

Proizvodnja biodizela u mikroreaktoru: esterifikacija jestivog ulja katalizirana enzimom lipaza

Ali, Dina

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:890413>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDIPLOMSKI STUDIJ

Dina Ali

PROIZVODNJA BIODIZELA U MIKROREAKTORU: ESTERIFIKACIJA JESTIVOG
ULJA KATALIZIRANA ENZIMOM LIPAZA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Bruno Zelić

prof. dr. sc. Aleksandra Sander

izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Zagreb, studeni 2016.

Sažetak

U novije vrijeme sve je veći naglasak na biodizelu kao alternativnom, ekološki prihvatljivom gorivu. Ono što biodizel razlikuje od konvencionalnog dizela jest odsutnost sumpora, smanjen udio čađe i ugljikova monoksida u ispušnim plinovima te općenito manje ostalih tvari štetnih po okoliš. Biodizel se danas proizvodi pirolizom, mikroemulzifikacijom, a najčešće se kao proizvodni proces primjenjuje transesterifikacija. Transesterifikacijom otpadnih ulja i masti može se dobiti biodizel bolje kvalitete uz niže proizvodne troškove. Uporabom enzima kao katalizatora u procesu transesterifikacije ostvaruje se čitav niz prednosti u odnosu na klasičnu industrijsku proizvodnju biodizela kataliziranu kemijskim katalizatorima. Na učinkovitost procesa znatno utječe i primjena mikroreaktorskih sustava koji u usporedbi s klasičnim makroreaktorima omogućuju bolji prijenos tvari i topline, kraća vremena zadržavanja, manje količine potrebnih reagensa i katalizatora, manje otpadnih procesnih struja, kompaktnost i jednostavnost dizajna, laminarni tok procesnih struja, učinkovitije miješanje, kraći difuzijski put molekula, lakšu kontrolu procesa, te smanjenu potrošnju energije.

U ovom radu provedena je transesterifikacija masnih kiselina iz jestivog i korištenog suncokretovog ulja uz enzim lipazu kao katalizator u mikroreaktoru promjera cijevi 1 mm i duljine 30 cm. Kao alkoholna faza korišten je metanol uz dodatak emulgatora SDS (natrijev dodecil-sulfat) koji se u pokusima pokazao najboljim za miješanje faza reakcijskog sustava. Proces je proveden za različite protoke komponenata reakcijske smjese, pri temperaturi 40 °C, a konverzija od 93 % postignuta je za vrijeme zadržavanja 80 min korištenjem jestivog ulja te 95 % korištenjem otpadnog ulja kao supstrata za vrijeme zadržavanja od 40 min. Ista konverzija, u kotlastom makroreaktoru postignuta je tek nakon 22 h. Kako prisustvo glicerola u biodizelu smanjuje njegovu kvalitetu razvijen je sustav od dvije serijski spojene mikroprocesne jedinice, mikroreaktora za proizvodnju biodizela i mikroseparatora za kontinuiranu separaciju glicerola uz primjenu kolin korid etilenglikola kao ekstraktne faze. Analizom biodizela nakon ekstrakcije glicerola utvrđeno je da je glicerol u potpunosti uklonjen iz biodizela.

Ključne riječi: biodizel, transesterifikacija, lipaza, glicerol, mikroreaktori

Summary

Biodiesel is recently being explored as an alternative fuel with eco-friendly properties. What differs biodiesel from conventional diesel is the absence of sulphur, less soot, carbon monoxide in exhaust gasses and generally less matters that are hazard for the environment. Biodiesel is today being produced by pyrolysis, microemulsification and transesterification. By using waste cooking oil, it is possible to conduct low-cost production process with good fuel properties. Enzymes as biocatalysts in the process of transesterification show series of advantages compared to the usage of classic industrial catalysts. Microreaction systems also show many advantages in biodiesel production, as they enable better heat and matter transfer, shorter retention time, less raw materials and catalysts, less waste products, laminar flow, better mixing, better molecular diffusion, less energy consumption, easier process control and, finally, they are compact and simple by design.

Transesterification of fatty acids from edible and waste cooking oil was conducted in this work. Enzyme lipase was used as a catalyst in a microreactor with tube diameter of 1 mm and length of 30 cm. Methanol was used as alcohol phase, and SDS (sodium dodecyl sulfate) as an emulsifier for stabilizing the two phases. The process was conducted at the temperature of 40 °C, and the conversion of 93% was achieved with the retention time of 80 min for edible oil and 95% for retention time of 40 min for waste cooking oil, respectively. Equal conversion in a batch macroreactor was achieved after 22 h. To continuously separate glycerol from the biodiesel, a system of two microprocess units was developed. Microreactor was used for biotransformation and microseparator was used for extraction of glycerol where choline chloride ethylenglycol was used as the extract phase. By analyzing biodiesel after the separation of glycerol, it is shown that all of glycerol was successfully removed.

Key words: biodiesel, transesterification, lipase, glycerol, microreactors

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Bruni Zeliću, na savjetima, pomoći i strpljenju prilikom izrade ovoga rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Aniti Šalić na trudu, savjetima, vremenu i pomoći koju je pružala tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Aleksandri Sander koja je omogućila rad s ionskom kapljevnom.

Također se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na mnogo strpljenja, ljubavi i podrške koju su mi pružali tijekom studiranja.

Sadržaj

| | |
|---|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 2. Teorijski dio | 3 |
| 2.1. Biodizel..... | 3 |
| 2.1.1. Proizvodnja biodizela | 3 |
| 2.1.1.1. <i>Transesterifikacija</i> | 4 |
| 2.2. Enzimi..... | 5 |
| 2.2.1. Lipaza | 6 |
| 2.3. Mikroreaktori..... | 7 |
| 2.4. Ekstrakcija | 7 |
| 2.4.1. Ionske kapljevine..... | 8 |
| 3. Eksperimentalni dio | 10 |
| 3.1. Materijali | 10 |
| 3.1.1. Kemikalije | 10 |
| 3.1.2. Priprema otopina | 11 |
| 3.2. Aparatura | 12 |
| 3.2.1. UV spektrofotometar..... | 12 |
| 3.2.2. Centrifuga..... | 12 |
| 3.2.3. pH metar | 12 |
| 3.2.4. Vodena kupelj | 13 |
| 3.2.5. Plinski kromatograf | 13 |
| 3.2.6. Mikroreaktorski sustav | 14 |
| 3.2.7. Ostala aparatura..... | 15 |
| 3.3. Metode rada | 15 |
| 3.3.1. Odabir emulgatora..... | 15 |
| 3.3.2. Određivanje koncentracije proteina | 16 |
| 3.3.3. Mjerenje aktivnosti enzima | 16 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.3.4. | Određivanje koncentracije estera i slobodnih masnih kiselina | 17 |
| 3.3.5. | Transesterifikacija u mikroreaktoru | 18 |
| 3.3.6. | Ekstrakcija glicerola | 19 |
| 4. | Rezultati i rasprava | 20 |
| 4.1. | Odabir emulgatora za formiranje stabilne emulzije voda:ulje i metanol:ulje | 20 |
| 4.2. | Određivanje koncentracije proteina | 27 |
| 4.3. | Mjerenje aktivnosti enzima | 27 |
| 4.4. | Određivanje koncentracije estera..... | 27 |
| 4.5. | Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina..... | 28 |
| 4.6. | Transesterifikacija u mikroreaktoru..... | 28 |
| 4.7. | Ekstrakcija glicerola | 29 |
| 5. | Zaključak..... | 31 |
| 6. | Popis oznaka, kratica i simbola..... | 32 |
| 7. | Literatura..... | 33 |
| 8. | Prilozi..... | 36 |
| | ŽIVOTOPIS | 39 |

1. Uvod

Posljednjih godina, s porastom broja stanovništva i razvojem gospodarstva, povećava se potražnja za alternativnim gorivima koja bi smanjila ili zamijenila dosadašnju uporabu fosilnih goriva čije su raspoložive zalihe sve manje. Jedna od mogućnosti produženja uporabe konvencionalnih goriva jest uporaba različitih otpadnih procesnih tokova, pri čemu se sve više kao zamjena za dizel upotrebljava biodizel (Bart i sur., 2010.). Pri proizvodnji biodizela jedna od značajnijih polaznih sirovina su i različita otpadna ulja. Uporaba otpadnih ulja u proizvodnji biodizela primjer je proizvodnje ekogoriva u kojem se iz neželjenog otpada proizvodi korisna sirovina te indirektno utječe na zaštitu okoliša. Biodizel, kao ekološki prihvatljivo gorivo, je postao predmet novijih razmatranje, te se danas provode brojna istraživanja primjene različitih sirovina za proizvodnju biodizela, pri čemu se razvijaju i različiti proizvodni procesi uz naglasak na različite mogućnosti upotrebe biodizela. Biodizel kao gorivo je danas moguće dobiti čak i iz kuhinjskog ulja poput suncokretovog, ali i iz različitih otpadnih ulja koja nastaju kao sporedni produkt proizvodnje u raznim industrijama ili kućanstvu (Bhuiya i sur., 2014.). Postoji nekoliko različitih metoda proizvodnje biodizela od kojih se najčešće primjenjuju transesterifikacija, mikroemulzifikacija te piroliza. Transesterifikacija je proces kojim se iz triglicerida i alkohola, u prisutnosti katalizatora, dobiva smjesa alkil estera (biodizel) i glicerola (Ranganathan i sur., 2007.; Abbaszaadeh i sur., 2012.). Transesterifikacija je najjednostavnija metoda proizvodnje biodizela jer se temelji na lako dostupnim reaktantima i katalizatorima, a sam proces se provodi u jednom reakcijskom stupnju. Kako bi se proces transesterifikacije pospješio i reakcija ubrzala, koriste se različiti katalizatori, bilo industrijski poput kiselina i lužina ili biokatalizatori poput enzima. Enzimski postupak dobivanja biodizela je jednostavniji i ekološki prihvatljiviji od kemijskog (Ognjanović i sur., 2008; Shah i sur., 2003; Budžaki i sur., 2015). Osnovne prednosti enzimskih u odnosu na kemijske postupke proizvodnje biodizela su blagi reakcijski uvjeti provedbe procesa (temperature od 30 do 60 °C), izdvajanje velikog dijela glicerola bez dodatnog pročišćavanja i bez stvaranja kemijskog otpada kao i svojstvo enzima lipaze da katalizira postupak esterifikacije slobodnih masnih kiselina prisutnih u uljima na način da su zahtjevi za čistoćom polaznih sirovina znatno blaži u odnosu na ostale usporedive procese. Primjenom enzima kao katalizatora u reakciji transesterifikacije ne nastaju sapuni kao sporedni proizvodi, čime se značajno olakšavaju postupci dodatnog čišćenja biodizela te posljedično dobiva biodizel bolje kvalitete. Zbog svega navedenog, prilikom korištenja biokatalizatora – enzima, nema potrebe za ispiranjem proizvoda u završnoj fazi sinteze

biodizela i njegovog pročišćavanja, pa se smanjuje količina otpadne vode koja predstavlja ozbiljan ekološki problem (Ranganathan i sur., 2007.). Kada se razmatra proces proizvodnje biodizela, najčešće se podrazumijeva industrijski proces koji se provodi u makrosustavu. Međutim, razvojem mikrotehnologije pojavile su se mogućnosti provedbe procesa proizvodnje biodizela i u mikroreaktorima. Primjena mikroreaktora u proizvodnji biodizela donosi niz prednosti u odnosu na makrosustave poput kompaktnije izvedbe, boljeg iskorištenja procesa, manje potrošnje energije, boljeg prijenosa tvari i topline, i slično (Šalić i Zelić, 2011.). Iako je proizvodnja biodizela u mikroreaktoru raširena i dalje su prisutni brojni nedostaci, poput cijene katalizatora te upitne stabilnosti proizvedenog biodizela, koje otvaraju brojne mogućnosti za buduća istraživanja i razvoj odgovarajućih tehnologija koje ove nedostatke moraju nadvladati. Biodizel se može dobiti iz raznih otpadnih ulja, a njegova kvaliteta je ovisna o sirovini iz koje se proizvodi. Najveći problem u procesu proizvodnje biodizela predstavlja glicerol koji smanjuje kvalitetu goriva. Kako bi se glicerol odvojio iz smjese, provodi se njegova separacija paralelno s proizvodnjom biodizela. Na ovoj način separirani glicerol se može koristiti kao sirovina za neke druge procese i proizvode (Atadashi, 2015.).

Ekstrakcija glicerola može se poboljšati uporabom ionskih kapljevina koje imaju vrlo dobra svojstva pri različitim procesnim uvjetima, nisu štene po okoliš te ih je moguće regenerirati u procesu (Sander, 2012.).

2. Teorijski dio

2.1. Biodizel

Biodizel (Slika 1.) je gorivo dobiveno iz različitih sirovina organskog podrijetla što znači da su mogućnosti njegove proizvodnje iz ovih izvora praktično neiscrpe. Uzgojem različitih biljnih sorti može se proizvoditi ulje koje se transesterifikacijom prerađuje u biodizel no ovaj proces je skup i nadmeće se za sirovine s prehrambenom industrijom. Otpadna ulja bolja su sirovina u procesu proizvodnje biodizela jer se u ovom procesu troše otpadne sirovine i dobiva korisno gorivo s ekološki prihvatljivim svojstvima. Biodizel je jedino biogorivo koje u većem dijelu može zamijeniti konvencionalni dizel i čija se proizvodnja unaprjeđuje zadnjih desetak godina (Bart i sur., 2010.). Prednost takvog goriva jest odsutnost sumpora, smanjen udio čađe, smanjen udio ugljikova monoksida u ispušnim plinovima te manje ostalih tvari štetnih po okoliš. Glavni nedostaci proizvodnje i primjene biodizela su prije svega visoka cijena sirovina, stabilnost pri skladištenju i pri izloženosti atmosferilijama, povećana emisija NO_x, niska kalorijska vrijednost i loša nisko-temperaturna svojstva (Šalić i Zelić, 2011.).



Slika 1. Biodizel

2.1.1. Proizvodnja biodizela

Biodizel se može proizvesti na nekoliko različitih načina, a od metoda koje su najčešće zastupljene treba izdvojiti pirolizu, mikroemulzifikaciju te transesterifikaciju. Ove metode u pravilu su izbor procesa u industrijskim postrojenjima.

Piroliza ili krekning je postupak konverzije organske tvari u drugu organsku tvar primjenom topline. Sirovine koje se koriste u proizvodnji biodizela pirolizom mogu biti biljna

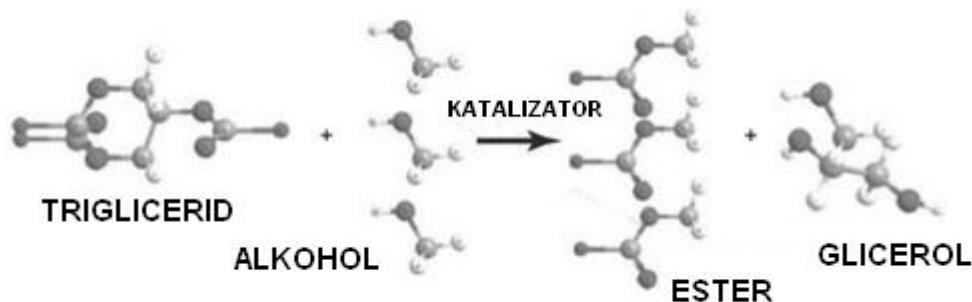
ulja, životinjske masti, prirodne masne kiseline ili metil esteri masnih kiselina (Abbaszaadeh i sur., 2012.).

Mikroemulzifikacija je postupak dobivanja emulzija koje su čisti, stabilni izotropni fluidi s tri komponente (uljna faza, vodena faza i površinski aktivna tvar) (Balat i Balat, 2010.).

Najznačajniju ulogu u procesu proizvodnje biodizela ima katalitička transesterifikacija na kojoj se temelji današnja industrijska proizvodnja.

2.1.1.1. Transesterifikacija

Transesterifikacija je najzastupljenija metoda proizvodnje biodizela. Radi se o reakciji triglicerida i alkohola u prisutnosti katalizatora, pri čemu nastaju alkil esteri (biodizel) i glicerol (Slika 2.). Prednosti ove metode proizvodnje biodizela su bolja kvaliteta goriva uz niže troškove, mogućnost korištenja otpadnog ulja kao jeftine sirovine te mogućnost primjene enzima kao katalizatora.



Slika 2. Proces transesterifikacije masnih kiselina

U industrijskom procesu proizvodnje biodizela transesterifikacija triglicerola se većinom provodi uz prisustvo kemijskih katalizatora (najčešće se koriste natrijeva i kalijeva lužina, sumporna kiselina te natrijev metoksid). Kiseline na tržištu, za razliku od lužina, drže više cijene što povećava trošak procesa, a njihova primjena rezultira i nižom konverzijom ulja i masti pa se lužine upotrebljavaju kao učinkovitija i jeftinija opcija.

Proizvodnja transesterifikacijom ima određene nedostatke kao što su veći utrošak energije, potreba za neutralizacijom katalizatora, izdvajanje glicerola iz reakcijske smjese te

stvaranje nusproizvoda poput sapuna koji otežavaju postupak separacije proizvedenog biodizela te zahtijevaju dodatno održavanje opreme. Nastanak sapuna može stvoriti i emulzije pri čemu se smanjuje prinos i čistoća estera – proizvedenog biodizela.

Nedostaci ovog konvencionalnog postupka mogu se prevladati na nekoliko načina:

- primjenom heterogenih katalizatora (hidroksidi i oksidi alkalnih metala) (Veljković i sur., 2009.; Dossin i sur., 2006.; Lukić i sur., 2009.),
- odvijanjem reakcije transesterifikacije pod superkritičnim uvjetima (Rathore i Madras, 2007.; Glisic i Skala, 2009.) ili
- korištenjem enzima (lipaza) kao bio-katalizatora (Ognjanović i sur., 2009-; Akoh i sur., 2007.).

Enzimski postupak proizvodnje biodizela je jednostavniji i ekološki prihvatljiviji od kemijskog (Budžaki i sur., 2015.). Osnovne prednosti enzimskih procesa u odnosu na kemijske procese su blagi reakcijski uvjeti (temperature od 30 do 60 °C), izdvajanje velikog dijela glicerola bez dodatnog pročišćavanja i bez stvaranja kemijskog otpada kao i sposobnost lipaza da kataliziraju proces esterifikacije slobodnih masnih kiselina prisutnih u uljima tako da su zahtjevi za čistoćom polaznih sirovina umanjeni. Primjenom enzima kao katalizatora u reakciji transesterifikacije ne nastaju sapuni kao sporedni proizvodi, čime se značajno olakšavaju postupci dodatnog čišćenja biodizela te time dobiva kvalitetniji produkt. Zbog svega navedenog, a prilikom korištenja biokatalizatora, nema potrebe za ispiranjem proizvoda u završnoj fazi sinteze biodizela i njegovog pročišćavanja, pa se smanjuje količina otpadne vode koja predstavlja ozbiljan ekološki problem u konvencionalnoj proizvodnji biodizela.

2.2. Enzimi

Enzimi su biokatalizatori koji nastaju sintezom u živim stanicama. Mogu se sintetizirati unutar ili izvan staničnih struktura te se danas koriste u brojnim procesima i industrijama. Njihova raznolikost u prirodi je velika, a posljednjih se godina, razvojem genetike, omogućila još intenzivnija uporaba enzima obzirom da se željena svojstva mogu lakše mijenjati različitim genetskim tehnikama.

Biokatalizatori se koriste u kemijskim procesima koji se u pravilu provode u manjem mjerilu. Prednosti enzima u odnosu na klasične industrijske katalizatore u procesima proizvodnje biodizela (kislina i lužine) su blagi uvjeti provedbe procesa, manje količine

potrebnih sirovina te nastajanje manjih količina nusprodukata (npr. sapuna) i otpadnih produkata. Visoka cijena te temperaturna nestabilnost glavni su nedostaci enzimskih katalizatora, a osim toga u određenim slučajevima mogu biti inaktivirani (npr. alkoholom u procesu proizvodnje biodizela).

2.2.1. Lipaza

Lipaza (Slika 3.) je enzim dobiven iz različitih biljnih i životinjskih izvora ili mikrobnih stanica. U ovom radu korištena je zbog već unaprijed ispitanih svojstava koja su se pokazala dobrima u proizvodnji biodizela. Temperaturna stabilnost čini ju povoljnom za reakcije koje se provode na temperaturi 40 °C, te ju je moguće oporabiti u procesu. Enzim može tijekom procesa transesterifikacije biti slobodan ili imobiliziran. Imobilizacija enzima omogućuje lakše zadržavanje enzima u reakcijskom sustavu te posljedično lakšu separaciju komponenata reakcijske smjese.



Slika 3. Struktura lipaze

Mikrobne lipaze su većinom ekstracelularne, izolirane iz mezofilnih i termofilnih mikroorganizama s optimalnom aktivnošću na temperaturama od 35 do 50 °C te od 60 do 80 °C. Lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* najveću aktivnost pokazuje pri temperaturi od 50 °C pri metanolizi suncokretovog ulja. Većina mezofilnih lipaza je nestabilna pri temperaturama iznad 70 °C gdje ih zamjenjuju termofilne lipaze koje pokazuju aktivnost sve do temperature od 100 °C, i to u prisutnosti organskog otapala i površinski aktivnih tvari. Istraživanja su pokazala da se aktivnost enzima povećava porastom temperature do određene granice, nakon čega slijedi nagli pad aktivnosti uzrokovan denaturacijom proteina (Christopher i sur., 2014.).

2.3. Mikroreaktori

Dodatni čimbenik kojim se može utjecati na učinkovitost procesa proizvodnje biodizela je primjena mikroreaktorskih sustava. Razvoj mikrotehnologije te istraživanja povezana s primjenom mikroreaktorskih sustava rezultirali su nizom prednosti ovakvih reaktora u odnosu na konvencionalne makroreaktore. Mikroreaktori su procesni uređaji malih dimenzija, često serijski ili paralelno spojeni kako bi se postigla veća učinkovitost procesa.

U usporedbi s klasičnim makroreaktorima, mikroreaktori posjeduju značajan potencijal za poboljšanje procesa proizvodnje biodizela zbog učinkovitog prijenosa tvari i topline, kratkih vremena zadržavanja, malih količina potrebnih reagensa, katalizatora koji se koriste u procesu i otpadnih procesnih struja koje u procesu nastaju, kompaktnosti i jednostavnosti dizajna, laminarnog toka procesnih struja, učinkovitog miješanja, kratkog difuzijskog puta molekula, lakše kontrole procesa, te smanjena potrošnja energije (Šalić i Zelić, 2011.).

Osnovni nedostaci provedbe transesterifikacije u mikroreaktoru su limitacija prijenosa tvari u slučaju nemješljivih faza reakcijskog sustava, povratne reakcije koje smanjuju konverziju masti, šaržna proizvodnja, cijene sirovina, te duža vremena zadržavanja. Različiti tipovi mikromiješalica, temeljeni na različitim principima rada, također su razvijeni i uspješno primijenjeni u mikroreaktorskoj tehnologiji. Svrha im je smanjiti difuzijski put te povećati međufaznu površinu između faza u mikrokanalu (Šalić i Zelić, 2011.).

2.4. Ekstrakcija

Ekstrakcija je separacijski proces kojim se odvajaju pojedine faze smjese. Kao i transesterifikaciju, separaciju je moguće provesti u mikrosustavima. Budući da tijekom procesa proizvodnje biodizela problem predstavlja nastali glicerol, ekstrakcija je nužno potrebna kako bi kvaliteta proizvedenog goriva – biodizela bila prihvatljiva.

Glicerol je neželjeni produkt transesterifikacije masnih kiselina jer snizuje gorivnu vrijednost te smanjuje aktivnost enzima. Njegovom separacijom moguće je ostvariti financijski dobitak s obzirom da ga je moguće oporabiti te koristiti u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji.

Najčešće metode pročišćavanja biodizela su vodom (mokro ispiranje), suho ispiranje te membranske tehnologije. Voda kao otapalo dobro uklanja ostatke natrijevih soli te sapuna, no ekonomski je i ekološki neisplativa. Osim što je potrebno zbrinuti otpadne procesne vode,

dio dobivenog biodizela zaostaje u vodi te tako uzrokuje gubitak u procesu proizvodnje. Kako bi se navedeni problemi izbjegli, istražuju se nove metode suhog ispiranja biodizela, primjerice korištenjem ionskih kapljevina kao otapala. Za razliku od vode, ionske kapljevine radi svojih svojstva pokazale su se mnogo boljom opcijom jer su kemijski stabilne i nisu toksične poput nekih organskih otapala (Atadashi, 2015.). Udio biodizela u dobivenoj smjesi veći je u takvim procesima radi jačih molekulskih sila kojima se glicerol veže na ionske soli i separira iz reakcijske smjese (Fathy i sur., 2015.).

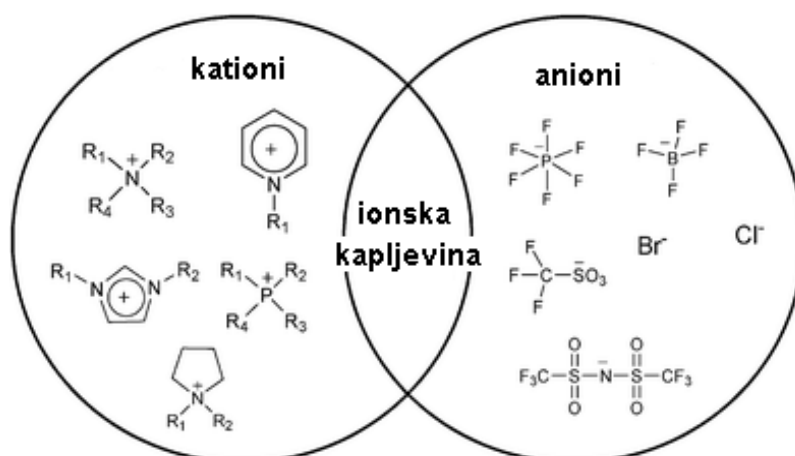
2.4.1. Ionske kapljevine

Proces ekstrakcije ekološki je nepovoljan jer organska otapala postaju neželjeni sporedni produkt u proizvodnji biodizela. Posljednjih godina se njihova uporaba nastoji smanjiti ili zamijeniti novijim tvarima koje ne posjeduju štetna svojstva i koja su na neki način idealna za reakcijske uvjete po svojim svojstvima. Takva svojstva pokazale su ionske kapljevine.

Ionske kapljevine su organske soli koje su pri sobnoj temperaturi u kapljevitom stanju, a zbog svojih specifičnih svojstava, koja ne posjeduje nijedna druga tvar, prikladne su za raznovrsnu uporabu. Sastoje se od kationa i aniona (Slika 4.) te posjeduju visok stupanj nesimetričnosti, zbog čega je onemogućena njihova kristalizacija. Uz definiciju ionskih kapljevina često se spominje i njihovo talište, koje je niže od 100 °C. Prednosti ionskih kapljevina u usporedbi s konvencionalnim organskim otapalima su: sposobnost otapanja različitih organskih i anorganskih tvari, u kapljevitom su stanju u širokom rasponu temperatura, velika toplinska i elektrokemijska postojanost, velika električna vodljivost, nehlapljive su zbog zanemarivog tlaka para, neeksplozivne su i nezapaljive, mogu biti hidrofilne ili hidrofobne, mogu se regenerirati i višestruko koristiti, njihova primjena rezultira većom selektivnošću, povišenom djelotvornošću procesa što posljedično utječe na veće brzine reakcija i učinkovitu provedbu procesa (Sander, 2012.).

Jedna od vrsta ionskih kapljevina su DES (*deep eutectic solvent*) kapljevine. To su spojevi različitih soli poput kolin klorida s donatorom vodikove veze poput uree ili limunske kiseline. Ono što ih razlikuje od klasičnih ionskih kapljevina jest da su to nakupine nekoliko soli, a ne jedna sol. Kao i ostale ionske kapljevine, DES su ekološki prihvatljive, kemijski stabilne i ekonomski pristupačne (Jenkin i sur., 2016.).

U ovom radu kao ionska kapljevina poslužio je kolin korid etilenglikol.



Slika 4. Struktura ionske kapljevine

3. Eksperimentalni dio

U ovome radu provedena je transesterifikacija jestivog i otpadnog ulja kataliziranu lipazom u mikroreaktoru. Nastali sporedni produkt, glicerol uklonjen je iz biodizela ekstrakcijom provedenom u mikroseparatoru.

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

- acetonitril (Sigma Aldrich, SAD)
- arapska guma (Sigma Aldrich, SAD)
- bjelanjak
- BSA (Bovine serum albumine) (Fluka, Hrvatska)
- dietil eter (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etanol (Kemika, Hrvatska)
- izooktan (Kemika, Hrvatska)
- kolin korid etilenglikol (sintetiziran na Zavodu za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu)
- lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L) (Sigma Aldrich, SAD)
- metanol (Kemika, Hrvatska)
- otpadno ulje sakupljeno nakon postupka prženja
- PEG 1550 (Serva, Heilderberg)
- PEG 20000 (Sigma Aldrich, SAD)
- SDS (Sigma Aldrich, SAD)

- senf (Podravka, Hrvatska)
- suncokretovo ulje (Zvijezda, Hrvatska)
- TRIS (Sigma Aldrich, SAD)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, SAD)
- Tween-80 (Fluka, Švicarska)

3.1.2. Priprema otopina

Priprema reagensa za određivanje koncentracije proteina

Reagens za određivanje koncentracije proteina pripremljen je miješanjem 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 reagensa (Fluka, Švicarska) s 50 cm³ etanola, 100 cm³ H₃PO₄ (85 %-tna) i 850 cm³ redestilirane vode.

Priprema otopine enzima

U kalij-kalij fosfatni pufer dodan je enzim lipaza kako bi se pripremile otopine sljedećih koncentracija: 1 mg/L, 2,5 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L te 10 mg/L.

Kalij-kalij fosfatni pufer 0,01 M

0,01 M kalij-kalij fosfatni pufer pripremljen je miješanjem 0,01 M KH₂PO₄ i 0,01 M K₂HPO₄ do postizanja pH 7,4. Promjena pH-vrijednosti praćena je pomoću pH elektrode uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici pri 25 °C.

Tris-HCl pufer

Za pripremu Tris-HCl pufera, 0,609 g praškastog TRIS-a otopljeno je u 100 mL destilirane vode nakon čega se u pufer dodaje 0,1 M HCl kako bi se pH podesio na 8.

Marmur reagens

Marmur reagens pripremljen je miješanjem kloroforma i izoamil alkohola u omjeru 24:1.

3.2. Aparatura

3.2.1. UV spektrofotometar

Za određivanje aktivnosti enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* te za određivanje koncentracije proteina u uzorcima korišten je UV spektrofotometar Shimadzu 1800, Japan (Slika 5.).



Slika 5. UV spektrofotometar *Shimadzu 1800*

3.2.2. Centrifuga

Prilikom određivanja aktivnosti enzima uzorci su centrifugirani na centrifugi Hettich Universal 320R, Njemačka (Slika 6.) Centrifuga je opremljena s 2 rotora za uzorke od 2 i 15 mL, te ima mogućnost regulacije temperature od -20 do +40 °C.



Slika 6. Centrifuga *Hettich Universal 320R*

3.2.3. pH metar

Pri pripremi potrebnih puferskih otopina za podešavanje pH-vrijednosti korišten je pH metar *LAB 860 Schott*, Australija (slika 7.)



Slika 7. pH metar *LAB 860 Schott*

3.2.4. Vodena kupelj

Prilikom sinteze biodizela temperatura od 40 °C održavana je pomoću vodene kupelji (Thermomix 1420, Braun, Germany) (Slika 8.)



Slika 8. Vodena kupelj

3.2.5. Plinski kromatograf

Za određivanje koncentracije slobodnih masnih kiselina u supstratu (suncokretovo ulje) korišten je plinski kromatograf *Shimadzu GC – 2014*, Japan (Slika 9.)



Slika 9. Plinski kromatograf *Shimadzu GC – 2014*

3.2.6. Mikroreaktorski sustav

Za provedbu reakcije korišten je mikroreaktorski sustav prikazan na Slici 10. Teflonske cijevi promjera 1 mm bile su spojene „T“ spojnicom, a cijeli sustav bio je uronjen u vodenu kupelj kako bi se postigla temperatura od 40 °C pri kojoj enzim lipaza pokazuje najveću aktivnost. Ukupna duljina mikroreaktora iznosila je 30 cm. Za odvojeno dovodenje dviju procesnih struja (enzim suspendiran u metanolu i ulju) u teflonsku cijev korištene su dvije pumpe (PHD 4400, Harvard Apparatus, SAD) opremljene špicama od nehrđajućeg čelika (8 cm³, Harvard Apparatus, SAD).



Slika 10. Mikroreaktorski sustav za dobivanje biodizela i ekstrakciju glicerola

3.2.7. Ostala aparatura

Osim prethodno navedene aparature korišten je i sljedeća aparatura:

- 1) homogenizator, Vibrofix VF1 (IKA-Werke, Njemačka)
- 2) magnetska miješalica (Vibrofix VF1, IKA-Werke, Njemačka)
- 3) deionizator za ultračistu vodu (Nirosta, Hrvatska)
- 4) vaga (Kern EW, max. 1500 g, min. 0,5 g) (Kern, Njemačka)
- 5) vaga (Uni Bloc, max. 120 g, min. 10 mg) (Shimadzu, Filipini)
- 6) mikroskop (Motic B1-220A, binokularni Weltzar, Njemačka)
- 7) dodatna pumpa za ekstrakciju glicerola PHD 33 Syringe Pump Series (Harvard Apparatus, SAD)

3.3. Metode rada

3.3.1. Odabir emulgatora

Kako bi pripremili stabilnu otopinu voda:ulje (V:U) te metanol:ulje (M:U) ispitani su različiti emulgatori: Triton X, arapska guma, PEG, SDS, Twin 80, te bjelanjak i senf koji su poslužili kao prirodni emulgator. Koncentracija svih emulgatora u smjesi iznosila je 0,1 g/L.

Prilikom pripreme emulzije V:U 4,5 g jestivog ulja pomiješano je s 0,5 g pripremljenog kalij-kalij fosfatnog pufera nakon čega je u smjesu dodano 0,005 g ispitivanog emulgatora.

U drugom slučaju, prilikom pripreme emulzije M:U, 4,5 g jestivog ulja pomiješano je s 0,5 g metanola nakon čega je u smjesu dodano 0,005 g ispitivanog emulgatora.

U oba slučaja smjese su prvo dobro homogenizirane na laboratorijskoj tresilici tijekom 10 min (600 rpm) te su nakon toga postavljene u vertikalni položaj radi promatranja stabilnosti emulzije i mjerenja visine raslojavanja. Bilježena su vremena početka i kraja raslojavanja te izračunate brzine raslojavanja. Svi uzorci su i fotografirani pod mikroskopom (povećanje 100x) na početku mjerenja te na samome kraju kako bi se utvrdila makrostruktura emulzija.

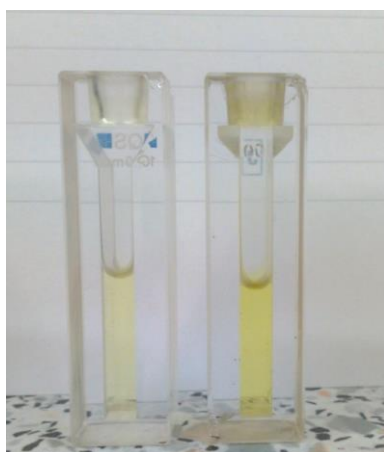
Nakon odabira najboljih emulgatora ispitan je i utjecaj koncentracije emulgatora na stabilnost emulzije.

3.3.2. Određivanje koncentracije proteina

0,8 mL uzorka je pomiješano s 0,2 mL reagensa za određivanje koncentracije proteina te inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi pri čemu je došlo do nastanka plavog obojenja. Na valnoj duljini od 595 nm izmjerene su apsorbancije uzoraka, te uz pomoć ranije određenog baždarnog pravca izračunate koncentracije proteina u uzorcima. Baždarni pravac određen je mjerenjem apsorbancije različitih poznatih koncentracija otopine BSA (Bovine serum albumine) pri istoj valnoj duljini. Baždarni pravac određen je prije svake serije mjerenja koncentracije proteina u procesnom uzorku (Prilog 1).

3.3.3. Mjerenje aktivnosti enzima

Aktivnost enzima određena je testom koji se temelji se na hidrolizi 0,1 M *p*-nitrofenil acetata (*p*NP) (Slika 11.). Smjesa je pripravljena razrjeđivanjem 250 μ L enzima (0,1 mg/mL) u 49,75 mL pufera, te se u 725 μ L takve otopine dodavalo 25 μ L supstrata (0,1 M *p*NP) i odabrani emulgator. Promjena apsorbancije mjerena je na 400 nm tijekom 20 s.



Slika 11. Različito obojenje u otopinama s manjom i većom koncentracijom enzima nakon dodatka supstrata

U drugom slučaju pripravljena otopina pufera, emulgatora i enzima (725 μ L) (u tri paralele) postavljena je na laboratorijsku tresilicu te je dodan supstrat (25 μ L). Tijekom 5 minuta, s razmakom od 20 s dodavan je Marmur reagens (2 mL) kako bi se zaustavila reakcija. Uzorci su tada centrifugirani 5 min, na 4 $^{\circ}$ C te 10 000 o/min dok se smjesa ne razdvoji na dvije faze nakon čega se gornja vodena faza odvaja radi mjerenja asporbancije (410 nm tokom 20 s) (Palacios i sur., 2014.).

Iz dobivene promjene apsorbancije u vremenu (dA/dt) izračunate su volumne aktivnosti ($V.A.$) prema jednadžbi (1) te specifične aktivnosti prema jednadžbi (2):

$$V.A. = \frac{Vr}{\varepsilon * d * Ve} * \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (1)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_E} \quad (2)$$

gdje je $V.A.$ volumna aktivnost enzima lipaze (U/mL), Vr ukupni volumen uzorka u kiveti (μL), ε ekstincijski koeficijent ($\varepsilon_{405} = 0,0123 \text{ L/mmol}\cdot\text{cm}$), d promjer kivete ($d = 1 \text{ cm}$), Ve volumen dodanog enzima (μL), dA/dt promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca, min^{-1}), $S.A.$ specifična aktivnost enzima lipaze (U/mg), γ_E masena koncentracija enzima lipaze (mg/cm^3).

3.3.4. Određivanje koncentracije estera slobodnih masnih kiselina

Koncentracije estera slobodnih masnih kiselina (SMK) u suncokretovom ulju određene su titrimetrijskom metodom te pomoću plinskog kromatografa.

Za titrimetrijsku metodu pripremljena je otopina etanola i dietiletera u omjeru 1:1 (25 mL: 25 mL). Zatim je izvagano 4,97 g i 4,92 g (dvije paralele) suncokretovog ulja te je dodano 25 mL pripremljene otopine. Kao indikator koristi se fenolftalein (5 kapi) te se otopina titrira s 0,1 M NaOH do pojave ružičastog obojenja. Rezultat titracije izražava se kao udio dominantne masne kiseline ulja, a izračunava se prema jednadžbi (3):

$$\text{SMK} = \frac{V * c * M}{10 * m} (\% \text{ oleinske kiseline}) \quad (3)$$

gdje je V utrošak otopine natrijeva hidroksida za titraciju uzorka (mL), c koncentracija otopine natrijeva hidroksida, 0,1 M, M molekulska masa oleinske kiseline, 282 g/mol, te m masa uzorka ulja (g).

Koncentracija SMK određivana je *plinskom kromatografijom* s plameno-ionizacijskim detektorom, korištenjem plina helija kao nosioca ($1,97 \text{ cm}^3/\text{min}$), na polarnoj koloni ZB-WAX ($l = 30 \text{ m}$; $ID = 0,53 \text{ mm}$; $df = 1 \mu\text{m}$). Temperatura injektora iznosila je $240 \text{ }^\circ\text{C}$, kao i temperatura detektora. Kolona se prvo zagrijava na $180 \text{ }^\circ\text{C}$ te se na toj temperaturi zadržava 1 min, a zatim se zagrijava na $230 \text{ }^\circ\text{C}$ brzinom $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Nakon sakupljanja uzorka, uzorci su filtrirani (Filter Chromafil Xtra PA-20/25; $0,2 \mu\text{m}$, 25 mm, Macherey-Nagel GmbH CoKG,

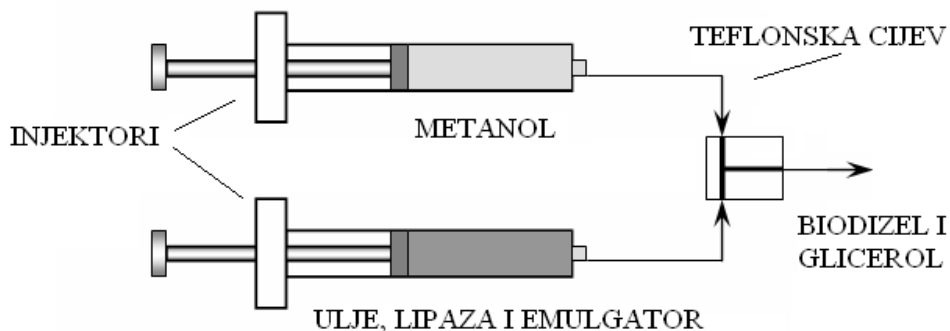
Njemačka) te injektirani u plinski kromatograf. Vrijeme zadržavanja pojedinih estera iznosilo je:

- ester palmitinske masne kiseline – 7,494 min
- ester stearinske masne kiseline – 10,192 min
- ester oleinske masne kiseline – 10,545 min
- ester linolne masne kiseline – 11,257 min

Uz pomoć baždarnog pravca izrađenog na temelju mjerenja uzoraka poznatih koncentracija etanola određivane su nepoznate koncentracije etanola u procesnim uzorcima (Prilozi 2.-6.)

3.3.5. Transesterifikacija u mikroreaktoru

Proces transesterifikacije ulja uz dodatak metanola proveden je u mikroreaktoru duljine 30 cm i promjera 1 mm uz dodatak enzima lipaze kao katalizatora (Slika 12). Komponente reakcijske smjese (ulje + enzim + emulgator i metanol) uvedene su u mikroreaktor pri različitim protocima, u rasponu od 20 do 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$. Uzorci na izlazu iz mikroreaktora prikupljani su u Marmur otopini u omjeru uzorak:otopina 1:9 ohlađenoj na ledu. Dobiveni uzorci dobro su homogenizirani te filtrirani prije analize na plinskom kromatografu.

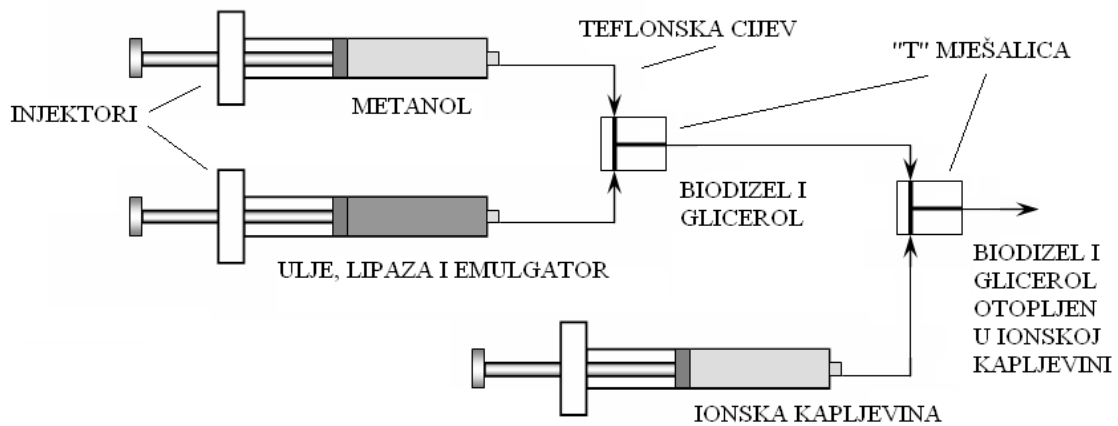


Slika 12. Shema procesa za provedbu transesterifikacije u mikroreaktoru s teflonskom cijevi

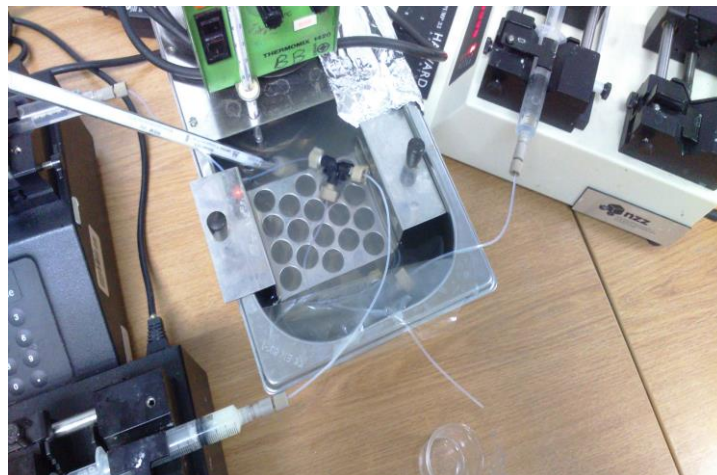
3.3.6. Ekstrakcija glicerola

Kako bi se u procesu proizvodnje biodizela provela kontinuirana separacija glicerola, na postojeći sustav spojen je još jedan mikroekstraktor istih dimenzija. Izlaz mikroreaktora spojen je na ulaz mikroekstraktora tvoreći tako dvije serijski spojene mikro procesne jedinice (Slike 13. i 14.).

Kao ekstraktna faza u mikroekstraktor uveden je kolin korid etilenglikol. Na izlazu iz mikroekstraktora uzorci su sakupljeni u Marmur otopini postavljenoj na led radi zaustavljanja reakcije. Nakon homogenizacije i filtriranja uzorci su analizirani na plinskom kromatografu.



Slika 13. Shema sustava sastavljenog od mikroreaktora i mikroekstraktora



Slika 14. Dobivanje biodizela u laboratoriju

4. Rezultati i rasprava

4.1. Odabir emulgatora za formiranje stabilne emulzije voda:ulje i metanol:ulje

S obzirom da su za proces proizvodnje biodizela iz ulja potrebne tri faze: enzim otopljen u puferu, ulje i metanol, a mikroreaktor se sastojao od dva ulaza, postoje tri mogućnosti uvođenja reakcijskih komponenti u sustav na način da:

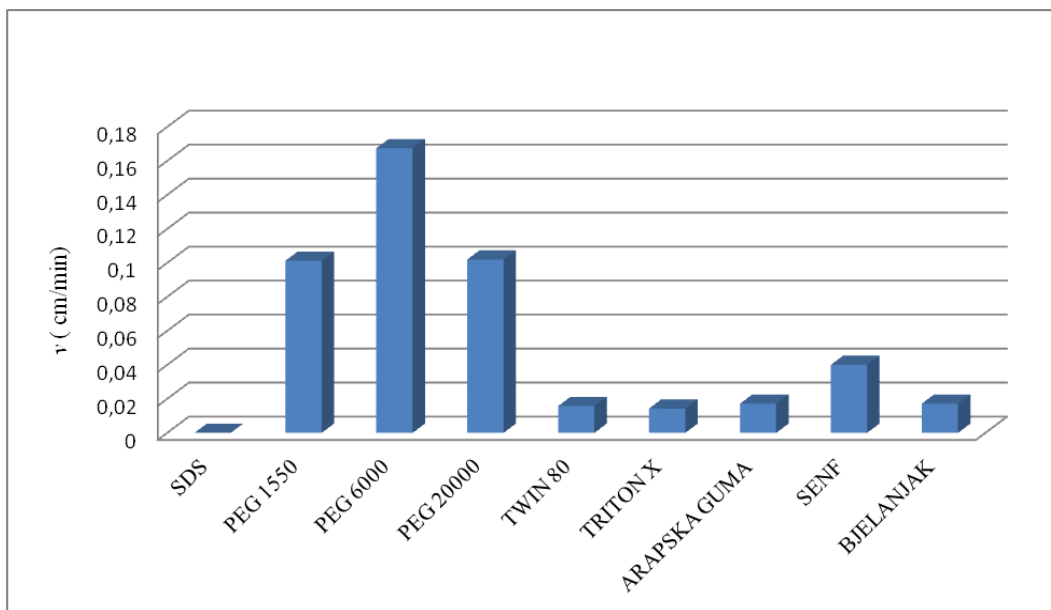
1. jednu fazu čine ulje i metanol dok je druga faza enzim suspendiran u puferu
2. jednu fazu čine ulje i enzim suspendirani u puferu dok je druga faza čisti metanol te
3. jednu fazu čine metanol i enzim suspendirani u puferu dok je druga faza ulje.

Prethodna istraživanja provedena u laboratoriju pokazala su da sustavi 1 i 2 nisu pogodni za proizvodnju biodizela u mikroreaktorima jer u klipovima za dobavu reakcijske smjese dolazi do raslojavanja faza ulja i metanola, te ulja i enzima u puferu. Zbog toga se u mikroreaktor dobivaju nehomogene smjese koje negativno utječu na učinkovitost i ponovljivost procesa. Također, pokazalo se da je sustav 3 isto tako dugoročno nepovoljno rješenje jer dolazi do deaktivacije enzima lipaze uslijed dugog kontakta s organskim otapalom, metanolom.

Zbog toga je razmotreno ponovno ispitivanje sustava 1 i 2, ali ovaj put uz dodatak emulgatora koji bi stvorili stabilne emulzije između pufera i ulja te metanola i ulja. Ispitano je devet različitih emulgatora: Triton X, arapska guma, PEG (tri različite molarne mase), SDS, Twin 80, te bjelanjak i senf koji su poslužili kao prirodni emulgator. Koncentracija svih emulgatora u smjesi iznosila je 0,1 g/L. Kako bi odredili koji je emulgator najbolji, praćena je brzina raslojavanja faza. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 15. i u Tablici 1.

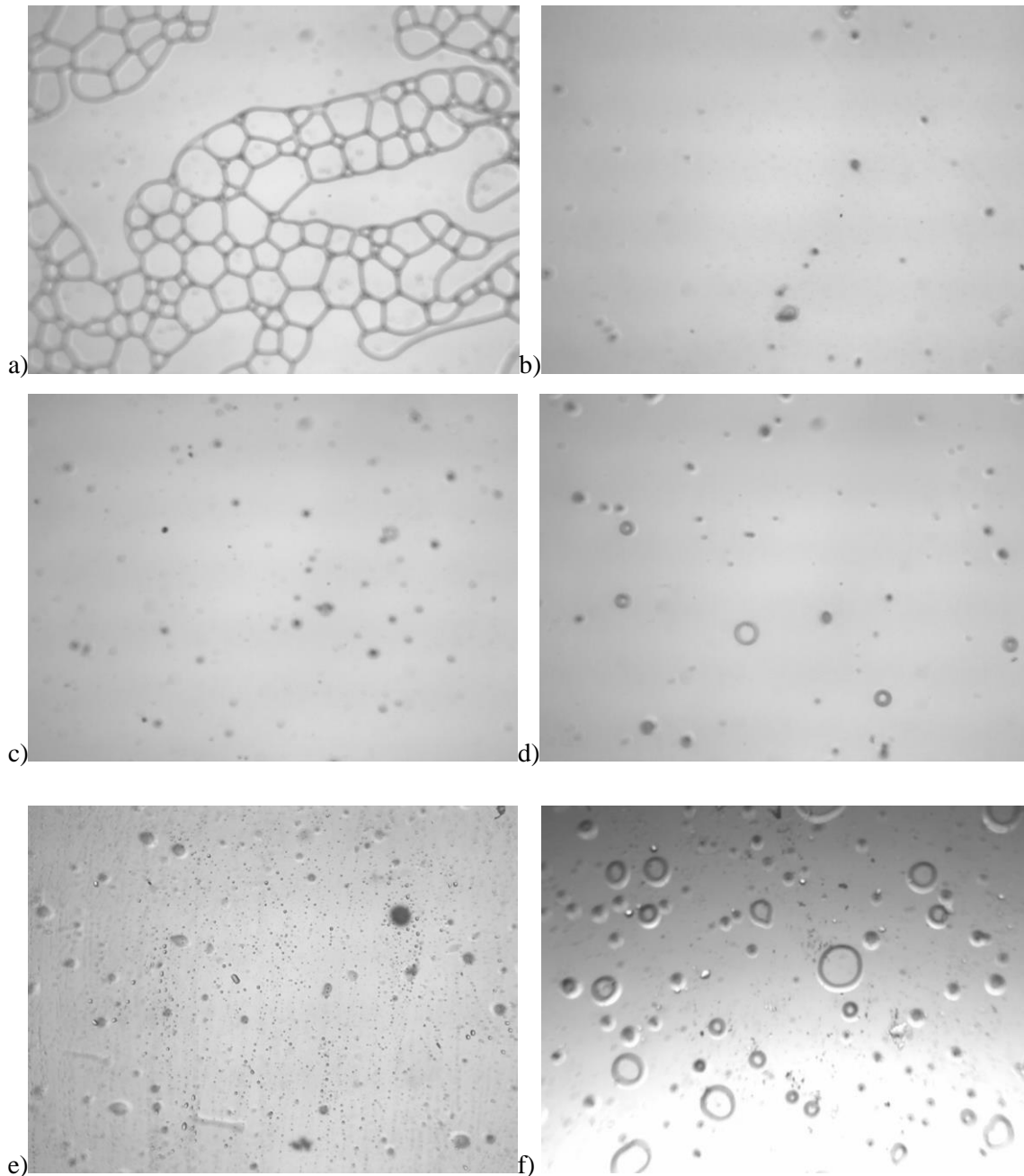
Tablica 1. Raslojavanje faza u uzorcima s različitim emulgatorima u smjesi ulje voda (U:V)

| Emulgator | <i>t</i> (raslojavanja) | <i>h</i> (sloja) (cm) |
|--------------|-------------------------|-----------------------|
| SDS | >7 dana | 0 |
| PEG 1550 | 12,84 min | 1,3 |
| PEG 6000 | 6,57 min | 1,1 |
| PEG 20000 | 12,75 min | 1,3 |
| TWIN 80 | 70 min | 1,1 |
| TRITON X | 70 min | 1,0 |
| ARAPSKA GUMA | 70 min | 1,2 |
| SENF | 30 min | 1,2 |
| BJELANJAK | 70 min | 1,2 |



Slika 15. Brzina raslojavanja faza za različite emulgatore za sustav ulje:voda (U:V)

Kao što je vidljivo, najbolji rezultat postignut je korištenjem SDSa kao emulgatora koji je održao smjesu stabilnom čak i nakon 7 dana, dok se kod pokusa provedenih s ostalim potencijalnim emulgatorima uočava značajno raslojavanje faza već nakon nekoliko minuta. S obzirom na brzinu raslojavanja učinkovitost emulgatora opada u sljedećem nizu: Triton X < Twin 80 < arapska guma < bjelanjak < senf < PEG 1550 < PEG 20000 < PEG 6000.



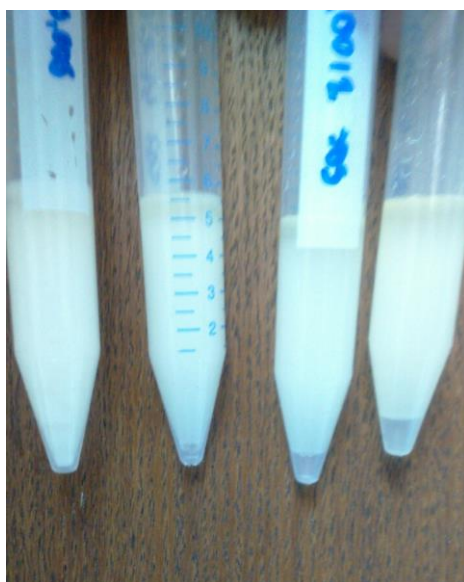
Slika 16. Rezultati mikroskopiranja emulzija pripremljenih dodatkom a) SDS-a b) PEG-a c) bjelanjka d) arapske gume e) Tween 80 f) Triton X

Promatranjem uzoraka pod mikroskopom, primjećuje se razlika i u homogenosti faza. Kao i u testu mjerenja brzine raslojavanja, uzorak sa SDS-om pokazuje najbolju stabilnost faza (Slika 16.a), što je vidljivo po pravilnijoj raspoređenosti mjehurića ulja i vode, dok se u uzorcima poput onog s PEG-om ili bjelanjkom (Slika 16.b i 16.c) uočava tek poneki mjehurić vodene faze u uljnoj. Na temelju rezultata zaključeno je da je SDS optimalan za provedbu daljnjih istraživanja.

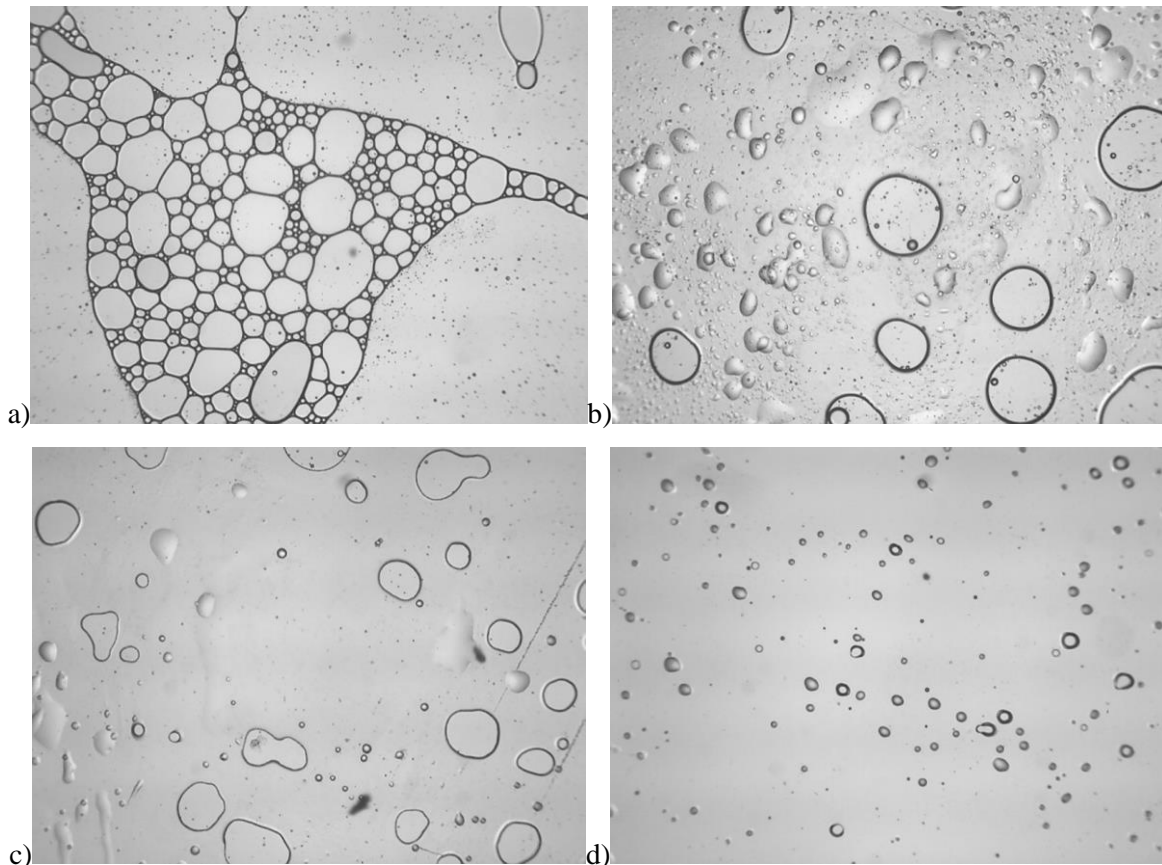
S obzirom da su svi emulgatori ispitani pri koncentraciji od 1 g/L, u sljedećoj fazi istraživanja analiziran je utjecaj koncentracije emulgatora na stabilnost smjese. Ispitane su koncentracije 2, 5 i 10 puta manje od početne. Rezultati su prikazani u Tablici 2. i na Slikama 17. i 18.

Tablica 2. Raslojavanje faza u uzorcima s različitom koncentracijom SDS-a

| <i>m</i> (SDS) (g) | <i>t</i> (raslojavanja) | <i>h</i> (sloja) (mm) |
|--------------------|-------------------------|-----------------------|
| 0,0050 | 120 min | 0 |
| 0,0025 | | 2 |
| 0,0012 | | 4 |
| 0,0006 | | 6 |



Slika 17. Raslojavanje faza u uzorcima sa SDSom



Slika 18. Rezultati mikroskopiranja emulzija pripremljenih dodatkom SDS-a a) 0,005 g b) 0,0025 g c) 0,0012 g d) 0,0006 g

Rezultati ispitivanja pokazuju da smanjenje koncentracije emulgatora negativno djeluje na stabilnost smjese tj. uočeno je raslojavanje kod svih ispitanih koncentracija osim početne.

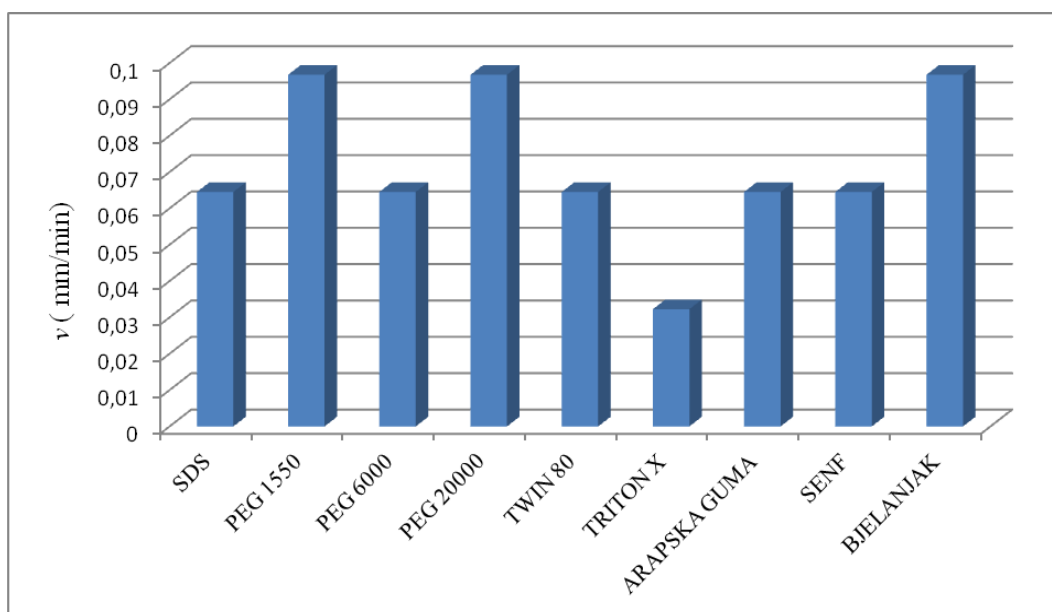
Mikroskopiranjem uzoraka sa SDS-om (Slika 18.), potvrđeno je da smanjenje njegove koncentracije u smjesi smanjuje homogenost, što se vidi po raspoređenosti mjehurića vodene faze u uljnoj.

Na temelju dobivenih rezultata odlučeno je da se za pripremu stabilne emulzije voda:ulje i dalje koristiti SDS kao emulgator u koncentraciji 1 g/L.

Nakon ispitivanja emulgatora za formiranje stabilne otopine voda:ulje, isti emulgatori ispitani su u sustavu metanol:ulje. Rezultati su prikazani u Tablici 3. te na Slici 19.

Tablica 3. Raslojavanje faza u uzorcima s različitim emulgatorima u smjesi metanol:ulje (M:U)

| Emulgator | t (raslojavanja) | h (sloja) (mm) |
|--------------|--------------------|------------------|
| SDS | 31min | 2 |
| PEG 1550 | | 3 |
| PEG 6000 | | 2 |
| PEG 20000 | | 3 |
| TWIN 80 | | 2 |
| TRITON X | | 1 |
| ARAPSKA GUMA | | 2 |
| SENF | | 2 |
| BJELANJAK | | 3 |



Slika 19. Brzina raslojavanja faza za različite emulgatore za sustav metanol:ulje (M:U)

Prema rezultatima iz Tablice 3. i Slike 19., niti jedan emulgator nije dovoljno dobar da formira emulziju koja bi bila stabilna kroz dulji vremenski period. Međutim usporedbom

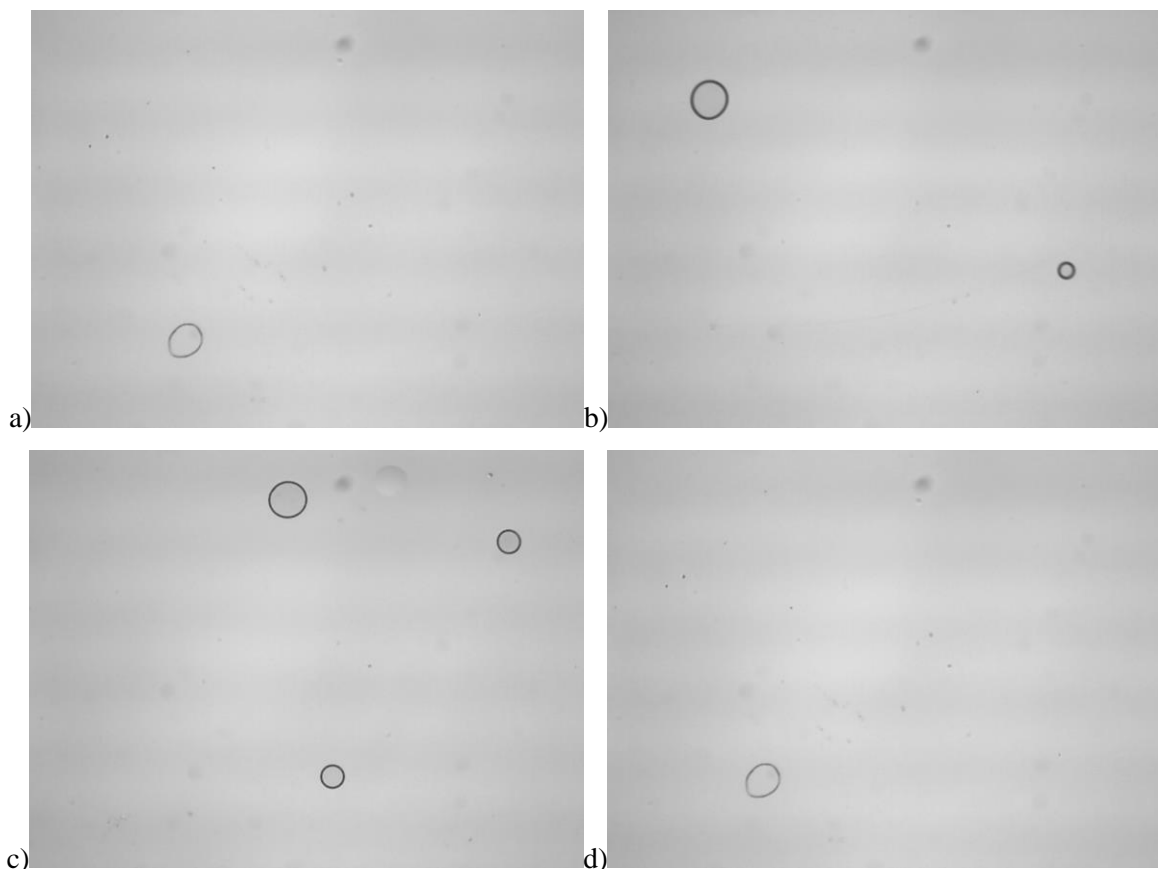
rezultata, kao najbolji se pokazao uzorak s Triton X za kojeg je uočeno raslojavanje od samo 1 mm.

Zbog toga je ovaj emulgator ponovno istražen, ali pri većim koncentracijama (2, 3, 4 i 10 puta veće od početne) kako bi se eventualno poboljšala stabilnost emulzije koju formira, a rezultati ovih pokusa su prikazani u Tablici 4.

Tablica 4. Raslojavanje faza u uzorcima s različitom koncentracijom Tritona X

| m (Triton X) (g) | t (raslojavanja) | h (sloja) (mm) |
|--------------------|--------------------|------------------|
| 0,0050 | 25 min | 1 |
| 0,0100 | | 2 |
| 0,0150 | | 2 |
| 0,0200 | | 2 |
| 0,0500 | | 2 |
| 0,1000 | | 2 |

Kao što je vidljivo, povećanje koncentracije nije pozitivno utjecalo na povećanje stabilnosti.



Slika 20. Rezultati mikroskopiranja emulzija pripremljenih dodatkom Triton X a) 0,005 g b) 0,010 g c) 0,020 g d) 0,100 g

Mikroskopiranjem je pokazano da svi uzorci imaju vrlo sličnu strukturu, zbog čega se može zaključiti da daljnje povećanje koncentracije Tritona X neće rezultirati stabilnijim sustavom.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da niti jedan od odabranih emulgatora nije povoljan za stvaranje stabilnih emulzija u sustavu voda:metanol te je odlučeno da ovaj sustav neće biti predmet daljnjeg istraživanja.

4.2. Određivanje koncentracije proteina

S obzirom da je enzim lipaza podrijetlom iz *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L) komercijalno dostupna samo kao suspenzija, a proizvođač nije naveo koncentraciju enzima u otopini, ista je određena metodom po Bradfordu. Iz dobivenog baždarnog dijagrama (Prilog 2.) i izmjerenih apsorbancija izračunata je koncentracija proteina u suspenziji komercijalnog pripravka od 24,20 mg/mL. Na temelju ovog rezultata izračunate su koncentracije enzima lipaze pri ispitivanju njene aktivnosti.

4.3. Mjerenje aktivnosti enzima

S obzirom da dodatak emulgatora može negativno utjecati na aktivnost enzima, ispitan je utjecaj SDS-a na aktivnost enzima lipaze. Rezultati su prikazani u Tablici 5.

Tablica 5. Ovisnost aktivnosti enzima lipaze o emulgatoru

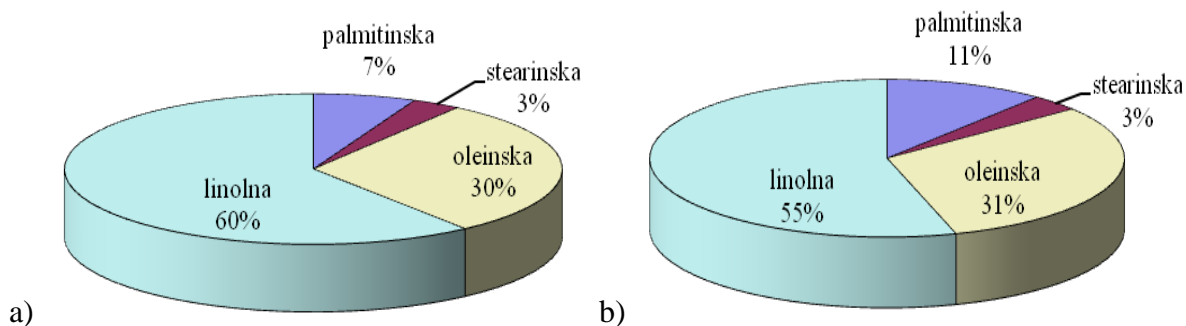
| Uzorak pufer+enzim+supstrat | V.A. (U/ml) | S.A. (U/mg) |
|--------------------------------|-------------|-------------|
| Bez emulgatora | 96,78 | 100 |
| Uz dodatak SDS-a | 211,12 | 218,12 |

Mjerenjem apsorbancije u različitim smjesama s i bez emulgatora, izračunate su volumne i specifične aktivnosti enzima. Dobiveni rezultati pokazuju da dodatak emulgatora pozitivno utječe na enzimsku aktivnost te ju čak i povećava.

4.4. Određivanje koncentracije estera

Prije provedbe reakcije transesterifikacije ispitan je sastav svježeg i otpadnog ulja kako bi se odredio sastav slobodnih masnih kiselina (SMK) u inicijalnim uzorcima. Udjeli pojedine SMK prikazani su na Slikama 21.a i 21.b. Najveći udio slobodnih masnih kiselina u

uzorcima zauzima linolna, a najmanji stearinska kiselina. Dobivene vrijednosti odgovaraju normativima za jestivo suncokretovo ulje po kojima je sastav SMK sljedeći: palmitinska 4-9 %, stearinska 1-7 %, oleinska 14-40 %, linolna 48-74 %. Također se može uočiti različiti udio istih kiselina u oba analizirana uzorka, jestivom suncokretovom ulju i otpadnom ulju, što ukazuje na to da se prženjem odnosno termičkom obradom ulja, mijenja njegov sastav.



Slika 21. Sastav masnih kiselina u a) jestivom suncokretovom ulju i b) otpadnom ulju

4.5. Određivanje sadržaja slobodnih masnih kiselina

Sadržaj slobodnih masnih kiselina dobiven titrimetrijski prikazan je u Tablici 6.

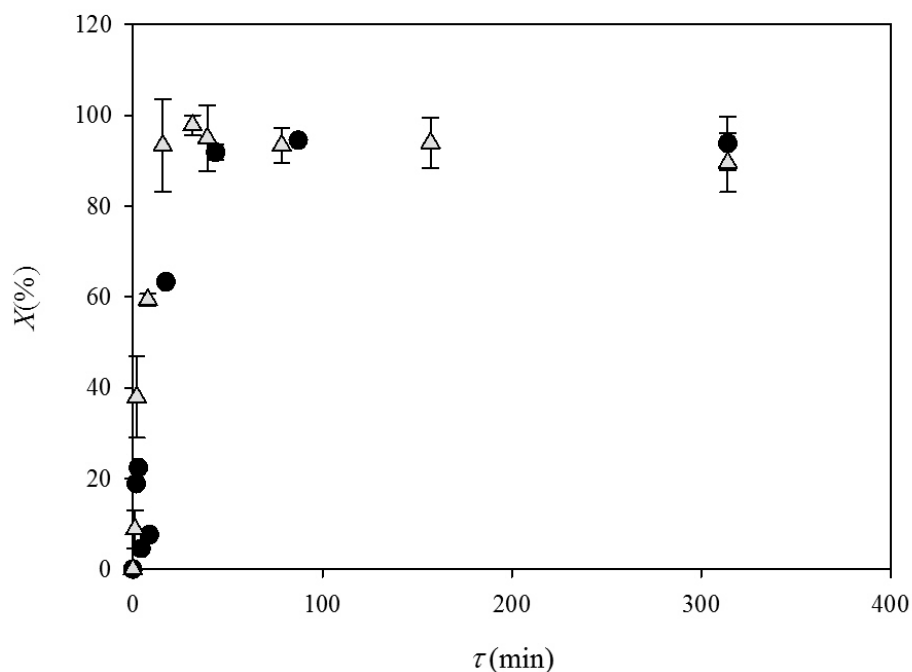
Tablica 6. Udio slobodnih masnih kiselina u jestivom i korištenom ulju izražen kao postotak oleinske kiseline

| SMK | % oleinske kiseline |
|--------------|---------------------|
| Jestivo ulje | 0,009108 |
| Otpadno ulje | 0,009618 |

Dobiveni rezultati pokazuju da korišteno (otpadno) kuhinjsko ulje sadrži veći udio slobodnih masnih kiselina što se vidi iz dobivenih rezultata (Tablica 6.). Veći udio SMK ukazuje na manju kvalitetu ulja. Može se zaključiti da se obradom ulja mijenja njegov sastav, ovisno o termičkoj izloženosti te udjelu nečistoća proizašlih obradom hrane.

4.6. Transesterifikacija u mikroreaktoru

Nakon što je određen sastav ulja i odabran najbolji reakcijski sustav, definiran najbolji emulgator te njegov utjecaj na enzimsku aktivnost, proveden je proces transesterifikacije u mikroreaktoru pri različitim vremenima zadržavanja. Rezultati su prikazani na Slici 22.



Slika 22. Utjecaj vremena zadržavanja na proces transesterifikacije: ● svježe ulje, Δ otpadno ulje

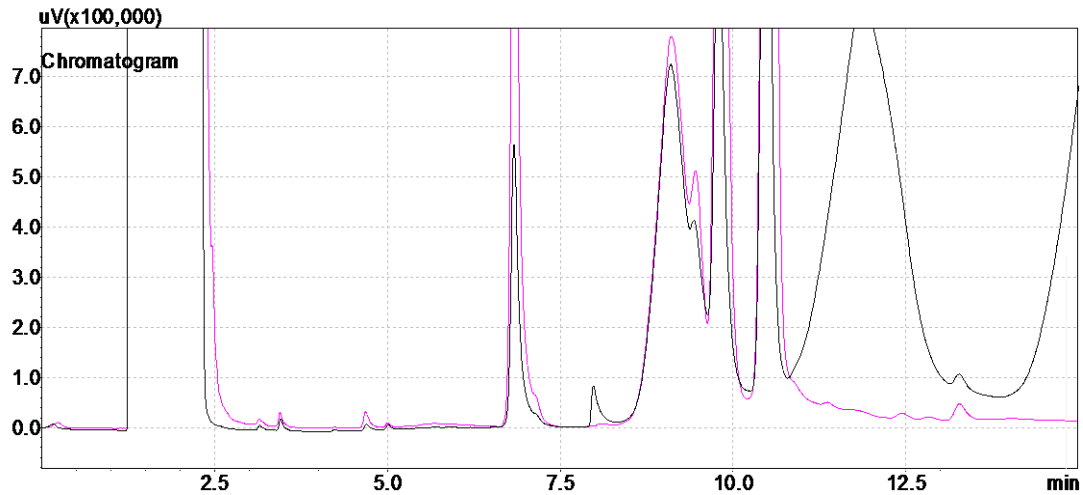
Kao što je vidljivo, za vrijeme zadržavanja od 80 min postignuta je konverzija od 93 % za jestivo ulje. Što se tiče otpadnog ulja, konverzija veća od 95 % postignuta je i za kraće vrijeme zadržavanja od 40 min. Dobiveni rezultati u skladu su s analizom svježeg i otpadnog ulja koji su pokazali da je u otpadnom ulju veći udio SMK s kraćim lancima te da otpadno kuhinjsko ulje sadrži veći udio SMK. Zbog toga je postignuta nešto veća konverzija u kraćem vremenu. U usporedbi s procesom provedenim u kotlastom makroreaktoru (Budžaki i sur., 2015.), jednaka konverzija je u šaržnom makrosustavu dobivena tek nakon 22 h što ukazuje na veću učinkovitost provedbe procesa u mikroreaktoru zbog svih ranije navedenih prednosti primjene mikroreaktora kao reakcijskog sustava.

Sakupljanjem uzoraka na izlazu iz reaktora (Slika 24.) uočeno je formiranje 4 faze: metanola, SDSa, biodizela i glicerola. Dobiveni biodizel nalazio se između faza SDSa i glicerola što u konačnici otežava njegovu separaciju.

4.7. Ekstrakcija glicerola

Kao posljednji korak u ovom istraživanju proveden je proces kontinuirane proizvodnje biodizela uz paralelnu separaciju glicerola u mikroekstratoru za vrijeme zadržavanja od 80 min (i za svježe i za otpadno ulje).

Usporedbom kromatografa (Slika 23.) uzoraka prije ekstrakcije i nakon ekstrakcije vidljivo je da za pokus proveden pri vremenu zadržavanja od 80 min nakon procesa ekstrakcije nije moguće pronaći karakteristični pik glicerola koji se na kromatogramu uzorka prije ekstrakcije može vidjeti za retencijsko vrijeme od 8.214 min.



Slika 23. Usporedba uzoraka biodizela prije (crno) i nakon ekstrakcije glicerola (ljubičasto)

Na temelju ovako provedenog pokusa možemo zaključiti da je glicerol uspješno uklonjen iz biodizela. Isti eksperiment proveden je s otpadnim uljem pri čemu je dobiven isti rezultat.

Također, promatrajući sakupljeni uzorak na izlazu iz reaktora (Slika 24.) uočeno je formiranje samo dvije faze: biodizela i DES-a koji je u stvari smjesa svih ostalih komponenata reakcijske smjese. S obzirom da se faza biodizela nakuplja na vrhu idući koraci separacije su znatno olakšani.



Slika 24. Uzorak biodizela prije i nakon ekstrakcije u mikroseparatoru

5. Zaključak

Na temelju provedenih pokusa u ovom radu može se zaključiti da je:

- pri ispitivanju stabilnosti smjese voda:ulje (V:U) najbolji rezultat postignut korištenjem SDS-a koji je održao smjesu stabilnom i nakon 7 dana. Mikroskopska analiza suspenzija pokazala je pravilnu raspodjelu faza odnosno mjehurića ulja i vode u tom uzorku.
- pri ispitivanju stabilnosti smjese metanol:ulje niti jedan emulgator nije bio prihvatljiv pri formiranju emulzije koja bi bila stabilna kroz dulji vremenski period.
- mjerenjem apsorbancije u različitim smjesama s i bez emulgatora, izračunate su volumne aktivnosti enzima. Dobiveni rezultati pokazuju da dodatak emulgatora pozitivno utječe na enzimsku aktivnost te ju čak i povećava.
- određivanjem sastava slobodnih masnih kiselina (SMK), uočen je različit udio istih kiselina u uzrocima svježeg i otpadnog ulja, što ukazuje na to da se prženjem mijenja sastav ulja.
- transesterifikacijom masnih kiselina u mikroreaktoru, za vrijeme zadržavanja od 80 min, postignuta je konverzija od 93 % za svježe ulje te 95 % konverzija ($\tau = 40$ min) za otpadno ulje.
- sakupljanjem uzoraka na izlazu iz reaktora uočeno je formiranje 4 sloja: metanola, SDS-a, biodizela i glicerola. Dobiveni biodizel nalazio se između slojeva SDS-a i glicerola što otežava proces separacije.
- nakon provedene paralelne proizvodnje i separacije glicerola u mikroreaktoru, glicerol je uspješno uklonjen iz biodizela te je na izlazu iz mikroekstraktora uočeno raslojavanje na samo 2 faze: biodizel (koji se nalazio na vrhu smjese) i DES u kojem su se nalazile ostale komponente reakcijske smjese čime su idući koraci separacije znatno olakšani.

6. Popis oznaka, kratica i simbola

| | |
|-----------------------------|--|
| $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ | promjena apsorbancije u vremenu (min^{-1}) |
| γ_E | masena koncentracija enzima lipaze (mg/cm^3) |
| A | aktivnost (U) |
| c | množinska koncentracija tvari (mM) |
| c_s | množinska koncentracija supstrata (mM) |
| d | promjer (cm) |
| h | visina sloja (cm) |
| m | masa (g) |
| M | molekulska masa (g/mol) |
| n | broj okretaja miješala (o/min) |
| r_s | reakcijska brzina (U/mL) |
| S | supstrat |
| $S.A.$ | specifična aktivnost enzima (U/mL) |
| T | temperatura ($^{\circ}\text{C}$) |
| V | volumen (mL) |
| $V.A.$ | volumna aktivnost enzima (U/mL) |
| V_e | volumen dodanog uzorka u kojem se nalazi enzim (μL) |
| V_r | ukupni volumen uzorka u kivetu (μL) |
| X | konverzija (%) |
| Δ | promjena |
| ϵ | ekstinkcijski koeficijent ($\text{L}/\text{mmol}\cdot\text{cm}$) |
| λ | valna duljina (nm) |

7. Literatura

Abbaszaadeh, A., Ghobadian, B., Omidkhah, M.R., Najafi, G. Current biodiesel production technologies, *Energy Conversion and Management*, **63** (2012) 138-148.

Adashi, I.M. Purification of crude biodiesel using dry washing and membrane technologies, *Alexandria Engineering Journal*, **54** (2015) 1265–1272.

Akoh, C.C., Chang, S.W., Lee, G.C. Shaw, J.F. Enzymatic approach to biodiesel production, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55** (2007) 8995–9005.

Balat, M., Balat, H. Progress in biodiesel processing, *Applied Energy*, **87** (2010) 1815-1835.

Bart, C.J., Palmeri, N., Cavallaro, S. From soil to oil, *Biodiesel Science and Technology*, *Woodhead Publishing Series in Energy*, **1** (2010) 11-24.

Bhuiya, M.M.K., Rasul, M.G., Khan, M.M.K., Ashwath, N., Azad, A.K., Hazrat, M.A. Second Generation Biodiesel: Potential Alternative to Edible Oil-Derived Biodiesel, *Energy Procedia* **61** (2014) 1969 – 1972.

Budžaki, S., Šalić, A., Zelić, B., Tišma, M. Enzyme-catalysed Biodiesel Production from Edible and Waste Cooking Oils, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **29** (2015) 465-469.

Christopher L.P., Kumar, H., Zambare, V.P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities, *Applied Energy*, **119** (2014) 497-520.

Dossin, T.F., Reyniers, M.-F., Berger, R.J., Marin, G.B. Simulation of heterogeneously MgO-catalyzed transesterification for fine-chemical and biodiesel industrial production, *Applied Catalysis B: Environmental*, **67** (2006) 136–148.

Fathy, A.Y., Fathy, Y.E.K. , Hoda, S.A., Latifa, K.M., Seham, A.S., Ahmed, K.E. Highly effective ionic liquids for biodiesel production from waste vegetable oils, *Egyptian Journal of Petroleum*, **24** (2015) 103–111.

Glisic, S., Skala, D. The problems in design and detailed analyses of energy consumption for biodiesel synthesis at supercritical conditions, *The Journal of Supercritical Fluids*, **49** (2009) 293–301.

Jenkin, R.T., Al-Bassam, A.Z.M., Harris, R.C., Abbott, A.P., Smith, D.J., Holwell, D.A., Chapman, R.J., Stanley, C.J. The application of deep eutectic solvent ionic liquids for environmentally-friendly dissolution and recovery of precious metals, *Minerals Engineering*, **87** (2016) 18–24.

Lukić, I., Krstić, J., Jovanović, D., Skala, D. Alumina Silica Supported K₂CO₃ as a Catalyst for Biodiesel Synthesis from Sunflower Oil, *Bioresource Technology*, **100** (2009) 4690–4696.

Ognjanović, N., Bezbradica, D., Knežević, Z. Optimization of the production of biodiesel by commercial immobilized lipase in a solvent-free system using a response surface methodology, *Journal of the Serbian Chemical Society*, **73** (2008) 147–156.

Ognjanović, N., Bezbradica, D., Knežević-Jugović, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: process optimization and the immobilized system stability, *Bioresource Technology*, **100** (2009) 5146–5154.

Ognjanović, N.D., Petrović, S.D., Bezbradica, D.I., Knežević-Jugović, Z.D. Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela. *Hemijska industrija*, **59** (2010) 49-59.

Palacios, D., Brusto, M.D., Ortega, N. Study of a new spectrophotometric endpoint assay for lipase activity determination in aqueous media. *LWT-Food Science and Technology* **55** (2014) 536-542.

Ranganathan, S.V., Narasimhan, S.L., Muthukumar, K. An overview of enzymatic production of biodiesel, *Bioresource Technology*, **99** (2008) 3975–3981.

Rathore, V., Madras, G. Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide, *Fuel*, **86** (2007) 2650–2659.

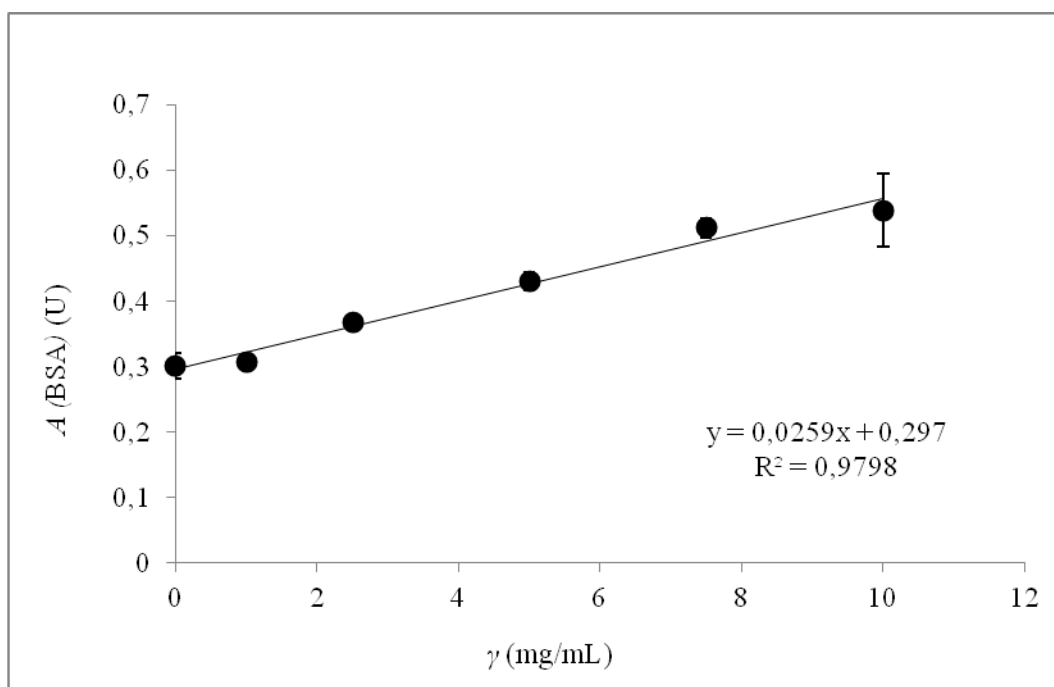
Sander, A. Ionske kapljevine u službi zelene kemije, *Polimeri*, **33** (2012) 3-4.

Shah, S., Sharma, S., Gupta, M.N. Enzymatic transesterification for biodiesel production, *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, **40** (2003) 392–399.

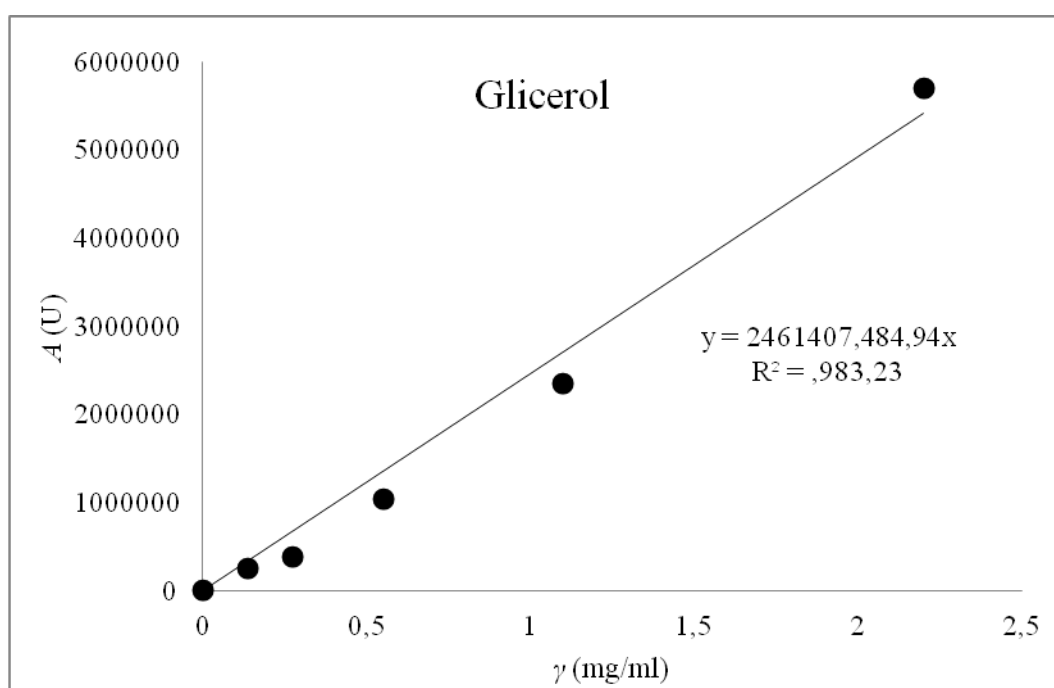
Šalić, A., Zelić, B. Mikroreaktori – prenosiva postrojenja za proizvodnju biodizelskoga goriva, *Goriva i maziva*, **50** (2011) 85-110.

Veljković, V.B., Stamenković, O.S., Todorović, Z.B., Lazić, M.L., Skala, D.U. Kinetics of sunflower oil methanolysis catalyzed by calcium oxide, *Fuel*, **88** (2009) 1554-1562.

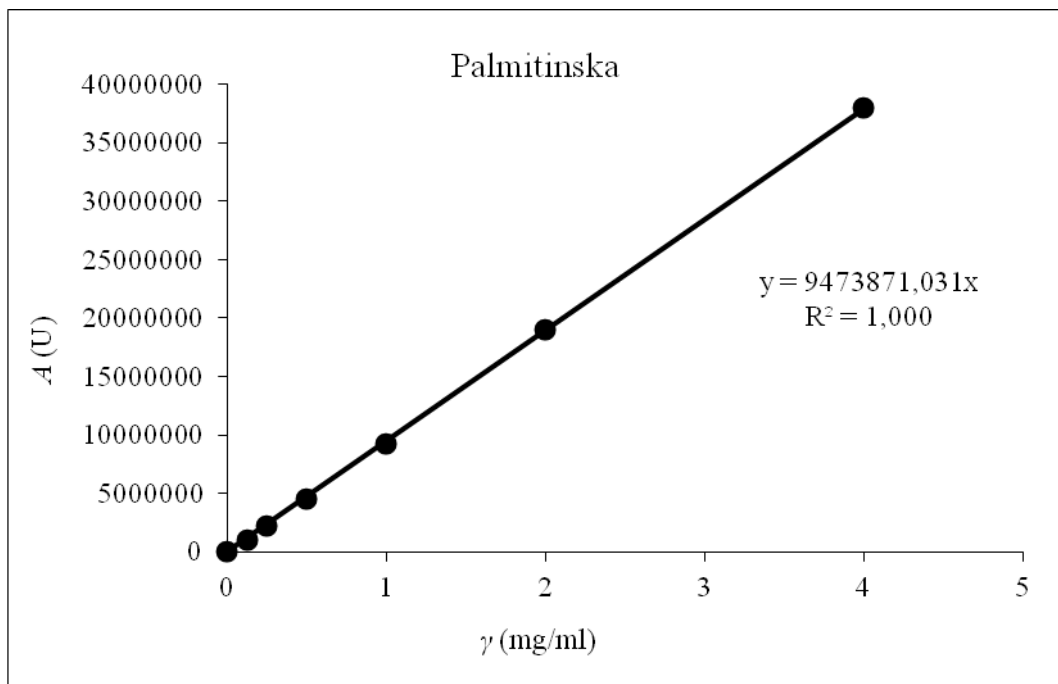
8. Prilozi



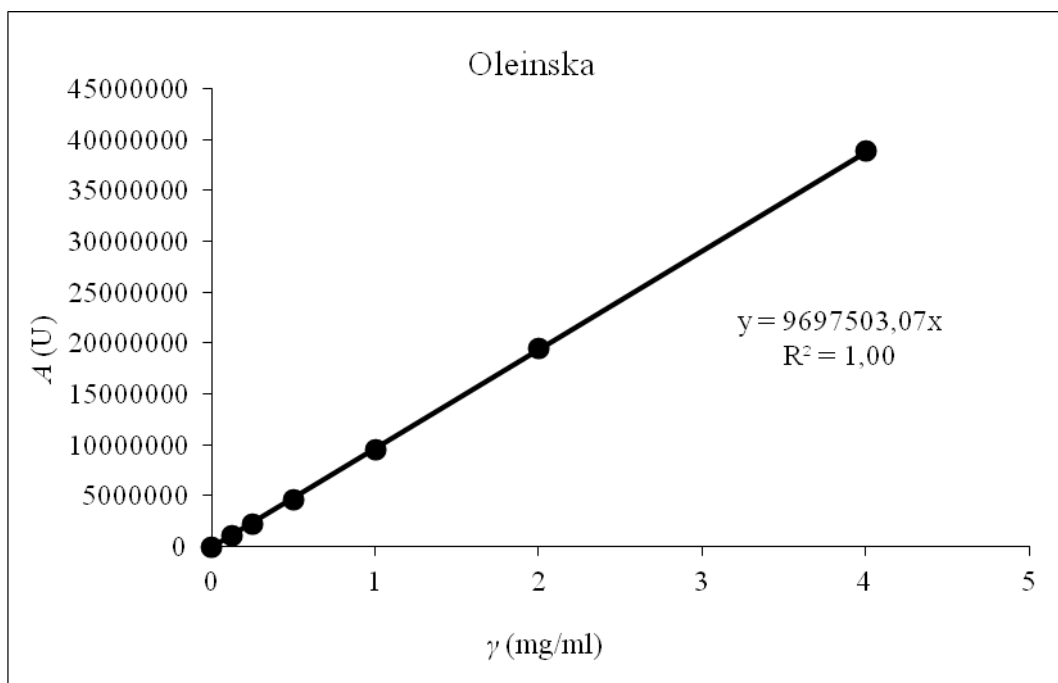
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina



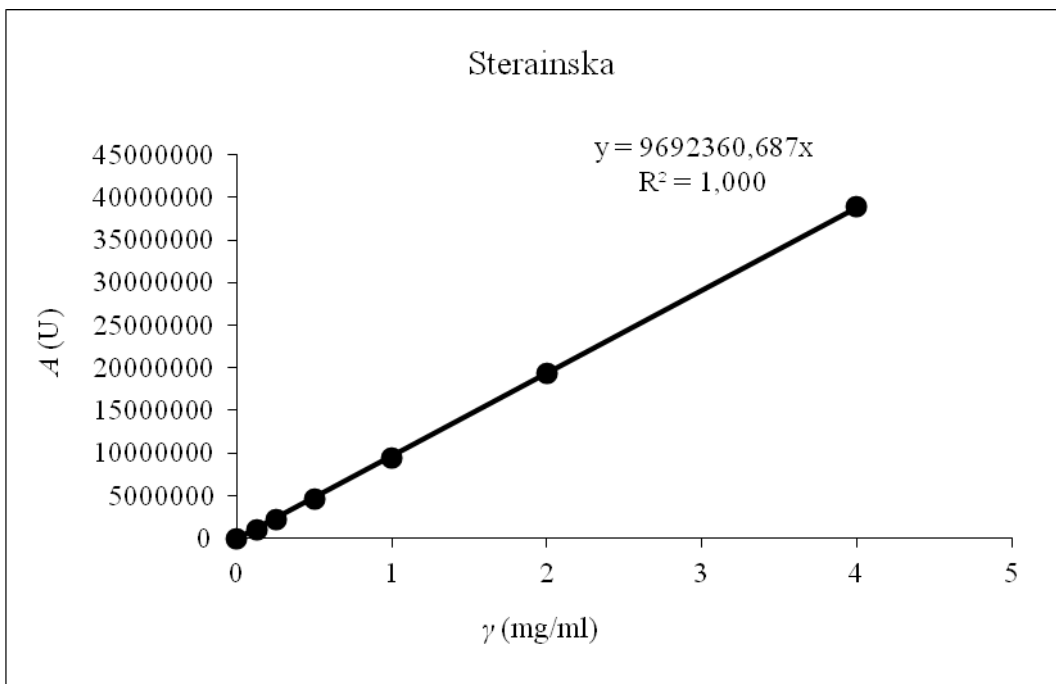
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola



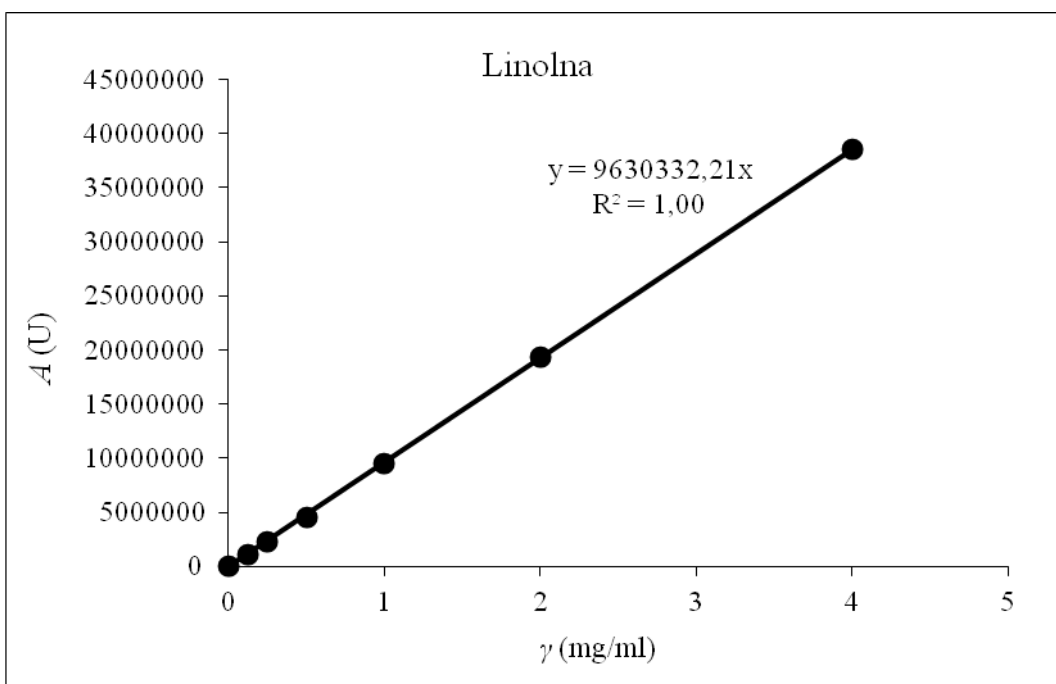
Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije palmitinske kiseline



Prilog 4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije oleinske kiseline



Prilog 5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije steirinske kiseline



Prilog 6. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije linolne kiseline

ŽIVOTOPIS

Osobni podaci:

Ime i prezime: Dina Ali

██████████

██████████

██████████

██████

██████

████████████████████

Školovanje:

2009. - 2016. Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

2005. - 2009. IX. Gimnazija – opća gimnazija

Aktivnosti za vrijeme studija

2016. Sudjelovanje na Radionici u sklopu projekta “Primjena mikroreaktora u praćenju antioksidacijske aktivnosti samoniklog bilja (MICROAA)”

2014. Demonstratorica na Zavodu za industrijsku ekologiju za kolegij Mikrobiologija i Zaštita okoliša

2013. Demonstratorica na Zavodu za industrijsku ekologiju za kolegij Mikrobiologija