

УДК 577.154.2 + 542.952 +  
+ 579.22; 577.152.1

## БИОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ГЕТЕРОГЕННЫЕ ПРОЦЕССЫ ПЕРЕЭТЕРИФИКАЦИИ РАСТИТЕЛЬНЫХ МАСЕЛ В БИОДИЗЕЛЬ

© 2014 г. **Г.А. Коваленко**<sup>1</sup>,  
**Л.В. Перминова**<sup>1</sup>,  
**А.Б. Беклемишев**<sup>2</sup>,  
**Е.Ю. Яковлева**<sup>1</sup>,  
**М.Б. Пыхтина**<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт катализа им. Г.К. Борескова СО РАН, г. Новосибирск

<sup>2</sup> Институт биохимии СО РАН, г. Новосибирск

### Введение

Биодизель, получаемый из растительных масел, является топливом, альтернативным углеводородному горючему. Первоначально, со времени изобретения Р. Дизеля, биодизелем называли смесь минерального дизельного топлива (70—95 %) с рапсовым маслом (5—30 %) [1]. Затем был разработан процесс переэтерификации (этерификации) растительного масла в присутствии метанола, в результате которого получались метиловые эфиры жирных кислот, очень близкие по физико-химическим показателям (вязкости, теплотворности) к дизельному топливу, и данные эфиры использовали в двигателях внутреннего сгорания [1, 2]. В настоящее время именно метиловые (или этиловые) эфиры жирных кислот растительных масел называют биодизелем. В качестве горючего используют как чистый биодизель (обозначается В100), так и смеси в любых пропорциях с традиционным углеводородным дизельным топливом. Наиболее распространенной маркой является топливо В20, в составе которого 20 % приходится на биодизель, 80 % — на дизель (цифра после буквы В обозначает процентное содержание биоди-

зеля в топливе). При применении смесей В5—В20 не требуется технических изменений в двигателях.

Гомогенный процесс и технология получения биодизеля из растительного масла сравнительно просты, и мини-заводы по производству биодизеля могут быть установлены не только на сельскохозяйственных предприятиях, но и вблизи крупных ресторанных комплексов, отходами которых являются использованные растительные масла и фритюры. Технологии, в том числе инновационные, а также оборудование и мини-заводы для получения биодизеля подробно описаны в [1, 3, 4].

Процесс метанолиза (или этанолиза) растительного масла проводят при 60 °С и 1 атм в присутствии катализатора — гидроксида калия или натрия. Легкие верхние фракции содержат эфиры жирных кислот (биодизель), нижние фракции, называемые глицериновой фазой, — глицерин, метанол и щелочь. Глицериновая фаза представляет серьезную проблему для хранения и утилизации из-за высокой щелочности и содержания токсичного метанола. При получении биодизеля высокого качества в гомогенных процессах необходимо выполнить ряд требований: 1) выход метиловых эфиров жирных кислот должен быть не ниже 96 %, 2) необходима тщательная очистка (промывание) от продуктов омыления, а также от токсичного метанола, 3) необходима «сушка» биодизеля, так как вода приводит к микробиологическому заражению и образованию жирных кислот, вызывающих коррозию металлических деталей (срок хранения биодизеля не превышает 3 мес.). В работах [5, 6] описан также гомогенный процесс переэтерификации рапсового масла в отсутствие катализаторов, но в сверхкритическом метаноле (при давлении 12,4—28,6 МПа и температуре 310—340 °С), при степени

**Коваленко Г.А.** — д-р хим. наук, проф., ведущий науч. сотрудник Института катализа СО РАН, руководитель группы биокатализа. Тел.: (383) 326-97-43. E-mail: galina@catalysis.ru

**Перминова Л.В.** — канд. хим. наук, науч. сотрудник того же института. Тел. тот же. E-mail: perminova@catalysis.ru

**Беклемишев А.Б.** — д-р биол. наук, проф., зав. лабораторией генной инженерии Института биохимии СО РАН. Тел.: (383) 306-44-71. E-mail: beklem@sorant.ru

**Яковлева Е.Ю.** — канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник Института катализа СО РАН. Тел.: (383) 326-97-69. E-mail: yakovl@catalysis.ru

**Пыхтина М.Б.** — науч. сотрудник Института биохимии СО РАН. Тел.: (383) 306-44-71. E-mail: oganer87@mail.ru

превращения масла 98 % ряд экологических проблем, очевидно, решается.

Гетерогенные процессы получения биодизеля с использованием твердых кислот-основных катализаторов — ионообменных смол, оксидов металлов (CaO, ZnO, SrO, MgO/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), цеолитов являются менее исследованными. В работе [6] в качестве гетерогенного катализатора был изучен β-цеолит в H-форме, который обладал высокими активностью и стабильностью, но не обеспечивал образования того набора эфиров жирных кислот, который отвечает принятым стандартам. В статье [7] авторы описали приготовление и исследование тонкодисперсного (размер частиц менее 0,28 нм) кислотного катализатора (RHC—SO<sub>3</sub>H) из рисовой шелухи путем ее пиролиза и сульфонирования. Выход эфиров жирных кислот в процессе метанолиза отходов пищевых масел достигал примерно 90 % за 15 ч, активность данного катализатора снижалась незначительно в течение 5 реакционных циклов [7].

В последнее время пристальное внимание уделяется изучению гетерогенного процесса ферментативной переэтерификации с участием иммобилизованных термостабильных липаз [8, 9]. В обзорных работах [10—13] описаны способы и условия ферментативной переэтерификации растительных масел в биодизель, а также природа и свойства используемых биокатализаторов. В 2007 г. одним из первых был реализован периодический процесс метанолиза отработанных пищевых масел производительностью 10 тыс. т. Для этого процесса гетерогенный биокатализатор был приготовлен путем иммобилизации липазы из *Candida* sp. [13].

Опишем кратко некоторые характерные особенности процессов ферментативной переэтерификации растительных масел в биодизель, а именно: 1) биокатализаторы и способы их приготовления, 2) условия процесса и исходное сырье, 3) режимы проведения процесса и реакторы, 4) побочные продукты производства и способы их утилизации.

**Биокатализаторы и способы их приготовления.** Активным компонентом биокатализаторов процесса получения биодизеля является фермент липаза, субстратом которой являются природные триглицериды. В водных средах липаза гидролизует эфирные связи в молекулах триглицеридов с образованием жирных кислот, глицерина, а также моно- и ди-глицеридов. В неводных средах этот фермент проводит обратные гидролизу реакции синтеза, например этерификацию жирной кислоты в присутствии спирта с образованием эфира этой кислоты. Следует обратить внимание на то, что биокатализаторы для получения биодизеля являются

цельноклеточными, т.е. приготовлены исключительно на основе целых клеток микроорганизмов, продуцирующих фермент липазу, без проведения стадий выделения и очистки индивидуального ферментного белка. Стоимость данных цельноклеточных биокатализаторов существенно ниже стоимости биокатализаторов, приготовленных на основе выделенного и частично очищенного фермента. По оценкам авторов [14], цена приготовленного ими цельноклеточного биокатализатора в 5 и 93 раза ниже стоимости коммерческих биокатализаторов Lypozyme® и Novozyme® 435 (NOVOZYMES) соответственно. В работе [14] авторы также оценили вклад стоимости фермента в стоимость конечного продукта — биодизеля (см. таблицу). Из этой таблицы видно, что биодизель, произведенный с участием цельноклеточного биокатализатора, существенно (на 1—2 порядка) дешевле продукта, полученного с участием коммерческих биокатализаторов, при этом скорость реакции, а также выход метиловых эфиров жирных кислот являются сравнительно высокими.

Одним из способов приготовления цельноклеточных биокатализаторов является выращивание микроорганизмов в присутствии носителя, на котором происходит спонтанная иммобилизация целых растущих клеток. В работах [10, 15—17] было показано, что полиуретановый гель является оптимальной матрицей для иммобилизации клеток мицелия микроскопических грибов *Rhizopus* sp. и *Aspergillus* sp. Выход Me-эфиров, полученных с участием данных биокатализаторов, зависит от природы и степени очистки растительного масла и составляет 80—90 % за 48 ч метанолиза соевого масла [10]. Через слой биокатализатора, приготовленного путем культивирования *R. oryzae* в присутствии нетканого волокнистого материала, циркулировала реакционная смесь соевого масла с метанолом, и в оптимальных условиях выход биодизеля составил ≥70 % за 23 ч [18]. «Популярным» методом приготовления цельноклеточных биокатализаторов является попеременная сшивка клеточной биомассы (например, *R. oryzae*) бифункциональным реагентом — глутаровым альдегидом с последующей сушкой и формованием гранул [19—23]. В оптимально подобранных условиях высокий выход Me-эфиров, равный 80—90 %, сохранялся в течение 20 периодических реакционных циклов (по 12 ч каждый). Интересный способ приготовления гетерогенного биокатализатора с липазной активностью предложили авторы работы [24]: в качестве носителя для клеток *Bacillus subtilis* они использовали гидрофобные полимерные микросферы, содержащие магнитные частицы Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Эти частицы позволяли удерживать

секретируемые микроорганизмами липазы внутри носителя за счет адсорбции белковых молекул на поверхности оксида железа (III). Авторы [24] провели процесс метанолиза масел, используемых в приготовлении пищи, с 90 %-ным выходом Ме-эфиров за 72 ч путем многократного добавления небольших порций метанола, поскольку большие количества спирта инактивируют ферменты.

Нельзя не отметить новые тенденции в приготовлении активного компонента для цельноклеточных биокатализаторов путем конструирования микроорганизмов с «химерными» липазами, иммобилизованными на клеточной стенке различных микроорганизмов, например, с помощью якорных белков [10]. Для таких биокатализаторов, во-первых, снимаются проблемы массопереноса триглицеридов внутрь клетки, что повышает активность липазы, и, во-вторых, появляются новые свойства, например повышенная устойчивость к органическим растворителям. Оценки, проведенные в работе [14] и представленные в таблице, относятся именно к таким биокатализаторам, в которых клетками-хозяевами являются метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris*, а химерная липаза была составлена из фрагментов липазы *B. Candida antarctica* или *Rhizomucor miehei* и якорного

белка из семейства  $\alpha$ -агглютининов. В работах варьируются как клетки-хозяева, так и якорные белки.

Поскольку переэтерификация протекает практически в безводных средах, то интересным является вопрос о состоянии и оптимальном содержании воды, необходимой для эффективного функционирования биокатализаторов. Авторы работ [18–20, 29–36] исследовали и анализировали роль воды, содержащейся как внутри биокатализаторов, так и в органических растворителях, а также в газовой фазе, и показали, что для достижения высоких величин активности и стабильности цельноклеточных биокатализаторов содержание «внутренней» воды должно быть оптимальным (5–15 %); в этом случае биокатализаторы работают так же эффективно, как и те, которые приготовлены на основе внеклеточных (растворимых) липаз. В работах [31, 34] было показано, что инактивация иммобилизованной липазы из *Candida parapsilosis* обусловлена дегидратацией биокатализатора из-за удаления воды из микроокружения фермента, а не ингибированием продуктами/субстратами реакции; если в систему дополнительно добавляли воду, время полуинактивации ( $t_{1/2}$ ) биокатализатора увеличивалось в 1,8 раза ( $t_{1/2} = 18$  ч). В работе [35] описан интересный результат, полученный при сравнении

#### Сравнительная характеристика процессов получения биодизеля в процессе метанолиза масел с участием различных биокатализаторов, включая коммерческие Lipozyme® и Novozyme®

Биокатализатор	Исходное сырье – масло	Условия процесса переэтерификации метанолом		Скорость образования Ме-эфиров, г·л <sup>-1</sup> ·ч <sup>-1</sup>	Выход Ме-эфиров, %	Стоимость* фермента в расчете на 1 кг биодизеля, USD/кг
		Соразтворитель	Продолжительность, ч			
Цельноклеточный [14]	Соевое масло (рафинированное)	Изооктан + трет-бутанол	12	37,7	94	0,05
Lipozyme TL IM		Нет	12	61,9	98	0,14
Novozyme 435		Трет-амиловый спирт	15	14,2	97	0,52
Цельноклеточный [14]	Кукурузное масло (рафинированное)	Изооктан + трет-бутанол	12	37,8	95	0,05
Lipozyme TL IM		Трет-бутанол	12	39,3	86	0,19
Novozyme 435		Диметилкарбонат	45	11,7	94	2,67
Цельноклеточный [14]	Подсолнечное масло (рафинированное)	Изооктан + трет-бутанол	12	38,7	95	0,05
Lipozyme TL IM		Нет	7	89,9	83	0,77
Novozyme 435		Нет	50	15,8	>99	0,76
Цельноклеточный [14]	Отходы от жарения	Изооктан + трет-бутанол	10	43,8	91	0,05
Novozyme 435		Нет	12	63,2	100	3,78
Lipozyme TL IM + Novozyme 435	Отходы от приготовления пищи	Трет-бутанол	10	38,0	83,5	0,64

\* Расчет при условии, что биокатализатор активен в течение 100 реакционных циклов.

двух способов приготовления биокатализаторов путем иммобилизации липазы на цеолите: «влажный» фермент смешивали с сухим силикатом и, наоборот, «сухой» фермент смешивали с влажным силикатом. При практически одинаковой активности воды в приготовленных биокатализаторах (0,28 и 0,34) скорость реакции составила 12,9 и 4,6 % прореагировавшего стеарата соответственно, т.е. с участием «сухого» фермента скорость реакции уменьшилась в 2,8 раза [35].

**Условия реакции и исходное сырье.** Процесс ферментативной переэтерификации масел проводят при температурах, не превышающих 50 °С, обычно около 40 °С. Как отмечалось выше, в качестве исходного субстрата используют различные растительные масла: рапсовое, соевое, кукурузное, подсолнечное в сыром и рафинированном виде, а также отходы пищевых масел. В качестве второго субстрата используют низшие спирты, чаще всего метанол, этанол, реже изопропанол. Поскольку масло сравнительно плохо растворяется в метаноле, используют соразтворитель (см. таблицу). Мольное соотношение в смеси масла и метанола составляет 1 : (4÷10) соответственно. После реакции биокатализатор удаляют фильтрацией или центрифугированием, промывают растворителем и возвращают в следующий реакционный цикл. Как видно из анализа литературы, продолжительность реакции составляет десятки часов. Поиск и подбор оптимального состава реакционной смеси (субстраты, растворитель и соразтворитель) для конкретной ферментативной реакции, катализируемой липазой, представляет непростую научно-практическую проблему. В работе [25] предложен подход к компьютерному моделированию (computer-aided molecular design) и подбору «кандидатов» на оптимальный состав реакционной смеси. Расчеты проводились с учетом термодинамических констант равновесия, конверсии субстрата, растворимости в реакционной среде субстратов и воды, а также физико-химических свойств растворителей (точки кипения) и их токсичности. На «входе» количество вариантов составило  $10^5$ , на «выходе» — 5–10 кандидатов, перспективных для дальнейшего масштабирования [25]. Расчетные модельные параметры растворителей и экспериментальные данные сравнивали для установления полуэмпирических корреляций [25]. Для изученной реакции переэтерификации с участием инулина, винил-лаурата и октанола с помощью липазы В из *Candida antarctica* оптимальными растворителями были изооктан, ацетон, толуол и гексан: конверсия составила 92–100 % [25]. Если в качестве растворителей использовали трет-бутанол или пиридин, то конверсия составила 69 и 57 % соответ-

ственно. В диметилсульфоксиде продукты реакции не обнаруживались.

Известно, что низшие спирты быстро инактивируют ферменты, поэтому для того чтобы уменьшить процесс инактивации, метанол в течение реакционного цикла добавляют порциями (ступенчато, до 12 раз в течение 30-часового реакционного цикла) [24–26]. В работе [27] было обнаружено, что инактивация биокатализаторов в метаноле протекает быстрее, чем в этаноле, при этом коммерческие биокатализаторы марки Lipozyme® TL IM инактивируются быстрее, чем Novozyme® 435 [27]. Несмотря на более высокую активность Lipozyme®, содержащего по сравнению с Novozyme® в пять раз меньше липазы, более предпочтительным с коммерческой точки зрения является более стабильный биокатализатор Novozyme® [27]. В оптимальных условиях метанолиза растительных масел (45 °С, масло : метанол = 1 : 3) с участием данного биокатализатора конверсия масла в Ме-эфирных жирных кислот составила более 99 % за 50 ч [13].

В работах [13, 28] были проведены исследования реакции ферментативной переэтерификации масел с использованием другого акцептора ацильных групп — метилацетата. Даже при мольном соотношении масло : метилацетат, равном 1 : 12, этот растворитель не снижает активность коммерческого биокатализатора Novozyme® 435 [28]. В оптимальных условиях работы биокатализатора выход Ме-эфиров составил 96 %, при этом время полуинактивации увеличилось в 20 раз по сравнению с реакцией в метаноле [13].

Были проведены исследования процессов гидролиза и переэтерификации в необычных для ферментативного катализа условиях — в газовой фазе (гидролиза этилацетата) [33], в сверхкритическом CO<sub>2</sub> [30], под давлением 0,1–150 МПа [37], под давлением пропана 5,0–20,0 МПа [38] и при вакуумировании [39]. При изучении влияния повышенного давления на свойства коммерческих биокатализаторов марки Lipozyme® было обнаружено, что время полуинактивации ( $t_{1/2}$ ) составило 15, 6 и 4 ч при 0,1, 50 и 150 МПа соответственно, т.е. при повышенном давлении стабильность биокатализаторов уменьшается [37]. Интересные результаты были описаны в работе [38]: в реакции гидролиза активность липазы из *Bacillus* sp. в свободном и иммобилизованном состоянии оставалась постоянной или снижалась (на 15–70 %) в течение 6 ч при 60 °С и 20,0 МПа, тогда как в тех же условиях в реакции этерификации лауриновой кислоты изопропанолом ферментативная активность увеличивалась (на 80–500 %).

**Режимы проведения процесса и реакторы.** В большинстве работ процессы ферментативной переэтери-

фикации с участием гетерогенных биокатализаторов проводят в периодическом режиме в реакторе идеального смешения, который представляет собой закрытый сосуд с перемешиванием. После каждого реакционного цикла (продолжительностью 12–72 ч) биокатализатор отделяют от реакционной среды, затем заливают средой того же состава. Чтобы минимизировать диффузионные ограничения для массопереноса субстрата к иммобилизованному ферменту, варьируют либо скорость перемешивания, например с помощью магнитной мешалки [40], либо уменьшают вязкость реакционной среды путем повышения температуры реакции или использования соразтворителя (гексана, изооктана, трет-бутанола). Чтобы уменьшить инактивацию биокатализатора при переэтерификации в смеси оливкового масла и его саломаса, авторы работы [41] предложили, наоборот, снижать температуру реакции в течение реакционного цикла с 70 °С (4 ч) до 60 °С (20 ч).

Процессы переэтерификации проводят также в непрерывном режиме в реакторе вытеснения с неподвижным слоем биокатализатора и сравнивают два режима — периодический и непрерывный [13, 18, 42–44]. В работе [43] было показано, что в периодическом реакторе квазиравновесное состояние достигается через 4–6 ч, тогда как в непрерывном режиме для достижения аналогичного состояния необходимое время контакта составляет от 5 мин до 2 ч. В работе [45] описан реактор с псевдооживленным слоем коммерческого биокатализатора Novozyme® для непрерывного процесса переэтерификации пальмового стеарина и соевого масла; в изученных условиях  $t_{1/2}$  составило 17 сут. Было обнаружено, что содержание свободных жирных кислот в продуктах, переэтерифицированных в непрерывном процессе, существенно ниже, чем в периодическом, и составляет 0,7–1,2 % против 2–6 %. Для проведения реакции этерификации олеиновой кислоты этанолом в сверхкритическом CO<sub>2</sub> и изучения кинетики этой реакции при температуре 33–50 °С и давлении 11–17 МПа авторы [30] разработали проточно-циркуляционную установку с сапфировым трубчатый реактором, заполненным биокатализатором марки Lypozyme™.

**Побочные продукты производства и способы их утилизации.** Как описано выше, в гомогенных химических процессах получения биодизеля побочные продукты метанолиза масла находятся в «глицериновой фракции», где содержание глицерина может достигать 80 %. Этот «технический» глицерин можно использовать либо как топливо для бойлеров, либо как добавку в пищу животным, либо подвергать тщательной очистке от солей, спирта и воды, для того чтобы затем использовать

глицерин в медицине, косметике, пищевой промышленности. Привлекательными с коммерческой точки зрения являются процессы химической конверсии глицерина в пропиленгликоль, пропионовую или акриловую кислоты, пропанол, изопропанол, аллиловый спирт и акролеин. Биоконверсия глицерина с помощью бактерий родов *Enterobacteriaceae* и *Clostridia* в анаэробных условиях (без кислорода) может протекать с образованием 1,3-пропандиола. Побочными продуктами этого процесса являются органические кислоты (уксусная, масляная, молочная, лимонная), спирты (бутанол, этанол), 2,3-бутандиол. Описанные процессы целесообразно интегрировать в процесс получения биодизеля для производства продуктов с добавленной стоимостью. Следует отметить, что процесс ферментативной переэтерификации не сопровождается образованием токсичных отходов.

При ферментативной переэтерификации растительных масел в присутствии метил- или этилацетата образуются различные ацилпроизводные глицерина, имеющие практические приложения. Например, ацетаты глицерина входят в состав отвердителей. Моно- и триацилпроизводные глицерина используют в качестве топливной добавки для улучшения эксплуатационных свойств биодизеля и бензина. Триацилглицерин (триацетин) широко используют в пищевой промышленности благодаря его влагоудерживающим свойствам, а также в табачной промышленности для пропитки сигаретных фильтров.

Вданной работе были проведены исследования гетерогенного биокаталитического процесса переэтерификации растительных масел в этиловые эфиры жирных кислот с участием этанола и этилацетата в различных концентрациях. Процесс осуществляли с помощью биокатализатора, приготовленного путем включения в ксерогель диоксида кремния лизатов рекомбинантного штамма *rE.coli/lip*, продуцирующего термостабильную липазу из *Thermomyces lanuginosus*. Процессы переэтерификации исследовали как в периодическом режиме в реакторе смешения, так и в непрерывном режиме в реакторе с неподвижным слоем биокатализатора.

## Экспериментальная часть

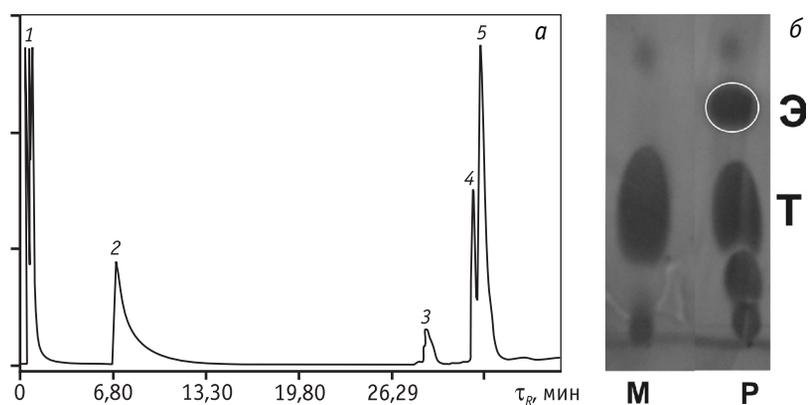
Рекомбинантный штамм-продуцент термостабильной липазы (обозначен как *rE.coli/lip*) был сконструирован методами клонирования гена липазы из *T. lanuginosus* в клетках *E.coli* BL21(DE3). Клеточные лизаты *rE.coli/lip* были получены при использовании ферментов (лизоцим, ДНК<sub>азы</sub> I и РНК<sub>азы</sub> A) и ультразвукового

дезинтегратора, как описано в [36]. Биокатализаторы были приготовлены путем включения клеточных лизатов *rE.coli/lip* в ксерогель диоксида кремния [36]. В работе исследовали биокатализаторы следующего состава, мас.% по сухим веществам: клеточные лизаты *rE.coli/lip* — 37–39, мальтодекстрины — 10, SiO<sub>2</sub> — 51–53. Влажность 6 %. Размер гранул 1–1,5 мм.

В реакциях переэтерификации использовали следующие субстраты: 1) смеси подсолнечного масла со спиртом — этанолом (обозначено как МС), 2) смеси подсолнечного масла с этилацетатом (обозначено как МЭ). Мольные соотношения масла и ацилирующих агентов варьировали в диапазоне 1 : (2+1000) соответственно. В качестве соразтворителя использовали *n*-гексан.

Периодический процесс переэтерификации МС и МЭ осуществляли в реакторе смешения следующим образом. Навеску биокатализатора (0,3–0,5 г) заливали субстратом (15–20 мл) и при перемешивании, например, с помощью качалки (120–150 об/мин), проводили реакционный цикл в течение от 5 ч до 6 сут. Непрерывный процесс переэтерификации МЭ осуществляли в реакторе вытеснения с неподвижным слоем биокатализатора. Для этого колонный стеклянный реактор заполняли гранулами биокатализатора размером 1–1,5 мм и через неподвижный слой биокатализатора (7 см<sup>3</sup>) прокачивали МЭ (0,1 М — подсолнечное масло и 2,3 М — этилацетат в гексане) со скоростью 1,2–10 мл/ч, варьируя время контакта ( $\tau$ ), равное отношению объема (см<sup>3</sup>) биокатализатора к объемной скорости (мл/ч) потока субстрата. Реакции переэтерификации осуществляли при 40 °С.

Анализ продуктов реакции переэтерификации МС или МЭ — смесей этиловых эфиров жирных кислот осуществляли методами газовой (ГХ) и тонкослойной (ТСХ) хроматографий (рис. 1, а и б). В ГХ использовали капиллярную колонку длиной 30 м и внутренним диаметром 0,32 мм, с толщиной пленки «Карбовакс 20М» (Supelco), равной 0,25 мкм. Анализ реакционной смеси проводился в режиме линейного программирования температуры колонки со скоростью подъема температуры 5 °С/мин от 40 до 200 °С. Температура детектора была 240 °С, испарителя — 260 °С. Общая продолжительность хроматографического определения составляла ≈50 мин. Количественный состав эфиров жирных кислот определялся методом внутреннего стандарта-



**Рис. 1.** ГХ (а) и ТСХ (б) анализ продуктов переэтерификации подсолнечного масла этилацетатом:

1 — растворитель; 2 — стандарт-гексанол; 3–5 эфиры жирных кислот:  
3 — пальмитиновой (16 : 0), 4 — стеариновой (18 : 0),  
5 — олеиновой и линолевой (18 : 1 и 18 : 2 соответственно)

Э — эфиры жирных кислот; Т — триглицериды; М — масло; Р — реакционная среда

гексанола, с учетом найденных экспериментально калибровочных коэффициентов. Данные ГХ обрабатывали по программе «NetChrom V2.0». В методе ТСХ использовали хроматографическую камеру с растворителем следующего состава (об.%): гексан/диэтиловый эфир/уксусная кислота = 80/20/1. После хроматографирования исходных и реакционных смесей ТСХ-платинки с нанесенным тонким слоем SiO<sub>2</sub> (марок Silufol, «Сорбфил») высушивали, затем проявляли в 5 %-ном растворе фосфорномолибденовой кислоты в этаноле с последующим програванием.

Расчет выхода продуктов (в процентах) в реакции переэтерификации проводили, учитывая тот факт, что для приготовления биокатализатора использовали липазу, специфичную к 1,3-связям в молекулах триглицеридов.

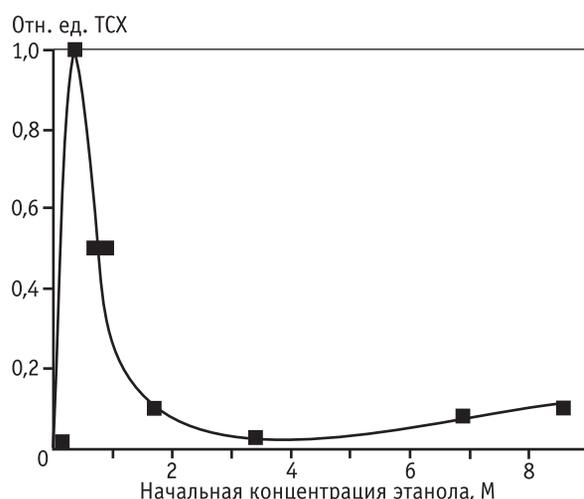
## Обсуждение результатов

Метод приготовления цельноклеточных биокатализаторов, разработанный авторами и основанный на применении золь-гель процессов, приводит к формированию неорганно-органических (гибридных) композитов, которые авторы [46] отнесли к новому поколению золь-гель материалов. В данном случае неорганической матрицей является SiO<sub>2</sub>-ксерогель, органической фазой — частично или полностью разрушенные бактериальные клетки (бактерии, дрожжи), обладающие ферментативной активностью и равномерно распределенные в неорганической матрице как наноразмерные включения второй фазы, придающие синтезируемым

материалам необходимые свойства [46]. В  $\text{SiO}_2$ -ксерогель, как показали исследования авторов настоящей статьи, можно вводить дополнительные компоненты, исполняющие в биокатализаторах определенную функциональную роль: 1) активаторы и/или стабилизаторы ферментов, 2) влагоудерживающие агенты, 3) адсорбенты, 4) наноструктурированный углерод [47]. Выбор оптимального состава многокомпонентных биокатализаторов осуществляли при одновременном выполнении следующих условий: 1) максимальная биокаталитическая активность в условиях реакции переэтерификации в безводных средах (с содержанием  $\text{H}_2\text{O}$  примерно 0,1–1 %) и 2) высокая механическая прочность гранул, обеспечивающая стабильную работу биокатализаторов в условиях реакционной среды.

#### Переэтерификация растительного масла этанолом.

При исследовании кинетических закономерностей реакции этанолиза подсолнечного масла с участием приготовленных трехкомпонентных биокатализаторов было обнаружено, что при увеличении концентрации этанола ( $>0,7$  М) количество образовавшихся этиловых эфиров жирных кислот резко уменьшается (рис. 2). Максимальная скорость переэтерификации наблюдалась при мольном соотношении 1 : (7÷9). Константа Михаэлиса для этанола ( $K_m$ ) была оценена примерно как 0,16 М. Как показали исследования, одной из причин резкого снижения скорости переэтерификации при концентрации этанола выше 0,9 М является образование эмульсии и переход реакции из гомогенных в микрогетерогенные условия. При повышении концентрации этанола ( $>3$  М) реакционная среда быстро расщивалась на две фазы.



**Рис. 2.** Зависимость количества образовавшихся эфиров жирных кислот от начальной концентрации этанола в реакционной среде

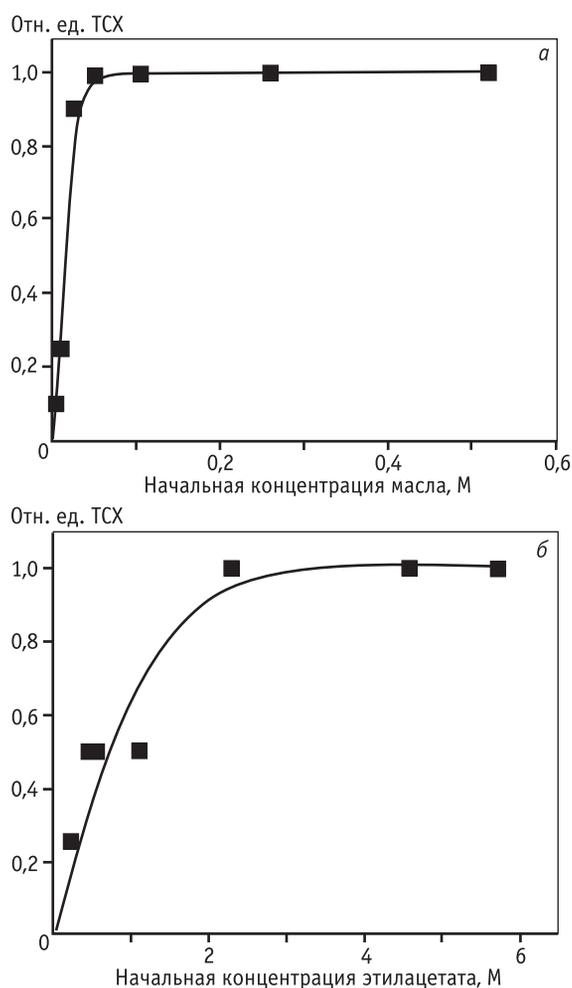
Как отмечалось выше, низшие спирты способны инактивировать ферменты. Чтобы оценить инактивирующее действие этанола в изученных условиях, приготовленные биокатализаторы были протестированы в последовательных реакционных циклах. Было показано, что в реакции этанолиза биокатализаторы необратимо теряют 80–90 % первоначальной активности в течение трех реакционных циклов (в течение 72 ч работы) даже при минимальной из изученных концентраций этилового спирта (0,35 М).

**Переэтерификация растительного масла этилацетатом.** ГХ анализ продуктов реакции переэтерификации (см рис. 1, а) показал, что в изученных условиях образуются этиловые эфиры жирных кислот, входящих в состав подсолнечного масла: пальмитиновой (16 : 0), стеариновой (18 : 0), олеиновой (18 : 1) и линолевой (18 : 2).

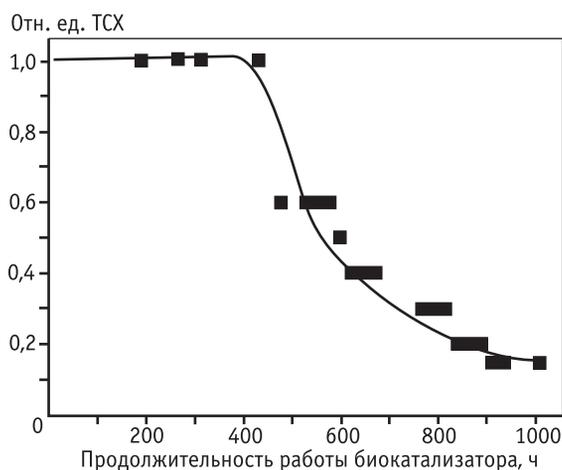
Были проведены исследования зависимости количества образовавшихся эфиров жирных кислот (по результатам ТСХ) от начальной концентрации масла и этилацетата в реакционной среде (рис. 3, а и б). Константа Михаэлиса для масла была оценена как 0,017 М, для этилацетата — как 0,75 М. Максимальная скорость переэтерификации наблюдалась при мольном соотношении масла и этилацетата, равном 1: (15÷20).

Изучение кинетики реакции переэтерификации при варьировании соотношения массы (г) биокатализатора к объему (мл) реакционной среды, равном 1 : (6÷20) показало, что при минимальном соотношении 1 : 6 скорость реакции была максимальной в течение первых 6–10 ч, тогда как при соотношении 1 : 20 количество эфиров практически линейно увеличивается в течение 28 ч, т.е. уменьшение соотношения массы биокатализатора к объему реакционной среды приводит к более быстрому накоплению эфиров жирных кислот. Для уменьшения данного соотношения процесс переэтерификации подсолнечного масла этилацетатом проводили в колоночном реакторе с неподвижным слоем биокатализатора. При времени контакта  $\tau$ , равном 3,5 ч, наблюдался максимальный выход эфиров; дальнейшее увеличение времени контакта (до 5,8 ч) не приводило к заметному увеличению количества образовавшихся эфиров. Значит, при непрерывном проведении процесса стационарное состояние в изученной системе достигается в 2–3 раза быстрее, чем при периодическом.

Исследования операционной стабильности приготовленных биокатализаторов проводили в реакционных средах, в которых наблюдалась максимальная скорость образования этиловых эфиров жирных кислот при минимальной концентрации субстратов, в периодическом режиме в реакторе смешения в течение



**Рис. 3.** Зависимость количества образовавшихся эфиров жирных кислот от начальной концентрации масла (а) при фиксированной концентрации этилацетата (5,7 М), а также этилацетата (б) при фиксированной концентрации масла (0,1 М)



**Рис. 4.** Стабильность приготовленного биокатализатора в реакции переэтерификации растительного масла этилацетатом. Условия реакции: 40 °С, 0,1 М масла, 2,3 М этилацетата, реактор смешения, скорость перемешивания 150 об/мин

25 реакционных циклов (более 1000 ч) (рис. 4). Константа инактивации составила  $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$  при 40 °С, что на 1–2 порядка меньше константы инактивации биокатализатора в реакции переэтерификации масложировых смесей при 70 °С [36]. Время полуинактивации приготовленных биокатализаторов в изученных условиях — 720 ч. Расчеты данных ГХ показали, что выход эфиров жирных кислот через 260 ч работы биокатализатора составил приблизительно 60 %, через 600 ч работы — 35 % за 24 ч.

## Заключение

В данной работе были проведены исследования гетерогенного биокаталитического процесса переэтерификации растительного масла в этиловые эфиры жирных кислот с участием этанола и этилацетата как в периодическом, так и непрерывном режимах. Процесс осуществляли с помощью биокатализатора, приготовленного путем включения в ксерогель диоксида кремния клеточных лизатов рекомбинантного штамма *E.coli/lip*, продуцирующего термостабильную липазу из *Thermomyces lanuginosus*.

Было показано, что в реакции образования этиловых эфиров жирных кислот этанол быстро и необратимо ингибирует ферментативную активность приготовленных биокатализаторов, тогда как в присутствии этилацетата биокатализаторы работают в течение сотен часов при оптимальном мольном соотношении масло : этилацетат, равном 1 : (15–20). Время полуинактивации биокатализаторов в реакции переэтерификации растительного (подсолнечного) масла этилацетатом составило 720 ч при 40 °С; выход продуктов — 60 %.

## Литература

1. Росс М.Ю., Стребков Д.С. Биодизельное топливо из водорослей. М., 2008. С. 88–162.
2. Девянин С.Н., Марков В.А., Семенов В.Г. Растительные масла и топлива на их основе для дизельных двигателей. М., 2008.
3. Федоренко В.Ф., Колчинский Ю.Л., Шилова Е.П. Состояние и развитие производства биотоплива. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2007. С. 79–118.
4. Инновационные технологии производства биотоплива второго поколения. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2009. С. 68.
5. Аникеев В.И., Степанов Д.А., Ермакова А. // Ж. физ. хим. 2011. Т. 85. № 8. С. 1449.
6. Аникеев В.И., Яковлева Е.Ю. // Ж. физ. хим. 2012. Т. 86. № 11. С. 1766.
7. Ming Li, Yan Zheng, Yixin Chen, Xifeng Zhu // Bioresource Technology. 2014. Vol. 154. P. 345.

8. Christensen M.W., Andersen L., Husum T.L., Kirk O. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2003. Vol. 105. P. 318.
9. Ипатова Л.Г., Кочеткова А.А., Нечаев А.П., Тутельян В.А. Жировые продукты для здорового питания. М.: ДеЛи принт, 2009.
10. Fukuda H., Hama S., Tamalampudi S., Noda H. // Trends in Biotechnology. 2008. Vol. 26 No.12. P. 668.
11. Bajaj A., Lohan P., Jha P.N., Mehrotra R. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2010. Vol. 62. P. 9.
12. Stoytcheva M., Montero G., Toscano L., Gochev V., Valdez B. // Biodiesel — Feedstocks and Processing Technologies. 2011. P. 397.
13. DiCosimo R., McAuliffe J., Poulouse A.J., Bohlmann G. // Chem. Soc. Rev. 2013.
14. Zi Jin, Shuang-Yan Han, Li Zhang, Sui-Ping Zheng, Yong Wang, Ying Lin // Bioresource Technology. 2013. Vol. 130. P. 102.
15. Hama S., Numata T., Tamalampudi S., Yoshida A., Noda H., Kondo A., Fukuda H. // J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 2009. Vol. 58. P. 93.
16. Hama S., Tamalampudi S., Fukumizu T., Miura K., Yamaji H., Kondo A., Fukuda H. // J. Biosci. Bioeng. 2006. Vol. 101. P. 328.
17. Oda M., Kaieda M., Hama S., Yamaji H., Kondo A., Izumoto E., Fukuda H. // Biochem. Eng. J. 2005. Vol. 23. P. 45.
18. Chen J.-P., Lin G.-H. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2010. Vol. 161. P. 181.
19. Sun T., Du W., Liu D. // Biofuels, Bioproducts & Biorefining. 2009. Vol. 3. P. 633.
20. Li W., Du W., Liu D., Yao Y. // Biochem. Eng. J. 2008. Vol. 41. P. 111.
21. Li W., Du W., Liu D. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2007. Vol. 45. P. 122.
22. Ban K., Hama S., Nishizuka K., Kaieda M., Matsumoto T., Kondo A., Noda H., Fukuda H. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2002. Vol. 17. P. 157.
23. Ban K., Kaieda M., Matsumoto T., Kondo A., Fukuda H. // Biochem. Eng. J. 2001. Vol. 8. P. 39.
24. Ying, M., Chen G. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2007. Vol. 137—140. P. 793.
25. Abildskov J., van Leeuwen M.B., Boeriu C.G., van den Broek L.A.M. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2013. Vol. 85—86. P. 200—213.
26. Shihong Liu, Kaili Nie, Xin Zhang, Meng Wang, Li Deng, Xianchun Ye, Fang Wang, Tianwei Tan // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2014. Vol. 99. P. 43.
27. Hernandez-Martin E., Otero C. // Bioresource Technol. 2008. Vol. 99 (2). P. 277—286.
28. Wei Du, Yuanyuan Xu, Dehua Liu, Jing Zeng // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2004. Vol. 30. P. 125.
29. Foresti M.L., Pedernera M., Bucala V., Ferreira M.L. // Enzyme Microb. Technol. 2007. Vol. 41. P. 62—70.
30. Marty A., Chulalaksananukul W., Willemot R.M., Condoret J.S. // Biotechnol. Bioeng. 1992. Vol. 39. P. 273—280.
31. Osorio N.M., Dubreucq E., da Fonseca M.M.R., Ferreira-Dias S. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2009. Vol. 111. P. 358—367.
32. Там же. P. 120—134.
33. Perez V.H., Miranda E.A., Valenca G.P. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2007. Vol. 136(1). P. 23—37.
34. Peter J.H. // Enzyme Microbial Technol. 1994. Vol. 16. P. 178—206.
35. Basri M., Kassim M.A., Mohamad R., Ariff A.B. // J. Mol. Catalysis B: Enzym. 2013. Vol. 85—86. P. 214—219.
36. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Беклемишев А.Б., Ткаченко В.И. // Биотехнология. 2013. № 6. С. 35—50.
37. Osorio N.M., Ribeiro M.H., da Fonseca M.M.R., Ferreira-Dias S. // J. Mol. Catalysis B: Enzym. 2008. Vol. 52—53. P. 58—66.
38. Carvalho N.B., de Oliveira Silva M.A., Fricks A.T., Franceschi E., Dariva C., Zanin G.M., Lima A.S., Soares C.M.F. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2014. Vol. 56. P. 130—135.
39. Weitkamp P., Weber N., Vosmann K. // J. Agricul. Food Chem. 2008. Vol. 56(13). P. 5083—5090.
40. Criado M., Hernandez-Martin E., Otero C. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2007. Vol. 109(5). P. 474—485.
41. Kim I.-H., Lee S.-M., Lee B.-M., Park H.-K., Kim J.-Y., Kwon K.-I., Kim J.-W., Lee J.-S., Kim Y.-H. // J. Agricul. Food Chem. 2008. Vol. 56(14). P. 5942—5946.
42. Ibrahim N.A., Guo Z., Xu X. // J. Am. Oil Chem. Soc. 2008. Vol. 85(1). P. 37—45.
43. Lopez-Hernandez A., Otero C., Hernandez-Martin E., Garcia H.S., Hill C.G., Jr. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2007. Vol. 109(12). P. 1147—1159.
44. Osorio N.M., da Fonseca M.M.R., Ferreira-Dias S. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2006. Vol. 108(7). P. 545—553.
45. Osorio N.M., Gusmao J.H., da Fonseca M.M., Ferreira-Dias S. // Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2005. Vol. 107(7—8). P. 455—463.
46. Мошников В.А., Таиров Ю.М., Хамов Т.В., Шилова О.А. Золь-гель технология микро- и нанокompозитов. СПб.: Лань, 2013. 314 С.
47. Kovalenko G.A., Beklemishev A.B., Perminova L.V., Mamaev A.L., Rudina N.A., Moseenkov S.I., Kuznetsov V.L. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2013. Vol. 98. P. 78—86.