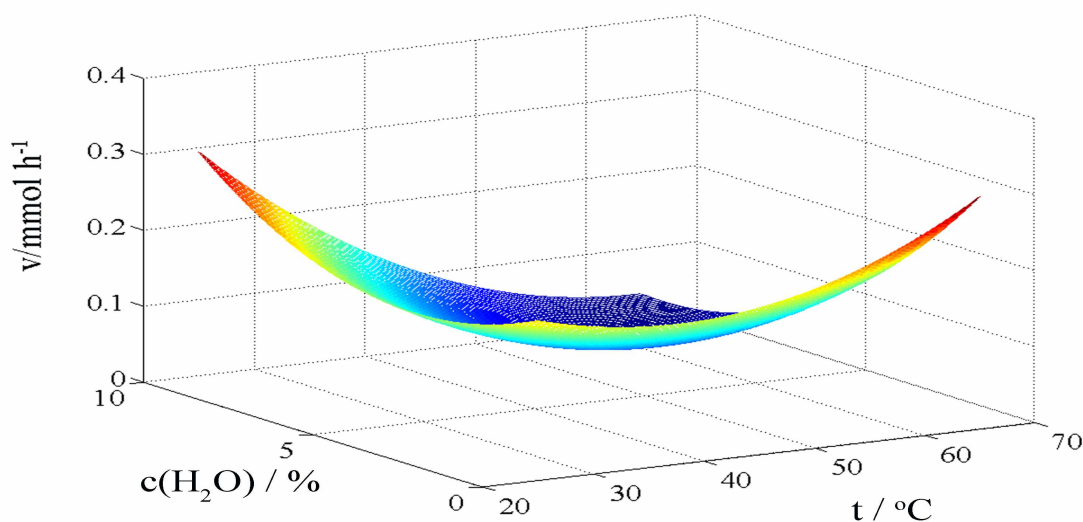
реакције. Најбољи резултати у испитиваном опсегу су примећени при најнижој температури од 25 °C. Овакав резултат указује на то да се липаза из *R. miehei*, као и неке друге липазе, липаза из *P. serasia*, *C. rugosa* или панкреасна липаза, денатурише када је изложена вишој температури дужи временски период.<sup>[140, 186, 187]</sup>

За испитивање утицаја фактора на брзину ензимске реакције по количини ензима добијен је модел другог реда са два фактора који показују међусобну негативну интеракцију:

$$y_2 = 0,0714 - 0,0198 x_1 - 0,0227 x_3 + 0,0163 x_1^2 + 0,0191 x_3^2 - 0,0219 x_1 x_3 \quad (3)$$

где је  $y_2$  ( $\text{mmol h}^{-1} \text{g}^{-1}$ ) брзина ензимске реакције по количини ензима.

Јасно је да су у другом моделу значајни параметри температура, садржај воде и интерактивни ефекат између температуре и воде. Утицај два значајна параметра је приказан на одзивној површини (Слика 3.5.) и јасно се види да се високи приноси могу добити при ниским температурама и високим садржајем воде, или обрнуто.



Слика 3.5. Одзивне површине утицаја почетне концентрације воде и температуре на брзину ензимске реакције по количини ензима (концентрација ензима 3%, моларни однос метанол/уље 6)

Поређењем ова два модела, јасно је да је у првом моделу количина ензима најзначајнији фактор са позитивним утицајем на брзину ензимске реакције, док у другом моделу та величина није утицала на брзину ензимске реакције по маси ензима. Ови резултати указују на то да, иако се повећањем количине ензима повећава брзина синтезе биодизела, то није економски оправдано јер се повећавају укупни трошкови процеса. Ипак, могу се наћи извештаји да је повећање концентрације ензима до 30% довело до повећања приноса биодизела.<sup>[89]</sup> Јасно је да брзина ензимске реакције по количини ензима представља важан параметар код процене ефикасности процеса производње биодизела.

У оба модела, моларни однос метанол/уље (3:1-9:1) није био значајан фактор за синтезу биодизела. У већини студија овај моларни однос значајно утиче на принос метил естара. Тако су Сумано (Soumanou) и сарадници са истом липазом испитивали утицај метанола на принос биодизела и најбоље резултате су остварили са моралним односом 3:1.<sup>[93]</sup> У овом случају, концентрација ензима је била драстично већа (10%) и чак и мали пораст вишка метанола је узроковао потпуну инактивацију липазе. У другим истраживањима, најбољи резултати су добијени при моларном односу метанол/уље 4:1 при још већој концентрацији ензима од 27%. Активност имобилисане липазе из *C. antarctica* је била смањена при већим концентрацијама метанола (5:1 и 6:1).<sup>[99]</sup>

Вода је фактор који је имао негативан утицај на брзину ензимске реакције. Највећа активност је остварена без додавања воде у реакциону смешу (Слика 3.5.). Повећање количине додате воде до 6,5 % је довело до наглог пада активности, док је даље повећање након те вредности довело до благог повећања. Такво понашање је последица сложеног механизма ензимске реакције трансестерификације. Оптимална количина воде је компромис између повећања ензимске активности повећањем међуфазне површине и минимизирања повратне реакције хидролизе.<sup>[47]</sup> Имобилисани ензими, међутим, показују највећу активност у системима са малом концентрацијом воде. Највећа почетна брзина трансестерификације, када се користила липаза из *P. fluorescence*, је постигнута са 0,3% додате воде у реакциони систем.<sup>[126]</sup> Способност липазе из *R. miehei* да катализује реакцију при изузетно малим вредностима активности воде је и раније документована и

доказано је да је липаза остала веома активна када је активност воде била испод 0,0001.<sup>[188]</sup>

Анализа помоћу Студентовог теста је показала да је коефицијент интеракције између температуре и количине воде сигнификантан. Овај коефицијент има негативну вредност, што упућује на закључак да је синтеза успешнија када један од ових фактора има ниску вредност, док други има високу вредност. Изглед одзивне површине ова два фактора то и потврђује: ензим је изузетно термостабилан при малим садржајима воде, док реакцији погодује велика количина воде само при ниским температурама. Ензим је подложен денатурацији при високим температурама и великом садржају воде. Такође, када је у систему присутна већа количина воде фаворизована је реакција хидролизе, посебно при високим температурама.

У овом сету експеримената је доказано да су коришћени модели за анализу утицаја различитих фактора на синтезу метил-естара липазом уз *R. miehei* били адекватни. Температура и количина додате воде у систем су значајно утицали на синтезу биодизела, и ти утицаји су описани квадратном функцијом. Што је најважније, методом одзивних површина омогућено је одређивање међусобног негативног утицаја између температуре и количине воде, што се не би могло запазити у конвенционалној методи која подразумева варирање једног од испитиваних фактора при константним вредностима осталих фактора. Највећи принос, од 10,15 mol kg<sup>-1</sup> ензима остварен је при следећим параметрима реакције: 45°C, моларни однос метанол/уље 6:1 и без додате воде у систем. Резултати овог истраживања такође указују, на основу поређења са претходно наведеним резултатима из литературе постигнутим у другим системима, да ензимска синтеза биодизела, липазом из *R. miehei*, није економски прихватљива када се изводи у шаржном систему, упркос одређеном повећању приноса производа.

### 3.3. Оптимизација ензимског поступка синтезе биодизела имобилисаном липазом из *Candida antarctica*

Као и у претходном сегменту, метанолиза је вршена тростепеним додавањем метанола у реакциону смешу у складу са динамиком потрошње како би се спречила инактивација ензима у присуству вишка метанола. Применом ротатабилног композиционог експерименталног плана испитан је утицај иста четири параметра на пет нивоа: почетне концентрације воде, концентрације ензима, моларног односа метанол/уље и температуре. Регресионом и дисперзионом анализом испитана је адекватност регресионог модела. Установљено је да је вредност Фишеровог критеријума 2,6907. Пошто је таблична вредност овог критеријума за праг значајности од 0,05 (5%) једнака 4,67, дакле, већа од израчунате вредности за дате експерименталне услове, модел је адекватан. Сигнификантност коефицијената регресије испитана је применом Студентовог теста. Експерименти су изведени насумичним распоредом да би се елиминисале евентуалне систематске грешке експеримената. Добијен је регресиони модел другог реда, са четири сигнификантна параметра, са четири међусобне интеракције:

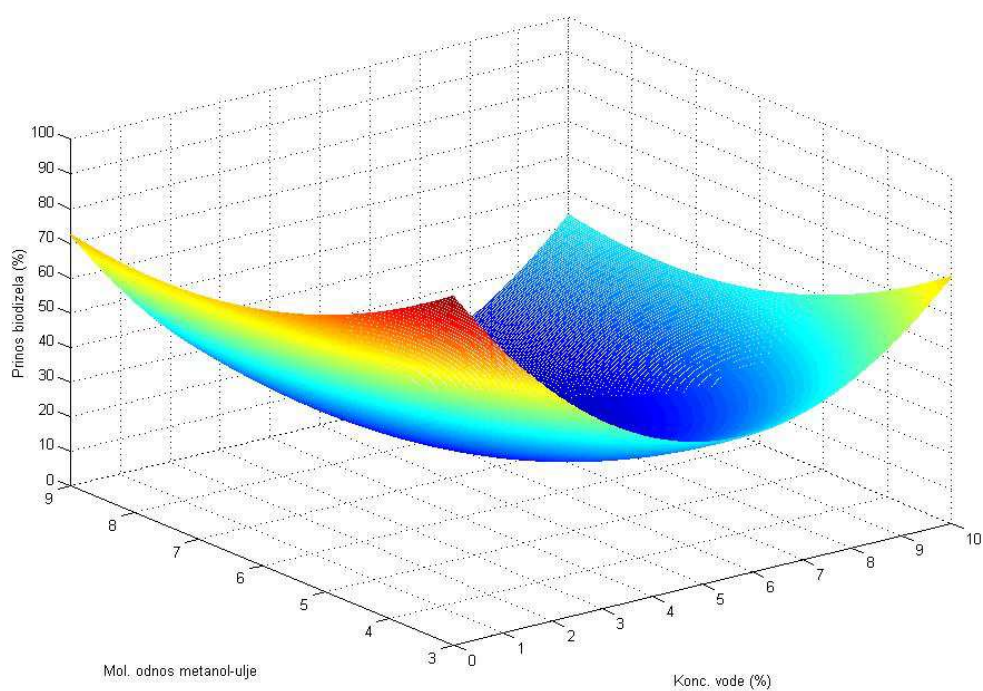
$$y = 14,0402 + 4,6946 x_1 + 6,2742 x_2 - 7,3659 x_3 - 7,0023 x_4 - 1,3624 x_1^2 + 11,2386 x_3^2 + 3,2240 x_4^2 + 2,8901 x_1 x_2 - 3,4352 x_1 x_4 - 1,5009 x_2 x_3 - 2,1591 x_2 x_4 \quad (4)$$

Статистичка анализа показује да је најзначајнији параметар почетна концентрација воде у систему. Позитивну међусобну интеракцију показују само температура и количина ензима док негативну интеракцију показују температура и моларни однос метанол/уље, количина ензима и количина воде као и количина ензима и моларни однос метанол/уље.

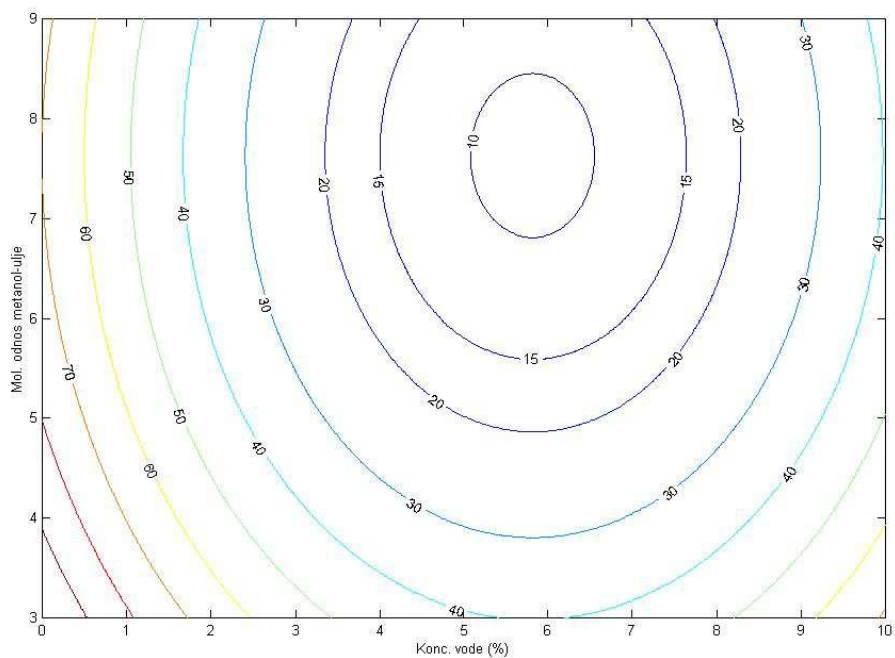
Табела 3.3. Експериментални дизајн у складу са ротатабилним планом са четири фактора на пет нивоа и експериментално добијени приноси биодизела (P, %)

Бр. ек.	$X_1$ (°C)	$X_2$ (% у односу на масу уља)	$X_3$ (% у односу на масу уља)	$X_4$ (mol/mol)	P (mol%)
1	35 (-1)*	2 (-1)	2.5(-1)	4.5 (-1)	17,23
2	55 (1)	2 (-1)	2.5(-1)	4,5 (-1)	27,83
3	35 (-1)	4 (1)	2.5(-1)	4,5 (-1)	28,23
4	55 (1)	4 (1)	2.5(-1)	4,5 (-1)	62,44
5	35 (-1)	2 (-1)	7.5(1)	4,5 (-1)	11,16
6	55 (1)	2 (-1)	7.5(1)	4,5 (-1)	25,34
7	35 (-1)	4 (1)	7.5(1)	4,5 (-1)	23,19
8	55 (1)	4 (1)	7.5(1)	4,5 (-1)	40,93
9	35 (-1)	2 (-1)	2.5(-1)	7,5 (1)	15,20
10	55 (1)	2 (-1)	2.5(-1)	7,5 (1)	15,12
11	35 (-1)	4 (1)	2.5(-1)	7,5 (1)	20,55
12	55 (1)	4 (1)	2.5(-1)	7,5 (1)	32,15
13	35 (-1)	2 (-1)	7.5(1)	7,5 (1)	9,50
14	55 (1)	2 (-1)	7.5(1)	7,5 (1)	11,17
15	35 (-1)	4 (1)	7.5(1)	7,5 (1)	14,15
16	55 (1)	4 (1)	7.5(1)	7,5 (1)	22,99
17	25 (-2)	3 (0)	5(0)	6 (0)	7,50
18	65 (2)	3 (0)	5(0)	6 (0)	14,41
19	45 (0)	1 (-2)	5(0)	6 (0)	6,66
20	45 (0)	5 (2)	5(0)	6 (0)	25,85
21	45 (0)	3 (0)	0(-2)	6 (0)	90,52
22	45 (0)	3 (0)	10(2)	6 (0)	32,36
23	45 (0)	3 (0)	5(0)	3 (-2)	47,43
24	45 (0)	3 (0)	5(0)	9 (2)	11,23
25	45 (0)	3 (0)	5(0)	6(0)	16,11
26	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	14,97
27	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	13,96
28	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	12,01
29	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	13,02
30	45 (0)	3 (0)	5(0)	6 (0)	11,80

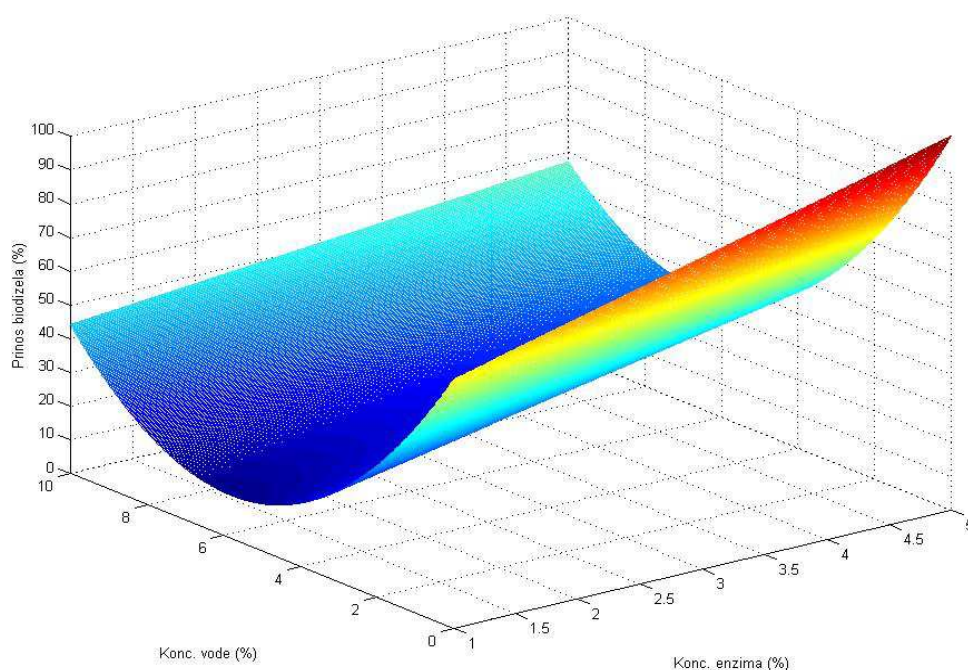
\*) Бројеви у заградама означава кодиране вредности параметара;  $X_1$ , температура;  $X_2$ , концентрација ензима по маси уља;  $X_3$ , концентрација воде по маси уља;  $X_4$ , моларни однос метанол/уље; P, принос биодизела



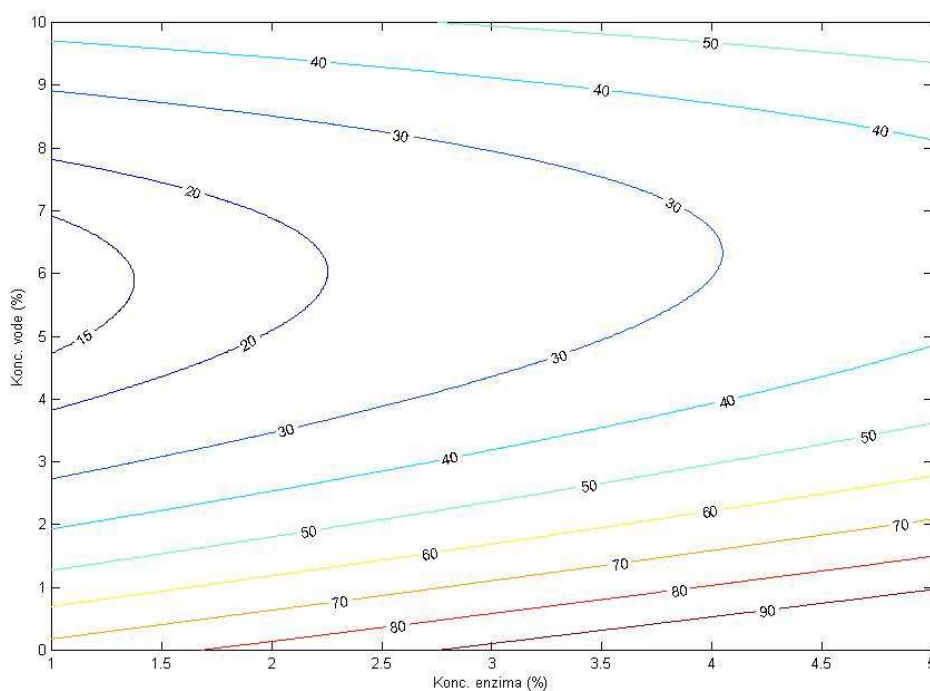
Слика 3.6.а Одзивне површине утицаја моларног односа метанол/уље и почетне концентрације воде на синтезу биодизела (температура 45°C, концентрација ензима 3%)



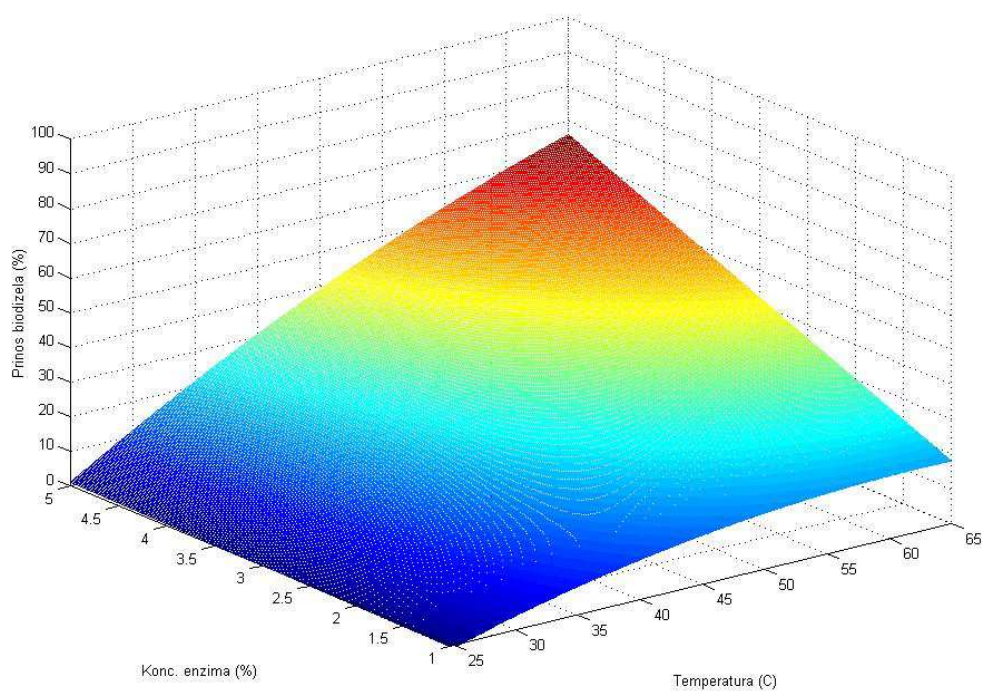
Слика 3.6.б Пројекција одзивне површине приноса биодизела при различитим вредностима моларног односа метанол/уље и концентрације воде (температура 45°C, концентрација ензима 3%)



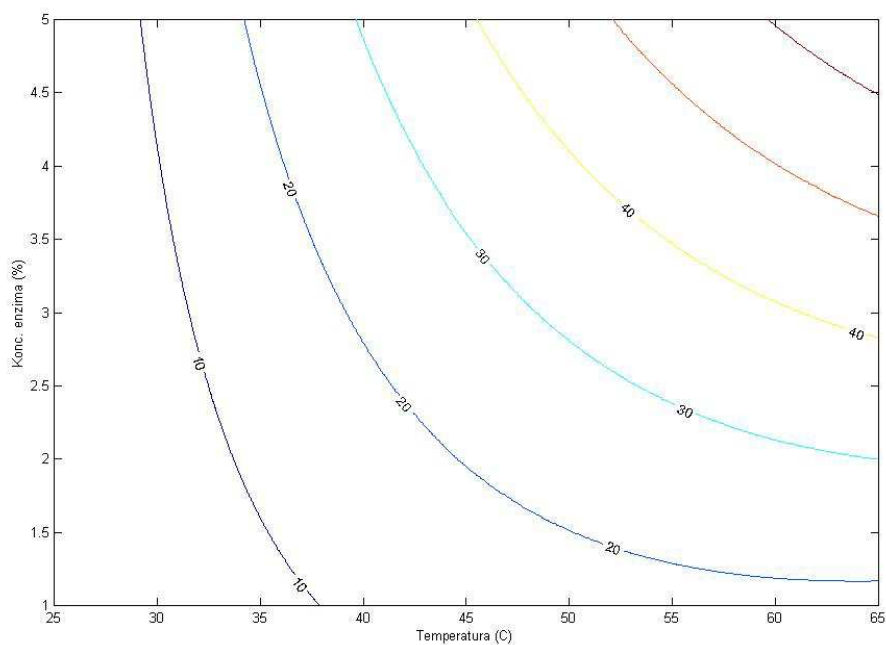
Слика 3.7.a Одзивне површине утицаја почетне концентрације воде и концентрације ензима на синтезу биодизела (моларни однос метанол/уље 6, температура 45°C)



Слика 3.7.b Пројекција одзивне површине приноса биодизела при различитим вредностима почетне концентрације воде и концентрације ензима (моларни однос метанол/уље 6, температура 45°C)

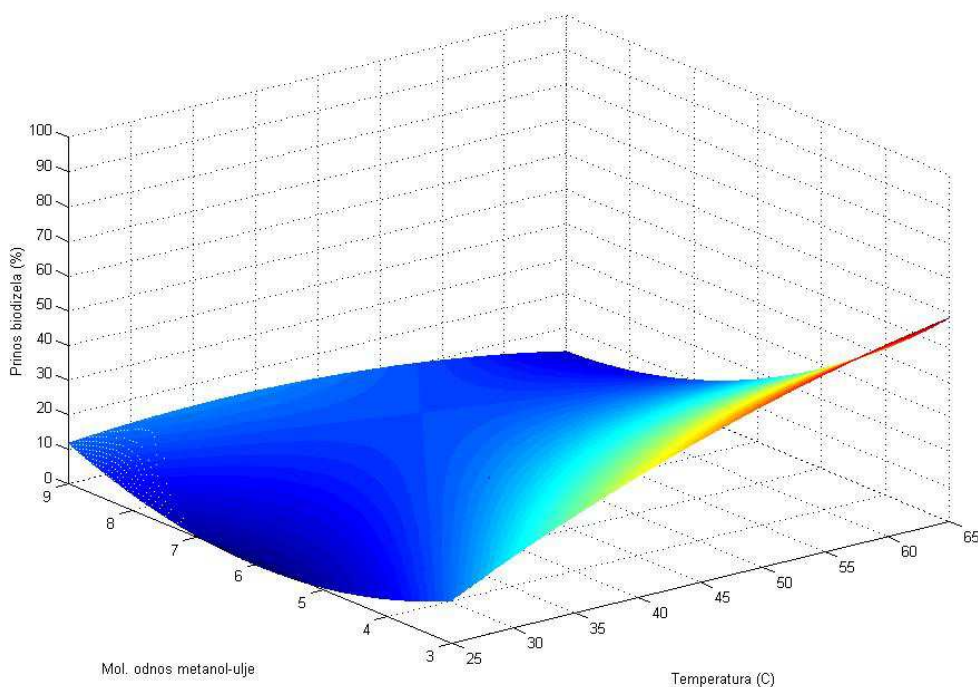


Слика 3.8.a Одзивне површине утицаја концентрације ензима и температуре (концентрација воде 5%, моларни однос метанол/уље 6)

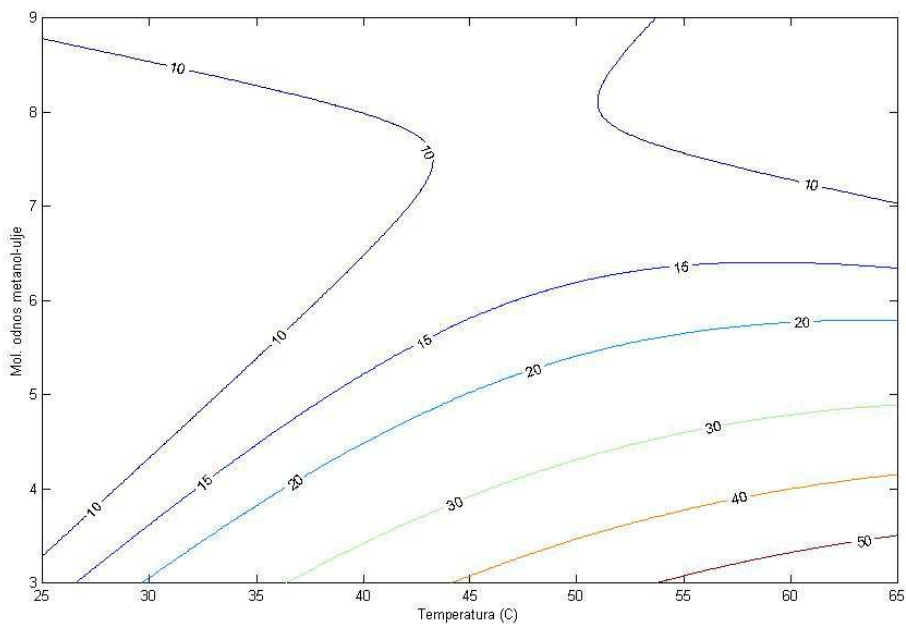


Слика 3.8.b Пројекција одзивне површине приноса биодизела при различитим вредностима концентрације ензима и температуре (концентрација воде 5%, моларни однос метанол/уље 6)





Слика 3.9.a Одзивне површине утицаја моларног односа метанол/уље и температуре (концентрација ензима 3%, концентрација воде 5%)



Слика 3.9.b Пројекција одзивне површине приноса биодизела при различитим вредностима моларног односа метанол/уље и температуре (концентрација ензима 3%, концентрација воде 5%)

Из модела се може уочити да су најважнији параметри за синтезу биодизела почетна концентрација воде и моларни однос метанол/уље. На слици 3.6.a и 3.6.b су приказане регресионе криве и њихове пројекције приноса биодизела у функцији од почетне концентрације воде и моларног односа метанол/уље на 55 °C за концентрацију ензима од 5% (рачунато на масу уља). У целом опсегу моларног односа метанол/уље, принос биодизела се смањује са порастом концентрације воде до 6%, док се даљим порастом концентрације након те вредности, принос повећава. Тако се при моларном односу метанол/уље 6:1 највећи принос (преко 99%) добија при најмањем садржају воде, односно, без додате воде у реакциону смешу. Сличан тренд је уочен и за интеракцију количине ензима и концентрације воде: највећи принос од 92,2% је остварен при најмањем садржају воде, односно без додатка воде у систем (0%), и највећој концентрацији ензима (5% у односу на масу уља) (слике 3.7.a и 3.7.b).

Механизам реакције естерификације је релативно сложен: уље се најпре хидролизује до слободних масних киселина и парцијалних глицерида а затим се слободне масне киселине естерификују метанолом. Одређена количина воде у систему је неопходна да би се спречила инактивација ензима и да би се омогућила почетна хидролиза триглицерида, али вишак воде може да стимулише и компетитивну реакцију хидролизе метилестара. Оптимални садржај воде обезбеђује одигравање хидролизе у довољној мери да настану слободне масне киселине које ће реаговати са метанолом, али да не превлада хидролиза новонасталих метил естара. Висок принос при малим концентрацијама воде упућује на чињеницу да макропорозни носач на који је имобилисана липаза из *S. antarctica* садржи довољну количину воде за одржавање активне конформације ензима. Тамалампуди (Tamalampudi) је користећи исту липазу закључио да се степен метанолизе смањује са повећањем садржаја воде у систему, при чему је остварен максимални принос од 75% у систему без додате воде.<sup>[189]</sup>

Температура и концентрација ензима имају позитиван утицај на принос биодизела и изражену позитивну међусобну интеракцију (Слика 3.8.a и 3.8.b). То значи да са порастом концентрације ензима долази до померања температурних оптимума ка вишим вредностима, као и до повећања приноса. Максимални приноси се могу добити када се ради на високим температурама и при високој концентрацији

ензима, при чему се достиже принос од 85,1% на 65 °C за концентрацију ензима од 5% (рачунато на масу уља). Имобилисана липаза из *C. antarctica* је прилично стабилна у системима без органског растварача те се температурни оптимум помера ка вишим вредностима у односу на слободне липазе.<sup>[190]</sup> Више температуре имају негативан утицај на принос биодизела само у систему у ком постоји вишак метанола. На сликама 3.9.a и 3.9.b је приказан принос биодизела у функцији од моларног односа метанол/уље и температуре при концентрацији воде и концентрацији ензима 2,5% и 5% респективно. Види се да је интеракција између температуре и моларног односа реактанта негативна. Повећање моларног односа метанол/уље доводи до смањења температурног оптимума, као и приноса биодизела. Најнижи приноси се могу очекивати у систему са вишком метанола и на вишим температурама. Овакво понашање липазе из *C. antarctica* може бити последица брже денатурације при истовременом дејству повишене температуре и велике концентрације метанола. Да би се смањила дифузиона ограничења и повећала брзина реакције потребно је додати алкохол у вишку у односу на стехиометријски потребну количину (3:1). У типичној реакцији метанолизе, услед слабе растворљивости метанола у уљу, реакциона смеша се састоји из две фазе. У контакту липаза са нерастворним капљицама алкохола, које постоје у уљу, алкохол се адсорбује на имобилисани ензим, блокира приступ триглицерида, због чега се смањује активност ензима, долази до његове инактивације и смањења приноса биодизела. Стога је веома битно знати оптимални однос метанол/уље за различите врсте липаза да би се избегла денатурација ензима и повећао принос биодизела.

Као и у претходном сегменту, ови резултати указују на значај правилног избора реакционих услова како би се остварио максималан принос биодизела у систему без органског растварача. Приказане тродимензионалне одзивне површине и њихове пројекције указују на жељене комбинације параметара који би омогућиле остваривање максималних приноса. Да би се смањила цена производње и потрошња ензима изабрани оптимални услови за синтезу биодизела су следећи: 45 °C, 3% ензима (на масу уља), моларни однос метанол/уље 3:1, без додате воде у систем. При оваквим условима, може се остварити принос од преко 90% после 50h реакције. Оваки резултати су веома охрабрујући имајући на уму да

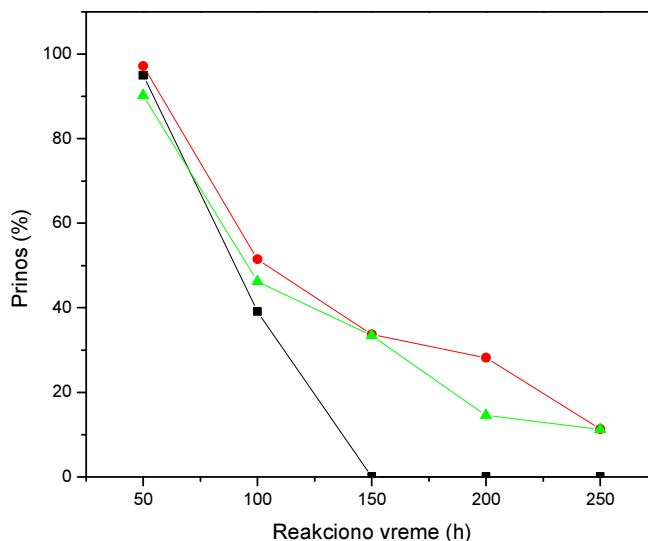
је постигнут висок принос са малом концентрацијом ензима. Користећи исту липазу и уље уљане репице, Чанг (Chang) и сарадници су остварили принос од 97,9% после 12,4h реакције али са концентрацијом ензима од 42,3% у односу на масу уља.<sup>[191]</sup>

### 3.4. Утицај ацил акцептора на синтезу биодизела

Важан параметар који утиче на економску оправданост процеса је стабилност биокатализатора и могућност његовог поновног коришћења током дужег временског периода. На основу претходно добијених резултата, и оптималних реакционих услова, испитали смо могућност вишестурке примене имобилисане липазе из *C. antarctica* у реакцији метанолизе синцокретовог уља. Иако је у првом циклусу остварен принос од 95%, активност је значајно пала у другом циклусу, док је у трећем циклусу липаза била практично инактивирана и принос је износио око 5% (Слика 3.14). Овакви резултати су у складу са претходно добијеним, где је преостала активност истог ензима у реакцији метанолизе са чак 50% ензима (у односу на масу уља) пала испод 12%.<sup>[192]</sup>

У покушају да се побољша стабилност имобилисаног система испитана је могућност коришћења различитих ацил акцептора. Најпре је испитана могућност примене разгранатог и алкохола дужег ланца: 2-пропанола и 1-бутанола. Предност употребе ових алкохола огледа се у томе што се са повећањем броја угљеникових атома повећава и октански број као и садржај топлоте горива. Друге предности су и снижавање температуре на којој је гориво оперативно чиме се побољшавају хладна паљења, снижава се температура течења и температура магљења, повишава се температура паљења што унапређује рад мотора и безбедност руковања. Зато се естри масних киселина разгранатих алкохола, или алкохола дужег ланца, могу користити и као адитиви за горива.<sup>[92, 170]</sup> Утицај врсте ацил акцептора на активност и стабилност ензима испитан је у тростепеном поступку (50h) у систему без органског растварача, на 45 °C након чега се ензим рециклира и поново користи. И са 2-пропанолом и 1-бутанолом остварени су високи приноси у првом циклусу: 96,85% и 89,31%. Међутим, већ у трећем циклусу, са оба алкохола, долази до пада активности за скоро 70%, односно 85%,

да би у петом циклусу принос био испод 10% (Слика 3.10.).

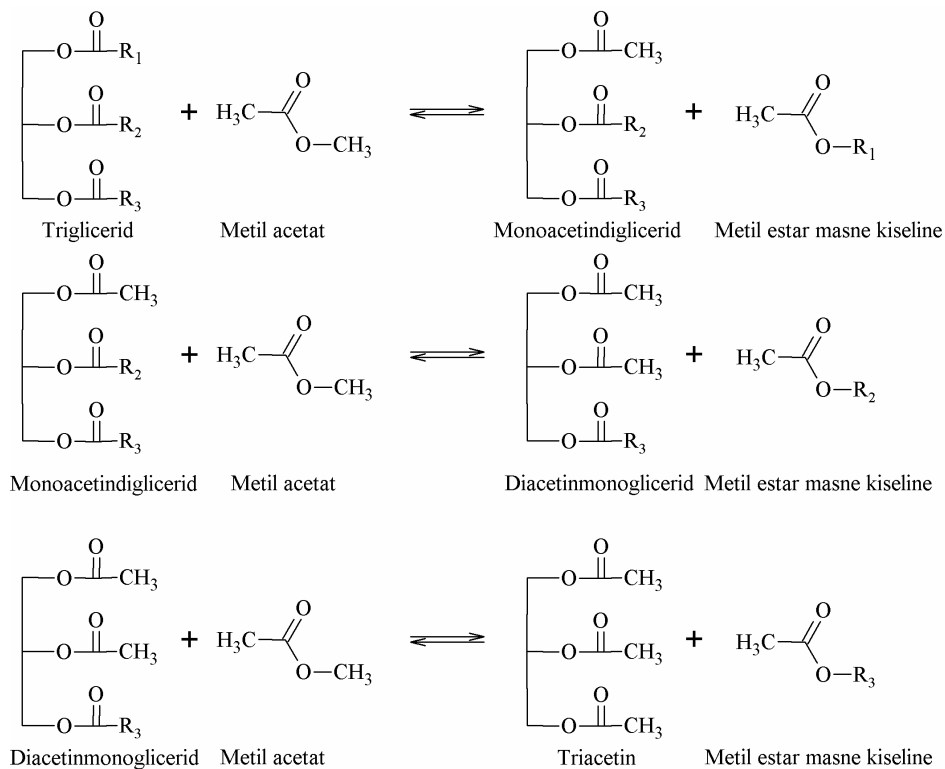


Слика 3.10. Стабилност ензима у поновљеним циклусима (■) метанол, (●) 2-пропанол, (▲) 1-бутанол. Реакциони услови: температура 45 °С, концентрација ензима 3% на масу уља, тростепени поступак у трајању од 50h

Замена метанола са мање поларним алкохолима је резултирала само у благом повећању активности липаза, пошто и даље долази до значајне инактивације ензима. То може бити спрегнути ефекат инактивације ензима услед дејства самих ацил акцептора и насталих производа реакције, односно глицерола. Глицерол је хидрофобан и лако се адсорбује на површину имобилисане липазе, што такође утиче на активност липазе и њену оперативну стабилност.

Зато је испитивана могућност коришћења и других нуклеофила осим алкохола у реакцији синтезе биодизела. Као атрактиван ацил акцептор показао се метил-ацетат. Он потенцијално има них предности у односу на метанол. Вишак метанола, као што је већ доказано, доводи до инактивације ензима, услед чега се процес мора водити тростепено што га чини знатно комплекснијим. У случају метил-ацетата, могуће је да се процес одвија једностепено. Такође, у реакцији са метанолом као нуспроизвод се ствара глицерол који такође може да инактивира ензим. За разлику од реакције трансестерификације, у реакцији интерестерификације, један естар замењује своју алкохолну групу са другим естром. Одсуство алкохола у смеси значи да се реакциона смеша мења из

поларне у мање поларну што има посебних предности у ензимски катализованој реакцији. Ова комплексна реакција се састоји из три узастопне реверзибилне реакције приказане на слици 3.11.

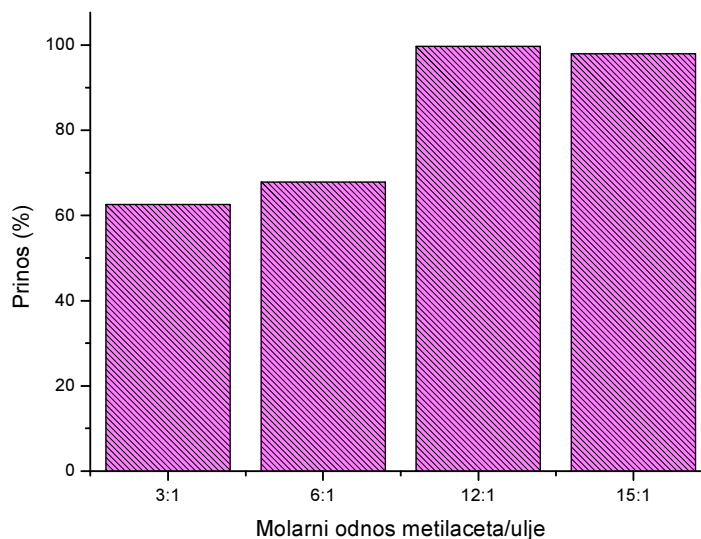


Слика 3.11. Механизам реакције интерестерификације

У реакцији са метил-ацетатом, повећава се стабилност липазе, јер се уместо глицерола синтетише триацетилглицерол, који нема негативан утицај на активност и стабилност липазе. Такође, триацетилглицерол је важан нуспродукт који се користи као пластификатор и адитив у производњи полимера и експлозива.<sup>[193, 194, 195]</sup> Утврђено је да се триацетин може користити и као адитив за гориво, или се чак може додати у биодизел гориво са циљем побољшања његових перформанси.<sup>[196, 197]</sup>

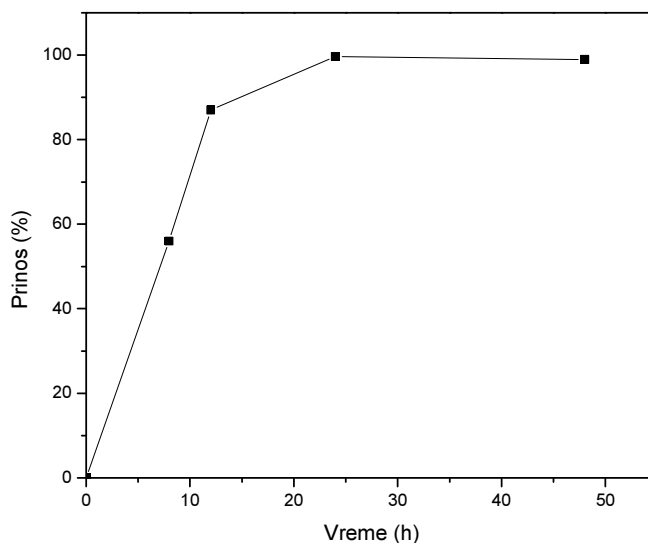
Најпре је испитан утицај почетног моларног односа метил-ацетат/уље на принос биодизела. Од четири испитана моларна односа 3:1, 6:1, 12:1 и 15:1 најбољи резултати су добијени у великом вишку метил-ацетата. Са графика се може приметити да је високи принос, преко 90%, добијен са моларним односом 12:1 и 15:1, али је очигледно економски исплатљивије користити мањи моларни

однос (Слика 3.12.).



Слика 3.12. Утицај моларног односа реактаната на принос биодизела. Реакциони услови: температура 45 °С, концентрација ензима 3% на масу уља, једностапено поступак

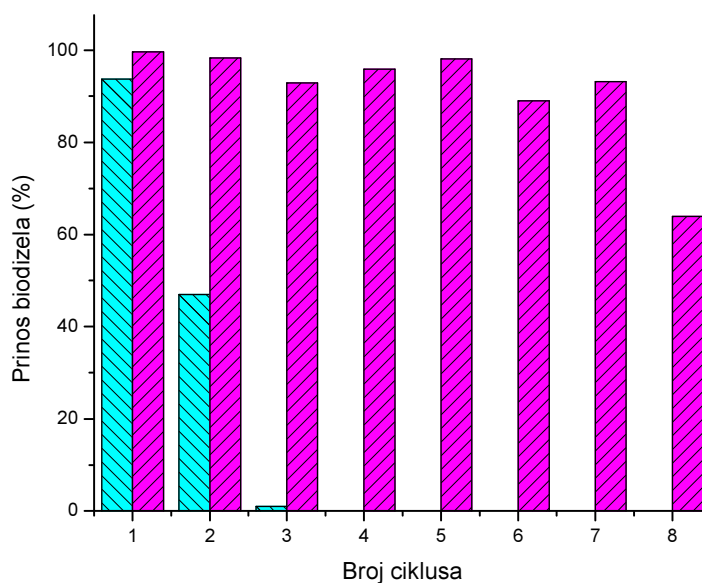
При том моларном односу испитали смо кинетику реакције која је приказана на слици 3.13. Утврђено је да се равнотежа успоставља већ након 24h при чему је остварен принос од преко 90%. При оваквим параметрима реакције (моларни однос метил-ацетат/уље 12:1, маса ензима 3% у односу на масу уља, температура 45°C), у шаржном систему, остварен је принос од 99,6 % за 24 h. Види се да је употребом метил-ацетата и применом једностапеног поступка знатно поједностављен процес синтезе биодизела, а такође је и скраћено време реакције са 50 h на 24 h.



Слика 3.13. Утицај дужине трајања реакције на принос биодизела. Реакциони услови: температура 45 °С, концентрација ензима 3% на масу уља, једностепени поступак

Данас главну баријеру индустријској имплементацији ензимске синтезе биодизела представља висока цена ензима. Зато је у циљу постизања економичности процеса неопходно повећати оперативну стабилност система. У циљу испитивања могућности рецикулације биокатализатора, имобилисани ензим је по завршетку реакције издвајан филтрацијом и поново коришћен у новом шаржном процесу. Утврђено је да се ензим може користити седам пута готово без губитка почетне активности (принос је износио  $95,65\% \pm 2,01$ ), да би у осмом циклусу активност опала (принос 63,96%). Ово указује да је ензим значајно стабилнији у присуству метил-ацетата у току дужег коришћења (200 h), за разлику од метанола када је ензим изгубио активност већ након трећег циклуса (Слика 3.14.)

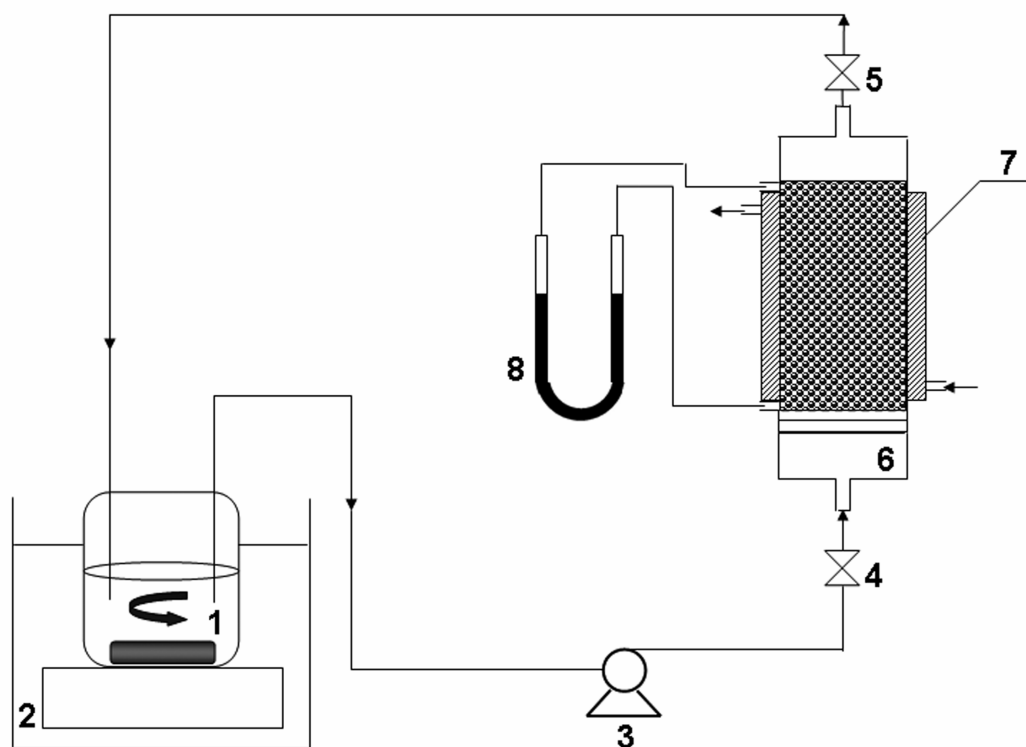




Слика 3.14. Оперативна стабилност ензима у синтези биодизела у шаржном реактору са метил-ацетатом (■) и метанолом (■) Реакциони услови: температура 45 °С, концентрација ензима 3% на масу уља

### 3.5. Ензимска синтеза биодизела у реактору са пакованим слојем

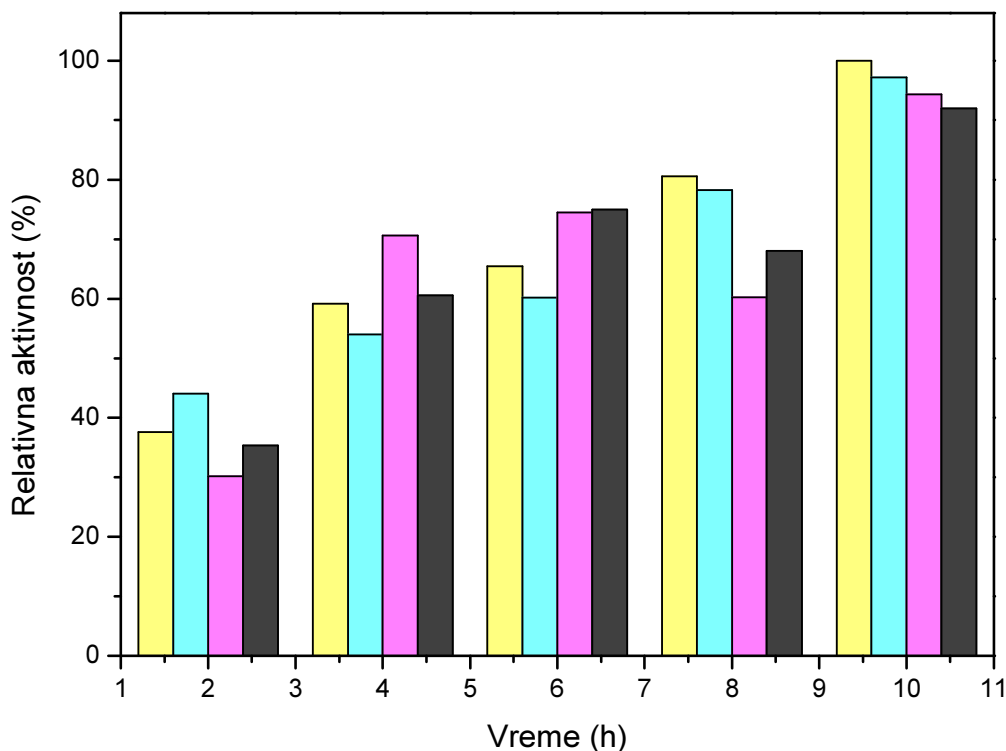
Важан аспект имплементације липаза у индустријску производњу биодизела је развој ефикасног реакторског система. Правилним избором реакторске конфигурације и услова рада, имобилисани ензими пружају одличну перспективу за постизање високе вредности конверзије, побољшане стабилности ензима, а тиме и продужено оперативно време и исплативе индустријске ензимске процесе. Реактор са пакованим слојем се често употребљава за ензимске реакције великих размера. Такви реактори омогућавају континуалну производњу са високим процентом ефикасности и смањују денатурацију ензима смицајним силама које су честе код реактора са идеалним мешањем. Осим тога, у реактору са пакованим слојем се добија већи принос по маси ензима у односу на шаржни и реактор са флуидизованим слојем.<sup>[23]</sup>



Слика 3.15. Реакторски систем са пакованим слојем: (1) Резервоар са реакционом смешом (метил-ацетат/уље), (2) Магнетна мешалица, (3) Перисталтичка пумпа, (4) Вентил за узорковање (улаз), (5) Вентил за узорковање (излаз), (6) Реактор са пакованим слојем (имобилисана *C. antarctica*), (7) Водени плашт, (8) Манометар

Испитана је могућност синтезе биодизела у реакцији интерестерификације метил- и етил-ацетатом сунцокретовог уља у реактору са пакованим слојем помоћу липазе из *C. antarctica* (Слика 3.15.). Реакција је вођена на 45°C при моларном односу супстрата 12:1 у систему без растварача. Маса ензима је износила 3% према маси уља. Испитан је утицај времена задржавања реакционе смеше на степен конверзије у систему, а будући да оперативна стабилност има пресудан утицај при коришћењу ензима, утврђен је број реакционих циклуса у оквиру којих систем остаје стабилан. Време задржавања је чинилац који одређује време контакта између ензима и супстрата. Реакциона смеша је увођена у систем улазним током при запреминским протоцима: 9,6, 16,6, 21,0 и 55,0 cm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>. Добијени резултати су приказани на слици 3.16. Евидентно је да промена запреминског протока, односно времена задржавања, у испитаном опсегу нема утицај на принос. Овакви резултати указују да су дифузионе лимитације занемарљиве обзиром да повећање брзине протицања не доводи до повећања

приноса. Такође, може се и приметити да је реакција веома брза будући да смањење времена задржавања не узрокује смањење приноса у испитаном опсегу.

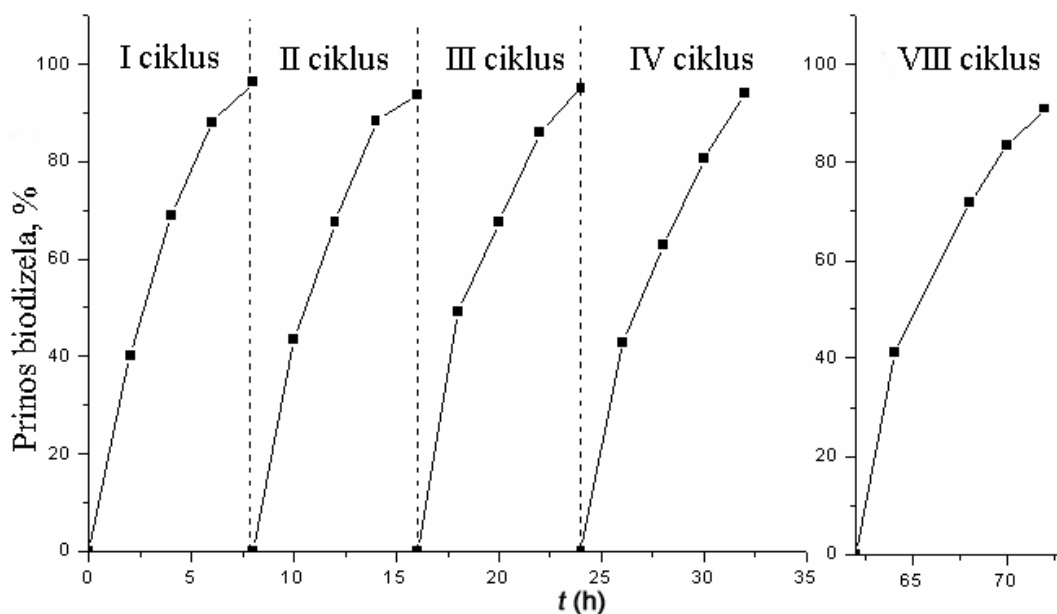


Слика 3.16. Утицај брзине протока реакционе смеше на степен конверзије биодизела у реактору са пакованим слојем у току 10h. (■) 9,6 cm³ min⁻¹, (■) 16,6 cm³ min⁻¹, (■) 21,0 cm³ min⁻¹, (■) 55,0 cm³ min⁻¹

Овакав резултат је интересантан имајући у виду да у већини случајева, дуже време задржавања погодује већем приносу јер је остварен бољи контакт ензима и супстрата. Тако је Ни (Nie) у реакцији синтезе биодизела од отпадних уља и метанола липазом из *Candida* sp. 99-125, потврдио пад приноса са повећањем брзине протицања смеше.<sup>[125]</sup> Шо (Shaw) и сарадници су се бавили континуалном синтезом биодизела из сојиног уља и метанола користећи комерцијалну имобилисану липазу из *C. antarctica* Novozyme 435. Реакција је вођена на 50 °C при моларном односу метанол/уље 4:1. Ради утврђивања утицаја брзине протицања реакционе смеше на степен конверзије варирали су проток у интервалу 0,1-0,5 cm³ min⁻¹. Највећи степен конверзије од 75% је остварен при најмањој

брзини протицања (најдуже време задржавања), при чему степен конверзије константно опада са повећањем запреминског протока.<sup>[198]</sup> Као и у претходним случајевима, закључује се да дуже време задржавања погодује већем приносу јер је остварен бољи контакт ензима и супстрата, тј. реакција је потпунија.

Стабилност имобилисане липазе у реактору са пакованим слојем је испитана при истим процесним параметрима и протоком од  $16,6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Стабилност система приказана као релативна активност је дата на слици (активност постигнута у првом циклусу је означена са 100%, апсолутна активност првог циклуса износи 47,22%).

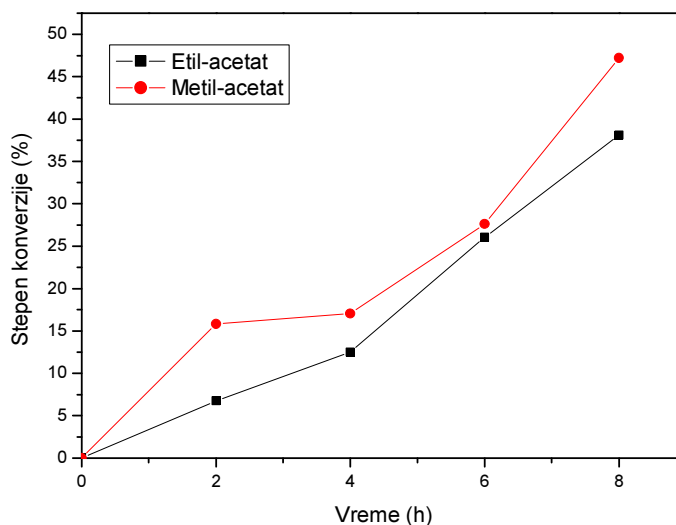


Слика 3.17. Синтеза метил естера у низу циклуса у реактору са пакованим слојем ( $45 \text{ }^\circ\text{C}$ , 3% ензима, брзина протицања  $16,6 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ ).

Резултати приказани на слици 3.17. показују да у реактору са пакованим слојем нема изразитог пада активности у 8 циклуса, однос преко 72 h рада. Скоро исти принос је добијен у првом као и у осмом циклусу ( $93,6 \pm 3,75\%$ ), што указује да ензим не губи своју активност чак ни у великом вишку метил-ацетата. Халим (Halim) и сарадници су испитивали оперативну стабилност имобилисане липазе у реактору са пакованим слојем, у реакцији метанолизе у присуству 2-метил-2-пропанол као растварача. Систем је био оперативан преко 120 сати. Међутим, коришћење растварача доприноси повећању трошкова производње, а сам процес чини мање еколошки прихватљивим. Стога је процес интерестерификације

сунцокретовог уља са метил-ацетатом, у систему без органског растварача, веома атрактиван и перспективан процес са потенцијалном индустријском применом.

Паралелно са метил-ацетатом, испитана је и могућност коришћења етил-ацетата у синтези биодизела у реактору са пакованим слојем. Доказано је да се са повећањем броја угљеникових атома повећава и цетански број као и топлотна моћ горива.<sup>[130, 132, 199]</sup> Прелиминарна испитивања су показала да се са етил-ацетатом као ацил-акцептором остварују знатно нижи приноси у шаржном реактору. При истим реакционим условима (45 °C, моларни однос супстрата 12:1, маса ензима 3% према маси уља) остварен је принос од 99,67% и 51,1% за метил- и етил-ацетат. Знатно већи степен конверзије се може приписати већој реактивности метил-ацетата у односу на етил-ацетат. У реактору са пакованим слојем та разлика је мања, па је максимални остварени принос за метил-ацетат 47,22%, док је за етил-ацетат 38,11%. На слици 3.18. приказан је упоредни ток синтезе метил и етил естра масних киселина у реактору са пакованим слојем.

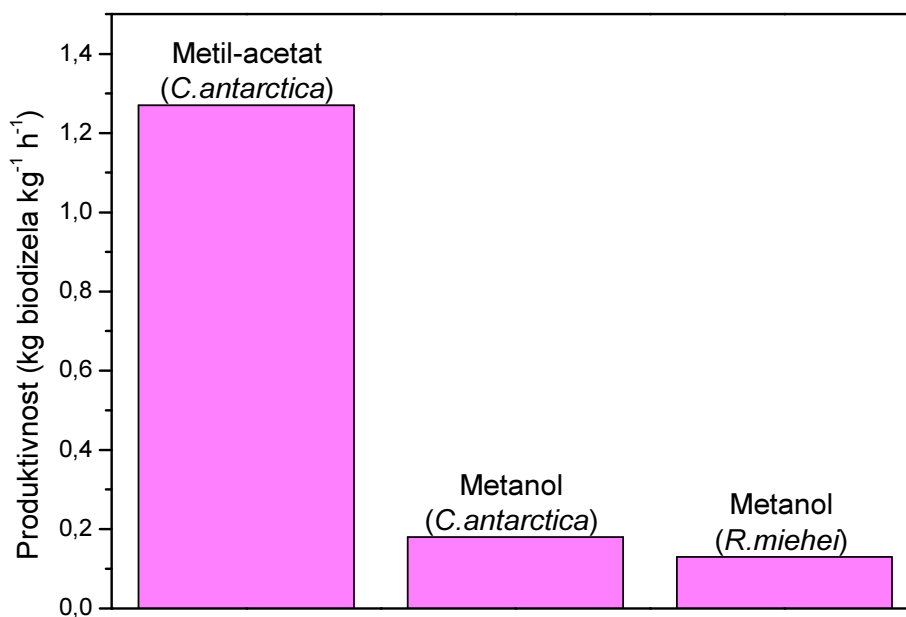


Слика 3.18. Синтеза метил- и етил-естара масних киселина у реактору са пакованим слојем. Реакциони услови: температура 45 °C, моларни однос супстрата 12:1, маса ензима 3% према маси уља

Продуктивност ензима представља најмеродавнији квантитативни критеријум оцене ефикасности ензимског процеса. Упоређени су резултати који су добијени под оптималним условима у три различита система и то:

1. систем са имобилисаном липазом из *C. antarctica* када се користи метил-ацетат као ацил акцептор,
2. систем са имобилисаном липазом из *C. antarctica* када се користи метанол као ацил акцептор и
3. систем са имобилисаном липазом из *R. miehei* када се користи метанол као ацил акцептор.

На основу добијених резултата приказаних на слици 3.18. може се закључити да се највећа продуктивност постиже када се као реактант користи метил-ацетат. Сасвим је јасно да овај процес има велику перспективу за индустријску производњу биодизела.



Слика 3.18. Поређење продуктивности различитих система.

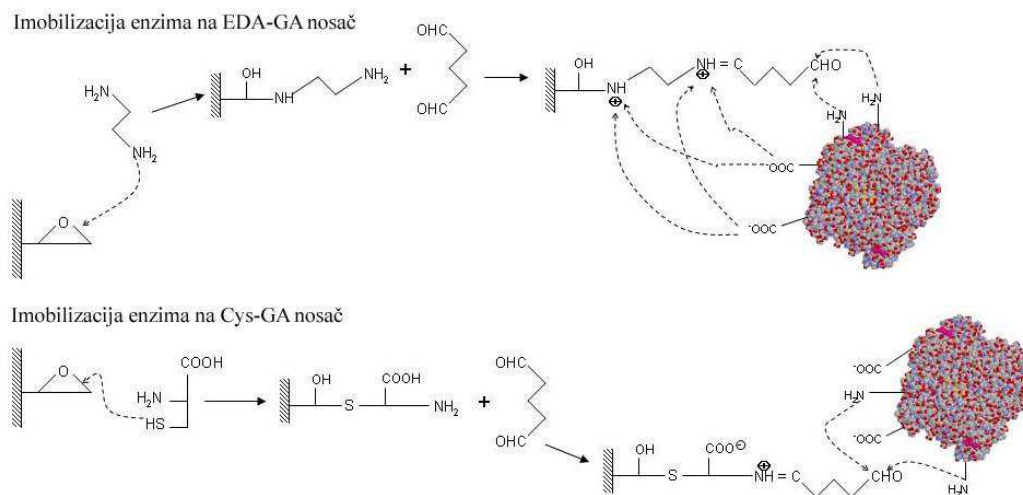
### 3.6. Примена полиметакрилатних носача модификованих цистеином у имобилизацији липазе

Једна од главних препрека за примену ензима у синтези биодизела је висока цена биокатализатора. Да би употреба ензима била економична, потребно је извршити њихову имобилизацију. Сама метода имобилизације је од кључног значаја, јер одређује укупну активност, стабилност, физичко-хемијска својства ензима, као и цену ензимског препарата, која у већини случајева може бити и главни ограничавајући фактор. Због тога је врло важно одабрати праву методу имобилизације. Често основне методе имобилизације на класичним носачима не дају ефикасне резултате при примени имобилисаног ензима у одређеном процесу, па се дошло до идеје о модификацији носача, као и самог ензима ради што боље и успешније имобилизације.

Ковалентна имобилизација је једна од највише примењиваних метода имобилизације кад је реч о липазама. Ковалентно имобилисани ензими су стабилни у широком опсегу спољних услова услед стварања хемијских веза са носачем. Међутим, неминовно при везивању ензима за носач, он губи део своје нативне активности, а услед недовољне јачине везе, може доћи и до спирања ензима. Да би се ово избегло, треба остварити бољу везу између ензима и носача, а то се може постићи модификацијом носача. Хемијске модификације носача се примењују ради увођења реактивних функционалних група са циљем добијања активних и стабилних имобилисаних ензима. Такође се може применити и модификација површине ензима, додавањем функционалних група, које обезбеђују боље и стабилније везивање за носач.

У овом докторату примењена је нова метода хемијске модификације полиметракрилатног носача Eupergit®С 250L помоћу цистеина и глутаралдехида ради добијања имобилисаног ензима веће стабилности. У већини истраживања чији предмет је модификација носача за имобилизацију ензима увођењем карбонилних група обично се примењује активација етилендиамином (ЕДА) и глутаралдехидом.<sup>[200, 201]</sup> У првом кораку, носач са епоксидним групама (какав је Eupergit®С 250L) активира се увођењем амино групе након реакције са ЕДА-ом. Након тога, у реакцији између слободне амино групе ЕДА и једне карбонилне

групе глутаралдехида формира се Шифова база, а друга карбонилна група глутаралдехида остаје слободна за реакцију са аминок групама ензима (Слика 3.19.).



Слика 3.19. Ковалентна имобилизација липазе глутаралдехидом на носач Eupergit® C 250L модификован етилендиамином у првом случају и на носач Eupergit® C 250L модификован цистеином у другом случају (Извор <sup>[80]</sup>).

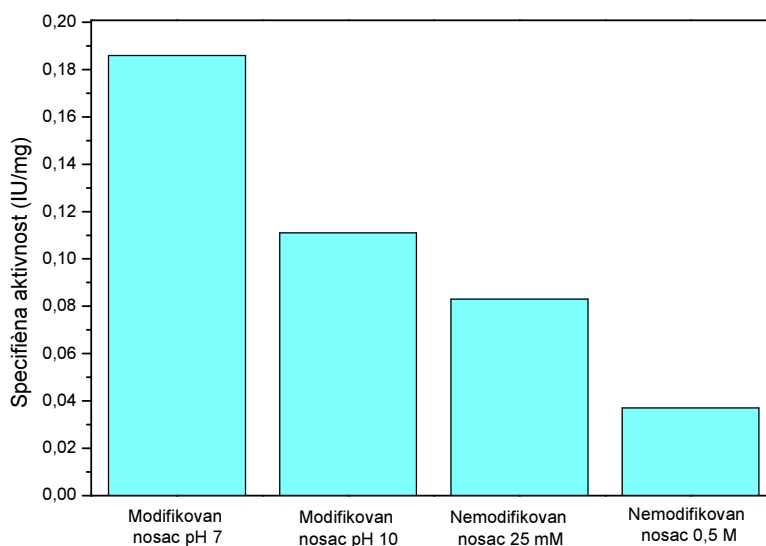
Са слике се може видети да тзв. „ножица“ која се формира на површини носача при активацији етилендиамином, садржи и две секундарне аминок групе, које су при условима карактеристичним за имобилизацију ензима наелектрисане. Услед тога, постоји могућност да се ензим имобилизује паралелно ковалентним везама и електростатичким привлачењима. Ово често доводи до мање стабилности ензима од жељене. Зато је у овом раду примењена метода активације носача у којој се у првом кораку активације, уместо етилендиамина, користи цистеин. Цистеин се за епоксидну групу везује преко своје сулфхидрилне групе, тако да аминок група цистеина остаје слободна за реакцију са глутаралдехидом. Кључна предност ове методе модификације је да на ножици постоји једно позитивно и једно негативно наелектрисање, и то у непосредној близини, тако да је мало вероватна имобилизација ензима електростатичким привлачењима.



### 3.6.1. Иммобилизација липазе из *C.rugosa* на модификовани и немодификовани Eupergit® C 250L

Иммобилизација је вршена са растворима ензима у пуферима различитих рН вредности и различите јонске јачине. Коришћени су раствори ензима у фосфатном пуферу 25mM чији је рН 7, односно рН 10. При различитим рН вредностима може се очекивати битна разлика у уделу недисосоване форме амино група лизина. Наиме, рК вредност амино група на лизинским остацима код већине ензима је око 10. Дакле, када се иммобилизација изводи на рН 7 занемарљив удео ових група је недисосован, док је при рН 10 око половине амино група у недисосованом, ненаелектрисаном облику.

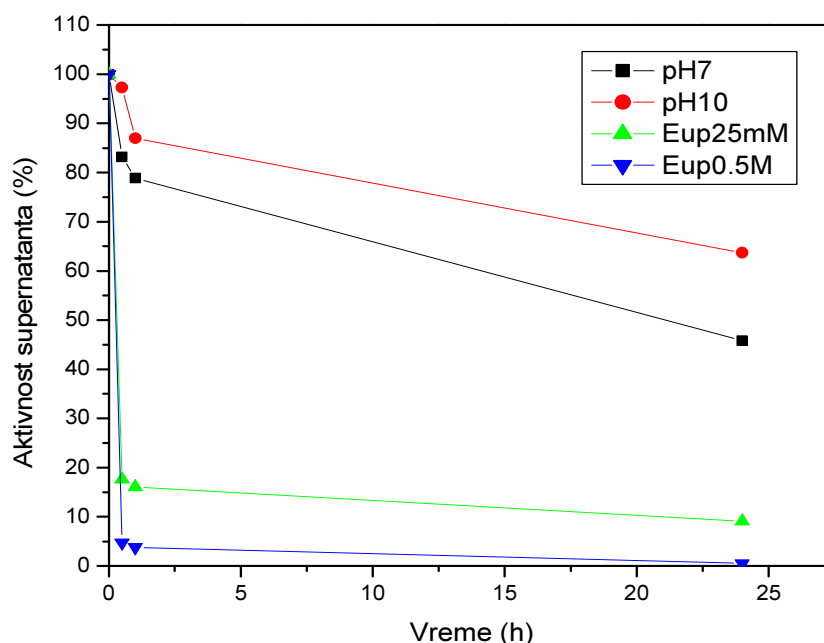
После модификације носача, а потом и иммобилизације, измерена је активност иммобилисаног ензима. Како би се упоредила активност иммобилисаног ензима на модификован носач, измерена је и активност иммобилисаног ензима на немодификованом Eupergit® C 250L који је иммобилисан на рН 7 у 25 mM и 0,5 M фосфатном пуферу.



Слика 3.20. Активности липазе из *C.rugosa* везане за модификоване и немодификоване носаче Eupergit® C 250L одређене применом *p*-нитрофенилпалмитатне методе

Са слике 3.20. се може закључити да највећу активност има липаза која је имобилисана из раствора фосфатног пуфера чији је рН 7 на носачу модификованом цистеином и глутаралдехидом. Генерално, може се приметити да се постиже већа специфична активност имобилисане липазе када се везује за модификовани носач, него за немодификовани Eupergit®С 250L. Вероватно је ово последица чињенице да је функционална група на модификованом носачу удаљенија од површине носача, захваљујући постојању тзв. „ножице“.

Кинетика имобилизације праћена је мерењем пада ензимске активности у супернатанту изнад имобилизата. Применом *p*-нитрофенилпалмитатне методе, мерена је активност ензима у супернатанту, како би се посредно одредила количина везаног ензима за модификован носач, а резултати су поређени са имобилизацијом на Eupergit®С 250L у 25 mM и 0,5 M фосфатном пуферу. Резултати су приказани на слици 3.21.



Слика 3.21. Пад ензимске активности у супернатанту током имобилизације на различитим полимерним носачима и при различитим условима.

Са слике 3.21. се види да активност ензима у супернатанту најспорије опада при имобилизацији на модификовани носач при рН 10. Генерално, може се приметити да је драстично бржи пад активности у супернатанту када се примењује

немодификовани Eupergit®C 250L, што указује на много бржу имобилизацију липазе из *C. rugosa* на овај носач. Практично, већ након 1h имобилизације имобилисано је више од 80% липазе. С друге стране, у имобилизацијама на модификовани Eupergit®C 250L након 1h везано је око 20% „понуђеног“ ензима, али имобилизација се одвија и после тога, иако спорије. Након 24h везује се око 35% ензима на рН 10, а око 55% на рН 7.

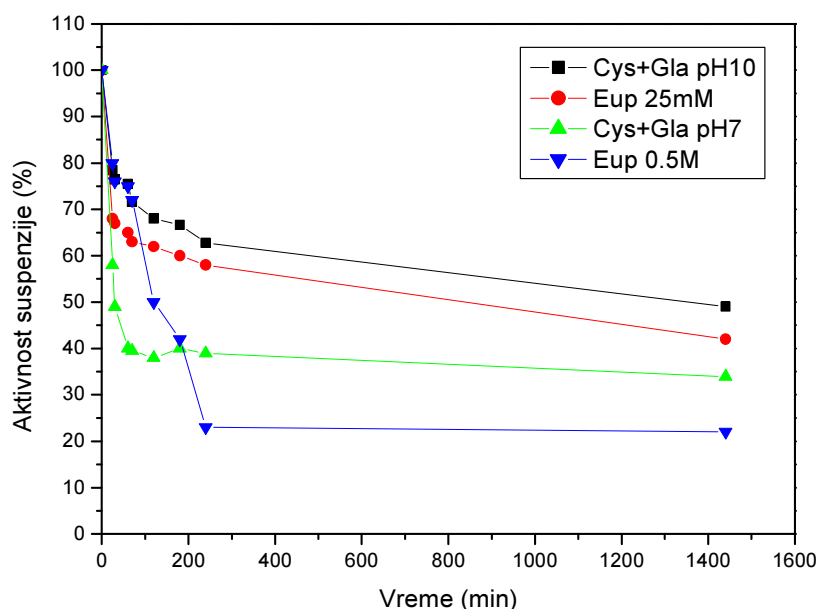
Изразито брзо везивање липазе за немодификовани носач није неочекивано јер је раније примећено да је основна карактеристика овог носача да се ензими прво адсорбују на површини носача, а затим се споро успостављају ковалентне везе између епоксидних група и аминокиселинских или сулфхидрилних група ензима.<sup>[202, 203]</sup> Пошто мерење губитка активности у супернатанту не даје увид у врсту имобилизације ензима, не може се са сигурношћу тврдити да ли се ради о ковалентној имобилизацији или имобилизацији адсорпцијом, али се на основу литературних података може претпоставити да се брзо одигра адсорпција главнине понуђеног ензима, а затим се лагано одвија формирање ковалентних веза.

С друге стране, имобилизација ензима на модификовани носач одиграва се знатно спорије. Може се претпоставити да је имобилизација спорија јер се ензим не може адсорбовати, па је потребно одређено време да ензим заузме одговарајућу оријентацију за формирање ковалентне везе. Ова хипотеза је додатно тестирана испитивањем термостабилности имобилисаних ензима, као и праћењем десорпције ензима са носача у присуству различитих десорпционих агенаса.

Поређењем резултата на сликама 3.20. и 3.21. може се приметити необична законитост између губитка активности супернатанта током имобилизације и активности имобилисаних ензима. Наиме, иако резултати на слици 5.3. показују да би се могла очекивати мања активност имобилизата добијеног имобилизацијом на модификовани Eupergit®C 250L, активност је значајно већа. Могуће је да се при формирању ковалентних веза између аминокиселинских група ензима и карбонилних група модификованог носача ензим везује са повољнијом оријентацијом која омогућује бољу доступност активног центра супстрату.

### 3.6.1.1. Одређивање термостабилности имобилисане липазе

Висока активност имобилисаних ензима је тек први услов за успешну индустријску примену. Поред тога, неопходно је да имобилисани ензим поседује и велику стабилност да би се омогућила вишеструка употреба и смањење производних трошкова. Из тог разлога, испитана је и стабилност (на 60 °C) липазе имобилисане директном имобилизацијом на Eupergit®C 250L и липазе имобилисане на модификованом Eupergit®C 250L преко карбонилне групе. Резултати су приказани на слици 3.22.



Слика 3.22. Ток инактивације липазе имобилисане на модификованом или немодификованом Eupergit®C 250L у различитим условима на температури 60°C

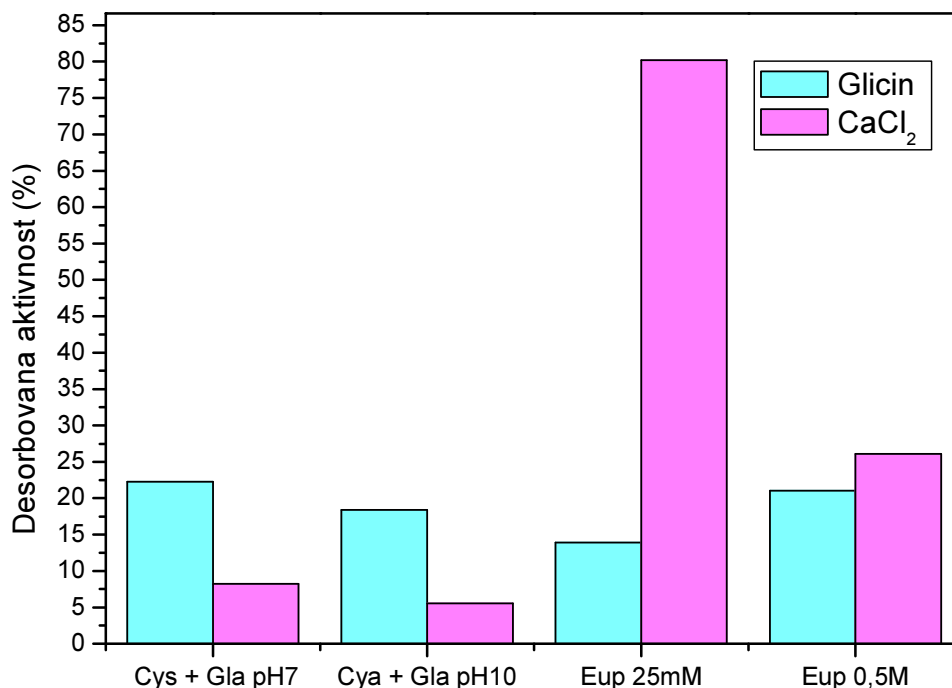
Може се приметити да је највећа стабилност липазе имобилисане на модификованом Eupergit®C 250L на рН 10. Интересантно је и да је много већа стабилност ензима када се имобилизација на истом носачу изведе на рН 10, него када се изведе на рН 7. Овакви резултати указују на могућност формирања тзв. „вишетачкасте“ имобилизације, односно стварања више ковалентних веза између једног молекула ензима и носача. Слични резултати добијени су и раније у истраживањима имобилизација које се одигравају преко аминокиселинских

остатака на ензиму, јер су у базној средини ове групе недисосоване и лакше реагују са карбонилним групама.<sup>[204]</sup>

### 3.6.1.2. Кинетика десорпције ензима са различитих носача

При ковалентној имобилизацији ензима за носач, поред формирања ковалентних веза између ензима и носача, у мањој или већој мери може доћи и до адсорпције ензима на носач, која је непожељан облик везивања ензима, јер лакше може доћи до његовог спирања, што има укупан негативни ефекат на имобилизацију. Како би одредили у којој мери је дошло до адсорпције ензима, имобилизат смо третирали глицином, а потом мерили активност ензима у раствору стандардном методом и пратили десорпцију ензима са носача. Поред физичке адсорпције, може доћи и до стварања јонских веза између носача и ензима, па се у том случају имобилизат третирао раствором  $\text{CaCl}_2$ .

На слици 3.23. приказана је десорпција липазе из *C.rugosa* са различитих имобилизата у присуству глицина или калцијум-хлорида. У експериментима у којима је десорпција изведена инкубацијом у раствору глицина подједнаки резултати су постигнути са свим носачима, па је активност измерена у супернатанту у распону од 13,9-22,3% од унете активности. Ови резултати указују на чињеницу да је мали удео ензима адсорбован хидрофобним интеракцијама, како на модификован, тако и на немодификован носач.

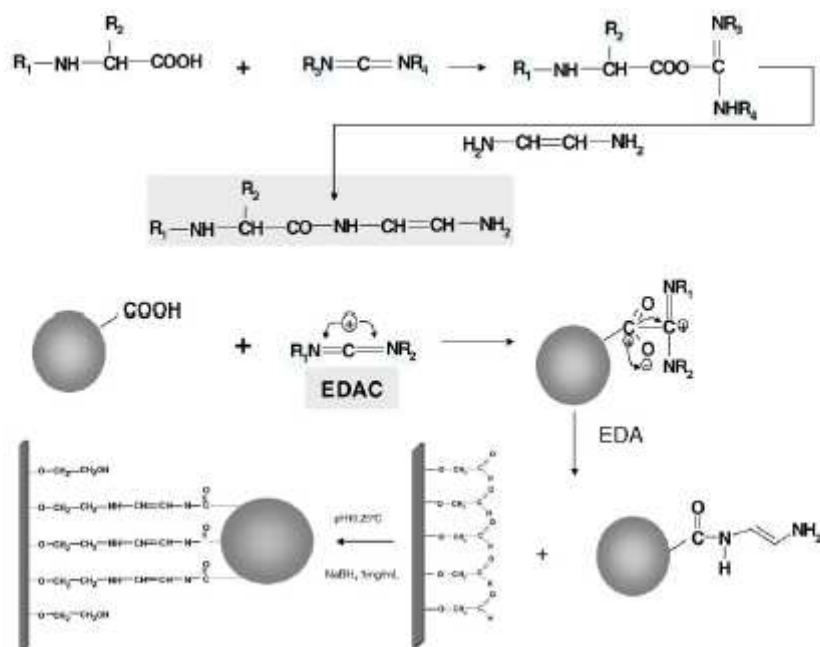


Слика 3.23. Десорпција липазе са различитих имобилизата у присуству глицина или калцијум-хлорида.

Када је десорпција изведена у раствору калцијум-хлорида примећене су значајно веће разлике између носача. Липаза имобилисана на модификовани носач десорбована је у занемарљивој мери, независно од рН имобилизације. С друге стране, липаза је у значајној мери десорбована са немодификованог носача са епоксидним групама. Када је анализиран имобилисани ензим добијен имобилизацијом при ниској јонској јачини раствора (25 mM), десорбовано је чак 80% активности липазе. Пошто се при малој јонској јачини лакше ензим имобилизује јонским интеракцијама, очекивано је да ће удео на овај начин имобилисаног ензима бити већи него на имобилизату добијеном са 0,5 M пуфером.

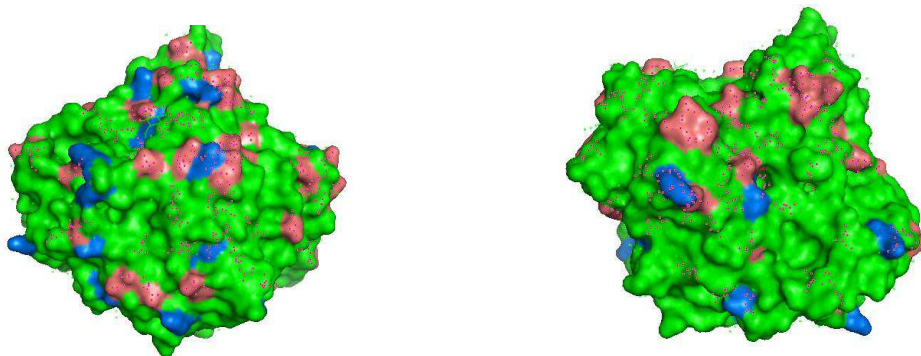
### 3.6.1.3. Имобилизација модификоване липазе на модификовани и немодификовани Eupergit® C 250L

Резултати у претходном делу рада су показали да нови, модификовани носач има одређене предности у односу на немодификовани Eupergit® C 250L. Установљено је да липаза из *C.rugosa* имобилисана на нови носач има велику активност (слика 3.20.) и велику стабилност (слика 3.22.), ако се имобилизација изведе на pH 10. На основу претходних истраживања објављених у научним радовима може се претпоставити да високој стабилности имобилисаних ензима погодује „вишетачкаста“ имобилизација, што је потврђено и високом стабилношћу ензима имобилисаног на pH 10. Из тог разлога, изведена је хемијска модификација липазе из *C.rugosa* карбодиимидом (ЕДАЦ) и етилендиамином, којом се карбоксилне групе остатака глутаминске и аспарагинске киселине трансформишу у аминок групе. Ово је позната реакција и она омогућује формирање амидне везе између активираних карбоксилних група ензима и аминок групе EDA, док једна примарна аминок група остаје слободна (Слика 3.24.).



Слика 3.24. Хемијска аминација карбоксилне групе ензима са карбодиимидом у присуству етилендиамина<sup>[145]</sup>

Основна идеја је да се тиме повећа концентрација аминокиселина на површини ензима и омогући формирање већег броја веза између ензима и носача и додатно повећа стабилност имобилисаних ензима. На слици 3.25. приказана је расподела лизинских остатака и остатака глутаминске и аспарагинске киселине на површини липазе из *C.rugosa*.



Слика 3.25. Расподела остатака лизина (плава боја) и глутаминске и аспарагинске киселине (црвена боја) на површини липазе из *C.rugosa*. а) фронтална пројекција, б) пројекција након ротације од 180° око z-осе.

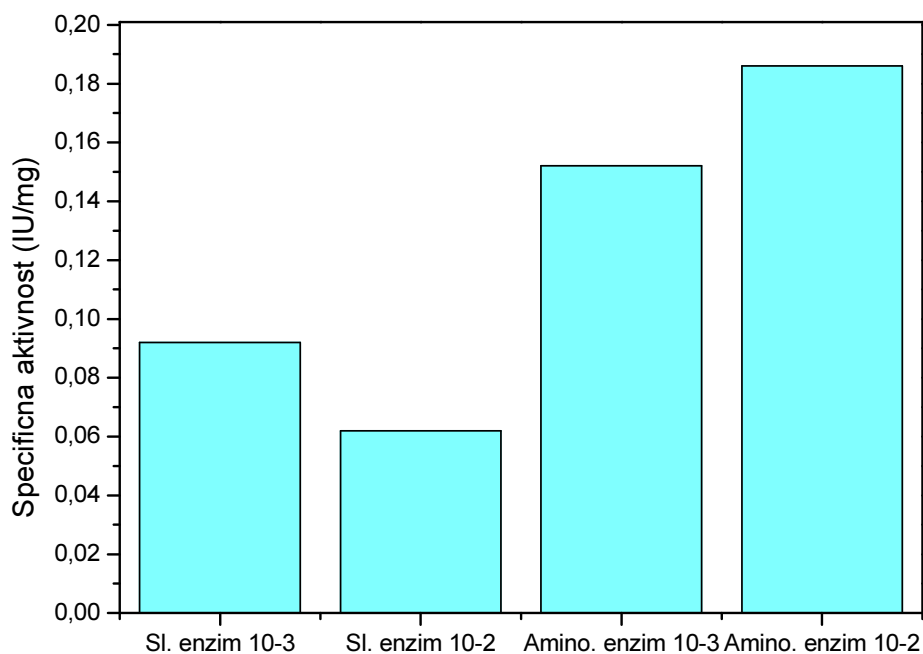
Може се приметити да на површини овог ензима има нешто више остатака киселих аминокиселина па се потпуним превођењем ових група у аминокиселинску групу концентрација аминокиселина може повећати више него двоструко. Поред тога, ове карбоксилне групе (означене црвеном бојом) лоциране су у близини аминокиселинских остатака (означене плавом бојом), што представља битан предуслов за успостављање више ковалентних веза између ензима и носача.

Припремљена су укупно четири имобилисана ензима, од којих први представља модификовани ензим имобилисан на модификованом носачу при чијој аминацији је коришћен раствор ЕДАК концентрације  $10^{-2}$  М, а за други узорак коришћен је раствор ЕДАК концентрације  $10^{-3}$  М. Остала два узорка представљају имобилисане ензиме који су аминовани при претходно наведеним концентрацијама ЕДАК, али су имобилисани на немодификоване носаче. Различите концентрације ЕДАК-а су примењене јер постоји хипотеза да се при концентрацији  $10^{-2}$  М постиже модификација свих карбоксилних група, док се на  $10^{-3}$  М постиже делимична модификација. Пошто потпуна хемијска модификација понекад негативно утиче на активност ензима, потребно је анализирати сваки појединачни ензим како би се закључило како модификација утиче на његову активност. Резултати су приказани



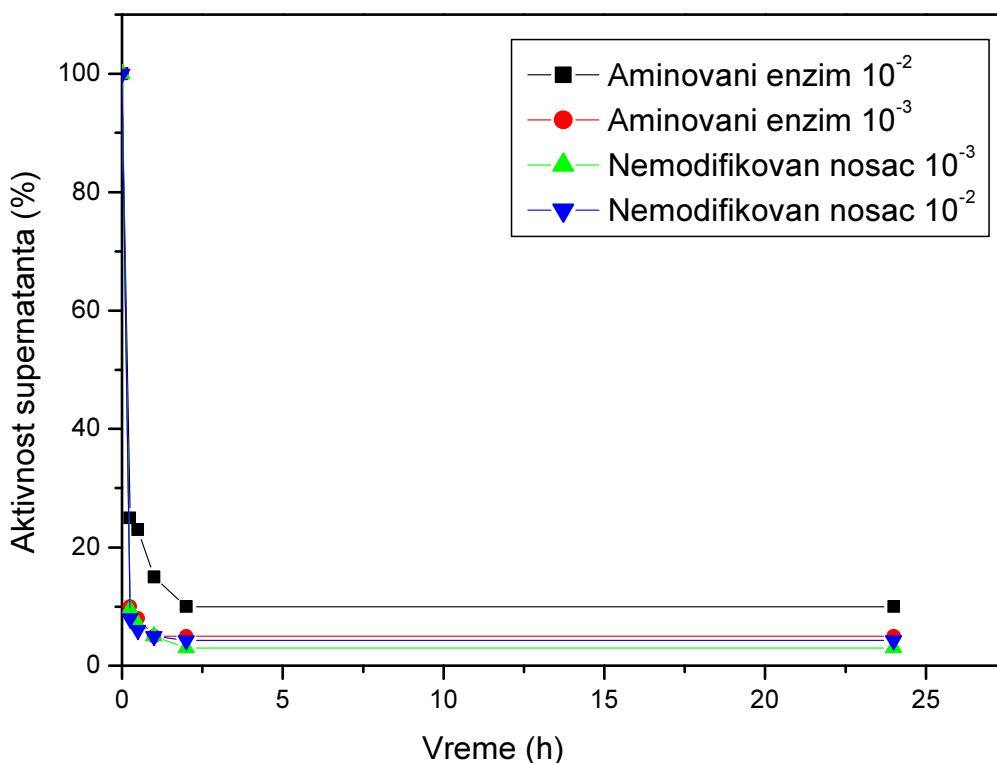
на слици 3.26. са које се може приметити да хемијска модификација ензима није негативно утицала на активност липазе, чак је активност модификоване липазе већа од активности липазе пре модификације.

Разлог за значајан раст специфичне активности после модификације може бити мала чистоћа полазног ензимског препарата. Комерцијални препарат липазе из *C. rugosa* садржи мање од 20% протеина, па је могуће да се при дијализи (која се изводи да би се одстранили хемијски агенси за активацију и модификацију ензима) одстрани и нечистоће мање моларне масе из ензимског препарата које смањују активност.



Слика 3.26. Специфичне активности слободне и хемијски модификоване липазе при различитим концентрацијама ЕДАК-а

У првом експерименту имобилизација је изведена при рН 7. Ток имобилизације на различитим носачима приказан је на слици 3.27.

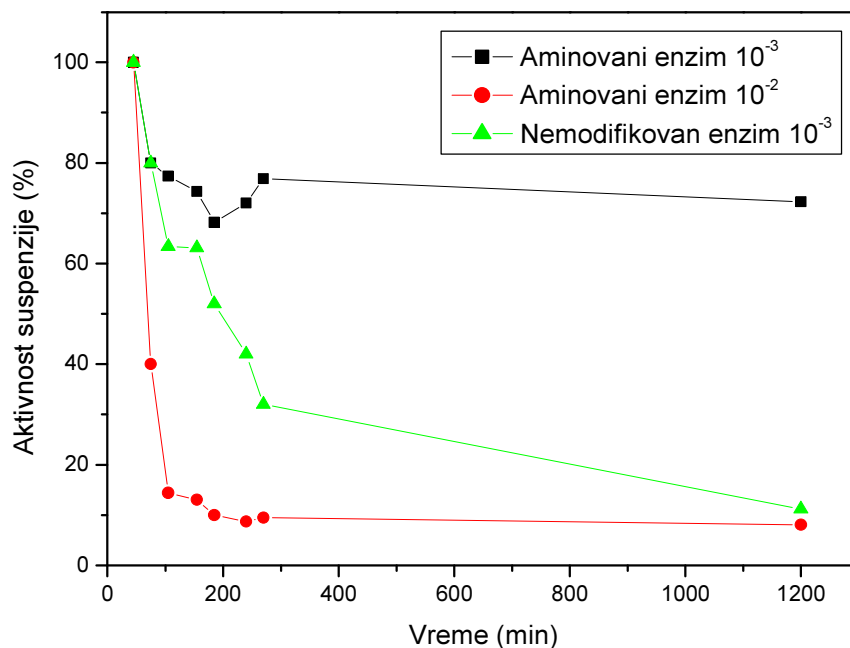


Слика 3.27. Губитак активности модификованог ензима у супернатанту при имобилизацији на pH 7 на различитим носачима

Може се приметити да је имобилизација врло брза у свим експериментима. Најспорија је имобилизација потпуно модификованог ензима (са  $10^{-2}$ М ЕДАЦ-ом), на модификован носач али и у том експерименту везано је око 75% липазе већ након 15 минута.

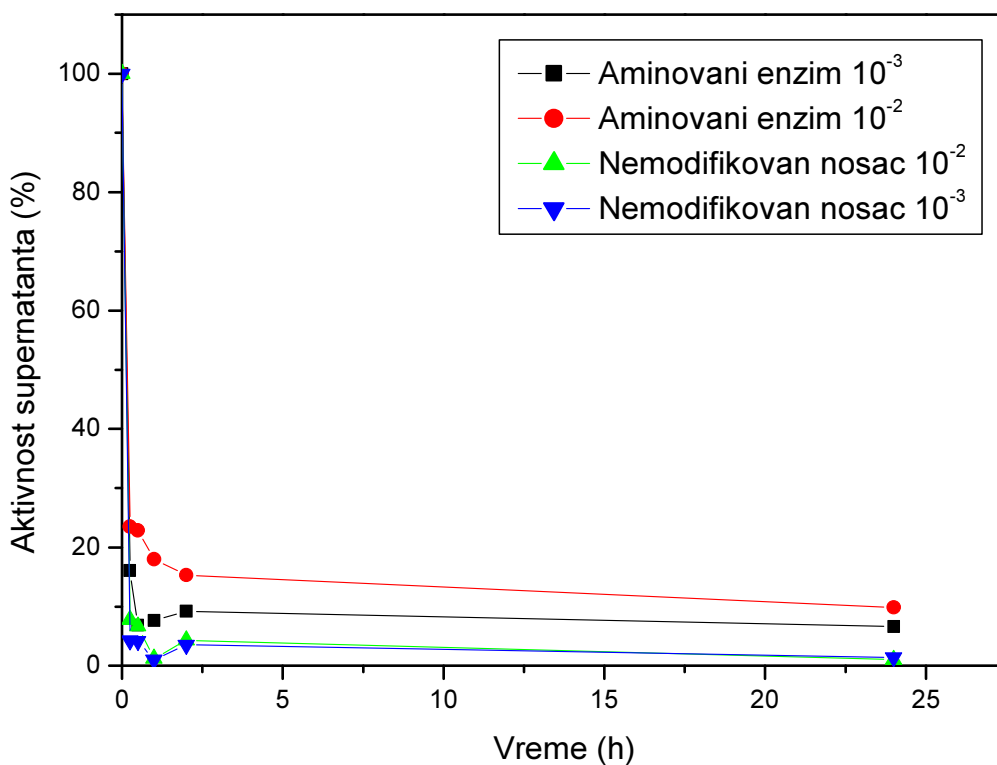
У следећој серији експеримената испитана је стабилност имобилисаних ензима на  $65^{\circ}\text{C}$  (Слика 3.28.). Разлике у стабилности су много веће него у брзини имобилизације. Далеко највећа је стабилност ензима модификованог са  $10^{-3}$  М карбодиимида и имобилисаног на модификовани носач. Овај имобилисани ензим задржава више од 70% активности и након 20 h инкубације. Исти ензим везан на немодификовани Eupergit<sup>®</sup>С 250L показује сличну стабилност у току прва 3 h инкубације, али после тога долази до наглог пада активности. Може се претпоставити да у другој фази инактивације долази до раскидања друге ковалентне везе успостављене између модификованог ензима и Eupergit<sup>®</sup>С 250L.

С друге стране, и већа стабилност истог модификованог ензима имобилисаног на модификовани Eupergit®С 250L вероватно се може приписати додатним ковалентним везама, али много чвршћим везама које се не раскидају ни након 20h инкубације на високим температурама.



Слика 3.28. Одређивање стабилности на 65 °C модификованих ензима имобилисаних на рН 7

Испитана је и имобилизација истих узорака на рН 9, јер је на овом рН велики део аминок група у недисосованом облику. Наиме, рК аминок група уведених модификацијом карбоксилних група етилендиамином и карбодиимидом је око 9,5, па се ово постиже са нижим рН него са немодификованим ензимом. Резултати су приказани на слици 3.29.



Слика 3.29. Губитак активности модификованог ензима у супернатанту при имобилизацији на рН 9

Кинетика имобилизације на немодификовани Eupergit<sup>®</sup>С 250L је непромењена у односу на имобилизацију изведену на рН 7. Међутим, имобилизација на модификовани носач је приметно спорија на рН 9 него на рН 7. Овакав ток имобилизације могао бити последица другачије оријентације ензима при имобилизацији, која би могла довести и до промењене стабилности.

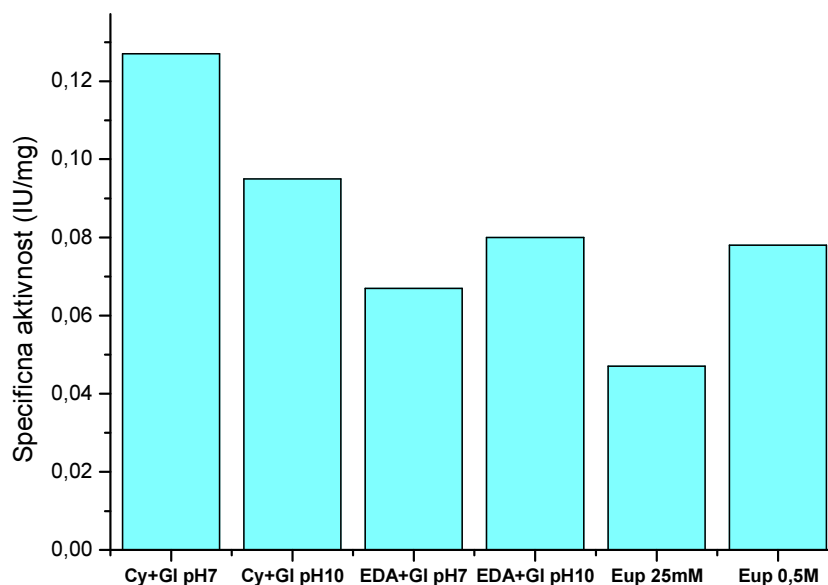
### 3.6.2. Иmobилизација липазе из *C. antarctica* на носач модификован цистеином

На основу резултата добијених имобилизацијом липазе из *C. rugosa*, имобилисана је и слободна липаза из *C. antarctica* која се затим користила у синтези биодизела. За синтезу биодизела, липаза је на различитим рН

вредностима имобилисана на носач модификован у једном случају етилендиамином и глутаралдехидом, а у другом цистеином и глутаралдехидом. Након мерења активности добијених имобилисаних система, четири узорка су примењена у реакцији синтезе биодизела.

Имобилизација је изведена на носачу Eupergit<sup>®</sup> C 250L модификованом на два различита начина а такође је имобилизација извршена и на немодификовани носач. Први корак модификације је изведен помоћу цистеина ради увођења аминок групе на носач. У следећем кораку изведена је модификација глутаралдехидом и на тај начин је уведена карбонилна група која може да реагује са аминок групама (првенствено лизина) на површини ензима.

Друга метода активације носача се разликује од прве по начину увођења аминок група на површину носача. Наиме, носач се прво активира у реакцији са етилендиамином, при чему се уводи слободна аминок група, која затим реагује са једном карбонилном групом глутаралдехида (формира се Шифова база). На овај начин остаје слободна друга карбонилна група глутаралдехида за реакцију са ензимом. „Ножица” која се формира на површини носача, у овом случају, садржи две секундарне аминок групе које су наелектрисане у складу са условима имобилизације. Услед тога, постоји могућност да се ензим имобилише ковалентно али и електростатичким привлачењем, односно јонском адсорпцијом. С друге стране, немодификовани носач има слободне епоксидне групе које могу да реагују са аминок и сулфхидрилним групама на површини ензима. Имобилизација липаза на модификоване и немодификоване носаче је извршена при различитим рН вредностима пуфера. На слици 3.30. упоређене су хидролитичке активности липазе имобилисане на различите носаче.

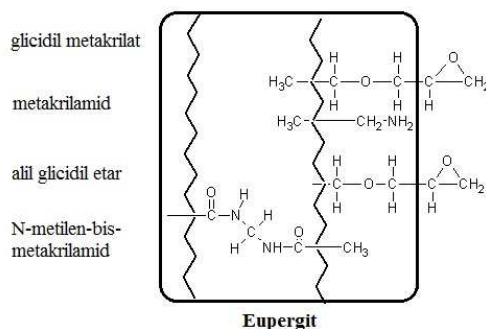


Слика 3.30. Специфична активност липазе из *C. antarctica* везане за модификоване и немодификоване носаче

Са слике 3.30. се првенствено може закључити да највећу активност има липаза која је имобилисана из раствора фосфатног пуфера чији је рН 7 на носачу модификованом цистеином и глутаралдехидом. Пошто се овом модификацијом значајно смањује могућност адсорпције липазе и промовише ковалентно везивање, из ових резултата се може претпоставити да се овом врстом имобилизације добија имобилисани ензим чији активни центар је у мањој мери закљоњен и није отежан приступ супстрата. Такође се и на примеру липазе из *C. antarctica* може приметити да се постиже већа специфична активност имобилисане липазе када се везује на модификован носач, него на немодификован Eupergit®С 250L. Вероватно је то последица чињенице да је функционална група на модификованом носачу удаљенија од површине носача, захваљујући постојању тзв. ножице. Уочава се и велика хидролитичка активност добијена са липазом имобилисаном директном имобилизацијом на Eupergit®С 250L при високој јонској јачини пуферског раствора (0,5 М). У присуству веће концентрације јона, лакше долази до успостављања хидрофобних интеракција између ензима и носача, па овако адсорбован ензим лакше формира ковалентне везе са епоксидним групама на носачу. С друге стране, када је јонска јачина мала (25 mM) у мањој мери су

присутне хидрофобне интеракције па се липаза везује у мањој мери и/или са другачијом оријентацијом. И рН вредност примењеног пуфера у току имобилизације на одговарајући начин утиче на активност ензима. Уколико се посматра погоднија метода модификације, са слике 3.30. се може закључити да је већа активност ензима постигнута при рН 7 на носач модификован цистеином и глутаралдехидом. Интересантно је да је задовољавајућа активност липазе имобилисане на немодификовани носач и носач модификован етилендиамином из раствора фосфатног пуфера чији је рН 10. То је у складу са резултатима имобилизације липазе из *S. rugosa*, односно, у базној средини се добија стабилнији имобилисани ензим. Сматра се да је разлог веће стабилности већи број формираних веза јер се у базној средини амино групе лизина на површини ензима налазе у недисосованој форми која је погоднија за реакцију са карбонилним групама.

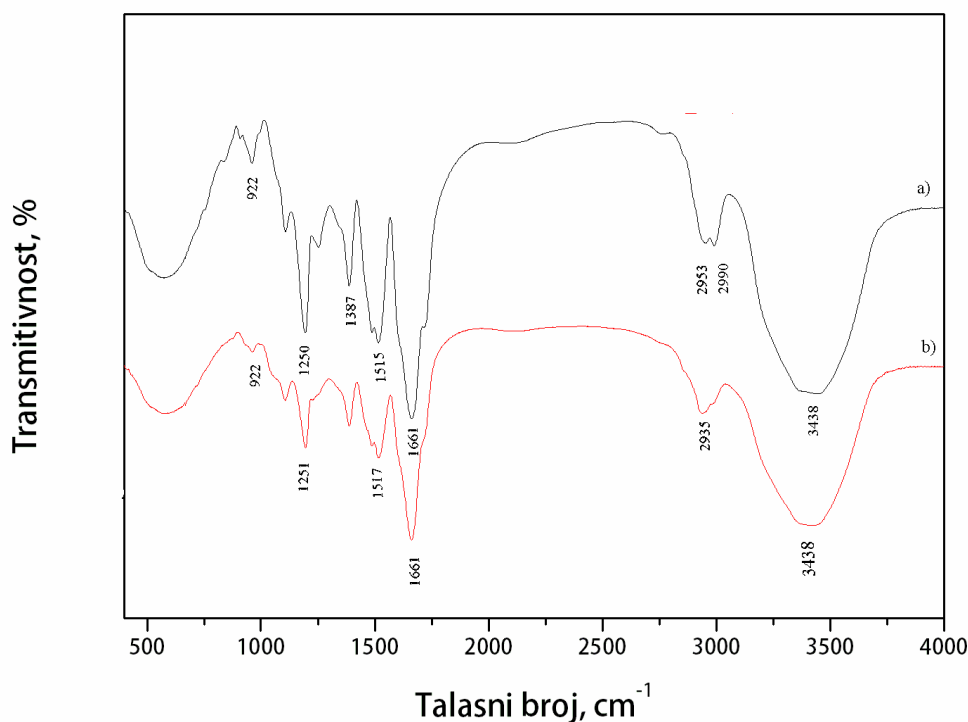
Да је липаза успешно имобилисана на Eupergit<sup>®</sup> C 250L потврђено је и FTIR спектроскопијом. У складу са структуром Eupergit<sup>®</sup> C 250L (слика 3.31) у спектру (слика 3.32 а) се могу видети сви карактеристични пикови.



Слика 3.31. Структура Eupergit<sup>®</sup> C 250L [202]

Широка трака на  $3438\text{ cm}^{-1}$  потиче од -N-H валенционих вибрација, а траке на  $2990$  и  $2953\text{ cm}^{-1}$  приписује се -C-H валенционим вибрацијама метилених група. Најистакнутија трака у овом спектру која се налази на  $1661\text{ cm}^{-1}$  потиче од -N-H деформационих и -C=O валенционих вибрација амидне везе, док широка трака на  $573\text{ cm}^{-1}$  указује на примарне амиде.<sup>[205, 206]</sup> Имајући у виду да све ове групе

постоје и у молекулу ензима не изненађује да се након имобилизације липазе из *Candida antarctica* спектар (слика 3.32 б) не мења значајно. Једина разлика која постоји између ових спектра јесте код пикова на 1250 и 922  $\text{cm}^{-1}$  који потичу од симетричног и асиметричног истезања епокси прстена. Због мале концентрације епоксидних група на површини носача мали је и интензитет пикова, али додатно смањење након третмана липазом доказује да је имобилизација на Eupergit® C 250L успешна и да је дошло до формирања ковалентне везе.



Слика 3.32. FT-IR спектри а) Eupergit® C 250L и б) имобилисаног ензима

### 3.6.2.1. Примена имобилисане липазе из *C. antarctica* у синтези биодизела

Пошто се показало да је комерцијално имобилисана липаза из *C. antarctica* врло активна у реакцији синтезе биодизела, испитана је могућност примене имобилизације нативне липазе из *C. antarctica* у синтези овог врло вредног производа. У литератури се ретко могу наћи подаци о коришћењу нативне липазе.

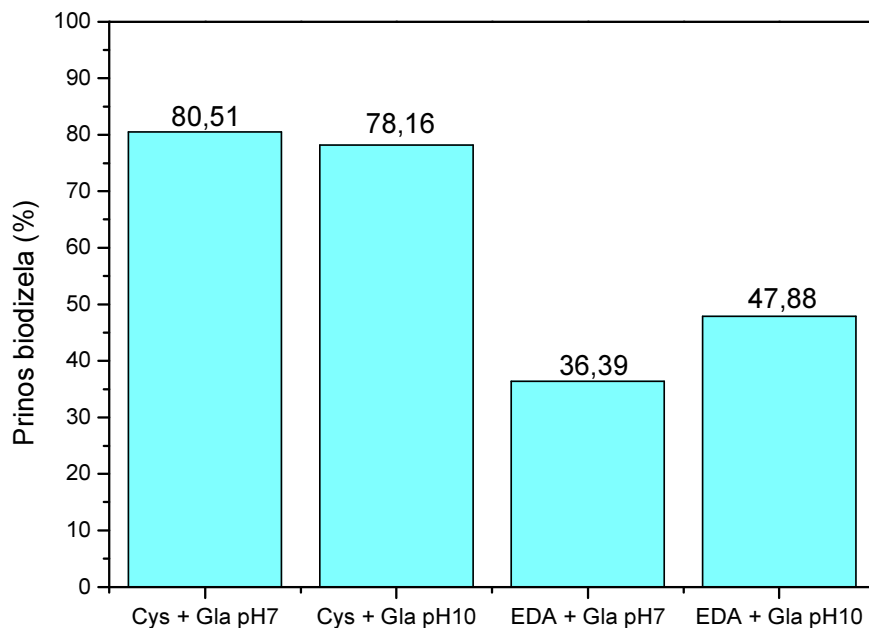


Најчешће се као биокатализатор у синтези биодизела користи липаза из *C. antarctica* имобилисана на метил-метакрилатну смолу (Lewatit VP OC 1600), позната под комерцијалним називом Novozyme 435<sup>®</sup>. Висока цена комерцијалних ензима представља прво ограничење у примени биокатализатора а посебно у индустрији биодизела где су присутна још два проблема: штетан утицај алкохола кратког ланца на ензим, и штетан утицај глицерола који је хидрофобан те се лако адсорбује на површину имобилисане липазе. Доказано је да се због хидрофилне природе комерцијалног носача (Lewatit VP OC 1600), глицерол лако апсорбује на његову површину што доводи до драстичног пада активности ензима.<sup>[207]</sup> Зато је носач избора за синтезу биодизела Eupergit<sup>®</sup> C 250L који се често користи за имобилизацију великог броја ензима и то пре свега зато што је веома стабилан носач са добрим хемијским и механичким карактеристикама (једноставан поступак имобилизације, висок капацитет везивања, добре особине у реакторима са мешањем итд.). То је неутралан носач, који се добија кополимеризацијом N, N'-метилен-бис-метакриламид, глицидил метакрилата, алилглицидил етра и метакриламидан (слика 3.31).

Реакција трансестерификације изведена је са сунцокретовим уљем као ацил-донором, и метил-ацетатом као ацил-акцептором. Реакција је вођена на 45°C при моларном односу супстрата 12:1 у систему без растварача. Маса ензима је износила 3% према маси уља. Реакција је катализована са различитим имобилизатима, од којих се као најпогоднији са аспекта приноса, показао управо онај који даје и максималну хидролитичку активност односно липаза која је имобилисана из раствора фосфатног пуфера чији је рН 7 на носачу модификованом цистеином и глутаралдехидом (Слика 3.33.). У претходним истраживањима ова реакција је изведена при истим условима са комерцијалном имобилисаном липазом из *C. antarctica* (Novozyme 435) и добијен је принос биодизела од 99,67%. Дакле, може се приметити да се имобилизацијом ове липазе на нови модификовани носач добијају активности које су истог реда величине са скупим комерцијалним препаратима, што свакако указује да је овај имобилизат веома перспективан за синтезу биодизела.

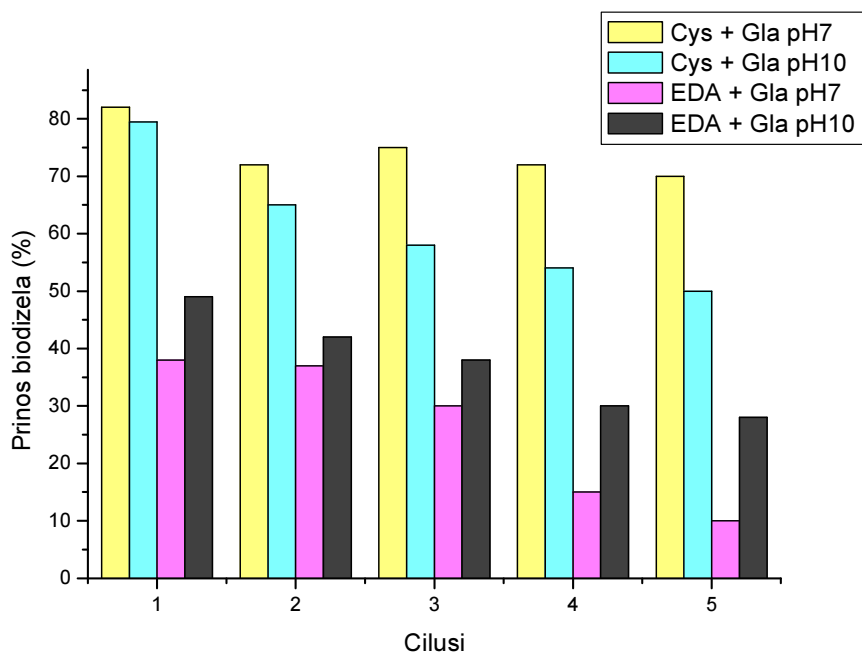
Важан параметар који утиче на економску оправданост процеса је стабилност биокатализатора и могућност његовог поновног коришћења током дужег

временског периода. Зато је испитана и могућност рециклације имобилисаних ензима у новим циклусима синтезе биодизела. Може се видети (слика 3.34.) да долази до малог пада активности након пет циклуса код свих имобилисаних ензима.



Слика 3.33. Утицај модификационог агенса и рН имобилизације на принос биодизела у реакцији трансестерификације сунцокретовог уља метил-ацетатом

Интересантно је упоредити стабилност имобилисаног ензима у реакцији трансестерификације са стабилношћу комерцијално имобилисане липазе из *S. antarctica* (Слика 3.14). Када се као биокатализатор користила комерцијално имобилисана липаза из *S. antarctica*, утврђено је да се ензим може користити седам пута готово без губитка почетне активности (принос је износио  $95,65 \pm 2,01$ ), да би у осмом циклусу активност опала (принос  $63,96\%$ ). У случају имобилизације на Eupergit® С 250L, до постепеног пада активности долази већ у првом циклусу, али до петог циклуса, тај пад не износи више од  $15\%$  од почетног приноса. Овакав резултат још једном указује на велики потенцијал нашег имобилизата.



Слика 3.34. Стабилност имобилисаног ензима у реакцији трансестерификације

Пун потенцијал ензимски синтетисаног биодизела ће доћи до изражаја тек када се као полазне сировине буду користила отпадна уља. Да би производња биодизела била економски исплатива неопходно је да се развије производња базирана на коришћењу отпадних и коришћених уља јер на тај начин и цена финалног производа постаје приступачнија, а такође тако се избегава стална конкуренција са прехранбеном индустријом. Осим ниске цене, предност коришћења отпадних уља је што се на тај начи решава и велики еколошки проблем њиховог одлагања. Ова уља су, као што је већ речено, нижег квалитета од рафинисаних биљних уља посебно због садржаја слободних масних киселина и воде, што може бити велики проблем за алкално катализовану трансестрификацију. Из тог разлога класични базни поступци производње биодизела при коришћењу отпадног и коришћеног уља губе трку у односу на ензимске.

## 4. ЗАКЉУЧАК

На основу приказаних резултата експерименталног рада могу се извести следећи закључци:

1. Оптимизацијом најважнијих процесних параметара, попут температуре, почетне концентрације ензима, почетне концентрације воде и моларног односа супстрата може се значајно повећати принос биодизела.
2. Применом статистичких метода планирања експеримената и обрадом резултата применом методе одзивних површина оптимизовани су услови реакције синтезе биодизела и установљено је постојање интеракција између различитих реакционих фактора које конвенционалним методама нису могле бити установљене.
3. Статистичка анализа показује да је најзначајнији параметар у синтези биодизела, када се као биокатализатор користи липаза из *R.miehei*, количина ензима у реакционој смеши, температура и количина воде. Установљено је да великом приносу погодује моларни однос метанол/уље 6:1, температура 45°C, без додате воде у систем.
4. Резултати истраживања указују да ензимска синтеза биодизела, липазом из *R.miehei* није економски прихватљива када се изводи у шаржном систему, упркос одређеном повећању приноса производа.
5. Када се у синтези биодизела као биокатализатор користи липаза из *S.antarctica*, статистичка анализа показује да је најзначајнији параметар, количина воде и молски однос метанол/уље и у посматраном опсегу имају негативан утицај. Најбољи резултати су добијени у систему са високом концентрацијом ензима, нижем садржају метанола у систему, повишеној температури и малим садржајем воде.
6. Као ацил-акцепторе у ензимској синтези биодизела могуће је користити алкоhole различите дужине ланца. Високи приноси се могу остварити само у тростепеним системима додавања алкохола.
7. Коришћењем метил-ацетата као ацил акцептора остварени су високи приноси (преко 95%) и развијен је једностепени поступак синтезе. Коришћењем метил-ацетата је значајно повећана стабилност система.
8. Развијен је систем са пакованим слојем имобилисаног ензима за интерестерификацију сунцокретовог уља метил-ацетатом који је показао велику оперативну стабилност у току 72h рада реактора. Потврђено је да је

- такав поступак веома ефикасан у циљу производње биодизела у систему без органског растварача у већим размерама.
9. Испитана је ефикасност модификације комерцијалног носача Eupergit® С 250L помоћу цистеина и глутаралдехида ради добијања имобилисаног ензима веће стабилности. Утврђено је да се постиже већа специфична активност липазе из *C.rugosa* када се везује за модификован носач у поређењу са везивањем на немодификован носач.
  10. Испитана је могућност модификације самог ензима увођењем амино група. Највећу стабилност је показала липаза из *C. rugosa* модификована са  $10^{-3}$  карбодиимидом, имобилисана на модификован носач.
  11. Модификација носача Eupergit® С 250L помоћу цистеина и глутаралдехида је коришћена и при имобилизацији липазе из *C. antarctica*. Имобилисан ензим настао ковалентним везивањем на модификован носаче је показао већу активност од имобилизата у коме је носач модификован етиледиамином, као и већу активност у односу на ензим имобилисан на немодификован носач.
  12. Утврђено је да се овако имобилисана липаза из *C. antarctica* може успешно користити као биокатализатор у синтези биодизела. Као најпогоднија метода имобилизације са аспекта приноса производа показала се метода хемијске активације носача цистеином и глутаралдехидом при рН 7.
  13. Применом липазе из *C. antarctica* на нови модификован носач добијају се приноси биодизела који су у рангу приноса које дају комерцијални препарати са имобилисаном липазом из *C. antarctica*. Исто тако, остварена је и задовољавајућа стабилност имобилисаног система у поновљеним циклусима.

## 5. ЛИТЕРАТУРА

1. S. V. Ranganathan, S. L. Narasimhan and K. Muthukumar, "An overview of enzymatic production of biodiesel", *Bioresour Technol* 99 (2008) 3975-3981.
2. M. Balat, "Potential alternatives to edible oils for biodiesel production - A review of current work", *Energy Conversion and Management* 52 (2011) 1479-1492.
3. D. Russo, M. Dassisti, V. Lawlor and A. G. Olabi, "State of the art of biofuels from pure plant oil", *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 16 (2012) 4056-4070.
4. J.C. Escobar, E.S. Lora, O.J. Venturini, E.E. Yanez, E.F. Castillo and O. Almazan, "Biofuels: environment, technology and food security", *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13 (2009) 1275-1287.
5. A. Demirbas, "Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections", *Energy Conversion and Management* 49 (2008) 2106-2116.
6. F. Ma and M. Hanna, "Biodiesel production: a review", *Bioresour Technol* 70 (1999) 1-15.
7. A. Srivastava and R. Prasad, "Triglycerides-based diesel fuels", *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 4 (2000) 111-133.
8. M. Anon, "Filtered used frying fat powers diesel fleet", *Journal of the American Oil Chemists Society* 59 (1982) 780A-781A.
9. M. Ziejewski, K. R. Kaufman, A. W. Schwab and E. H. Pryde, "Diesel engine evaluation of a nonionic sunflower oil-aqueous ethanol microemulsion", *Journal of the American Oil Chemists Society* 61 (1984) 1620-1626.
10. N. J. Schlautman, J. L. Schinstock and M. A. Hanna, "Unrefined expelled soybean oil performance in a diesel engine", *Transaction of the American Society of Agricultural and Biological Engineers* 29 (1988) 70-73.
11. A. W. Schwab, M. O. Bagby and B. Freedman, "Preparation and properties of diesel fuels from vegetable oils", *Fuel* 66 (1987) 1372-1378.
12. E. H. Pryde, "Vegetable oils as diesel fuel: Overview", *Journal of the American Oil Chemists Society* 60 (1983) 1557-1558.
13. E. H. Pryde, "Vegetable oils as fuel alternatives - symposium overview", *Journal of the American Oil Chemists Society* 61 (1984) 1609-1610.
14. C. E. Goering and B. Fry, "Engine durability screening test of a diesel oil/soy oil/alcohol microemulsion fuel", *Journal of the American Oil Chemists Society* 61 (1984) 1627-1632.
15. M. Balat, M. Balat, E. Kirtay and H. Balat, "Main routes for the thermo-conversion of biomass into fuels and chemicals. Part 1: Pyrolysis systems", *Energy Conversion and Management* 50 (2009) 3147-3157.
16. A. W. Schwab, G. J. Dykstra, E. Selke, S. C. Sorenson and E. H. Pryde, "Diesel fuel from thermal decomposition of soybean oil", *Journal of the American Oil Chemists Society* 65 (1988) 1781-1785.
17. S. Al-Zuhair, "Production of biodiesel: possibilities and challenges", *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr* 1 (2007) 57-66.
18. A. Salis, M. Pinna, M. Monduzzi and V. Solinas, "Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis", *Journal of Biotechnology* 119 (2005) 291-299.
19. N. N. A. N. Yusuf, S. K. Kamarudin and Z. Yaakub, "Overview on the current trends in biodiesel production", *Energy Conversion and Management* 52 (2011) 2741-2751.

20. A. Robles-Medina, P. A. Gonzalez-Moreno, L. Esteban-Cerdan and E. Molina-Grima, "Biocatalysis: towards ever greener biodiesel production", *Biotechnol Adv* 27 (2009) 398-408.
21. G. Antolin, F. V. Tinaut, Y. Briceno, V. Castano, C. Perez and A. I. Ramirez, "Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification", *Bioresour Technol* 83 (2002) 111-114.
22. S. Shah and M. N. Gupta, "Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system", *Process Biochemistry* 42 (2007) 409-414.
23. S. F. A. Halim, A. H. Kamaruddin and W. J. N. Fernando, "Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: Optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies", *Bioresource Technology* 100 (2009) 710-716.
24. A. V. Tomasevic and S. S. Siler-Marinkovic, "Methanolysis of used frying oil", *Fuel Processing Technology* 81 (2003) 1-6.
25. F. Yagiz, D. Kazan and A. N. Akin, "Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites", *Chemical Engineering Journal* 134 (2007) 262-267.
26. C. Carraretto, A. Macor, A. Mirandola, A. Stoppato and S. Tonon, "Biodiesle as alternative fuel: Experimental analysis and energy evaluations", *Energy* 29 (2004) 2195-2211.
27. T. Furman, "Biodizel: Proizvodnja i korišćenje", Monografija (1995) Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Novi Sad
28. M. Balat and H. Balat, "Progress in biodiesel processing", *Applied Energy* 87 (2010) 1815-1835.
29. A. E. Atabani, A.S. Silitonga, I.A. Badruddin, T.M.I.Mahlia, H.H. Masjki and S. Mekhilef, "A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics", *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 16 (2012) 2070-2093.
30. A. E. Atabani, A. S. Silitonga, H. C. Ong, T.M.I.Mahlia, H. H. Masjki, I. A. Badruddin and H. Fayaz, "Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production", *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 18 (2013) 211-245.
31. C. C. Akoh, S. W. Chang, G. C. Lee and J. F. Shaw, "Enzymatic approach to biodiesel production", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 8995-9005.
32. J. C. Pasqualino, D. Montane and J. Salvado, "Synergic effects of biodiesel in the biodegradability of fossil-derived fuels", *Biomass & Bioenergy* 30 (2006) 874-879.
33. <http://www.green-trust.org/biodiesel1.htm>
34. "American Society for Testing and Materials", <http://www.astm.org/Standards/D6751.htm>
35. "European Committee for Standardization ", <http://www.cen.eu/cen/pages/default.aspx>
36. A. Demirbas, "Biodiesel production from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical methanol transesterification methods", *Progress in Energy and Combustion Science* 31 (2005) 466-487.
37. B.K. Barnwal and M. P. Sharma, "Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India", *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 9 (2005) 363-378.
38. L.C. Meher, D. Vidva Sagar and S. N. Naik, "Technical aspects of biodiesel

- production by transesterification-a review", *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 10 (2006) 248-268.
39. J. v. Gerpen, "Biodiesel processing and production", *Fuel Processing Technology* 86 (2005) 1097-1107.
40. C. Stavarache, M. Vinatour, R. Nishimura and Y. Maed, "Fatty acids methyl esters from vegetable oil by means of ultrasonic energy", *Ultrasonics Sonochemistry* 12 (2005) 367-372.
41. L.C. Meher, M.G. Kulkarni, A.K. Dalai and S. N. Naik, "Transesterification of karanja (*Pongamia pinnata*) oil by solid basic catalysts", *European Journal of Lipid Science and Technology* 108 (2006) 389-397.
42. H.A. Aksoy, I. Becerik, F. Karaosmanoglu, H.C. Yamaz and H. Civelekoglu, "Utilization prospects of Turkish raisin seed oil as an alternative engine fuel", *Fuel* 69 (1990) 600-603.
43. V. Varghaa and P. Truterb, "Biodegradable polymers by reactive blending transesterification of thermoplastic starch with poly(vinyl acetate) and poly(vinyl acetate-co-butyl acrylate)", *European Polymer Journal* 41 (2005) 715-726.
44. B. Freedman, R.O. Butterfield and E. H. Pryde, "Transesterification kinetics of soybean oil", *Journal of the American Oil Chemists Society* 63 (1986) 1375-1380.
45. Z. Helwani, M. R. Othman, N. Aziz, W. J. N. Fernando and J. Kim, "Technologies for production of biodiesel focusing on green catalytic techniques: A review", *Fuel Processing Technology* 90 (2009) 1502-1514.
46. W. Parawira, "Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review", *Crit Rev Biotechnol* 29 (2009) 82-93.
47. H. Fukuda, A. Kondo and H. Noda, "Biodiesel fuel production by transesterification of oils", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 (2001) 405-416.
48. M. Hass, "The interplay between feedstock quality and esterification technology in biodiesel production", *Lipid Technology* 16 (2004) 7-11.
49. M. Canakci, "The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks", *Bioresource Technology* 98 (2007) 183-190.
50. D. Kusdiana and S. Saka, "Effects of water on biodiesel fuel production by supercritical methanol treatment", *Bioresource Technology* 91 (2004) 289-295.
51. G. Guan, K. Kusakabe, N. Sakurai and K. Moriyama, "Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using acid catalysts in the presence of dimethyl ether", *Fuel* 88 (2009) 81-86.
52. R. Romero, S. Martinez and R. Natividad, "Biodiesel production by using heterogeneous catalysts", *Alternative fuel* (2011) InTech, Rijeka, Croatia
53. J. M. Encinar, J. F. Gonzalez and A. Rodriguez-Reinares, "Biodiesel from used frying oil. Variables affecting the yields and characteristics of the biodiesel", *Industrial & Engineering Chemistry Research* 44 (2005) 5491-5499.
54. C. S. MacLeod, A. P. Harvey, A. F. Lee and K. Wilson, "Evaluation of the activity and stability of alkali-doped metal oxide catalysts for the application to an intensified method of biodiesel production", *Chemical Engineering Journal* 135 (2008) 63-70.
55. M. Verziu, B. Cojocar, J. Hu, R. Richards, C. Ciuculescu and P. Filip, "Sunflower and rapeseed oil transesterification to biodiesel over different nanocrystalline MgO catalysts", *Green Chemistry* 10 (2008) 373-381.
56. D. E. Lopez, J. G. Goodwin, D. A. Bruce and E. Lotero, "Transesterification of triacetin with methanol on solid acid and base catalysts", *Applied Catalysis a-General* 295 (2005) 97-105.



57. Y. Warabi, D. Kusdiana and S. Saka, "Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols", *Bioresource Technology* 91 (2004) 283-287.
58. A. Demirbas, "Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey", *Energy Conversion and Management* 44 (2003) 2093-2109.
59. M. Mittelbach and C. Remschmidt, *Biodiesel: The Comprehensive Handbook* (2004) Boersedruck Ges.m.b. , Vienna, Austria
60. Kusdiana D. and S. Saka, "Kinetics of transesterification in rapeseed oil to biodiesel fuel as treated in supercritical methanol", *Fuel* 80 (2001) 693-698.
61. A. Pandey, S. Benjamin, C. R. Soccol, P. Nigam, N. Krieger and V. T. Soccol, "The realm of microbial lipases in biotechnology", *Biotechnology and Applied Biochemistry* 29 (1999) 119-131.
62. V. M. Balcao, A. L. Paiva and F. X. Malcata, "Bioreactors with immobilized lipases: State of the art", *Enzyme and Microbial Technology* 18 (1996) 392-416.
63. R. Lortie, "Enzyme catalyzed esterification", *Biotechnol Adv* 15 (1997) 1-15.
64. O. Kirk, T. V. Borchert and C. C. Fuglsang, "Industrial enzyme applications", *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2002) 345-351.
65. R. Gupta, N. Gupta and P. Rathi, "Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties", *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (2004) 763-781.
66. J. B. v. Beilen and Z. Li, "Enzyme technology: an overview", *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2002) 338-344.
67. K. E. Jaeger and T. Eggert, "Lipases for biotechnology", *Current Opinion in Biotechnology* 13 (2002) 390-397.
68. F. Hasan, A. A. Shah and A. Hameed, "Industrial applications of microbial lipases", *Enzyme and Microbial Technology* 39 (2006) 235-251.
69. R. Sharma, Y. Chisti and U. C. Banerjee, "Production, purification, characterization, and applications of lipases", *Biotechnol Adv* 19 (2001) 627-662.
70. Z. D. Knezevic, S. S. Siler-Marinkovic and L. V. Mojovic, "Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil in lecithin/izooctane reversed micelles", *Applied Microbiology and Biotechnology* 49 (1998) 267-271.
71. A. R. M. Yahya, W. A. Anderson and M. Moo-Young, "Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions", *Enzyme and Microbial Technology* 23 (1998) 438-450.
72. K. E. Jaeger and T. Eggert, "Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution", *Current Opinion in Biotechnology* 15 (2004) 305-313.
73. Z. Knežević, "Imobilisane lipaze kao katalizatori", *Biblioteka Disertatio, Zadužbina Andrejević* (2004)
74. R. Schmid and R. Verger, "Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications", *Angewandte Chemie International Edition* 37 (1998) 1608-1633.
75. S. H. Krishna, S. Divakar, S. G. Prapulla and N. G. Karanth, "Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*", *Journal of Biotechnology* 87 (2001) 193-201.
76. S. Benjamin and A. Pandey, "*Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology", *Yeast* 14 (1998) 1069-1087.
77. R. V. Muralidhar, R. R. Chirumamilla, R. Marchant, V. N. Ramachandran, O. P. Ward and P. Nigam, "Understanding lipase stereoselectivity", *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18 (2002) 81-97.
78. M. O. Jensen, T. R. Jensen, K. Kjaer, T. Bjornholm, O. G. Mouritsen and G. H.

- Peters, "Orientation and conformation of a lipase at an interface studied by molecular dynamics simulations", *Biophysical Journal* 83 (2002) 98-111.
79. J. Pleiss, M. Fischer and R. D. Schmid, "Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site", *Chemistry and Physics of Lipids* 93 (1998) 67-80.
80. D. Bezbradica, "Sinteza estara katalizovana slobodnom lipazom i lipazom imobilisanom na polimernim nosačima" (2007) Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu
81. D.L. Ollis, E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S.M. Franken, M. Harel, S.J. Remington, I. Silman and J. Schrag, "The  $\alpha/\beta$  hydrolase fold", *Protein Engineering* 5 (1992) 197-211.
82. M. Rusnak, "Untersuchungen zur enzymatischen Enantiomerentrennung von Glykolethern und Etablierung neuer Methoden des synthetischen Shufflings" (2004) Doktorska disertacija,
83. R. C. Rodrigues, C. A. Godoy, G. Volpato, M. A. Z. Ayub, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan, "Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination", *Process Biochemistry* 44 (2009) 963-968.
84. D. Royon, M. Daz, G. Ellenrieder and S. Locatelli, "Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent", *Bioresour Technol* 98 (2007) 648-653.
85. F. F. Guan, P. Peng, G. L. Wang, T. Yin, Q. Peng, J. J. Huang, G. H. Guan and Y. Li, "Combination of two lipases more efficiently catalyzes methanolysis of soybean oil for biodiesel production in aqueous medium", *Process Biochemistry* 45 (2010) 1677-1682.
86. W. Du, Y. Xu, D. Liu and J. Zeng, "Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 30 (2004) 125-129.
87. N. Dizge, B. Keskinler and A. Tanriseven, "Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer", *Biochemical Engineering Journal* 44 (2009) 220-225.
88. N. Ognjanovic, D. Bezbradica and Z. Knezevic-Jugovic, "Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability", *Bioresour Technol* 100 (2009) 5146-5154.
89. O. Kose, M. Tuter and H. A. Aksoy, "Immobilized *Candida antarctica* lipase-catalyzed alcoholysis of cotton seed oil in a solvent-free medium", *Bioresour Technol* 83 (2002) 125-129.
90. Y. Watanabe, P. Pinsirodom, T. Nagao, A. Yamauchi, T. Kobayashi, Y. Nishida, Y. Takagi and Y. Shimada, "Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized *Candida antarctica* lipase", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 44 (2007) 99-105.
91. L. L. Li, W. Du, D. H. Liu, L. Wang and Z. B. Li, "Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction medium", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 43 (2006) 58-62.
92. M. K. Modi, J. R. C. Reddy, B. V. S. K. Rao and R. B. N. Prasad, "Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor", *Bioresour Technol* 98 (2007) 1260-1264.
93. M. M. Soumanou and U. T. Bornscheuer, "Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil", *Enzyme and Microbial*

*Technology* 33 (2003) 97-103.

94. Y. M. Chen, B. Xiao, J. Chang, Y. Fu, P. M. Lv and X. W. Wang, "Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor", *Energy Conversion and Management* 50 (2009) 668-673.
95. N. W. Li, M. H. Zong and H. Wu, "Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*", *Process Biochemistry* 44 (2009) 685-688.
96. M. Ying and G. Y. Chen, "Study on the production of biodiesel by magnetic cell biocatalyst based on lipase-producing *Bacillus subtilis*", *Applied Biochemistry and Biotechnology* 137 (2007) 793-803.
97. A. Kumari, P. Mahapatra, V. K. Garlapati and R. Banerjee, "Enzymatic transesterification of Jatropha oil", *Biotechnology for Biofuels* 2 (2009)
98. N. R. Kamini and H. Iefuji, "Lipase catalyzed methanolysis of vegetable oils in aqueous medium by *Cryptococcus* spp. S-2", *Process Biochemistry* 37 (2001) 405-410.
99. M. Kaieda, T. Samukawa, A. Kondo and H. Fukuda, "Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 91 (2001) 12-15.
100. Z. Knezevic-Jugovic, D. Bezbradica and N. Ognjanovic, "Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel in solvent-free system with different acyl acceptors", *New Biotechnology* 25 (2009) S159-S160.
101. S. Al-Zuhair, F. W. Ling and L. S. Jun, "Proposed kinetic mechanism of the production of biodiesel from palm oil using lipase", *Process Biochemistry* 42 (2007) 951-960.
102. H. Nouredini, X. Gao and R. S. Philkana, "Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil", *Bioresource Technology* 96 (2005) 769-777.
103. M. Foresti and M. Ferreira, "Computational Approach to Solvent-Free Synthesis of Ethyl Oleate using *Candida rugosa* and *Candida antarctica* B Lipases. I. Interfacial activation and Substrate (Ethanol, Oleic Acid) Adsorption", *Biomacromolecules* 5 (2004) 2366-2375.
104. T. Lai and J. O'Connor, "Studies on synthesis of short chain alkyl esters catalyzed by goat pregastric lipase", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 6 (1999) 411-420.
105. X. He, B. Chen and T. Tan, "Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl esters of fatty acids by immobilized lipase from *Candida* sp. 99-125", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 18 (2002) 333-339.
106. A. Janssen and P. Halling, "Specificities of enzymes corrected for solvation depend on the choice of the standard state", *Journal of the American Chemical Society* 116 (1994) 9827-9830.
107. R. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, "Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification Review", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66 (2010) 15-32.
108. E. Boel, B. Høge-Jensen, M. Christensen, L. Thim and N. Fiil, "Rhizomucor miehei triglyceride lipase is synthesized as a precursor", *Lipids* 23 (1988) 701-706.
109. B. Høge-Jensen, F. Andreasen, T. Christensen, M. Christensen, L. Thim and E. Boel, "Rhizomucor miehei triglyceride lipase is processed and secreted from transformed *Aspergillus oryzae*", *Lipids* 24 (1989) 781-785.
110. A. Vonderhagen, "Enzymatic esterification" (2002) US Patent 6,479,618

111. J. Uppenberg, M.T. Hansen, S. Patkar and T. Jones, "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*", *Structure* 2 (1994) 293-308.
112. E. Anderson, K. Larsson and O. Kirk, "One biocatalyst-Many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis", *Biocatalysis and Biotransformation* 16 (1998) 181-204.
113. P. Trodler and J. Pleiss, "Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents", *BMC Structural Biology* 8 (2008) 9-19.
114. J. Uppenberg, N. Oehrner, M. Norin, K. Hult, G.J. Kleywegt, S. Patkar, V. Waagen, T. Anthonsen and T. A. Jones, "Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols", *Biochemistry* 34 (1995) 16838-16851.
115. T.B. Nielsen and O.Kirk, "Lipase A and B from the yeast *Candida antarctica*", *Biotechnological applications of cold-adapted organisms* (1999) Springer, New York
116. Z. Knežević-Jugović, "Enzimsko inženjerstvo", (2008) TMF, Beograd
117. K. R. Jegannathan, S. Abang, D. Poncelet, E. S. Chan and P. Ravindra, "Production of biodiesel using immobilized lipase: A critical review", *Crit Rev Biotechnol* 28 (2008) 253-264.
118. A. Akova and G. Ustun, "Activity and adsorption of lipase from *Nigella sativa* seeds on celite at different pH values. ", *Biotechnology Letters* 22 (2000) 355-359.
119. Z. Knezevic, L. Mojovic and B. Adnadjevic, "Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y", *Enzyme and Microbial Technology* 22 (1998) 275-280.
120. J. Shaw, R. Chang, F. Wang and Y. Wang, "Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials", *Biotechnology and Bioengineering* 35 (1990) 132-137.
121. S. Hwang, K.T. Lee, J.W. Park, B.R.Min, S. Haam, I.S. Ahn and J. K. Jung, "Stability analysis of *Bacillus stearothermophilus* L1 lipase immobilized on surface-modified silica gels", *Biochemical Engineering Journal* 17 (2004) 85-90.
122. M. Karra-Châabouni, I. Bouaziz, A. M. B. d. R. S. Boufi and Y. Gargouri, "Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies ", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 66 (2008) 168-177.
123. Z. Knezevic, G. Kukic, M. Vukovic, B. Bugarski and B. Obradovic, "Operating regime of a biphasic oil/aqueous hollow-fibre reactor with immobilized lipase for oil hydrolysis", *Process Biochemistry* 39 (2004) 1377-1385.
124. G. Yang, T. Tian-Wei, N. Kai-li and W. Fang, "Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media", *Chinese Journal of Biotechnology* 22 (2006) 114-118.
125. K. L. Nie, F. Xie, F. Wang and T. W. Tan, "Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 43 (2006) 142-147.
126. M. Iso, B. X. Chen, M. Eguchi, T. Kudo and S. Shrestha, "Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 16 (2001) 53-58.
127. A. Kumari, S. Shah and M. N. Gupta, "Preparation of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of high free fatty acid containing oil from *Madhuca indica*", *Energy and Fuels* 21 (2007) 368-371.
128. A. F. Hsu, K. Jones, T. A. Foglia and W. N. Marmer, "Immobilized lipase-

- catalysed production of alkyl esters of restaurant grease as biodiesel", *Biotechnology and Applied Biochemistry* 36 (2002) 181-186.
129. A. Salis, M. Pinna, M. Monduzzi and V. Solinas, "Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 54 (2008) 19-26.
130. A. F. Hsu, K. C. Jones, T. A. Foglia and W. N. Marmer, "Continuous production of ethyl esters of grease using an immobilized lipase", *Journal of the American Oil Chemists Society* 81 (2004) 749-752.
131. O. Orcaire, P. Buisson and A. Pierre, "Application of silica aerogel encapsulated lipases on the synthesis of biodiesel by transesterification reaction", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 42 (2006) 106-113.
132. R. C. Rodrigues, B. C. C. Pessela, G. Volpato, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Guisan and M. A. Z. Ayub, "Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*", *Process Biochemistry* 45 (2010) 1268-1273.
133. L. Freitas, P. C. M. Da Ros, J. C. Santos and H. F. de Castro, "An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya sp*)", *Process Biochemistry* 44 (2009) 1068-1074.
134. N. Dizge, C. Aydiner, D. Y. Imer, M. Bayramoglu, A. Tarriseven and B. Keskinler, "Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer", *Bioresource Technology* 100 (2009) 1983-91.
135. F.M. Gomes, E.B. Pereira and H. F. Castro, "Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis", *Biomacromolecules* 5 (2004) 1667-1682.
136. W. Xie and N. Ma, "Immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production", *Energy and Fuels* 23 (2009) 1347-1353.
137. A.B.R. Moreira, V. H. Perez, G.M. Zanin and H. F. Castro, "Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite", *Energy and Fuels* 21 (2007) 3689-3694.
138. S. Meunier and R. Legge, "Evaluation of diatomaceous earth as a support for sol-gel immobilized lipase for transesterification", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62 (2010) 54-58.
139. G. D. Yadav and S. R. Jadhav, "Synthesis of reusable lipases by immobilization on hexagonal mesoporous silica and encapsulation in calcium alginate: Transesterification in non-aqueous medium", *Microporous and Mesoporous Materials* 86 (2005) 215-222.
140. Z. Knezevic, N. Milosavic, D. Bezbradica, Z. Jakovljevic and R. Prodanovic, "Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit® C supports by covalent attachment", *Biochemical Engineering Journal* 30 (2006) 269-278.
141. N. Z. Prlainovic, Z. D. Knezevic-Jugovic, D. Z. Mijin and D. I. Bezbradica, "Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Sepabeads(A (R)): the effect of lipase oxidation by periodates", *Bioprocess Biosyst Eng* 34 (2011) 803-810.
142. C. Mateo, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan, "Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment", *Enzyme and Microbial Technology* 26 (2000) 509-515.
143. D. Bezbradica, D. Mijin, M. Mihailovic and Z. Knezevic-Jugovic, "Microwave-assisted immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Eupergit (R) supports", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84 (2009) 1642-1648.

144. G. Bayramoglu, B. Kaya and M. Y. Arica, "Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto spacer-arm attached poly(GMA-HEMA-EGDMA) microspheres", *Food Chemistry* 92 (2005) 261-268.
145. F. Lopez-Gallego, T. Montes, M. Fuentes, N. Alonso, V. Grazu, L. Betancor, J. M. Guisan and R. Fernandez-Lafuente, "Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports", *Journal of Biotechnology* 116 (2005) 1-10.
146. A. A. Mendes, R. C. Giordano, R. D. C. Giordano and H. F. de Castro, "Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 68 (2011) 109-115.
147. J. K. Lu, L. Deng, R. Zhao, R. S. Zhang, F. Wang and T. W. Tan, "Pretreatment of immobilized *Candida sp* 99-125 lipase to improve its methanol tolerance for biodiesel production", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 62 (2010) 15-18.
148. J. O. Rich, V. V. Mozhaev, J. S. Dordick, D. S. Clark and Y. L. Khmelnitsky, "Molecular imprinting of enzymes with water-insoluble ligands for nonaqueous biocatalysis", *Journal of the American Chemical Society* 124 (2002) 5254-5255.
149. J. W. Chen and W. T. Wu, "Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95 (2003) 466-469.
150. T. Samukawa, M. Kaieda, T. Matsumoto, K. Ban, A. Kondo, Y. Shimada, H. Noda and H. Fukuda, "Pretreatment of immobilized *Candida antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil", *Journal of Bioscience and Bioengineering* 90 (2000) 180-183.
151. S. Tamalampudi, M. R. Talukder, S. Hama, T. Numata, A. Kondo and H. Fukuda, "Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst", *Biochemical Engineering Journal* 39 (2008) 185-189.
152. M. E. da Cunha, L. C. Krause, M. S. A. Moraes, C. S. Faccini, R. A. Jacques, S. R. Almeida, M. R. A. Rodrigues and E. B. Caramao, "Beef tallow biodiesel produced in a pilot scale", *Fuel Processing Technology* 90 (2009) 570-575.
153. H. L. Ngo, N. A. Zafiroopoulos, T. A. Foglia, E. T. Samulski and W. B. Lin, "Efficient two-step synthesis of biodiesel from greases", *Energy & Fuels* 22 (2008) 626-634.
154. K. S. Chen, Y. C. Lin, K. H. Hsu and H. K. Wang, "Improving biodiesel yields from waste cooking oil by using sodium methoxide and a microwave heating system", *Energy* 38 (2012) 151-156.
155. S. F. A. Halim and A. H. Kamaruddin, "Catalytic studies of lipase on FAME production from waste cooking palm oil in a *tert*-butanol system", *Process Biochemistry* 43 (2008) 1436-1439.
156. G. Knothe, "Analyzing biodiesel: standards and other methods", *Journal of the American Oil Chemists Society* 83 (2006) 823-833.
157. C.-C. Lai, S. Zullaikah, S. R. Vali and Y.-H. Ju, "Lipase-catalyzed production of biodiesel from rice bran oil", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 80 (2005) 331-337.
158. G. Knothe and R.O. Dunn, "Biodiesel: an alternative diesel fuel from vegetable oils or animal fats", *Industrial uses of vegetable oils* (2005) AOCS Press, USA
159. I. Kralova and J. Sjöblom, "Biofuels—renewable energy sources: A review",

*Journal of Dispersion Science and Technology* 31 (2010) 409-425.

160. M. Charoenchaitrakool and J.Thienmethangkoon, "Statistical optimization for biodiesel production from waste frying oil through two-step catalyzed process", *Fuel Processing Technology* 92 (2011) 112-118.

161. T. Tan, J. Lu, K. Nie, L. Deng and F. Wang, "Biodiesel production with immobilized lipase: A review", *Biotechnol Adv* 28 (2010) 628-34.

162. A. Kumar and S. Sharma, "Potential non-edible oil resources as biodiesel feedstock: An Indian perspective", *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15 (2011) 1791-1800.

163. L. A. Nelson, T. A. Foglia and W. N. Marmer, "Lipase-catalyzed production of biodiesel", *Journal of the American Oil Chemists Society* 73 (1996) 1191-1195.

164. Y. Shimada, Y. Watanabe, T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda and Y. Tominaga, "Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase", *Journal of the American Oil Chemists Society* 76 (1999) 789-793.

165. Y. Shimada, Y. Watanabe, A. Sugihara and Y. Tominaga, "Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 17 (2002) 133-142.

166. Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara and Y. Tominaga, "Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor", *Journal of the American Oil Chemists Society* 78 (2001) 703-707.

167. Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara and Y. Tominaga, "Conversion of degummed soybean oil to biodiesel fuel with immobilized *Candida antarctica* lipase", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 17 (2002) 151-155.

168. Y. Watanabe, Y. Shimada, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda and Y. Tominaga, "Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase", *Journal of the American Oil Chemists Society* 77 (2000) 355-360.

169. S. M. P. Meneghetti, M. R. Meneghetti, C. R. Wolf, E. C. Silva, G. E. S. Lima, L. De Lira Silva, T. M. Serra and L. G. De Oliveira, "Biodiesel from Castor Oil: A Comparison of Ethanolysis versus Methanolysis", *Energy and Fuels* 20 (2006) 2262-2265.

170. N. Dizge and B. Keskinler, "Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase", *Biomass & Bioenergy* 32 (2008) 1274-1278.

171. L. Wang, W. Du, D. H. Liu, L. L. Li and N. M. Dai, "Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in *tert*-butanol system", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 43 (2006) 29-32.

172. G.V. Chowdary and S. G. Prapulla, "The influence of water activity on the lipase catalyzed synthesis of butyl butyrate by transesterification", *Process Biochemistry* 38 (2002) 393-397.

173. P.S.J.Cheetham, "The applications of enzymes in industry", Handbook of enzyme biotechnology (1995) Ellis Horwood Ltd, Chichester, U.K.

174. P. Adlercreutz, "Modes for using enzymes in organic media", Enzymatic reactions in organic media (1996) Blackie Academic and Professional, Scotland

175. B. Selmi and D. Thomas, "Immobilized lipase-catalyzed ethanolysis of sunflower oil in a solvent-free medium", *Journal of the American Oil Chemists Society* 75 (1998) 691-695.

176. W. Du, D. H. Liu, L. L. Li and L. M. Dai, "Mechanism exploration during lipase-mediated methanolysis of renewable oils for biodiesel production in a *tert*-butanol system", *Biotechnology Progress* 23 (2007) 1087-1090.

177. M. M. R. Talukder, J. C. Wu, T. B. Van Nguyen, N. M. Fen and Y. L. S. Melissa, "Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 60 (2009) 106-112.
178. E. Severac, O. Galy, F. Turon, P. Monsan and A. Marty, "Continuous lipase-catalyzed production of esters from crude high-oleic sunflower oil", *Bioresour Technol* 102 (2011) 4954-4961.
179. L. Fjerbaek, K. V. Christensen and B. Norddahl, "A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification", *Biotechnol Bioeng* 102 (2009) 1298-315.
180. M. Hajar, S. Shokrollahzadeh, F. Vahabzadeh and A. Monazzami, "Solvent-free methanolysis of canola oil in a packed-bed reactor with use of Novozym 435 plus loofa", *Enzyme and Microbial Technology* 45 (2009) 188-194.
181. S. Hama, H. Yamaji, T. Fukumizu, T. Numata, S. Tamalampudi, A. Kondo, H. Noda and H. Fukuda, "Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles", *Biochemical Engineering Journal* 34 (2007) 273-278.
182. J.C. Ogbonna, Y-C. Liu, Y-K. Liu and H. Tanaka, "Loofa (*Luffa cylindrica*) sponge as a carrier for microbial cell immobilization ", *Journal of Fermentation and Bioengineering* 78 (1994) 437-442.
183. L. F. Sotoft, B. G. Rong, K. V. Christensen and B. Norddahl, "Process simulation and economical evaluation of enzymatic biodiesel production plant", *Bioresour Technol* 101 (2010) 5266-74.
184. L. F. Sotoft, P. Westh, K. V. Christensen and B. Norddahl, "Novel investigation of enzymatic biodiesel reaction by isothermal calorimetry", *Thermochimica Acta* 501 (2010) 84-90.
185. M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254.
186. C.J. Shieh, H.F. Liao and C. C. Lee, "Optimization of lipase catalyzed biodiesel by response surface methodolgy", *Bioresource Technology* 88 (2003) 103-106.
187. B. Manohar and S. Divakar, "Applications of surface plots and statistical designs to selected lipase catalysed esterification reactions", *Process Biochemistry* 39 (2004) 847-853.
188. R. H. Valivety, P.J. Halling and A. R. Macrae, "*Rhizomucor miehei* lipase remains highly active at water activity below 0.0001", *FEBS Letters* 301 (1992) 261-264.
189. S. Tamalampudi, M. D. M. R. Talukder, S. Hama, T. Tanino, Y. Suzuki, A. Kondo and H. Fukuda, "Development of recombinant *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst expressing lipase-encoding gene from *Candida antarctica*", *Applied Microbiology and Biotechnology* 75 (2007) 387-395.
190. S. Al-Zuhair, "The effect of substrate concentrations on the production of biodiesel by lipase-catalysed transesterification of vegetable oils", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81 (2006) 299-305.
191. H.-M. Chang, H.-F. Liao, C.-C. Lee and C.-J. Shieh, "Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 80 (2005) 307-312.
192. E. Hernandez-Martin and C. Otero, "Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym (R) 435 and Lipozyme (R) TL IM", *Bioresour Technol* 99 (2008) 277-286.
193. S. Saka and Y. Isayama, "A new process for catalyst-free production of biodiesel



- using supercritical methyl acetate", *Fuel* 88 (2009) 1307-1313.
194. A. Casas, J.R. Ruiz, M.J. Ramos and A. Perez, "Effects of triacetin on biodiesel quality", *Energy Fuels* 24 (2010) 4481-4489.
195. A. Casas, M. J. Ramos and A. Perez, "New trends in biodiesel production: Chemical interesterification of sunflower oil with methyl acetate", *Biomass and Bioenergy* 35 (2011) 1702-1709.
196. E. Garcica, M. Laca, E. Pecrez, A. Garrido and J. Peinado, "New class of acetal derived from glycerin as a biodiesel fuel component", *Energy Fuels* 22 (2008) 4274-4280.
197. J. Bonet, J. Costa, R. Sire, J.M. Reneaume, A.E. Plesu and V. Plesu, "Revalorization of glycerol: comestible oil from biodiesel synthesis", *Food and Bioproducts Processing* 87 (2009) 171-178.
198. J. F. Shaw, S. W. Chang, S. C. Lin, T. T. Wu, H. Y. Ju, C. C. Akoh, R. H. Chang and C. J. Shieh, "Continuous enzymatic synthesis of biodiesel with Novozym 435", *Energy & Fuels* 22 (2008) 840-844.
199. R. C. Rodrigues, G. Volpato, M. A. Z. Ayub and K. Wada, "Lipase-catalyzed ethanolysis of soybean oil in a solvent-free system using central composite design and response surface methodology", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 83 (2008) 849-854.
200. D. S. Rodrigues, A. A. Mendes, W. S. Adriano, L. R. B. Goncalves and R. L. C. Giordano, "Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 51 (2008) 100-109.
201. C. Mateo, G. Fernandez-Lorente, O. Abian, R. Fernandez-Lafuente and J. Guisan, "Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve immobilization of proteins. The promotion of physical adsorption of proteins on the supports before their covalent linkage", *Biomacromolecules* 1 (2000) 739-745.
202. E. Katchalski-Katzir and D. M. Kraemer, "Eupergit (R) C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential", *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 10 (2000) 157-176.
203. J. M. Bolivar, C. Mateo, V. Grazu, A. V. Carrascosa, B. C. Pessela and J. M. Guisan, "Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: Amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports", *Process Biochemistry* 45 (2010) 1692-1698.
204. J.M. Bolivar, J. Rocha-Martin, C.Mateo, F.Cava, J. Berenguer, D. Vega, R. Fernandez-Lafuente and J. M. Guisan, "Purification and stabilization of a glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* via oriented multisubunit plus multipoint covalent immobilization", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 58 (2009) 158-163.
205. W. A. Patterson, "Infrared Absorption Bands Characteristic of Oxirane Ring", *Analytical Chemistry* 26 (1954) 823-835.
206. O. Alptekin, S.S. Tukul, D. Yildirim and D. Alagoz, "Immobilization of catalase onto Eupergit C and its characterization", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64 (2010) 177-183.
207. E. Severac, O. Galy, F. Turon, C.A. Pantel, J-S. Condoret, P. Monsan and A. Marty, "Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact", *Enzyme and Microbial Technology* 48 (2011) 61-70.

## Биографија аутора

Невена Луковић (девојачко Огњановић) рођена је у Београду где је завршила основну школу Краљ Петар I и III београдску гимназију. Студије на Технолошко-металуршком факултету Универзитета у Београду уписала је школске 1997/1998. године Дипломирала је на ТМФ-у на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију 05.10.2004. са оценом на дипломском раду 10 (десет) и просечном оценом у току студија 8,53. По завршетку редовних студија, уписала је магистарске студије на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију. Одлуком Наставно-научног већа одржаног 07.02.2008. године прелази са магистарских на докторске студије Технолошко-металуршког факултета на Катедри за биохемијско инжењерство и биотехнологију (ментор др Зорица Кнежевић-Југовић, ван. проф). Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских студија са просечном оценом 10,00, укључујући и завршни испит. Од 2005. до 2007. године Невена Луковић је као истраживач приправник била ангажована на научно-истраживачком пројекту Министарства за науку и заштиту животне средине Републике Србије под називом "Развој технологије синтезе биодизела" ев. број ТР6742 у оквиру програма за технолошки развој. Од априла 2008. до 2011. године била је запослена на пројекту технолошког развоја "Развој биотехнолошких поступака за производњу адитива и нових формулација за прехранбену индустрију" ев. број ТР20064 који је финансирало Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, а 25. јуна 2009. стиче звање истраживач сарадник.. У пројектном циклусу од 2011. године ангажована је на пројекту "Развој нових инкапсулационих и ензимских технологија за производњу биокатализатора и биолошки активних компонената хране у циљу повећања њене конкурентности, квалитета и безбедности" ев. бр. ИИИ 46010. Од јула 2013. године ангажована је на заједничком научноистраживачком пројекату између Републике Србије и Народне Републике Кине, под називом "Примена пољопривредног отпада за производњу ензима".

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора НЕВЕНА ЛУКОВИЋ  
Број индекса ДС-34/07  
Студијски програм ТЕХНОЛОГИЈЕ И ИНЖЕНЈЕРСТВО  
Наслов рада РАЗВОЈ ЕНЗИМСКОГ ПОСТУПКА ЗА СИНТЕЗУ МЕТИЛ ЕСТЕРА МАСЛИХ ИКСЕЛИНА  
Ментор Др ЗОРИЦА КНЕЖЕВИЋ-ЈУРКОВИЋ

Потписани/а НЕВЕНА ЛУКОВИЋ

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 10.1.2014.

Невена Луковић

## Изјава о ауторству

Потписани-а НЕВЕНА ЛУКОВИЋ  
број индекса ДС-34/07

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом  
РАЗВОЈ ЕНЗИМСКОГ ПОСТУПКА ЗА СИНТЕЗУ МЕТИЛ  
ЕСТАРА МАШНИХ КИСЕЛИНА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

### Потпис докторанда

У Београду, 10.1.2014.

Невена Луковић

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

РАЗВОЈ ЕНЗИМСКОГ ПОСТУПКА ЗА СИНТЕЗУ

МЕТИЛ ЕСТАРА МАСНИХ КИСЕЛИНА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 10.1.2014

Невена Луковић