

# Rapsų aliejaus peresterinimas metilformiatu biokatalitiniu metodu

Violeta Makarevičienė<sup>1</sup>,

Ieva Sendžikaitė<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Vytauto Didžiojo universiteto  
Žemės ūkio akademija,  
Studentų 11, 53361 Akademija, Kauno r.  
El. paštas violeta.makareviciene@asu.lt

<sup>2</sup> Kauno technologijos universitetas,  
Radvilėnų pl. 19, 50254 Kaunas  
El. paštas ieva.sendzikaitė@ktu.edu

Gaminant biodyzeliną susidaro šalutinis gamybos produktas – glicerolio fazė (apie 10 % nuo gauto produkto). Augalinio aliejaus peresterinimui naudojant mažos masės karboksirūgščių esterius, nesusidaro įprastinės biodyzelino gamybos šalutinis produktas glicerolis, jo junginiai (mono-, di- ir triformilgliceridai) kartu su biodyzelinu gali būti naudojami kaip degalai dyzeliniuose varikliuose. Darbo tikslas – ištirti metilformiato panaudojimo biodyzelino gamyboje galimybes taikant biotechnologinius metodus. Tyrimai atlikti Aleksandro Stulginskio universiteto Aplinkos technologijos cheminių ir biocheminių tyrimų laboratorijoje. Nustatyta, kad fermentinis preparatas Lipozyme RM IM yra efektyvus rapsų aliejaus peresterinimui metilformiatu. Didžiausia rapsų aliejaus metilesterių išeiga gaunama šiomis sąlygomis: 13 % fermento Lipozyme RM IM (nuo aliejaus masės), metilformiato ir aliejaus molinis santykis – 32:1, temperatūra – 20 °C, trukmė – 42 val. Šiomis sąlygomis gaunama 60,68 ± 0,95 % rapsų aliejaus metilesterių išeiga.

**Raktažodžiai:** biodyzelinas, metilformiatas, peresterinimas, fermentai

## ĮVADAS

Dažniausiai biodyzelinas gaminamas taikant cheminį aliejaus peresterinimo procesą metanolio (Basha et al., 2009). Be rapsų aliejaus metilesterių (biodyzelino), susidaro šalutinis produktas – glicerolio fazė (apie 10 % nuo gauto produkto), kurios sudėtis skiriasi, priklausomai nuo taikomos biodyzelino gamybos technologijos. Glicerolio fazė susideda iš 80–90 % glicerolio, riebalų rūgščių metilesterių (RRME), muilų, alkoholio ir vandens (Ayoub et al., 2012). Grynas glicerolis yra naudojamas popieriaus, esterių, tabako, celiuliozės, maisto, farmacijos pramonėje ir kt. (Behr et al., 2001; Klepavova et al., 2003; Karinen, Krause, 2006). Jis taip pat gali būti naudojamas kombinuotų pašarų ar medžio briketų gamyboje (Saoharit, Khanal, 2011; Raslavičius, 2012). Gaminant biodyzeliną susidaro glicerolio

fazė, turinti įvairių priemaišų. Prieš naudojimą anksčiau minėtiems tikslams ją būtina išvalyti. Šis procesas reikalauja didelių energijos ir materialinių sąnaudų (Azita et al., 2012; Quispe et al., 2013). Biodyzelino gamybos procesas taptų ekonomiškai efektyvesnis, jeigu nesusidarytų šalutinių produktų ar būtų rastos naujos glicerolio panaudojimo galimybės. Viena iš tokių galimybių – aliejaus peresterinimo procese naudojamą metanolį pakeisti mažos masės karboksirūgščių esteriais arba taikyti superkrizines sąlygas (aukštą temperatūrą ir slėgį). Tačiau superkrizinės sąlygos reikalauja didelių energetinių sąnaudų: aukšto slėgio (20–43 MPa) ir temperatūros (350–400 °C) (Van Kasteren et al., 2007; Shiro, Isayama, 2009; Tat et al., 2011; García-Martínez et al., 2017; Lamba et al., 2017). Biodyzelino gamybos procese, naudojant mažos molekulinės masės karboksirūgščių esterius, nesusidaro įprastinės

biodyzelino gamybos šalutinis produktas – glicerolis (Casas et al., 2011; Huang et al., 2015; Alavianmehr et al., 2017), o gauti jo dariniai (glicerolio ir mažos masės karboksirūgščių esteriai) gerai tirpsta biodyzeline. Gautas mišinys pasižymi geresnėmis žematemperatūrinėmis savybėmis nei grynas biodyzelinas ir gali būti naudojamas kaip degalai dyzeliniuose varikliuose. Šaltesnio klimato zonose biodyzelino naudojimą pristabdo ir tai, kad žiemos sezonu naudojamas dyzelinas turi atitikti antros arktinės klasės reikalavimus, t. y. ribinė filtruojamumo temperatūra (RFT) turi būti žemesnė nei  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ši priežastis verčia ieškoti būdų, kaip sumažinti ribinę filtruojamumo temperatūrą. Pramoniniai depresantai, kurių reikia labai daug pridėti į riebalų rūgščių metilesterius (RRME), labai padidina produkto savikainą. Vienas iš galimų būdų pažeminti RFT – tai mažos molekulinės masės karboksirūgščių ir glicerolio esterio priedas (Wessendorf, 1995; Serdadi et al., 1999; EP1331260, 2008). Tirtas metodas, kai žalias glicerolis (gautas peresterinimo metu) paverčiamas į glicerolio triacetatą. Glicerolio triacetato mišinys su riebalų rūgščių metil- arba etilesteriais leidžia gauti biodyzeliną su pagerintomis savybėmis, ypač žematemperatūrinėmis (EP 1331260A2, 2003; EP 1985684B1, 2009), ir išvengti brangios glicerolio valymo procedūros (Quispe, 2013).

Įvairių alkoholių ir acto rūgšties esterių panaudojimą rapsų aliejaus peresterinimui pasitelkiant natrio metoksido katalizatorių tyrė Z. Sustere ir kt. (2016). Nustatytos optimalios proceso sąlygos: optimalus molinis alkilacetatų ir aliejaus santykis 36 : 1, proceso temperatūra – alkilacetatų virimo temperatūra. Riebalų rūgščių alkilesterių išeiga buvo 93, 89, 87 ir 88 %, kai naudoti metil-, etil-, propil- ir izopropilacetatai (Sustere et al., 2016). Kai kurių šalių mokslininkai analizavo metil- ir etilacetatų panaudojimą biodyzelino gamyboje taikant biotechnologinius metodus ir naudojant įvairių rūšių aliejų (Wey et al., 2004; Xu, 2005; Kumar et al., 2007; Chinh et al., 2018). Nustatyta, kad tokio proceso metu ne tik nesusidaro šalutinių produktų, bet ir neinaaktyvuojami fermentai kaip naudojant metanolį (Nguyen et al., 2017).

Rapsų aliejaus peresterinimui galima būtų naudoti metilformiatą, kuris gaunamas iš metanolio. Metilformiatas iš metanolio gali būti pagamintas įvairiais būdais: iš dalies oksiduojant

metanolį ant aktyvių platinoidinių heterogeninių katalizatorių su deguonies trūkumu; taikant metanolio karbonizaciją į metilformiatą natrio metilatu; metanolio karbonizaciją anglies monoksidu naudojant turinčius vario, platinos ir anijonines grupes bei kitus panašius heterogeninius katalizatorius; dehidrinant metanolį su vario ir kitais heterogeniniais katalizatoriais (Tonner et al., 1984; Ma, 2002).

Pradėti metilformiato panaudojimo biodegalų sintezėje tyrimai naudojant rapsų aliejų ir cheminį katalizatorių (28,6 % natrio metoksido tirpalą metanolyje). Nustatyta, kad sintezę vykdant  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, esant katalizatoriaus ir aliejaus moliniam santykiui 0,16 : 1, metilformiato ir aliejaus moliniam santykiui 18 : 1, reakcijos trukmei 60 min., gaunama 88,3 % biodyzelino išeiga (Sustere, Kampars, 2017). Tačiau duomenų apie metilformiato panaudojimą biotechnologinėje biodyzelino sintezėje nėra.

Darbo tikslas – ištirti metilformiato panaudojimo biodyzelino gamyboje galimybes taikant biotechnologinius metodus.

## TYRIMŲ METODAI IR SĄLYGOS

Tyrimai atlikti Aleksandro Stulginskio universiteto Aplinkos technologijos cheminių ir biocheminių tyrimų laboratorijoje 2017–2018 metais.

Tyrimams naudoti reagentai:

- rafnuotas rapsų aliejus, atitinkantis LST 1959 reikalavimus;
- metilformiatas (analiziškai grynas, UAB Labochema);
- dietileteris (analiziškai grynas, UAB Labochema);
- acto rūgštis (99,8 %, analiziškai gryna, Penta);
- petroleteris (analiziškai grynas, Sigma-Aldrich);
- jodas (99,8 %, analiziškai grynas, Sigma-Aldrich).

Atrenkant efektyviausią peresterinimo procese lipazę buvo panaudoti šie biokatalizatoriai: 1 – Lipase F-EC (lipazė iš *Rhizopus oryzae*, imobilizuota ant dekstrino, aktyvumas  $\geq 150\text{ kU/g}$ ); 2 – Lipase G „Amano“ 50 (lipazė iš *Penicillium camemberti*, milteliai, aktyvumas  $\geq 50\text{ kU/g}$ ); 3 – Lipase su perlite (lipazė iš *Enterobacter aerogenes* E13, imobilizuota ant perlito); 4 – Lipozyme RM IM (lipazė iš *Rhizomucor miehei*, imobilizuota

ant makroporingo plastiko, aktyvumas >30 U/g); 5 – Lipozyme TL IM (lipazė iš *Thermomyces lanuginosus*, imobilizuota ant silikagelio, aktyvumas  $\geq 3\ 000$  U/g); 6 – Lipozyme 435 (lipazė iš *Candida antarctica*, imobilizuota ant polipropileno, aktyvumas – 600 U/g); 7 – Novozym 435 (lipazė iš *Candida antarctica*, imobilizuota ant polipropileno, aktyvumas  $\geq 5\ 000$  U/g); 8 – Lipolase 100L (lipazė iš *Thermomyces lanuginosus*, skysta, aktyvumas 122 kU/g); 9 – Lipex 100L (lipazė iš *Thermomyces lanuginosus*, skysta, aktyvumas 10 kU/g); 10 – Palatase 20000L; 11 – Lecitase Ultra (lipazė iš *Fusarium oxysporum*, skysta, aktyvumas 150 U/g); 12 – Resinase 2X (lipazė iš *Aspergillus oryzae*, skysta, aktyvumas 119,6 kU/g); 13 – Lipozyme CALB (lipazė iš *Candida antarctica* B., skysta, aktyvumas 5 000 U/g); 14 – Lipozyme TL 100L (lipazė iš *Thermomyces lanuginosus*, skysta, aktyvumas 100 kU/g); 15 – Lipex 100L (lipazė iš *Thermomyces lanuginosus*, skysta, aktyvumas 10 kU/g).

Rapsų aliejaus peresterinimo metilformiatu tyrimai naudojant biokatalizatorius atlikti kūginėje kolboje, kuri buvo sujungta su grįžtamuju kondensatoriumi, termometru su temperatūros kontrolieriu ir maišykle (maišyta nekintančiu sūkių dažniu  $250\ \text{min}^{-1}$ ). Į kolbą įpilta rapsų aliejaus ir metilformiato mišinio, nuolatos maišyta ir įdėta biokatalizatoriaus.

Siekiant parinkti efektyviausią biokatalizatorių, tyrimai buvo atliekami esant vienodoms sąlygoms: temperatūra – 20 °C; fermento kiekis – 10 % (nuo aliejaus kiekio); metilformiato ir aliejaus molinis santykis – 12 : 1; reakcijos trukmė – 5 valandos. Praėjus numatytam laikui, mišinys buvo nufiltruojamas, t. y. pašalinamas biokatalizatorius. Iš likusio mišinio 52 °C išgarinamas metilformiato perteklius. Gautas produktas (biodyzelino (rapsų aliejaus riebalų rūgščių metilesterių) ir formilglicerolio mišinys) analizuotas plonasluoksnės chromatografijos metodu ant boru impregnuotų silikagelio G-25 plokštelių (sluoksnio storis 0,25 mm). Produktas (50  $\mu\text{l}$ ) buvo ištirpinamas 500  $\mu\text{l}$  dietileteryje, gautas mišinys homogenizuotas. Ant plonasluoksnės chromatografijos plokštelių švirkštu užlašinta 2  $\mu\text{l}$  paruošto mišinio. Kaip kontrolė naudoti rapsų aliejus (RA), rapsų aliejaus riebalų rūgščių metilesteriai (RME) ir glicerolis ( $K_G$ ). Plokštelės buvo įmerkiamos į tirpiklių (petroleteris, dietileteris ir

acto rūgštis, sumaišyti atitinkamai 70 : 30 : 1 tūrio dalimis) mišinį ir buvo laikomos tol, kol eliuentas pasieks apie 1–1,5 cm iki plokštelių viršaus. Tada plokštelės buvo išimamos, džiovinamos ir laikomos jodo garuose. Kai vaizdas išryškėjo, plokštelės analizuotos – tirtų mėginių dėmės lygintos su kontrolės dėmėmis (buvo atsižvelgiama į dėmės padėtį, ryškumą ir jos plotą).

Parinkus aktyviausią biokatalizatorių peresterinimo metilformiatu procesui, buvo tiriamos optimalios biotechnologinio metodo sąlygos. Tyrimai buvo atliekami esant tokioms sąlygoms: temperatūra – 20 °C; metilformiato ir aliejaus molinis santykis – nuo 6 : 1 iki 24 : 1; fermento kiekis – nuo 5 iki 17 %; vandens kiekis – nuo 0 iki 10 %; sintezės trukmė – nuo 3 iki 48 valandų.

Esterių kiekis buvo vertintas pagal formilgliceridų kiekį mėginyje. Glicerolis, formilgliceridai (monoformilgliceridai, diformilgliceridai ir triformilgliceridai) analizuoti dujiniu chromatografu Perkin Elmer Clarus 500 (detektorius – FID, kolonėlė – Restek MXT-Biodiesel TG (0, 15 m, – 0,32 mm – 0,10  $\mu\text{m}$ ) pagal standartą LST EN 14105.

Esterių kiekis iš nustatyto gliceridų kiekio apskaičiuotas pagal formulę:

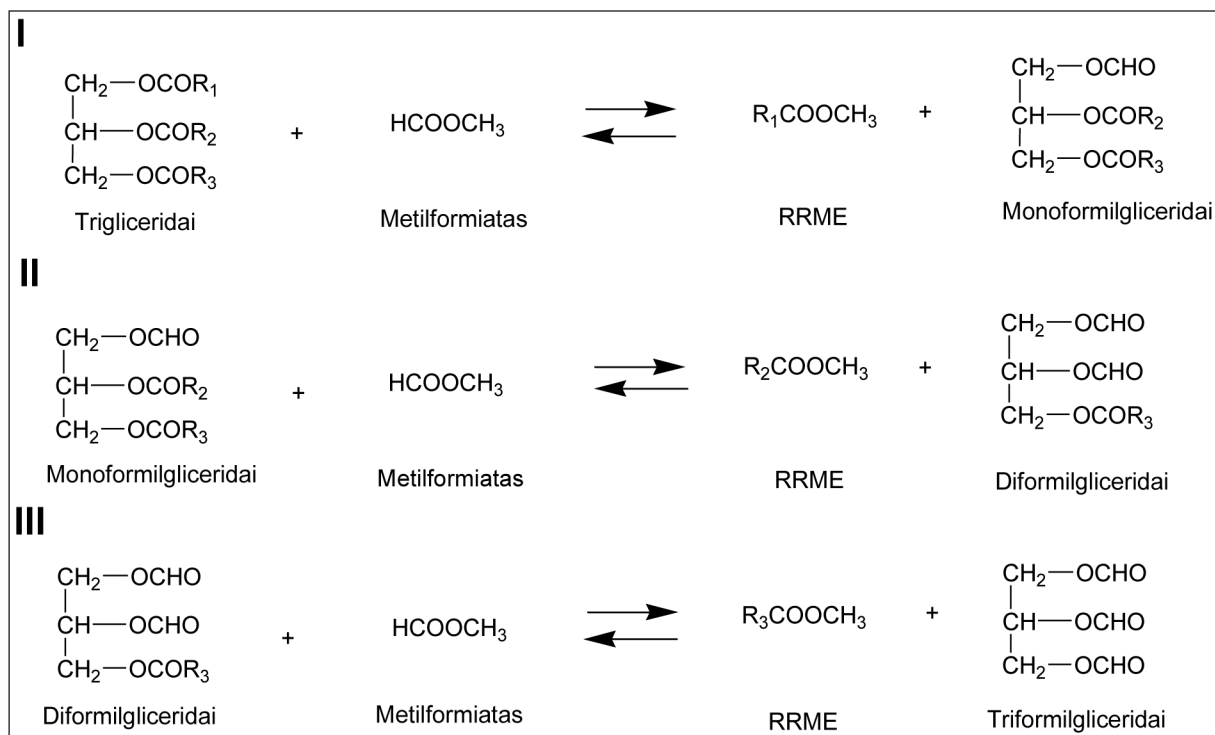
$$\eta_E = 100 \cdot \left( 1 - \frac{0,427 \cdot \text{MG} + 0,271 \cdot \text{MD} + 0,199 \cdot \text{TG}}{19,9} \right);$$

$\eta_E$  – esterių kiekis, %; MG, DG, TG – mono-, di- ir triformilgliceridų koncentracija (nustatyta dujinės chromatografijos metodu), %; 0,427; 0,1271 ir 0,199 – perskaičiavimo koeficientai atitinkamiems formilgliceridams; 19,9 – formilglicerolio kiekis, gaunamas iš 100 g rapsų aliejaus.

Teorinis RME kiekis reakcijos produkte reaguojant rapsų aliejui su metilformiatu – 80,1 %, triformilgliceridų – 19,9 %. RME išeiga (%) apskaičiuota eksperimentinį kiekį padalijus iš teorinio.

## TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Trigliceridų peresterinimo metilformiatu schema pateikta 1 paveiksle. Pirmoje stadijoje trigliceridai reaguoja su metilformiatu (MF), susidaro riebalų rūgščių metilesteriai (RME) ir monoformilgliceridai, kurie antroje stadijoje reaguoja su MF, susidaro RME ir diformilgliceridai, kurie trečioje stadijoje reaguoja su MF, ir susidaro galutiniai produktai – RME ir triformilgliceridai.



**1 pav.** Trigliceridų peresterinimo metilformiatu schema

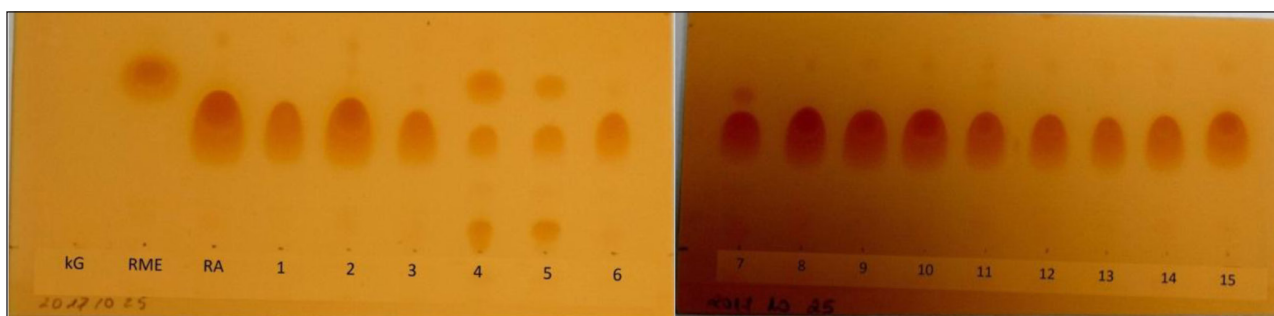
*Fig. 1. Scheme of interesterification of triglyceride using methyl formate*

### Biokatalizatoriaus parinkimas

Pirmajame etape buvo parenkamas efektyviausias biokatalizatorius, tinkantis rapsų aliejaus metilesterių sintezei naudojant metilformiatą. Tirta penkiolika skirtingų lipazių. Kontroliniai mėginiai – glicerolis ( $K_G$ ), rapsų aliejus (RA) ir rapsų aliejaus riebalų rūgščių metilesteriai (RME).

Gauti plonasluoksnės chromatografijos tyrimų rezultatai pateikti 2 paveiksle.

Kaip matyti iš pateiktos chromatogramos, RME ir formilglicerolio sintezėje daugelis tirtų lipazių neveiksmingos. Sintezę katalizuojant Lipase su perlite, Lipozyme RM IM, Novozyme 435, Lipolase 100L, 9 – Lipex 100L, 10 – Palatase



**2 pav.** Rapsų aliejaus peresterinimo metilformiatu reakcijos produktai naudojant skirtingas lipazes: 1 – Lipase F-EC; 2 – Lipase G „Amano“ 50; 3 – Lipase su perlite; 4 – Lipozyme RM IM; 5 – Lipozyme TLIM; 6 – Lipozyme 435; 7 – Novozym 435; 8 – Lipolase 100L; 9 – Lipex 100L; 10 – Palatase 20000L; 11 – Lecitase Ultra; 12 – Resinase 2X; 13 – Lipozyme CALB; 14 – Lipozyme TL 100L; 15 – Lipex 100L. Kontrolė –  $K_G$  – glicerolis, RME – rapsų aliejaus metilesteriai, RA – rapsų aliejus

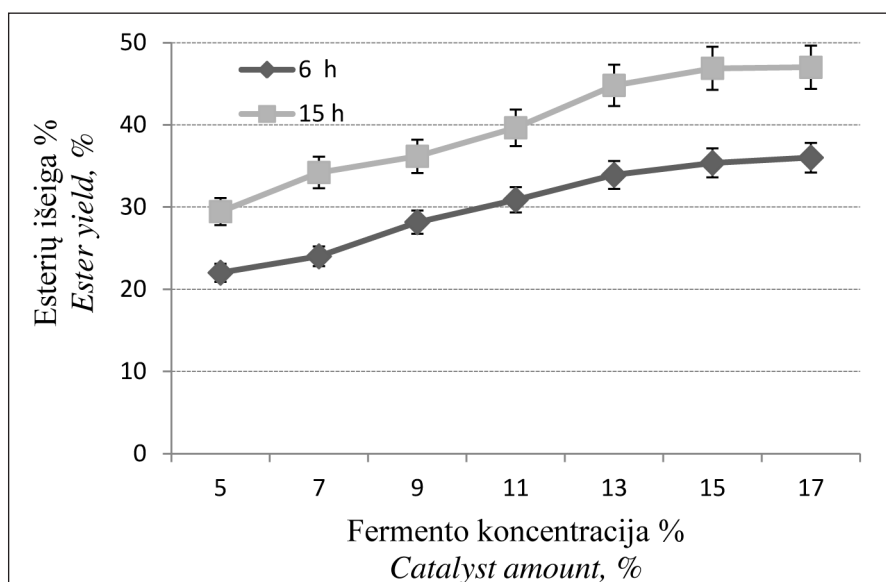
*Fig. 2. Reaction products of interesterification of rapeseed oil with methyl formate using different lipases: 1, Lipase F-EC; 2, Lipase G 'Amano' 50; 3, Lipase with perlite; 4, Lipozyme RM IM; 5, Lipozyme TLIM; 6, Lipozyme 435; 7, Novozym 435; 8, Lipolase 100L; 9, Lipex 100L; 10, Palatase 20000L; 11, Lecitase Ultra; 12, Resinase 2X; 13, Lipozyme CALB; 14, Lipozyme TL 100L; 15, Lipex 100L. Control,  $K_G$  – glycerol; RME, rapeseed oil methyl esters; RA, rapeseed oil*

20000L, 11 – Lecitase Ultra fermentais RME susidaro, tačiau lieka ir nesureagavusio aliejaus. Didesniu efektyvumu pasižymi trys lipazės, kurias pagal efektyvumą galima išdėstyti tokia tvarka (link efektyviausio fermentinio preparato): Novozyme 435, Lipase su perlite ir Lipozyme RM IM (pats efektyviausias). Taigi tolimesniems tyrimams buvo pasirinktas fermentas Lipozyme RM IM. M. K. Modi ir kt. (2007), tyrę žalio aliejaus iš *Jatropha curcas* (jatropha), *Pongamia pinnata* (karanja) ir *Helianthus annuus* (saulėgrąžų) peresterinimą etilacetatu, naudojo Novozyme 435 fermentą, tačiau jie netyrė kitų fermentų efektyvumo ir nevykdė atrankos (Modi et al., 2007). Mokslininkai, analizavę biotechnologinį sojų aliejaus peresterinimo procesą, naudojo fermentinį preparatą Novozyme 435 (Du et al., 2004). Vabzdžių riebalų peresterinimui metilacetatu taip pat naudotas Novozyme 435 (Nguyen et al., 2018), kuris yra gaminamas pramoniniu būdu ir daugelio mokslininkų įvardijamas kaip efektyviausias fermentinėje biodyzelino sintezėje. Tačiau nerasta duomenų apie efektyviausio fermento parinkimą peresterinant aliejų mažos masės karboksirūgščių esteriais. Fermentas Lipozyme RM IM mokslininkų naudotas kaip efektyviausias augalinio aliejaus peresterinimui įvairiais alkoholiais (Rodrigues et al., 2008; Sendzikiene et al., 2016).

### Optimalių proceso sąlygų parinkimas

Pradiniame etape, siekiant nustatyti tinkamiausias peresterinimo metilformiatu sąlygas, parinktas optimalus fermento Lipozyme RM IM kiekis. Tyrimai atlikti reakcijos terpėje esant nuo 9 iki 17 % (aliejaus masės) katalizatoriaus, vykdant procesą 6 ir 15 val., esant metilformiatu ir aliejaus moliniam santykiui – 12 : 1; temperatūrai – 20 °C. Gauti tyrimų rezultatai pateikti 3 paveiksle.

Iš pateiktų duomenų matyti, kad didėjant fermento kiekiui bei trukmei auga ir esterių išeiga. Kai fermento kiekis 9 %, o proceso trukmė 6 val., rapsų aliejaus metilesterių esterių išeiga siekia  $28,16 \pm 0,10$  %; 15 val. –  $36,17 \pm 0,12$  %. Padidinus fermento koncentraciją iki 13 %, esterių išeiga padidėja iki  $33,9 \pm 0,14$  % (vykdant procesą 6 val.) ir  $44,81 \pm 0,18$  % (esant 15 val. trukmei). Padidinus biokatalizatoriaus kiekį iki 15 %, esterių išeiga kinta nežymiai: esant 6 val. proceso trukmei, esterių išeiga siekia  $35,37 \pm 0,15$  %, procesą vykdant 15 val., gaunama  $46,88 \pm 0,15$  % rapsų aliejaus metilesterių esterių išeiga. Atsižvelgiant į tai, kad esterių išeiga tik šiek tiek padidėjo ir į tai, kad fermentiniai preparatai yra brangūs, juos sunku regeneruoti ir naudoti pakartotinai, tolesniems tyrimams pasirinktas 13 % fermentinio preparato kiekis. Mokslininkai, tyrę augalinio



**3 pav.** Rapsų aliejaus metilesterių išeigos priklausomybė nuo fermento koncentracijos, kai proceso trukmė 6 ir 15 val.

**Fig. 3.** Dependence of the rapeseed oil methyl ester yield on the amount of the catalyst when the process duration is 6 and 15 hours

aliejaus peresterinimą etilacetatu, naudojo fermentą Novozyme 435 ir nustatė, kad optimalus jo kiekis – 10 % (Modi et al., 2007). W. Du ir kt. (2004) augalinio aliejaus peresterinimui naudojo metilacetatą ir Novozyme 435 kaip katalizatorių, kurio nustatyta optimali koncentracija – 30 % (Du et al., 2004).

Augalinio aliejaus peresterinimo, kaip ir kitų cheminių procesų, efektyvumui ir produktų išeigai didelę įtaką turi reaguojančių medžiagų molinis santykis. Vienam moliui aliejaus teoriškai reikia trijų molių alkoholio (1 pav.) ar mažos molekulinės masės rūgščių ir metanolio esterių. Biodyzelino sintezės reakcija pasižymi pusiausvyra, todėl tam, kad padidėtų produkto išeiga, paprastai naudojamas didesnis nei teorinis metanolio ar mažos masės karboksirūgščių metilesterių kiekis.

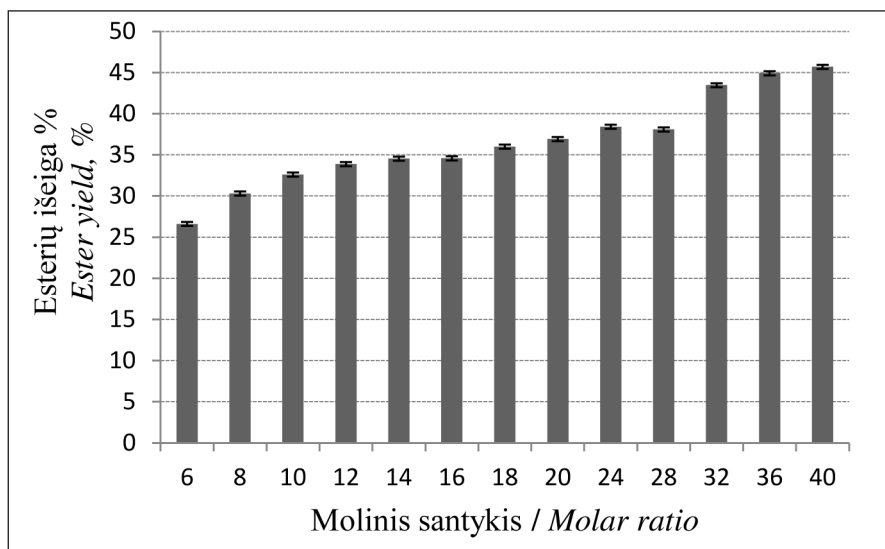
Siekdami nustatyti optimalų metilformiato kiekį, molinį metilformiato ir aliejaus santykį keitėme nuo 6 iki 40. Procesą vykdėme naudodami 13 % lipazės Lipozyme TL IM esant 20 °C temperatūrai ir 6 val. proceso trukmei. 1 lentelėje pateikti duomenys apie gliceridų kiekį reakcijos produkte, o 4 pav. parodyta rapsų aliejaus metilesterių išeigos priklausomybė nuo metilformiato ir rapsų aliejaus molinio santykio.

Kaip matyti iš pateiktų duomenų, esant metilformiato ir aliejaus moliniam santykiui 6 : 1 rapsų aliejaus metilesterių išeiga siekia  $26,6 \pm 0,09$  %. Didėjant metilformiato ir aliejaus moliniam santykiui rapsų aliejaus metilesterių išeiga didėja: kai molinis santykis 8 : 1, esterių išeiga yra  $30,29 \pm 0,10$  %; kai molinis santykis 14 : 1, išeiga siekia  $34,52 \pm 0,10$  %; kai molinis santykis 32 : 1, išeiga –  $43,45 \pm 0,12$  %. Toliau didinant reaguojančių medžiagų molinį santykį (iki 36 : 1 ir 40 : 1) esterių išeiga šiek tiek didėja (iki  $44,9 \pm 0,11$  ir  $45,59 \pm 0,12$  %). Galima teigti, kad optimalus metilformiato ir rapsų aliejaus molinis santykis yra 32 : 1. Kai kurie tyrėjai mano, kad didinant metanolio ir mažos molekulinės masės rūgščių esterių kiekį reakcijos terpėje prasideda fermento inaktyvacija ir mažėja produkto išeiga. Panašios tendencijos pastebėtos ir įprastinio aliejaus peresterinimo metanoliumi, naudojant biokatalizatorius, atveju. Tyrimų, naudojant aliejaus peresterinimui įvairius alkoholius, rezultatai rodo, kad didesni metanolio kiekiai inaktyvuoja lipazes (Shimada et al., 1999; Shimada et al., 2002; Du et al., 2004). W. Du ir kt. (2004) nustatė, kad fermentų aktyvumą slopina ir mažos masės karboksirūgščių esteriai, turintys metilo grupes

1 lentelė. Reakcijos produkto sudėtis esant skirtingam metilformiato ir rapsų aliejaus moliniam santykiui

Table 1. Composition of the reaction product at a different molar ratio of methyl formate and rapeseed oil

Metilformiato ir aliejaus molinis santykis <i>The molar ratio of methyl formate to oil</i>	Trigliceridai % <i>Triglycerides, %</i>	Monoformilgliceridai % <i>Monoformilglycerides, %</i>	Diformilgliceridai % <i>Diformilglycerides, %</i>	Triformilgliceridai % <i>Triformilglycerides, %</i>	Esterių koncentracija % <i>Ester concentration, %</i>
6	45,58 ± 0,12	3,89 ± 0,11	15,62 ± 0,10	5,52 ± 0,10	22,20 ± 0,11
8	41,11 ± 0,09	4,90 ± 0,10	15,61 ± 0,10	6,28 ± 0,12	25,28 ± 0,12
10	40,01 ± 0,11	5,48 ± 0,11	17,02 ± 0,12	6,76 ± 0,10	27,21 ± 0,11
12	40,18 ± 0,12	6,22 ± 0,16	17,64 ± 0,14	7,02 ± 0,18	28,26 ± 0,11
14	40,45 ± 0,14	6,26 ± 0,11	18,28 ± 0,14	7,16 ± 0,14	28,81 ± 0,13
16	41,25 ± 0,18	6,57 ± 0,14	19,43 ± 0,15	6,96 ± 0,18	28,02 ± 0,19
18	39,15 ± 0,14	6,80 ± 0,11	18,87 ± 0,12	7,46 ± 0,11	30,04 ± 0,15
20	44,7 ± 0,17	8,08 ± 0,15	20,18 ± 0,16	7,65 ± 0,12	30,80 ± 0,14
24	34,97 ± 0,13	8,18 ± 0,13	22,48 ± 0,14	7,96 ± 0,11	32,06 ± 0,15
28	35,78 ± 0,16	8,82 ± 0,14	21,53 ± 0,14	7,89 ± 0,13	31,77 ± 0,15
32	30,18 ± 0,17	9,54 ± 0,14	21,98 ± 0,15	9,01 ± 0,17	36,26 ± 0,14
36	27,03 ± 0,21	9,37 ± 0,19	21,52 ± 0,18	9,31 ± 0,18	37,47 ± 0,19
40	28,87 ± 0,18	9,60 ± 0,16	21,94 ± 0,15	9,47 ± 0,16	38,10 ± 0,16



**4 pav.** Rapsų aliejaus metilesterių išeigos priklausomybė nuo metilformiato ir aliejaus molinio santykio

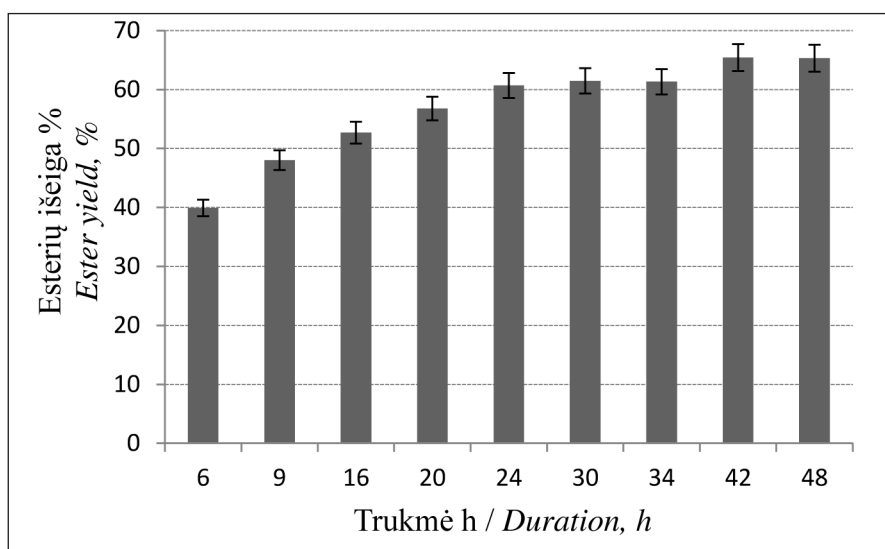
*Fig. 4. Dependence of the rapeseed oil methylester yield on the molar ratio of methyl formate to oil*

(pvz., metilacetatas), o esteriai, kuriuose yra etilo grupės (etilacetatas, etilformiatas), neturi jokios neigiamos įtakos fermentų aktyvumui. Tai sutampa su mūsų gautais rezultatais, kad didesni metilformiato kiekiai slopina fermento aktyvumą.

Reakcijos trukmė – vienas svarbesnių veiksnių, darančių įtaką biotechnologinių procesų išeigai. Siekiant įvertinti proceso trukmės įtaką rapsų aliejaus interesterinimo metilformiatu procesui, tyrimai atlikti keičiant proceso trukmę nuo 6 iki

48 val., esant metilformiato ir aliejaus moliniam santykiui 32 : 1, fermento kiekiui – 13 %, temperatūrai – 20 °C. Gauti rezultatai pateikti 5 pav., o reakcijos produkto gliceridų sudėtis, priklausomai nuo proceso trukmės, 2 lentelėje.

Nesunku pastebėti, kad didėjant proceso trukmei didėja ir metilesterių išeiga. Peresterinimą vykdant 6 val., esterių išeiga siekia  $39,9 \pm 0,91$  %, o kai trukmė 16 val., metilesterių išeiga padidėja iki  $52,7 \pm 1,05$  %. Vykdamas procesą 24 val. pasiekama



**5 pav.** Rapsų aliejaus metilesterių išeigos priklausomybė nuo reakcijos trukmės

*Fig. 5. Dependence of the rapeseed oil methylester yield on the reaction duration*

2 lentelė. Reakcijos produkto sudėtis esant skirtingai peresterinimo proceso trukmei

Table 2. Composition of the reaction product at a different duration of interesterification

Trukmė val. Duration, h	Trigliceridai % Triglycerides, %	Monoformilgliceridai % Monoformilglycerides, %	Diformilgliceridai % Diformilglycerides, %	Triformilgliceridai % Triformilglycerides, %	Esterių koncentracija % Ester concentration, %
6	43,3 ± 0,15	10,97 ± 0,22	17,11 ± 0,12	8,28 ± 0,19	33,32 ± 0,21
9	30,11 ± 0,19	13,76 ± 0,25	13,44 ± 0,22	9,96 ± 0,18	40,08 ± 0,19
16	23,3 ± 0,20	12,76 ± 0,12	12,18 ± 0,18	10,92 ± 0,11	43,97 ± 0,14
20	17,69 ± 0,21	13,75 ± 0,11	10,94 ± 0,09	11,77 ± 0,14	47,39 ± 0,16
24	15,5 ± 0,09	13,6 ± 0,19	8,85 ± 0,11	12,37 ± 0,15	49,81 ± 0,10
30	12,11 ± 0,12	14,69 ± 0,15	8,85 ± 0,09	12,74 ± 0,11	51,3 ± 0,18
34	10,48 ± 0,11	14,25 ± 0,14	7,92 ± 0,11	12,72 ± 0,14	51,18 ± 0,14
42	10,52 ± 0,09	14,85 ± 0,21	7,63 ± 0,18	13,56 ± 0,17	54,6 ± 0,14
48	9,22 ± 0,10	14,77 ± 0,16	7,13 ± 0,15	13,54 ± 0,14	54,5 ± 0,11

60,68 ± 0,95 % metilesterių išeiga. Dar labiau didinat proceso trukmę esterių išeiga didėja lėčiau: kai proceso trukmė 30 val., esterių išeiga siekia 61,47 ± 1,10 %, kai 42 val. ir 48 val., gaunama atitinkamai 65,4 ± 1,11 % ir 65,3 ± 1,14 % išeiga. Iš gautų rezultatų galima daryti išvadą, kad optimali proceso trukmė yra 42 valandos.

Apibendrinant rapsų aliejaus peresterinimo metilformiatu proceso tyrimų metu gautus rezultatus galima teigti, kad didžiausia rapsų aliejaus metilesterių išeiga gaunama naudojant 13 % aliejaus masės fermentinio preparato Lipozyme TL IM, imant 32 : 1 metilformiato ir aliejaus molinį santykį, reakciją vykdant 42 val. 20 °C temperatūroje. Tačiau tokiomis sąlygomis peresterinama tik 60,68 ± 0,95 % rapsų aliejaus. Ši išeiga nėra pakankama, toks produktas negali būti tiesiogiai naudojamas kaip degalai dyzeliniam varikliui. Būtina tirti kitas galimybes, didinti metilesterių išeigą. Viena tokių – taikyti daugiastadijinį peresterinimo procesą, kaip tai daroma įprastinėje biodyzelino sintezėje taikant dviejų ar trijų stadijų procesus.

## IŠVADOS

- Iš tirtų penkiolikos lipazių efektyviausias biokatalizatorius, tinkantis rapsų aliejaus peresterinimui metilformiatu, yra Lipozyme RM IM. Optimalus jo kiekis – 13 % (aliejaus masės).

- Didžiausia rapsų aliejaus metilesterių išeiga gaunama peresterinimo procesą vykdant 20 °C

temperatūroje esant metilformiato ir aliejaus moliniam santykiui 32 : 1, kai proceso trukmė 42 valandos.

- Nustatytomis sąlygomis peresterinama 60,68 ± 0,95 % aliejaus. Metilesterių išeiga yra per maža, kad būtų galima tiesiogiai reakcijos produktą naudoti kaip degalus. Siekiant padidinti išeigą, tikslinga taikyti antrąją peresterinimo stadiją.

## PADĖKA

Mokslinis tyrimas finansuotas Europos socialinio fondo lėšomis pagal priemonę Nr. 09.3.3-LMT-K-712 „Mokslininkų, kitų tyrėjų, studentų mokslinės kompetencijos ugdymas per praktinę mokslinę veiklą“. Autoriai dėkingi UAB „Biopolis“ už biokatalizatorių pavyzdžius.

Gauta 2019 01 07

Priimta 2019 04 26

## LITERATŪRA

1. Ayoub M., Ahmad Z. A. 2012. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 16(5). P. 2671–2686.
2. Alavianmehr M. M., El-Shaikh M., Akbari F., Behjatmanesh-ardakani R. 2017. A new equation of state for modeling thermodynamic properties of some fatty acids alkyl esters, methyl ester-based biodiesels and their blends. *Fluid Phase Equilibria*. Vol. 442. P. 53–61.



3. Azita J., Hasheminejad M., Tahvildari K., Tabatabaei M. 2012. High quality potassium phosphate production through step-by-step glycerol purification: A strategy to economize biodiesel production. *Bioresource Technology*. Vol. 104. P. 788–790.
4. Behr A., Oberdorf L. 2001. Verfahrensentwicklung der säurekatalysierten Veretherung von Glycerin mit Isobuten zu Glycerintertiärbutylethern. *Chemie-Ingenieur-Technik*. Vol. 73. No. 11. P. 1463–1467.
5. Casas A., Ramos M. J., Pérez Á. 2011. Kinetics of chemical interesterification of sunflower oil with methyl acetate for biodiesel and triacetin production. *Chemical Engineering Journal*. Vol. 171. P. 1324–1332.
6. Chinh N. H., Liang S.-H., Chenc S.-H., Suc C.-H., Linc J.-H., Chien-Chung Chienc C. C. 2018. Enzymatic production of biodiesel from insect fat using methyl acetate as an acyl acceptor: Optimization by using response surface methodology. *Energy Conversion and Management*. Vol. 158. P. 168–175.
7. Du W., Xu Y., Liu D., Zeng J. 2004. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 30. P. 125–129.
8. EP 1985684B1. *Process to obtain biodiesel fuel with improved properties at low temperature and comprising glycerine acetates*. August 2009.
9. EP 1331260A2. *Procedure to obtain biodiesel fuel with improved properties at low temperature*. July 2003.
10. EP 1331260. *Verwendung von Glycerintriacetat als Biodiesekraftstoffzusatz*. June 2008.
11. García-Martínez N., Andreo-Martínez P., Quesada-Medina J., de los Ríos A. P., Chica A., Beneito-Ruiz R. 2017. Optimization of non-catalytic transesterification of tobacco (*Nicotiana tabacum*) seed oil using supercritical methanol to biodiesel production. *Energy Conversion and Management*. Vol. 131. P. 99–108.
12. Huang X., Bi J., Wang J., Ouyang J., Xiao Y., Hao H., Wang Y., Yin Q. 2015. Liquid–liquid equilibrium of binary and ternary systems composed by palm oil or palm oil fractions with methanol/ethanol and water. *Fluid Phase Equilibria*. P. 40417–40425.
13. Karinen R. S., Krause A. O. I. 2006. New biocomponents from glycerol. *Applied Catalysis A: General*. Vol. 306. P. 128–133.
14. Kumar M. M., Reddy J. R. C., Rao B. V. S. K., Prasa R. B. N. 2007. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource Technology*. Vol. 98. No. 6. P. 1260–1264.
15. Lamba N., Gupta K., Modak J. M., Madras G. 2017. Biodiesel synthesis from *Calophyllum inophyllum* oil with different supercritical fluids. *Bioresource Technology*. Vol. 241. P. 767–774.
16. Modi M. K., Reddy J. R. C., Rao B., Prasa R. B. N. 2007. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. *Bioresource Technology*. Vol. 98. No. 6. P. 1260–1264.
17. Nguyen H. C., Liang S. H., Doan T. T., Su C. H., Yang P. C. 2017. Lipase-catalyzed synthesis of biodiesel from black soldier fly (*Hermetica illucens*): optimization by using response surface methodology. *Energy Conversion and Management*. Vol. 145. P. 335–342.
18. Quispe C. A. G., Coronado C. J. R., Carvalho Jr. J. A. 2013. Glycerol: production, consumption, prices and new trends in combustion. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. Vol. 27. P. 475–493.
19. Raslavičius L. 2012. Characterization of the woody cutting waste briquettes containing absorbed glycerol. *Biomass and Bioenergy*. Vol. 45. P. 144–151.
20. Rodrigues R. C., Volpato G., Wada K., Ayub M. A. Z. 2008. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 85. P. 925–930.
21. Saoharit N., Khanal S. K. 2011. Biodiesel-derived crude glucerol bioconversion to animal feed. A sustainable option for a biodiesel refinery. *Bioresource Technology*. Vol. 102. No. 10. P. 5808–5814.
22. Sendzikiene E., Sinkuniene D., Kazanceva I., Kazancev K. 2016. Optimization of low quality rapeseed oil transesterification with butanol by applying the response surface methodology. *Renewable Energy*. Vol. 87. No. 1. P. 266–272.
23. Shimada Y., Watanabe Y., Sugihara A., Tominag Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction oil processing. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 17. P. 133–142.
24. Shimada Y., Watanabe Y., Samukawa T., Sugihara A., Hideo Noda H., Fukuda H., Tominaga Y. 1999. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol. 76. No. 7. P. 789–793.
25. Shiro S., Isayama Y. 2009. A new process for catalyst-free production of biodiesel using supercritical methyl acetate. *Fuel*. Vol. (88)7. P. 1307–1313.
26. Sustere Z., Kampars V. 2017. The influence of acyl and alcohol moieties of carboxylate esters on rapeseed oil chemical interesterification. *Materials, Methods and Technologies*. Vol. 11. P. 1–7.
27. Sustere Z., Murnieks R., Kampars V. 2016. Chemical interesterification of rapeseed oil with methyl, ethyl, propyl and isopropyl acetates and fuel properties of obtained mixtures. *Fuel Processing Technology*. Vol. 149. P. 320–325.

28. Tat T. K., Lee K. T., Mohamed A. R. 2011. Prospects of non-catalytic supercritical methyl acetate process in biodiesel production. *Fuel Processing Technology*. Vol. 92. No. 10. P. 1905–1909.
29. Tonner S. P., Trimm D. L., Wainwright M. S., Cant N. W. 1984. Dehydrogenation of methanol to methyl formate over copper catalysts. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*. Vol. 23(3). P. 384–388.
30. Van Kasteren J. M. N., Nisworo A. P. 2007. A process model to estimate the cost of industrial scale biodiesel production from waste cooking oil by supercritical transesterification. *Resources, Conservation and Recycling*. Vol. 50. No. 4. P. 442–458.
31. Wei D., Xu Y., Liu D., Zeng J. 2004. Comparative study on lipase-catalyzed transformation of soybean oil for biodiesel production with different acyl acceptors. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. Vol. 30. P. 125–129.
32. Wessendorf R. 1995. Glycerinderivate als Kraftstoffkomponenten. *Erdöl und Kohle, Erdgas, Petrochemie vereinigt mit Brennstoff-Chemie*. Vol. 48. No. 3. P. 138–142.

Violeta Makarevičienė, Ieva Sendžikaitė

## BIOCATALYTIC TRANSESTERIFICATION OF RAPESEED OIL BY METHYL FORMATE

### Summary

Due to the awareness of adverse effects of conventional fuels on environment and on a frequent rise in the crude oil price, the need for a sustainable and environment-friendly alternate source of energy has gained importance. Recently, options have been analysed to replace the triglyceride transesterification process, which is generally used in biodiesel production, by the process where raw glycerol is not generated, whereas triacylglycerides obtained instead glycerol can be directly used as fuel for a diesel engine in a mixture with fatty acid esters. In the present work, interesterification of rapeseed oil to biodiesel was carried out with methyl formate and using lipase as a catalyst. The research was carried out at the Laboratory of Chemical and Biochemical Research for Environmental Technology of Aleksandras Stulginskis University.

First, the most effective biocatalyst suitable for the process was selected. 14 different lipases were studied. The samples obtained after the synthesis were analysed by the thin-layer and gas chromatography. Process experiments were performed using a methyl formate to oil molar ratio of 6:1 to 40:1, a lipase amount of 5 to 17% (mass of oil) and synthesis duration of 3 to 48 h. The highest yield of fatty acid methyl esters (FAME) was obtained using Lipozyme RM IM as a catalyst and its optimal amount was 13%. The optimal temperature was found to be 20°C and the duration of interesterification 42 h. The optimal molar ratio of methyl formate to oil was determined to be 32:1. Under the obtained conditions the transesterification degree was  $60.68 \pm 0.95\%$ .

**Keywords:** biodiesel, methyl formate, interesterification, lipase