

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Ivana Baotić**

**ENZIMSKI KATALIZIRANA SINTEZA BIODIZELA IZ OTPADNOG ULJA**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, rujan 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo  
Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij** Procesno inženjerstvo  
**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Energija i okoliš  
**Tema rada** je prihvaćena na XI. Sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 25. rujna 2017.  
**Mentor:** izv. prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*

**Enzimski katalizirana sinteza biodizela iz otpadnog ulja**  
Ivana Baotić, 213/DI

**Sažetak:** Industrijalizacija i demografska ekspanzija dovele su do povećanja svjetske potražnje za energijom i zato je potrebno posegnuti za obnovljivim izvorima energije u koje spadaju biogoriva, pa i biodizel. Biodizel je obnovljivo i biorazgradivo gorivo koje se može proizvesti iz biljnih ulja, životinjskih masti i otpadnih jestivih/nejestivih ulja. U okviru ovoga rada sinteza biodizela provedena je u kotlastom reaktoru transesterifikacijom otpadnog suncokretovog ulja, zaostalog nakon prženja krumpira, katalizirana slobodnom lipazom iz *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L) uz dodatak metanola. Jednostupanjska i četverostupanjska reakcija transesterifikacije provedene su na temperaturi 40, 50 i 60 °C. Najviši udio metilnih estera viših masnih kiselina (95%) dobiven je jednostupanjskom transesterifikacijom u reakciji provedenoj na 40 °C.

**Ključne riječi:** biodizel, otpadno ulje, transesterifikacija, lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*

**Rad sadrži:** 29 Stranica  
5 Slika  
1 Tablica  
28 Literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. izv. prof. dr. sc. <i>Marina Tišma</i>   | predsjednik   |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i> | član – mentor |
| 3. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>       | član          |
| 4. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i>     | zamjena člana |

**Datum obrane:** 23. rujna 2019.

**Rad je tiskan i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josipa Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Process Engineering**  
**Subdepartment of Thermodynamics and Reaction Engineering**  
Franje Kuhača 20, HR – 31000 Osijek, Croatia

**Graduate program** Process Engineering  
**Scientific area:** Biotechnical Sciences  
**Scientific field:** Food Technology  
**Course title:** Energy and Environment  
**Thesis subject** was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food technology Osijek at its session no. XI. held on September 25, 2017.  
**Mentor:** Sandra Budžaki, PhD, associate prof.

### The Enzyme-Catalyzed Synthesis Of Biodiesel From Waste Oil

Ivana Baotić, 213/DI

**Summary:** Industrialization and demographic expansion have led to an increase in world demand for energy and therefore for renewable energy sources that include biofuels and biodiesel. Biodiesel is a renewable and biodegradable fuel that can be produced from vegetable oils, animal fats and waste edible oils. In this respect, the aim of this thesis was synthesis of biodiesel in a fed-batch reactor by transesterification of sunflower oil catalysed by free lipase from *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L) with the addition of methanol. One-step and four-step transesterification reaction of waste frying oil were carried out in a batch reactor at three different temperatures, 40, 50 and 60 °C. The highest fatty acids methyl esters content (95%) was achieved in the one-step transesterification reaction of edible sunflower oil performed at 40 °C.

**Key words:** biodiesel, waste cooking oil, transesterification, lipase from *Thermomyces lanuginosus*

**Thesis contains:** 29 Pages  
5 Figures  
1 Tables  
28 References

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |    |                                      |              |
|----|--------------------------------------|--------------|
| 1. | Marina Tišma, PhD, associate prof.   | chair person |
| 2. | Sandra Budžaki, PhD, associate prof. | supervisor   |
| 3. | Ivica Strelec, PhD, full prof.       | member       |
| 4. | Mirela Planinić, PhD, full prof.     | stand-in     |

**Defense date:** September 23, 2019

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem svojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sandri Budžaki na posvećenom vremenu, neizmjerne strpljivosti, poticanju i brojnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala na pristupačnosti u svakom trenutku.

Zahvaljujem svojim kolegama i prijateljima koji su uvijek bili uz mene i pomagali kad god je bilo potrebno. Hvala vam svima što ste učinili moj studentski život ljepšim.

Zahvaljujem mojim prijateljima u Županji što su vjerovali u mene i podržavali me kroz sve godine studiranja. Hvala vam na svim riječima ohrabrenja i utjehe.

Posebno i veliko hvala mojim dragim roditeljima, bratu i njegovoj obitelji, hvala vam svima na velikom strpljenju tokom svih godina čekanja ovog velikog dana. Hvala vam na potpori, riječima ohrabrenja i vjeri u mene. Vaša me ljubav i vjera tjerala da nikad ne odustanem i bez vas ovo ne bi bilo moguće.

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	3
<b>2.1. Biodizel</b> .....	4
2.1.1. Transesterifikacija .....	6
2.1.2. Sirovine.....	7
2.1.3. Katalizatori.....	9
<b>2.2. Lipaze</b> .....	9
2.2.1. Lipaze u proizvodnji biodizela .....	11
<b>2.3. Svojstva biodizela</b> .....	12
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	14
<b>3.1. Zadatak</b> .....	15
<b>3.2. Materijali</b> .....	15
<b>3.3. Metode</b> .....	15
3.3.1. Sinteza biodizela u kotlastom reaktoru.....	15
3.3.2. Određivanje udjela metilnih estera masnih kiselina u biodizelu .....	17
<b>3.4. Jednostupanjska reakcija sinteze biodizela</b> .....	18
<b>3.5. Četverostupanjska reakcija sinteze biodizela</b> .....	18
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	20
<b>4.1. Jednostupanjska reakcija sinteze biodizela</b> .....	21
<b>4.2. Četverostupanjska reakcija sinteze biodizela</b> .....	22
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	24
<b>6. LITERATURA</b> .....	26

## **1. UVOD**

Obzirom na sve veću potrebu i potrošnju energenata i činjenicu da se svjetske zalihe fosilnih goriva smanjuju iz godine u godinu, raste interes i potreba za alternativnim izvorima energije. Zbog toga se sve veća pažnja usmjerava na poboljšanje postojećih i razvoj novih tehnologija proizvodnje alternativnih goriva pri čemu jedno od značajnijih predstavlja biodizel.

Trenutačna industrijska proizvodnja biodizela zasniva se na reakciji transesterifikacije jestivog ulja visoke kvalitete i metanola uz lužinu kao katalizator (NaOH ili KOH) pri čemu nastaje smjesa metilnih estera viših masnih kiselina (biodizel) i glicerol (Issariyakul i sur., 2014.; Lam i sur., 2010.). Nedostaci navedenog procesa su nastajanje sapuna u sporednoj neželjenoj reakciji saponifikacije. Nastale sapune je potrebno izdvojiti iz smjese nastalih produkta što uvelike povećava količinu vode koja se koristi u procesu pročišćavanja biodizela, proizvodne troškove biodizela kao i njegovu cijenu. Upotreba enzima (lipaza) u proizvodnji biodizela kao biokatalizatora reakcije transesterifikacije ima nekoliko prednosti. Osim što enzimi zahtijevaju blaže procesne uvjete koji smanjuju potrošnju energije potrebne za proizvodnju biodizela, enzimskim procesom ne nastaju sapuni, pa u tom slučaju nema dodatnih troškova za pročišćavanje produkta (Santacesaria i sur., 2012.). Kako bi proces proizvodnje biodizela bio ekonomski isplativiji te ekološki prihvatljiviji velik broj autora objavio je rezultate znanstvenih istraživanja kojima dokazuje da se iz otpadnih ulja niže kvalitete (visoki udio slobodnih masnih kiselina) u reakciji transesterifikacije kataliziranoj lipazama može dobiti biodizel iste ili bolje kvalitete nego što je to u slučaju kemijskih katalizatora (Yaakob i sur., 2013.; Azocar i sur., 2010.).

U okviru ovoga rada provedena je sinteza biodizela u kotlastom reaktoru transesterifikacijom otpadnog suncokretovog ulja zaostalog nakon prženja hrane, kataliziranom slobodnom lipazom iz *Thermomyces lanuginosus* u prisustvu metanola. Pokusi su izvedeni na tri različite temperature ( $T = 40, 50$  i  $60^{\circ}\text{C}$ ), jednostupanjskom i četverostupanjskom reakcijom. Tijekom četverostupanjske reakcije metanol je dodavan postepeno uz konačni udio u reakcijskoj smjesi kao i kod jednostupanjske reakcije. Eksperimentalni dio rada proveden je u Laboratoriju za procesno inženjerstvo Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek.

## **2. TEORIJSKI DIO**



## 2.1. Biodizel

Industrijalizacija i demografska ekspanzija dovele su do povećanja svjetske potražnje za energijom. Ograničene rezerve fosilnih goriva i rast potrošnje energenata mogu izazvati energetska krizu, ali su i važan pokretač istraživanja u pravcu razvoja alternativnih izvora energije, koji mogu djelomično ili potpuno zamijeniti fosilna goriva. Osim toga, sagorijevanjem fosilnih goriva oslobađaju se velike količine plinova koji izazivaju efekt staklenika i pojave kiselih kiša. Zbog tog u razvijenim zemljama postoji rastući trend primjene suvremenih tehnologija za efikasno korištenje bioenergije u obliku biogoriva, među kojima vodeće mjesto zauzima biodizel (Veljković i sur, 2012.).

Danas se u industrijskoj proizvodnji biodizelskog goriva koriste različite tehnologije, a najviše je razvijen način proizvodnje procesom transesterifikacije alkalnim katalizatorima. Budući da ekonomičnost ovih procesa ovisi o nekoliko bitnih čimbenika, npr. kvaliteti sirovine (sastav sirovine), potrošnji energije, pročišćavanju i odvajanju od nusproizvoda, obradi otpadnih voda i sl. ispituju se razne mogućnosti poboljšanja postojećih tehnologija i razvoj novih kao što je biokatalitička konverzija, tj. enzimska tehnologija (Kučan Polak, 2006.).

Po članku 4. Uredbe o kakvoći biogoriva (NN 141/2005), biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina (FAME) koja se proizvodi od biljnog ili životinjskog ulja i ima približna svojstva kao mineralni dizel, a koristi se kao biogorivo. Ili jednostavnije - biodizel je obnovljivo i biorazgradivo gorivo koje se može proizvesti iz biljnih ulja, životinjskih masti i otpadnog jestivog/nejestivog ulja (*eng.* waste cooking oil, WCO) (Voća, 2008.). Spada u skupinu goriva koja se dobivaju iz obnovljivih izvora, najviše iz poljoprivrednih kultura, i kao takvo se upotrebljava u dizelskim motorima. Biodizel je prvo i (za sada) jedino alternativno gorivo koje je prošlo kompletnu evaluaciju emisije ispušnih plinova i potencijalnih rizika propisanih od strane Agencije za zaštitu okoliša (EPA - Environmental Protection Agency). Ova ispitivanja su pokazala da dizelski motori sa pogonom na biodizel imaju znatno manju emisiju dima i čestica, čak do 40%. Niža emisija postiže se i kod primjene smjese konvencionalnog dizelskog goriva i biodizela. Dobri rezultati se dobivaju i u pogledu redukcije emisije ugljičnog monoksida (smanjenje za oko 40 %) i ugljikovodika (smanjenje oko 65 %). Emisija dušikovog oksida pri pogonu dizelskog motora veća je u prosjeku za oko 10 % u odnosu na mineralno dizelsko gorivo (Mustapić i sur., 2006.).

Proizvodnja biodizela može se provoditi kao šaržni ili kontinuirani postupak. Kod šaržnog postupka kompletan sadržaj, sirovina i katalizatora, se dodaje u reaktor i u njemu ostaje do kraja reakcije. Šaržni postupak dobivanja biodizela je prikladan za manja postrojenja kao i za česte promjene sirovina u pogledu kvalitete jer je fleksibilniji pri čemu se svaki šaržni postupak brzo može prilagoditi karakteristikama sirovine kako bi konačni proizvod bio što je moguće kvalitetniji (Sinčić, 2008.).

Kontinuirani postupak proizvodnje biodizela podrazumijeva kontinuirano uvođenje sirovina i katalizatora u proizvodni proces kojem je osnova protočni reaktor sa miješanjem ili cijevni reaktor. Kontinuirani postupak omogućava nižu cijenu i jednoličniju kvalitetu biodizela nego što je to slučaj kod šaržnog procesa (Noureddini i sur., 1998.; Darnoko i sur., 2000.) pa se on u posljednje vrijeme više koristi, pogotovo za industrijska postojanja većih kapaciteta (Sinčić, 2008.; Noureddini i sur., 1998.; Darnoko i sur., 2000.).

Biodizel se na tržištu može naći kao mješavina s mineralnim dizelom u različitim omjerima od 5 % kao B5 do čak 95 % kao B95.

Prednosti koje ima korištenje biodizela su njegova obnovljivost kao energetske izvora, niska razina toksičnosti, okolišna neškodljivost, niska emisija štetnih plinova ( $\text{CO}_2$  i  $\text{SO}_2$ ), odlično miješanje s mineralnim dizelom u širokom rasponu omjera. Biodizel je jedino alternativno gorivo koje se može koristiti za pokretanje dizel motora bez njihove prethodne modifikacije (Sharma i sur., 2008.).

Nedostaci koji se pripisuju korištenju biodizela su veća potrošnja zbog manje energetske vrijednosti, niža točka smrzavanja u odnosu na mineralni dizel, manje je stabilan prilikom dužeg skladištenja (ne može se čuvati duže od 6 mjeseci), te emitira više dušikovog oksida od mineralnog dizela (Grujić i sur., 2017.).

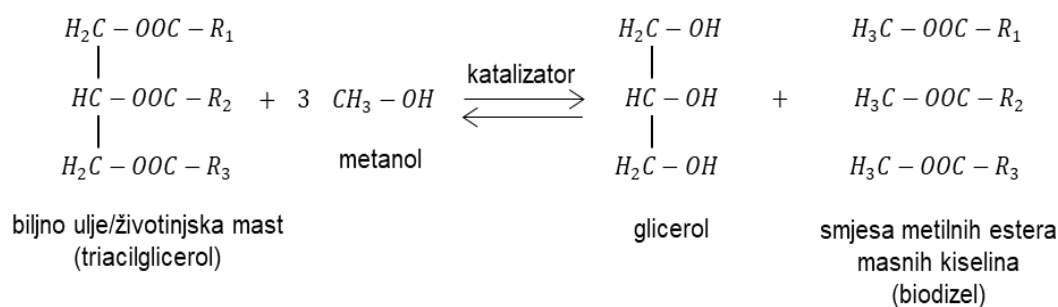
Proces trenutne industrijske proizvodnje biodizela temelji se na kemijskoj reakciji transesterifikacije triacilglicerola i alkohola uz prisutnost alkalnih katalizatora (NaOH ili KOH). Od alkohola najčešće se koristi metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) zbog niza prednosti između kojih je i laka dostupnost i niska cijena. Kao produkt nastaje smjesa metilnih estera viših masnih kiselina i glicerol te sapuni kao neželjeni nusprodukti ovisno o kvaliteti početne sirovine (Šilić i sur., 2012.).

Biodizel se može proizvesti na 4 načina: miješanjem biljnog ulja s dizelom, postupkom mikroemulzifikacije, pirolize i transesterifikacije.

### 2.1.1. Transesterifikacija

Izuzev transesterifikacije, ostali načini pretvorbe prirodnih ulja i masti u pogonsko gorivo za dizel motore zbog svojih nedostataka nisu imali širu primjenu. Transesterifikacija (**Slika 1**) se pokazala vrlo učinkovitom i danas najčešće korištenom metodom za proizvodnju kvalitetnog biodizela iz biljnih ulja, ali i iz masti i ulja životinjskog podrijetla, a isto tako i iz otpadnih jestivih ulja.

Alkoholiza ili transesterifikacija ulja općenito se odvija prema slijedećoj jednadžbi:



**Slika 1** Reakcija transesterifikacije (Budžaki i Miljić, 2017.)

Reakcija transesterifikacije može se odvijati u prisustvu kiselih ili baznih katalizatora, ali i bez prisustva katalizatora. Najčešće se provodi bazno-katalizirana transesterifikacija jer je oko 4000 puta brža od kiselo-katalizirane (Andričić i sur., 2008.).

Transesterifikacija je reverzibilna reakcija koja se odvija u 3 stupnja. U prvom stupnju iz triacilglicerola nastaju diacilgliceroli, zatim slijedi drugi stupanj u kojem nastaju monoacilgliceroli i u završnom trećem stupnju nastaju metilni esteri masnih kiselina te kao nusproizvod nastaje glicerol (Yang i sur., 2014.). U svakom stupnju esterifikacije dobiva se po jedna molekula metilnog estera. Kod triacilglicerola oznake  $R_1$ ,  $R_2$  i  $R_3$  su masne kiseline i najčešće su to palmitinska, oleinska, stearinska, linolna i linoleinska kiselina. Potreban je i višak alkohola da pomakne ravnotežu reakcije u smjeru stvaranja estera (Predojević, 2010.).

Prema definiciji (NN 141/2005) biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina, ali se kod sinteze biodizela mogu još koristiti i drugi jednostavni alkoholi kao što je etanol ili bioetanol (Yang i sur., 2014.).

Kemijska reakcija transesterifikacije mora biti katalizirana da bi se postigla visoka konverzija. Istraživanja kinetike transesterifikacije su pokazala da je prvi stupanj reakcije najsporiji odnosno taj korak je "usko grlo procesa". Kod određivanja reda reakcije mora se uzeti u obzir da reakcijska smjesa nije homogena tijekom cijelog procesa transesterifikacije i upravo zbog toga je reakcija na početku spora dok se ne uspostavi homogenost. Nakon toga postaje vrlo brza i slijedi kinetika reakcije drugog reda sve do kraja kada gotovo potpuno usporava (Mitelbach i sur., 2004.).

Proces transesterifikacije triacilglicerola sa metanolom može se odvijati bez katalizatora, ali pod uvjetom da su tlak u reakciji i temperatura dovoljno visoki. Prednost procesa bez katalizatora su visoka čistoća dobivenog biodizela i glicerola. No, postoje i znatni nedostaci takvog procesa proizvodnje, a to su nisko iskorištenje, dugotrajnost i puno oštriji uvjeti reakcije (nakon 10 sati pri temperaturi od 235 °C i pri tlaku od 62 bara, 85 % konverzija sojinog ulja je zabilježena) koji iziskuju i velike utroške energije (Diasakou i sur., 1998.).

### **2.1.2. Sirovine**

Najčešće korištene sirovine za proizvodnju biodizela su ulja uljane repice, suncokreta, soje, palme, otpadno jestivo ulje, goveđi loj i slično. Izbor sirovine ovisi o dostupnosti poljoprivrednih kultura u pojedinim zemljama. U Europi se biodizel najviše proizvodi iz repičina ulja (84 %) i suncokreta (13 %), dok se u SAD-u najviše koristi sojino ulje (Šilić i sur., 2012.).

Sirovine ovise o specifičnim uvjetima pojedine zemlje (navike stanovništva, klima, uobičajene poljoprivredne kulture koje su prisutne u toj zemlji i sl.). Kao najznačajnija sirovina izdvaja se ulje uljane repice i u velikoj mjeri ulje suncokreta. Ulje uljane repice (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) izabrali su pioniri proizvodnje biodizela za eksperimente transesterifikacije zbog relativno niske cijene u odnosu na druga ulja (Mustapić i Pospišil, 2005.).

Prema procjenama, do 40 milijuna hektara zemljišta u Europskoj Uniji moglo bi se koristiti za proizvodnju energije i to bez utjecaja na opskrbu hranom, što čini zanemariv postotak obradivih površina cjelokupne Unije (Voća, 2017.).

Procijenjeno je da će u idućih nekoliko godina biodizel dobiven iz palminog ulja doseći jednu četvrtinu udjela u ukupnoj proizvodnji biodizela na tržištu Europske Unije. Razlog znatno povećane količine proizvodnje biodizela iz palminog ulja je velika dostupnost i rasprostranjenost, ali isto tako i relativno niži troškovi proizvodnje u odnosu na ostale uljaricama što utječe na finalnu cijenu proizvoda (Kurevija, 2007.).

Uljana repica je još uvijek najzastupljenija kultura za proizvodnju biodizela na području EU sa udjelom od preko 80 %, ali zbog kompetitivnosti energetske i prehrambenog sektora došlo je do porasta cijene ulja. Istovremeno cijena palminog ulja bila je za 1/3 jeftinija nego uljane repice. Kada bi kompletnu količinu proizvedenog dizela zamijenili sa biodizelom onda bi više od polovice površine Europske Unije bilo zasijano nasadima uljane repice. Ovi podaci govore kolika je potreba za uvozom sirovina za potrebe proizvodnje biodizela iz ostatka svijeta (Kurevija, 2007.).

U razdoblju od 1989. do 2000. na području Indonezije utrostručila se površina za uzgoj palmi što je blisko povezano sa rastom svjetske proizvodnje palminog ulja za navedeno razdoblje. U 2000-oj godini najveći dio palminih plantaža bio je smješten u Indoneziji na otocima Sumatri (75 % plantaža) i Borneu (18 % plantaža). Zbog velike brzine rasta potražnje za biodizelskim gorivom očekuje se i četverostruko povećanje plantaža za uzgoj palmi do 2020. godine. U razdoblju od 1985.-2000. ukupan broj palminih plantaža je iznosio 87 % ukupne površine tropskih šuma koje su uništene radi uzgoja palminog ulja u Maleziji, dok je ta brojka u Indoneziji dosegla do 66 %. Povećanje potražnje za biodizelskim gorivom u svijetu uzrokuje godišnji gubitak od otprilike 2 milijuna hektara tropskih prašuma u Indoneziji s ciljem da se njihova površina iskoristi za sadnju plantaža palmi što je ekvivalentna površini jedne države kao što je Slovenija (Kurevija, 2007.).

U sirovine za proizvodnju biodizela moramo ubrojiti i alkohole, pri čemu se najčešće koristi metanol kao alkohol u reakciji transesterifikacije iako se mogu koristiti i drugi jednostavni alkoholi (primarni ili sekundarni alkoholi s 1 – 8 ugljikovih atoma). Kako je već prethodno napisano, iako je prema definiciji biodizel smjesa metilnih estera masnih kiselina u tu svrhu mogu se, osim metanola, koristiti i drugi jednostavni alkoholi kao što je etanol ili bioetanol. S obzirom na to da je reakcija reverzibilna, potrebno je alkohol dodati u suvišku kako bi se osigurao pomak kemijske reakcije u desnu stranu, u smjeru nastajanja produkta. Stehiometrijski omjer alkohola i triacilglicerola je 3:1, no omjeri koji se koriste u industrijskoj

proizvodnji, pa i u laboratorijskim uvjetima istraživanja razlikuju se s obzirom na kvalitetu sirovine i njeno porijeklo (svježe ili otpadno ulje) kao i katalizator, i kreću se od stehiometrijske količine 3:1, pa sve do 245:1. Međutim, prekomjerni udio alkohola uzrokovat će topljivost glicerola u reakcijskoj smjesi što će rezultirati smanjenim nastajanjem metilnih estera masnih kiselina tj. biodizela (Budžaki i Miljić, 2017.).

### **2.1.3. Katalizatori**

Reakcija transesterifikacije može biti katalizirana lužinama (NaOH/KOH), kiselinama ( $H_2SO_4/HCl$ ) i enzimima (lipaze), a može se odvijati u vodenoj i bezvodnoj sredini što ovisi o tipu odabranog katalizatora. Osnovni zadatak katalizatora je povećati brzinu kemijske reakcije (transesterifikacije) pri čemu u njima sami ne sudjeluju. Katalizatori mogu biti u istom agregacijskom stanju kao i reaktanti (homogeni katalizatori) ili različitom (heterogeni katalizatori). Natrijev hidroksid, NaOH, je kristal bijele boje, dobro apsorbira vodu i ugljični dioksid i dobro se otapa u vodi, alkoholu i glicerolu te se zbog visokog udjela nastalih metilnih estera viših masnih kiselina koje nastaju u reakciji transesterifikacije u vrlo kratkom roku, najčešće je korišten katalizator u proizvodnji biodizela.

### **2.2. Lipaze**

Enzimi su katalizatori biološkog porijekla; biokatalizatori. Nalaze se u stanicama svih živih bića (životinjskim, biljnim i mikrobnim) gdje ubrzavaju kemijske reakcije koje su važne za održavanje životnih funkcija organizama. Zbog svoje visoke specifičnosti kako za supstrat, tako i za tip reakcije koji provode, naišli su na veliku primjenu u prehrambenoj, biotehnološkoj i farmaceutskoj industriji. Industrijski enzimi su najčešće mikrobnog porijekla, prosječne molekulske mase od 30 do 50 kDa, a djeluju u umjerenim reakcijskim uvjetima ( $pH = 7 - 9$ , i  $T = 20 - 80$  °C pri atmosferskom tlaku) bez sporednih neželjenih reakcija i stvaranja dodatne količine otpadnih procesnih struja, što svakako utječe na sniženje cijene proizvodnog procesa i konačnog proizvoda.

Lipaze su hidrolitički enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize, esterifikacije i transesterifikacije. Pri tome u reakcijama esterifikacije i/ili transesterifikacije one prevode slobodne masne kiseline do metilnih estera kao i triacilglicerole. Optimalni uvjeti za katalitičku aktivnost lipaza su blagi procesni uvjeti u smislu relativno niske temperature (30 – 50 °C) u odnosu na temperature koje zahtijevaju kemijski katalizatori (60 – 80 °C). Separacija

nastalog biodizela je puno jednostavnija, u samom procesu ne nastaju sapuni kao neželjeni produkti kao ni otpadna voda koja je potrebna za njihovo uklanjanje iz smjese produkata. Međutim, enzimska sinteza biodizela je još uvijek u laboratorijskom mjerilu s obzirom da je industrijska proizvodnja ekonomski neisplativa zbog visoke cijene lipaza, kao i zbog niske stabilnosti u reakcijskoj smjesi. Istraživanja se provode u pravcu imobilizacije enzima na različite nosače koji omogućuju ponovno korištenje enzima kroz duže vremensko razdoblje čime se utječe na smanjenje cijene koštanja sintetiziranog biodizela, stabilnost enzima kao i mogućnost razvoja kontinuiranih reaktorskih sustava u svrhu sinteze biodizela.

Slobodne ili imobilizirane lipaze mogu se koristiti kao biokatalizatori. Prednost imaju imobilizirane lipaze jer se povećava stabilnost biokatalizatora koji može biti korišten više puta u ponovljenim ciklusima što uvelike smanjuje potrošnju enzima i troškove proizvodnje. Enzimski postupak je u prednosti u odnosu na kemijski jer stvara puno manje otpada i ubraja se u tzv. „zelene postupke“ sinteze biodizela koja će imati veliki značaj i primjenu u bliskoj budućnosti (Ognjanović i sur., 2009.).

Lipaze porijeklom iz mikroorganizama (gljive, bakterije i plijesni) kao što su *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* i *Rhizomucor miehei* najviše su korištene lipaze u proizvodnji biodizela (Ognjanović i sur., 2009.).

Prema regiospecifičnosti lipaze se dijele na nespecifične, 1,3 regiospecifične i 2 regiospecifične lipaze. To svojstvo omogućuje im primjenu kao biokatalizatora u brojnim reakcijama u kojima nastaje vrlo širok spektar različitih proizvoda. Za primjenu u reakcijama transesterifikacije za proizvodnju biodizela koriste se nespecifične lipaze pri čemu se dobiveni biodizel odlikuje visokim udjelom metilnih estera viših masnih kiselina u odnosu kad se koriste 1,3 i 2 regiospecifične lipaze. Lipaza iz *T. lanuginosus* je regio nespecifična lipaza.

Proizvodi dobiveni enzimskim putem su čišći i imaju manje primjesa, što je jako važno u kasnijim fazama pročišćavanja dobivenih proizvoda posebno u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. U ukupnoj svjetskoj proizvodnji enzima na prvom mjestu su proteaze, zatim enzimi koji kataliziraju hidrolizu ugljikohidrata, a lipaze zauzimaju treće mjesto (Ognjanović i sur., 2009.). Premda se udio lipaza u trenutnoj industrijskoj proizvodnji kreće oko 10 % od svih industrijski korištenih enzima, za očekivati je da će zbog svestranosti djelovanja doći do porasta njihove uporabe.

Lipaze se upotrebljavaju kao katalizatori u industrijskoj proizvodnji i kao sastojak proizvoda. Lipaze imaju značajnu ulogu u mnogim granama industrije, a to su prehrambena industrija (modifikacija arome pojedine namirnice), industrija masti i ulja, kožarska industrija (odmašćivanje kože), kozmetička industrija, mliječna industrija (hidroliza mliječne masti) (Houde i sur., 2004).

### **2.2.1. Lipaze u proizvodnji biodizela**

Niz različitih faktora utječu na enzimski kataliziranu sintezu biodizela: omjer ulja i alkohola upotrijebljenog u sintezi, prisutnost organskog otapala, prisutnost vode u reakcijskoj smjesi, temperatura reakcije, vrsta i tip lipaze (Ognjanović i sur., 2009.).

Za sintezu biodizela kao polazna sirovina koristi se biljno ulje različitog porijekla: suncokretovo ulje, palmino ulje, sojino ulje i ulje uljane repice. Obzirom na visoku cijenu jestivog ulja, a kako bi se postigla niža cijena finalnog proizvoda teži se korištenju otpadnog i iskorištenog ulja kao polazne sirovine koje je jeftinije. Ulje uljane repice predstavlja idealnu sirovinu za proizvodnju biodizela zbog visokog sadržaja mononezasićenih masnih kiselina i niskog sadržaja zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina te je stoga najčešće korištena sirovina za proizvodnju biodizela u Europi. U sintezi biodizela koriste se slobodno suspendirane ili imobilizirane lipaze u sustavima sa organskim otapalom (vodom) li bez organskog ko-otapala (heksan, heptan, acetonitril). U dosadašnjim istraživanjima korištene su lipaze koje produciraju različiti mikroorganizmi kao što su *Mucor miehei*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* i *Pseudomonas cepacia*. Istraživanja su pokazala da su imobilizirani enzimi u odnosu na slobodno suspendirane, aktivniji i stabilniji (Ognjanović i sur., 2009.).

Radni vijek enzima se produžava uz pomoć imobilizacije jer se nakon završetka reakcije imobilizirani enzim može odvojiti iz reakcijske smjese i opet koristiti u slijedećoj sintezi. Imobilizacija enzima je omogućila i razvoj kontinuiranih sustava sinteze biodizela kao i snižavanje ukupne cijene proizvodnje.



### 2.3. Svojstva biodizela

Izuzetno mali sadržaj sumpora je velika prednost biodizela jer on povećava emisiju krutih čestica, HC, NOx i CO i oštećuje pročištače za prihvatanje i izgaranje čestica dizelskih motora. Dobra strana sumpora je što daje gorivu mazivost koja je potrebna za podmazivanje visokotlačnih pumpi za ubrizgavanje. Biodizel posjeduje izvrsna maziva svojstva usprkos niskom udjelu sumpora u svom sastavu što je posljedica udjela sumpora u sirovini iz koje se proizvodi, i već i mala količina biodizela (samo 0,4 %) u mineralnom dizelskom gorivu osigurava propisanu mazivost, pa zato mješavina s malim udjelom biodizela može poboljšati mazivost goriva s nedostatkom sumpora. U dizelskim motorima biodizel se koristi na dva načina – kao dodatak gorivu u različitim omjerima (5 – 95 %) ali i kao čisti biodizel (Šilić i sur., 2012.).

Velika viskoznost biodizela u odnosu na mineralno gorivo, otežava njegovo ubrizgavanje i raspršivanje, a posljedica toga je loše miješanje sa zrakom i nepotpuno izgaranje. Zbog visokog vrelišta dolazi do stvaranja taloga na injektorima, do razgradnje i razrjeđivanja ulja za podmazivanje. Kombinacija više čimbenika kao što su visoko vrelište, slaba hlapivost i viskoznost uzrokuju probleme kod starta motora i vremenske zadržke kod paljenja (Jurac, 2011.).

Biodizel je prvo alternativno gorivo s karakteristikama definiranim odgovarajućim standardom. Karakteristike biodizela, kemijske i fizikalne, propisane su američkim standardom ASTM D 6751 i europskom normom EN 14214 koju je s obzirom na članstvo Republike Hrvatske u Europskoj uniji preuzelo i naše zakonodavstvo. Dakle, u RH kvalitativna svojstva biodizela podliježu standardu HRN:EN 14214 (HZN, 2014.), a prikazana su u **Tablici 1.**

**Tablica 1** Svojstva biodizela prema HRN:EN 14214 (Ostojčić, 2018.)

Svojstvo	Mjerna jedinica	Minimum	Maksimum	Test metoda
Udio metilnih estera masnih kiselina	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Gustoća pri 15 °C	kg/m <sup>3</sup>	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viskoznost pri 15 °C	mm <sup>2</sup> /s	3,50	5,00	EN ISO 3104
Točka zapaljenja	°C	101	-	EN ISO 2719 EN ISO 3679
Cetanski broj	-	51,0	-	EN ISO 5165
Korozija bakrene trake (3h pri 50 °C)	stopa	klasa 1		EN ISO 2160
Oksidacijska stabilnost (pri 110 °C)	h	8,0	-	EN 14112 prEN 15751
Kiselinski broj	mgKOH/g	-	0,50	EN 14104
Jodni broj	g I <sub>2</sub> /100g	-	120	EN 14111 EN 16300
Metil esteri linoleinske kiseline	% (m/m)	-	12,0	EN 14103
Polinezasićeni (>=4 dvostruke veze) metil esteri	% (m/m)	-	1,00	EN 15779
Udio metanola	% (m/m)	-	0,20	EN 14110
Udio monoglicerida	% (m/m)	-	0,70	EN 14105
Udio diglicerida	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Udio triglicerida	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Slobodni glicerol	% (m/m)	-	0,02	EN 14105 EN 14106
Ukupni glicerol	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Udio vode	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Ukupna kontaminacija	mg/kg	-	24	EN 12662
Udio sulfoniranog pepela	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Udio sumpora	mg/kg	-	10,0	EN ISO 20846 EN ISO 20884 EN ISO 13032
Metali 1.skupine (Na+K)	mg/kg	-	5,0	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Metali 2.skupine (Ca+Mg)	mg/kg	-	5,0	EN 14538
Udio fosfora	mg/kg	-	4,0	EN 14107 EN 16294

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak

Cilj rada bio je provesti enzimski kataliziranu sintezu biodizela iz otpadnog ulja koje je zaostalo nakon procesa prženja krumpira.

Kako bi se postigao zadani cilj provedena je sinteza biodizela katalizirana slobodnom lipazom iz *Thermomyces lanuginosus* iz otpadnog ulja i metanola. Jednostupanjska i četverostupanjska reakcija transesterifikacije provedena je u kotlastom (šaržnom) reaktoru u ovisnosti o temperaturi.

Sintetizirani biodizel analiziran je plinskom kromatografijom (GC) s ciljem utvrđivanja udjela nastalih metilnih estera viših masnih kiselina u konačnom produktu sinteze.

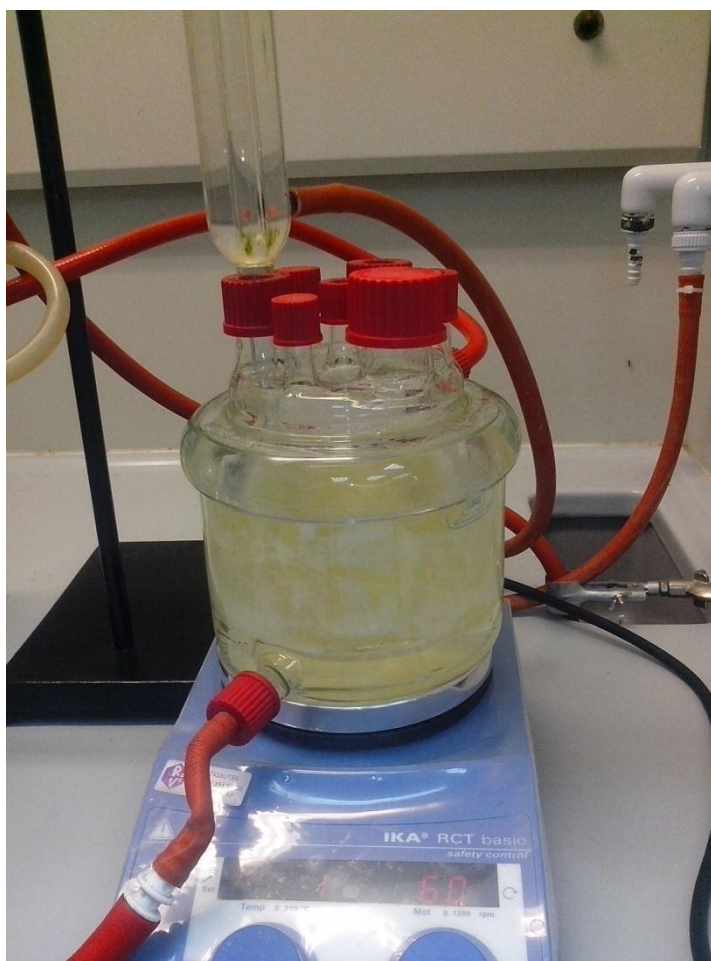
### 3.2. Materijali

Tijekom izrade eksperimentalnog dijela diplomskog rada korišteno je: otpadno jestivo suncokretovo ulje zaostalo nakon procesa prženja; lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L) (Sigma Aldrich, Austrija); metanol (Kemika Zagreb, Hrvatska); fosfatni pufer PBS (pH = 7,4) (Sigma Aldrich, Austrija); F.A.M.E. mix GLC-10, analitički standard (Sigma Aldrich, Austrija); metil heptadekanoat - analitički standard (Sigma Aldrich, Austrija); filter za šprice - Nylon, Syringe filter, promjera 25 mm, veličine pora 0.45  $\mu\text{m}$  (Sigma Aldrich, Austrija); magnetska miješalica (IKA WERK, Njemačka); vodena kupelj (Mettler WNB 14) i tehnička vaga (OHAUS, SAD).

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Sinteza biodizela u kotlastom reaktoru

Sinteza biodizela provedena je u laboratorijsko kotlastom (šaržnom) reaktoru ukupnog volumena 500 mL (**Slika 2**) koji je konstruiran kao posuda sa dvostrukom stjenkom i koji je spojen na vodenu kupelj s cirkulacijom, te je na taj način omogućeno strujanje vode odgovarajuće temperature unutar plašta reaktora čime je osigurano zagrijavanje reakcijske smjese na odgovarajuću temperaturu. Reaktor je spojen na Liebig-ovo hladilo kako bi se spriječilo isparavanje i gubitak metanola tijekom sinteze. Na poklopcu reaktora se nalazilo više otvora kroz koje je provedeno uvođenje sirovina i izuzimanje uzoraka (produkata) reakcije tijekom sinteze. Cijeli reaktor bio je postavljen na magnetnu miješalicu za postizanje homogenizirane reakcijske smjese miješanjem tijekom cijelog vremena trajanja reakcije.



**Slika 2** Kotlasti reaktor korišten za sintezu biodizela

Da bi se istražio utjecaj temperature tijekom sinteze biodizela iz otpadnog suncokretovog ulja eksperimenti su provedeni na tri različite temperature: 40, 50 i 60 °C. Četverostupanjska reakcija provedena je kako bi se izbjegla moguća inaktivacija lipaze metanolom. Kako bi se osigurala dovoljna količina metanola u jednostupanjskoj reakciji, molarni omjer ulja i metanola bio je 1:3,4. U četverostupanjskoj reakciji, molarni omjer ulja i metanola na početku procesa bio je 1:1, nakon čega je metanol dodavan u reakcijsku smjesu svakih 12 sati u molarnom omjeru ulja i metanola 1:0,8 pri čemu se nakon zadnjeg dodavanja metanola postigao isti molarni omjer ulja i metanola kao u jednostupanjskoj reakciji (1:3,4). Svi pokusi provođeni su četiri dana (ukupno 96 sati) uz stalno miješanje na magnetskoj miješalici (600 o/min). Lipaza za sintezu biodizela pripravljena je u fosfatnom puferu u omjeru 1:10 kako bi se osigurala potrebna količina vode koja je potrebna za optimalno

djelovanje lipaze. Inicijalna koncentracija lipaze bila je ista u svim eksperimentima i iznosila je 10 % na masu upotrijebljenog ulja u pokusu.

Reakcija sinteze biodizela provedena je tako da se prvi korak sastojao od dodavanja ulja i metanola u reaktor nakon čega je smjesa miješana na magnetnoj miješalici u termostatiranim uvjetima dok smjesa nije postigla zadanu temperaturu. Nakon toga dodana je lipaza, te je u tom trenutku započela reakcija transesterifikacije. Ukupna masa reakcijske smjese bila je 550,95 g i sadržavala je 450 g ulja, 55,95 g metanola i 45 g lipaze Lipolase 100L. Uzorci biodizela izuzimani su iz reakcijske smjese u određenim vremenskim razmacima: nakon 1, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84 i 96 sati. Uzorci su se izuzimali iz gornjeg sloja reakcijske smjese gdje se očekivao nastali produkt (metilni esteri viših masnih kiselina) te su se nakon toga analizirali plinskom kromatografijom. Uzorci su nakon uzorkovanja filtrirali na filteru za šprice veličina pora 0,45  $\mu\text{m}$  promjera 25 mm da bi se izdvojio eventualno tijekom uzorkovanja zahvaćeni glicerol i lipaza. Nakon 96 sati koliko je trajala sinteza, reakcijska smjesa kvantitativno je prenesena u lijevak za odjeljivanje kako bi se sintetizirani biodizel razdvojio od nusprodukta i katalizatora (glicerola i lipaze). U lijevku za odjeljivanje biodizel (smjesa metilnih estera masnih kiselina) se izdvojio kao gornji sloj, a glicerol i lipaza s puferom kao donji sloj. Sinteza je provedena sukladno podacima objavljenim u radu Budžaki i suradnici (2015.).

### **3.3.2. Određivanje udjela metilnih estera masnih kiselina u biodizelu**

Dobivena smjesa metilnih estera viših masnih kiselina transesterifikacijom otpadnog suncokretovog ulja analizirana je plinskom kromatografijom na uređaju Shimadzu GC-2014 (Kyoto, Japan) opremljenim sa FID detektorom (Flame Ionization Detector – plameno ionizacijskim detektorom) i Zebron ZB-wax kolonom (duljine 30 m, unutrašnjeg promjera 0,53 mm i debljine sloja 1,00  $\mu\text{m}$ ) uz metilni heptadekanoat kao interni standard. Metoda se sastojala od održavanja temperature na 180 °C tijekom jedne minute i zatim zagrijavanja do 230 °C brzinom od 5 °C/min. Plin nosioc bio je helij. Ukupno vrijeme određivanja bilo je 20 minuta. Identifikacija pikova provedena je pomoću standardnog F.A.M.E. mix GLC-10. Vrijeme zadržavanja odgovarajućih estera masnih kiselina iznosilo je 7,494 min za metilni ester palmitinske kiseline, 10,192 min za metilni ester stearinske kiseline, 10,545 min za metilni ester oleinske kiseline, 11,257 min za metilni ester linolne kiseline, 12,336 min za metilni ester linolenske kiseline, a za interni standard 9,07 min.

Ukupni sadržaj metilnih estera masnih kiselina (FAME) (C, %) određen je prema jednadžbi (1):

$$C = \frac{\sum A - A_{st}(A_{17:0})}{A_{st}(C_{17:0})} \cdot \frac{V_{st}C_{17:0}}{m_s} \cdot 100 \quad [\%] \quad (1)$$

gdje A označava ukupnu površinu pika  $C_{14:0} - C_{24:1}$ ;  $A_{st}$  površinu pika internog standarda;  $V_{st}$  volumen otopine internog standarda ( $\text{cm}^3$ );  $C_{st}$  koncentracija otopine internog standarda ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ) i  $m_s$  masu uzorka (mg) (Budžaki i sur., 2015.).

### 3.4. Jednostupanjska reakcija sinteze biodizela

Reakcijska smjesa se sastojala od otpadnog suncokretovog ulja i metanola koji je dodan u suvišku (omjer ulje:metanol = 1:3,4). Masa ukupne reakcijske smjese je bila 550,95 g, gdje je masa ulja iznosila 450 g, masa metanola 55,95 g, a masa dodane lipaze 45 g (pripremljene u 0,01 M fosfatom puferu pri pH 7,4,  $m(\text{lipaze}):m(\text{ulja}) = 1:10$ ). Provedena su tri pokusa u tri paralele na tri različite temperature (40, 50 i 60 °C) u ukupnom trajanju od 96 sati uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici ( $n = 600$  o/min). Prvi dan i prvih 12 sati izvođenja pokusa uzorci su izuzimani svaka 3 sata, a kasnije svakih 12 sati. Uzorci su izuzimani iz površinskog dijela reakcijske smjese volumena 100  $\mu\text{L}$  pomoću mikropipete u Eppendorf epruvetu preko filtera za šprice (0,45  $\mu\text{m}$ , 25 mm) koja je stavljena u zamrzivač za daljnju analizu plinskom kromatografijom. Nakon završetka pokusa u lijevku za odjeljivanje provedeno je odijeljivanje reakcijske smjese na gornji (biodizelski sloj) i donji sloj (vodeni sloj).

### 3.5. Četverostupanjska reakcija sinteze biodizela

Reakcijska smjesa koja se koristila u četverostupanjskoj reakciji sastojala se od otpadnog suncokretovog ulja, alkohola metanola i lipaze prethodno pripremljene kao i za jednostupanjsku reakciju. Na početku kemijske reakcije u reaktor su dodani isti molarni omjeri ulja i metanola (1:1) i svakih 12 sati dodavan je metanol kako bi se u konačnoj reakcijskoj smjesi tijekom 96 sati postigao isti omjer ulja i metanola (1:3,4) kao u jednostupanjskoj reakciji. Konačna masa reakcijske smjese je iznosila 550,95 g, gdje je masa otpadnog suncokretovog ulja bila 400 g, masa metanola 55,95 g, a masa dodane lipaze 45 g pripremljene kako je već opisano. Provedena su tri pokusa u tri paralele na tri različite temperature (40, 50 i 60 °C) u ukupnom trajanju od 96 sati uz konstantno miješanje na

magnetskoj miješalici ( $n = 600$  o/min). Tijekom četverostupanjske reakcije uzorci za daljnje analize izuzimani su prema istom protokolu kao i kod jednostupanjske sinteze.

Na **Slici 3** prikazana je cijela aparatura u kojoj su proveden sinteze biodizela iz otpadnog jestivog suncokretovog ulja.

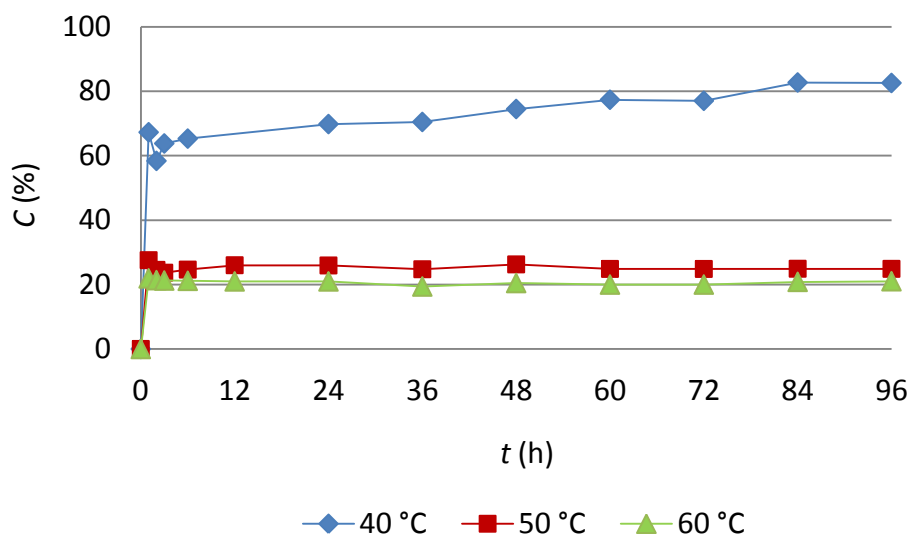


**Slika 3** Aparatura za sintezu biodizela u kotlastom reaktoru



## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

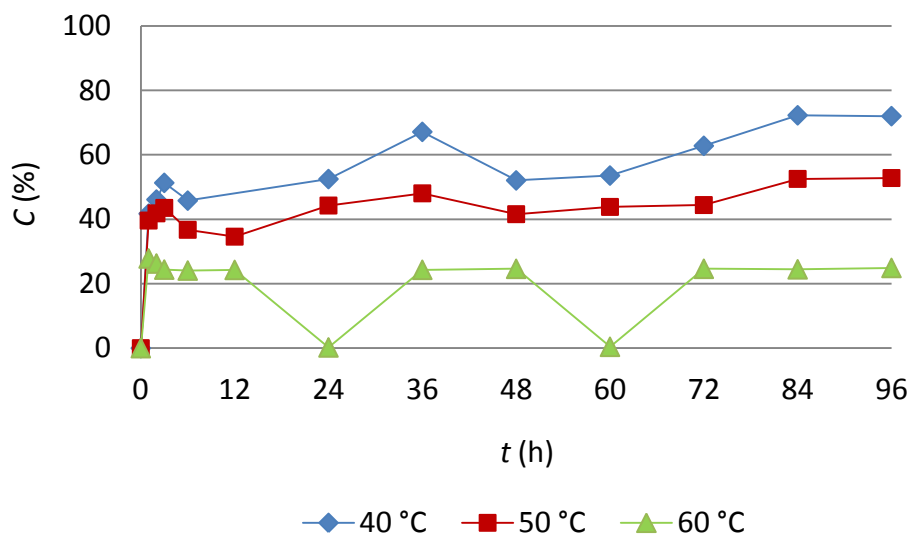
#### 4.1. Jednostupanjska reakcija sinteze biodizela



**Slika 4** Dijagram ovisnosti udjela metilnih estera (C, %) u biodizelu o vremenu (t, h) za jednostupanjsku reakciju kataliziranu lipazom iz *T. lanuginosus* na 40, 50 i 60 °C

Na grafičkom prikazu ovisnosti udjela ukupnih metilnih estera (C, %) u biodizelu o vremenu (t, h) (**Slika 4**) nakon transesterifikacije iz otpadnog suncokretovog ulja i metanola za jednostupanjsku reakciju kataliziranu lipazom iz *T. lanuginosus* na 40, 50 i 60 °C vidljiv je nagli porast udjela metil estera već nakon jednog sata na 40 °C (67 %). Nakon 2 sata od početka reakcije zabilježen je lagani pad na 58 % i zatim postepeni rast do kraja izvođenja pokusa gdje je konačni udio metil estera 82.57 %. Na temperaturi od 50 °C nakon jednog sata udio metilnih estera iznosio je 27,56 % uz lagana variranja pri čemu se udio metilnih estera ne mijenja do kraja izvođenja pokusa. Na temperaturi od 60 °C tijekom sinteze nije zabilježena značajnija promjena udjela metilnih estera od vrijednosti koja je određena nakon jednog sata (20 %) sve do kraja provođenja pokusa (96 sati).

## 4.2. Četverostupanjska reakcija sinteze biodizela



**Slika 5** Dijagram ovisnosti udjela metilnih estera (C, %) u biodizelu o vremenu (t, h) za četverostupanjsku reakciju kataliziranu lipazom iz *T. lanuginosus* na 40, 50 i 60 °C

Na grafičkom prikazu ovisnosti udjela metilnih estera (C, %) u biodizelu o vremenu (t, h) (Slika 5) nakon transesterifikacije iz otpadnog suncokretovog ulja i metanola za četverostupanjsku reakciju kataliziranu lipazom iz *T. lanuginosus* na 40, 50 i 60 °C vidljivo je da ukupni udio metilnih estera tijekom sinteze ima isti trend porasta kad se reakcija odvija na 40 i 50 °C za razliku od sinteze na 60 °C. Do 48 sata provođenja sinteze vrijednosti za udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu variraju u granicama od 34,61 % do 67,14 % da bi nakon 48 sata provođenja sinteze pa sve do završetka pokusa vrijednost samo rasla. Konačni udio metilnih estera masnih kiselina u četverostupanjskoj reakciji transesterifikacije na 40 °C nakon 96 sati provedbe sinteze iznosio je 72,02 %, a na 50 °C 52,81 %. Ukupni udio metilnih estera određen nakon završetka sinteze na 60 °C iznosi o je 24,9 % što je skoro pa jednako udjelu metilnih estera masnih kiselina određenih nakon prvog sata sinteze (27,84 %).

Tijekom četverostupanjske reakcije transesterifikacije provedene na 60 °C porast udjela metilnih estera masnih kiselina vidljiv je nakon svakog dodavanja metanola u reakcijsku smjesu koje je provedeno svakih 12 sati. Pad udjela metilnih estera masnih kiselina između 6., 12., 36. i 48. sata može se objasniti nedovoljnim udjelom metanola u reakcijskoj smjesi da

se reakcija pomakne u smjeru nastajanja produkta pa se događa upravo suprotno. Umjesto transesterifikacije i nastanka metilnih estera masnih kiselina odvija je hidroliza istih pri čemu nastaju slobodne masne kiseline i metanol.

Da bi smjesa metilnih estera masnih kiselina predstavljala biodizel njihov udio u smjesi treba biti veći ili jednak 96,5 % što je propisano europskom pa tako i hrvatskom normom HRN EN 142014 kao je već ranije spomenuto.

U jednostupanjskoj reakciji nastane više metilnih estera masnih kiselina (82,57 %) nego u četverostupanjskoj (72,02 %) pri čemu se temperatura od 40 °C pokazala kao optimalna. Da bi se povećao udio metilnih estera nakon četverostupanjske reakcije transesterifikacije, kako je navedeno u radu Budžaki i suradnici (2015.), potrebno je u reakciji transesterifikacije s otpadnim uljem povećati molarni omjer ulja i metanola.

## **5. ZAKLJUČCI**

Na temelju dobivenih rezultata, doneseni su sljedeći zaključci:

U jednostupanjskim i četverostupanjskim reakcijama koje su provedene pri temperaturi 40, 50 i 60 °C najviši udio metilnih estera je postignut na 40 °C. Maksimalni udio metil estera kod jednostupanjske reakcije (82,57 %) je viši u odnosu na četverostupanjsku reakciju (72,02 %) nakon 96 h.

Jednostupanjske reakcije su poželjnije u usporedbi s četverostupanjskim reakcijama zbog postizanja većeg konačnog udjela metilnih estera masnih kiselina (82,57 %) za isto vrijeme trajanja reakcije.

Korištenje otpadnog ulja nakon prženja kao jeftinije sirovine može smanjiti troškove i biti ekološki prihvatljivije, jer otpadna ulja iz prehrambene industrije čine značajnu količinu otpada. No, da bi se zadovoljili uvjeti propisani Normom, tj. povećao udio metilnih estera viših masnih kiselina nastalih u reakciji transesterifikacije iz otpadnog ulja i metanola uz lipazu kao katalizator daljnja istraživanja bit će potrebno usmjeriti ka intenziviranju procesa.

## **6. LITERATURA**

- Andričić B, Kovačić T, Čagalj M: Transesterifikacija otpadnih jestivih ulja u svrhu proizvodnje biodizela. U *International Conference MATRIB 2008*, 8-12. Hrvatsko društvo za materijale i tribologiju, Zagreb, 2008.
- Azcoar L, Ciudad G, Heipieper HJ, Navia R: *Biotechnological processes for biodiesel production using alternative oils. Applied Microbiology and Biotechnology* 88(3):621-636, 2010.
- Budžaki S, Šalić A, Zelić B, Tišma M: Enzyme-catalysed Biodiesel Production from Edible and Waste Cooking Oils. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 29(3):329- 333, 2015.
- Budžaki S, Miljić G: Otpadno ulje i nusproizvodi prehrambene industrije kao sirovine za proizvodnju biodizela. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije*, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 165-177, 2017.
- Darnoko D, Cheryan M: Continuous production of palm methyl esters. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 77(12):1269-1272, 2000.
- Diasakou M, Louloudi A, Papayannakos N: Kinetics of the non-catalytic transesterification of soybean oil. *Fuel* 77:1297-1302, 1998.
- Grujić A, Petrović V: *Proizvodnja biodizela*. Razvojno – istraživački centar grafičkog inženjerstva TMF, Beograd, 2018.
- Houde A, Kademi A, Leblanc D: Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118:155-170, 2004.
- Hrvatski zavod za norme: *Tekući naftni proizvodi – Metilni esteri masnih kiselina (FAME) za dizelske motore i grijanje – Zahtjevi i metode ispitivanja* (HRN EN 14214:2012+A1:2014)
- Issariyakul T, Dalai A K: Biodiesel from vegetable oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 31:446-471, 2014.



- Jurac Z: Optimiranje proizvodnje biodizela iz otpadnih jestivih ulja s obzirom na zahtjeve kvalitete. *Doktorska disertacija*. Tehnički fakultet, Rijeka, 2011.
- Kučan Polak V: Proizvodnja biodizelskog goriva enzimskom transesterifikacijom. *Goriva i maziva* 45(4):217-222, 2006.
- Kurevija T: Negativni ekološki učinci globalne proizvodnje biodizelskog goriva. *Goriva i maziva* 46(2):103-127, 2007.
- Lam MK, Lee KT, Mohamed AR: Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. *Biotechnology Advances* 28(4):500-518, 2010.
- Mittelbach M, Remschmidt C: *Biodiesel, The Comprehensive Handbook*, Graz, 2004.
- Noureddini H, Harkey D, Medikonduru V: A continuous process for the conversion of vegetable oils into methyl esters of fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75(12):1775-1783, 1998.
- Ostojčić M: Sinteza biodizela u mikroreaktorima upotrebom komercijalne i nepročišćene lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2018.
- Ognjanović DN, Petrović S, Bezbradica DI, Knežević-Jugović ZD: Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela. *Hemijska industrija* 64:1-8, 2010.
- Santacesaria E, Vicente GM, Di Serio M, Teser R: Main technologies in biodiesel production: State of the art and future challenges. *Catalysis Today* 195(1):2-13, 2012.
- Sharma YC, Singh B, Upadhyay SN: Advancements in development and characterization of biodiesel: A review. *Fuel* 87(12):2355-2373, 2008.
- Sinčić D: Biodizel: Svojstva i tehnologija proizvodnje. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 4:51-52, 2009.

Šilić Đ, Stojković V, Mikulić D: *Goriva i maziva*, Veleučilište Velika Gorica, Velika Gorica, 2012.

Veljković V, Stamenković O: Perspektivne tehnologije dobijanja biodizela. *Zaštita materijala* 53:281-291, 2012.

Vidović E: Metanol–zvijezda među kemikalijama. *Goriva i maziva* 55(2):84-100, 2016.

Mustapić Z, Krička T, Stanić Z: Biodizel kao alternativno motorno gorivo. *Energija* 55(6):634 – 657, 2006.

Yaakob Z, Mohammad M, Alherbawi M, Alm Z, Sopian K: Overview of the production of biodiesel from waste cooking oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 18:184-193, 2013.

Yang X, Lee JH, Yoo HY, Shin HY, Thapa LP, Park C, Kim SW: Production of bioethanol and biodiesel using instant noodle waste. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37:1627-1635, 2014.