

Pročišćavanje sirovog biodizela primjenom membranske ultrafiltracije

Brkić, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:967762>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-03**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



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

Sanja Brkić

**PROČIŠĆAVANJE SIROVOG BIODIZELA PRIMJENOM MEMBRANSKE
ULTRAFILTRACIJE**

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, 31000 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 X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 16. srpnja 2019.

Mentor: izv. prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*

Pomoć pri izradi: *Marta Ostojčić*, asistent

Pročišćavanje sirovog biodizela primjenom membranske ultrafiltracije

Sanja Brkić, 0113137645

Sažetak:

Enzimska sinteza biodizela provedena je u kotlastom reaktoru uz katalizator Amano lipazu podrijetlom iz *Burkholderia cepacia* pri dva različita pH reakcijske smjese, pH 10,0 i pH 7,0 i temperaturu od 50°C. Udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu kretao se u rasponu od 97,3 do 97,6 %, a udio slobodnog glicerola u rasponu od 0,043 do 0,144 % (m/m). Pročišćavanje biodizela provedeno je konvencionalnim pročišćavanjem uparavanjem, sušenjem i centrifugiranjem, i primjenom membranske ultrafiltracije s ciljem uklanjanja zaostalog glicerola. Nakon konvencionalnog pročišćavanja biodizela udio glicerola je bio ispod razine detekcije u oba uzorka sintetiziranog biodizela. Za pročišćavanje na filtracijskom modulu Amicon Stirred Cell korištene su celulozne i polietersulfonske ultrafiltracijske membrane veličine pora 10 kDa, promjera 44,5 mm uz tlak od 2 do 4 bara, sobnoj temperaturi i temperaturi od 45 °C uz dodatak vode od 0,1 % (m/m) i 0,2 % (m/m). Primjenom celulozne i polietersulfonske ultrafiltracijske membrane u opisanim uvjetima membranske filtracije na modulu Amicon Stirred Cell nije došlo do uspješne filtracije sintetiziranog biodizela.

Ključne riječi: biodizel, lipaze, pročišćavanje, membranska ultrafiltracija

Rad sadrži: 35 stranica
 7 slika
 4 tablice
 2 priloga
 40 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

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

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | Predsjednik |
| 2. izv. prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Anita Pichler</i> | Član |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 23. rujna 2019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip 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 of Food Technology Osijek Council at its session no. 10 held on July 16, 2019.
Mentor: *Sandra Budžaki*, PhD, associate prof.
Technical assistance: *Marta Ostojčić*, assistant

Purification of the crude biodiesel by membrane ultrafiltration

Sanja Brkić, 0113137645

Summary:

The enzymatic synthesis of biodiesel was carried out in a batch bioreactor with an Amano lipase from *Burkholderia cepacia* at two different pH of the reaction mixture, pH 10,0 and pH 7,0 and a temperature of 50 ° C. The content of fatty acid methyl esters in biodiesel ranged from 97.3 to 97.6% and the free glycerol content ranged from 0.043 to 0.144% (m / m). To remove residual glycerol purification was carried out by conventional methods by evaporation, drying and centrifugation, and the application of membrane ultrafiltration. After conventional biodiesel purification, the glycerol content was below the detection level in both samples of the synthesized biodiesel. For purification on the Amicon Stirred Cell filtration module, cellulose ultrafiltration membranes with a pore size of 10 kDa, 44.5 mm in diameter at 4 bar pressure, room temperature and 45 ° C were added with the addition of 0.1% water (m / m) and 0.2% (w / w). The use of cellulose and polyethersulfone ultrafiltration membranes did not result in the successful filtration of the synthesized biodiesel under the described membrane filtration conditions on the Amicon Stirred Cell module.

Key words: biodiesel, lipases, purification, membrane ultrafiltration

Thesis contains: 35 pages
7 figures
4 tables
2 supplements
40 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, full prof. | chair person |
| 2. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, associate prof. | supervisor |
| 3. <i>Anita Pichler</i> PhD, associate prof. | member |
| 4. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate 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.

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta *Razvoj integriranog mikrosustava za biokatalitičku proizvodnju biodizela* (DeMSy(BioPro)²; IP-2016-06-7993) koji je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. BIODIZEL	4
2.1.1. Proizvodnja biodizela.....	6
2.1.2. Kemijski katalizirana transesterifikacija.....	7
2.1.3. Enzimski katalizirana transesterifikacija	9
2.2. TEHNIKE PROČIŠĆAVANJA BIODIZELA	9
2.2.1. Mokro pročišćavanje	10
2.2.2. Suho pročišćavanje	11
2.2.3. Membranska filtracija kao metoda pročišćavanja biodizela	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. ZADATAK	16
3.2. MATERIJALI	16
3.2.1. Sirovine	16
3.2.2. Katalizator.....	16
3.2.3. Kemikalije	16
3.2.4. Aparatura.....	16
3.3. METODE	17
3.3.1. Sinteza biodizela	17
3.3.2. Određivanje udjela metilnih estera masnih kiselina	18
3.3.3. Određivanje udjela glicerola u biodizelu	19
3.3.4. Konvencionalno pročišćavanje biodizela	19
3.3.5. Pročišćavanje biodizela membranskom ultrafiltracijom	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. UDIO METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA U BIODIZELU	24
4.2. UDIO GLICEROLA U BIODIZELU	25
4.3. KONVENCIONALNO PROČIŠĆAVANJE BIODIZELA	26
4.4. PROČIŠĆAVANJE BIODIZELA MEMBRANSKOM ULTRAFILTRACIJOM	27
5. ZAKLJUČCI	29
6. LITERATURA	31
7. PRILOZI	35

1. UVOD

Onečišćenje je svakodnevno ispuštanje štetnog materijala u okoliš različitim ljudskim aktivnostima (Sofilić, 2015.). Negativan utjecaj čovjeka je postao takav da prirodi treba sve više i više vremena kako bi se oporavila. Izgaranjem fosilnih goriva oslobađaju se mnogi štetni plinovi koji uzrokuju opasna onečišćenja zraka. Obzirom na povećanu svijest o štetnim posljedicama veliki naponi se ulažu u smjeru smanjenja onečišćenja kao i razvoja alternativnih goriva – biodizel.

Autori nekoliko studija (Amini i sur., 2017.; Kim i sur., 2018.) istaknuli su biodizel kao alternativno gorivo iz obnovljivih izvora energije kao široko prihvaćeno što potvrđuju i podaci o rastu njegove proizvodnje. Biodizel se proizvodi iz obnovljivih izvora energije kao što su biljna ulja i životinjske masti te iz otpadnih i nejestivih ulja i masti koji reagiraju s alkoholom uz odgovarajući katalizator.

Najčešće korišteni način proizvodnje biodizela je postupak transesterifikacije, koja može biti kemijski ili enzimski katalizirana. Tijekom oba načina proizvodnje nastaje odgovarajuća količina glicerola kao i različitih neželjenih nusprodukata, prvenstveno kod kemijski katalizirane reakcije, koje je potrebno ukloniti kako bi se zadovoljili propisani kvalitativni parametri biodizela koji podliježu standardu HRN:EN 14214 (HZN 2014.) u Republici Hrvatskoj.

Cilj ovog rada bio je analizirati sintetizirani biodizel kataliziran lipazom iz *Burkholderia cepacia* te isti pročistiti primjenom fizikalnih metoda separacije, i membranske ultrafiltracije na membranskom modulu Amicon Stirred Cells uz membrane veličine pora 10 kDa u svrhu uklanjanja glicerola. Eksperimentalni dio rada proveden je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek i Fakultetu za kemijsko inženjerstvo i tehnologiju Sveučilišta u Zagrebu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIODIZEL

Biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina biljnih i/ili životinjskih ulja i masti (Uredba o kakvoći biogoriva, NN 141/2005.). Kod sinteze biodizela mogu se koristiti različiti alkoholi, no prema definiciji je to smjesa metilnih estera masnih kiselina (eng. FAME- fatty acid methyl ester) koje se nalaze u sastavu sirovine (ulja ili masti).

Korištenje biodizela kao pogonskog goriva ima veliki utjecaj na nacionalnu ekonomiju države što za sobom povlači i smanjenje ovisnosti o uvozu nafte. Fosilna goriva koja nose oznaku BXX su goriva kojima je dodan biodizel, gdje je XX postotni udio biodizela. Prema tome, na tržištu se mogu naći goriva s različitim udjelima biodizela u sastavu, npr. B20 (20 % biodizela) pa sve do B100 (čisti biodizel) (Yücel i sur., 2012.).

Kvalitativna svojstva biodizela propisana su američkim standardom ASTM D 6751 i europskom normom EN 14214, a s obzirom na članstvo Republike Hrvatske u Europskoj uniji hrvatsko zakonodavstvo je preuzelo spomenutu normu. Stoga, u Republici Hrvatskoj kemijske i fizikalne karakteristike biodizela podliježu standardu HRN:EN 14214 (HZN 2014). Kvalitativna svojstva biodizela prema HRN:EN 14214 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 ³	860	900	EN ISO3675 EN ISO 12185
Viskoznost pri 15 °C	mm ² /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 ISO 14112 prEN 15751
Kiselinski broj	mgKOH/g	-	0,50	EN 1404
Jodni broj	g I ₂ /100g	-	120	EN 14111 EN 16300
Metil esteri linoleinse kiseline	% (m/m)	-	12,0	EN 14103
Polinezasićeni (>=4 dvostruke veze) metil esteri	% (m/m)	-	1,0	EN 15779

Udio metanola	% (m/m)	-	0,20	EN 14110
Udio monoacilglicerola	% (m/m)	-	0,70	EN 14105
Udio diacilglicerola	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Udio triacilglicerola	% (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

Prednosti biodizela u odnosu na mineralno gorivo su visoka točka vrelišta (iznad 120 °C), , netoksičnost, biorazgradivost i mogućnost proizvodnje iz obnovljivih izvora, dobra maziva svojstva te što u svom sastavu ne sadrži sumpor. Zbog činjenice da se izgaranjem biodizela u atmosferu vraća ona količina CO₂ koju je biljka iz nje uzela za proces fotosinteze, biodizel se smatra alternativnim, obnovljivim gorivom čiju proizvodnju i korištenje potiču brojne industrije (Canakci i Van Gerpen, 2001.; Demirbas, 2003.).

Osnovni nedostaci biodizelskog goriva su manja radna snaga motora, veća potrošnja kisika, lošija fizikalna svojstva na niskim temperaturama, sposobnost otapanja naslaga s rezervoara što iziskuje češću zamjenu filtera i ulja, lošija oksidacijska i termička stabilnost (Sinčić, 2014.).

Obzirom na velik izbor ulja koja se mogu koristiti u proizvodnji biodizela moguća je klasifikacija biodizela u generacije na temelju korištenih sirovina te postupaka proizvodnje.

Biodizel dobiven iz jestivih ulja ubraja se u prvu generaciju (konvencionalna) biogoriva. Trenutno je u svijetu dominantna proizvodnja biodizela iz jestivih ulja (sojinog, suncokretovog i uljane repice).

Drugoj generaciji (napredna biogoriva) pripada biodizel dobiven iz otpadnih jestivih ili nejestivih ulja i masti. U otpadna jestiva ulja i masti ubrajaju se masnoće iz restorana, goveđi i svinjski loj te otpadno ulje zaostalo nakon pripreme hrane, a izvor nejestivih ulja su kaučuk (*Ficus elastica*), barbadoski oraščić (*Jatropha curcas*), duhan (*Nicotina tabacuma*) i dr. Glavna prednost druge generacije biodizela u odnosu na prvu je što njegova proizvodnja ne utječe na opskrbu ljudi hranom.

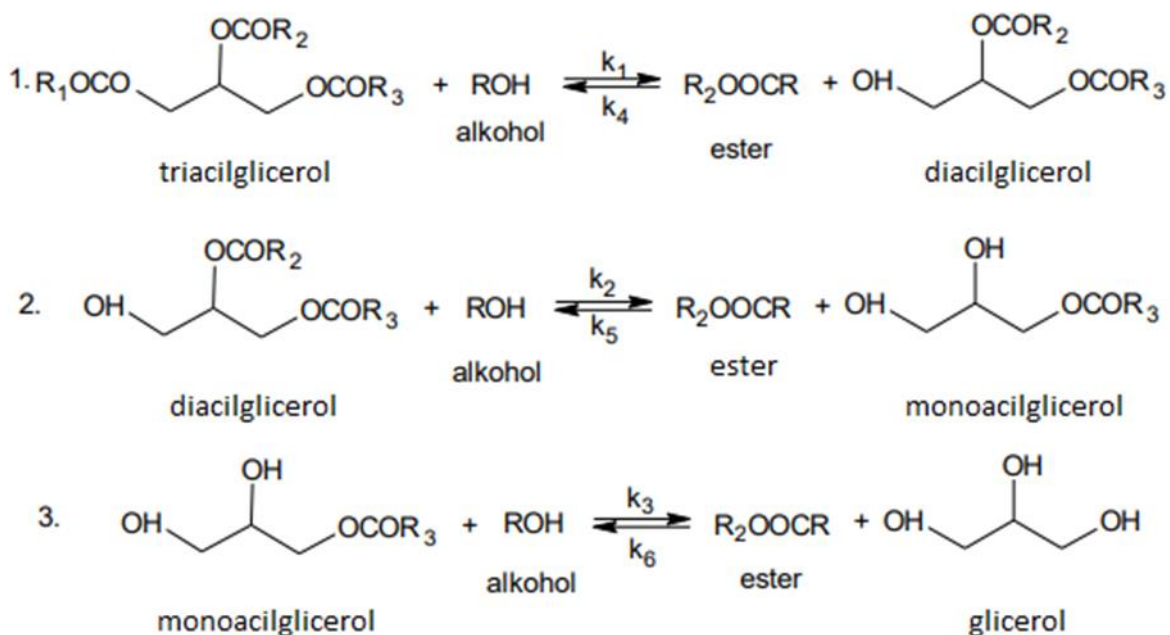
Biodizel podrijetlom iz ulja mikro- i makro- algi, genetički modificiranih algi i mikroorganizama ubraja se u treću i četvrtu generaciju biogoriva (Ahmad i sur., 2011.; Sinčić 2014.).

Cijena biodizela varira ovisno o odabranoj sirovini koja se koristi za proizvodnju obzirom na geografski položaj i tip procesa (kontinuirani, polukontinuirani ili šaržni tip reaktora; kemijski ili biokemijski katalizatori). Najveća količina biodizela trenutačno se proizvodi od sojinog ulja, metanola i alkalnih katalizatora, a visoka vrijednost sojina ulja kao prehrambenog proizvoda proizvodnju biodizela čini izazovnom. Međutim, postoje velike količine otpadnog (jeftinog) ulja i masti kao što su one koje zaostaju u restoranima nakon pripreme hrane i otpadna ulja iz prehrambene industrije koja se mogu koristiti za njegovu proizvodnju. Glavni problem otpadnih ulja i masti kod kemijski katalizirane proizvodnje biodizela je kvaliteta obzirom na udio slobodnih masnih kiselina (SMK) i vode čija prisutnost u sirovini uzrokuje odvijanje neželjenih sporednih reakcija (saponifikacija i hidroliza nastalih metilnih estera masnih kiselina) tvoreći neželjene nusprodukte.

2.1.1. Proizvodnja biodizela

Biodizel se može proizvoditi mikroemulzifikacijom, pirolizom i najčešće korištenom transesterifikacijom. Transesterifikacija predstavlja reakciju triacilglicerola s alkoholom, pri čemu nastaje smjesa alkilnih estera masnih kiselina (biodizel) i glicerol, a koja je katalizirana kemijskim (NaOH/KOH i/ili HCl/H₂SO₄) ili biokemijskim (lipaze) katalizatorima. Zbog povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava, polarnosti i brzine reagiranja s triacilglicerolima, najčešće se upotrebljava primarni alkohol metanol. Stehiometrijski omjer alkohola i triacilglicerola neophodan za odvijanje transesterifikacije je 3:1, pri čemu se metanol dodaje u suvišku kako bi se reakcija odvijala u smjeru nastajanja produkta. Transesterifikacija se odvija u tri stupnja: u prvom stupnju triacilgliceroli se prevode u diacilglicerole, zatim u drugom nastaju monoacilgliceroli, a u posljednjem stupnju nastaju glicerol i smjesa metilnih estera masnih

kiselina (FAME) koje se nalaze u sastavu sirovine (**Slika 1**) (Ma i Hanna, 1999.; Predojević, 2010.).



Slika 1 Reakcija transesterifikacije (preuzeto i prilagođeno iz rada Islam i Ravindra, 2017.)

Osim omjera alkohol/ulje, na konverziju triacilglicerola u FAME utječu još i temperatura, vrsta katalizatora (kiseli, alkalni ili enzimski) i njegova koncentracija te čistoća sirovine (udio vode i udio slobodnih masnih kiselina). Obzirom na vrstu katalizatora, proces transesterifikacije može biti kemijski (kislina ili lužina) i enzimski kataliziran (lipaze). Tu podjelu moguće je proširiti prema agregatnom stanju katalizatora u reakcijskoj smjesi na homogenu i heterogenu katalizirane procese (Lam i sur., 2010.).

2.1.2. Kemijski katalizirana transesterifikacija

Alkalno katalizirana transesterifikacija

Homogeni alkalni katalizatori, kao što su natrijev hidroksid (NaOH) i kalijev hidroksid (KOH), najčešće se koriste u industrijskoj proizvodnji biodizela. Dostupnost i cijena, mogućnost postizanja visokih konverzija u kratkom vremenu, velika aktivnost pri blagim reakcijskim uvjetima te manja korozivnost njihove su prednosti u odnosu na kisele katalizatore (Lam i sur. 2010.). Primjenom 0,5 do 1 % (m/m) NaOH ili KOH, omjeru metanol/biljno ulje 6:1 i

temperaturi od 45-80 °C je moguće ostvariti 94-99 % konverziju ulja u biodizel (Demirbas i Karslioglu, 2007.).

Glavni nedostatak alkalnih katalizatora predstavlja reakcija saponifikacije u kojoj reagiraju slobodne masne kiseline i katalizatori (NaOH i KOH) tvoreći sapun i vodu. Stoga, ovi katalizatori nisu prikladni za proces transesterifikacije ukoliko se u biljnim uljima nalazi više od 2% slobodnih masnih kiselina i kada je u reakcijskoj smjesi prisutna voda (Kawentar i Budiman, 2013.). To uzrokuje poteškoće pri uklanjanju glicerola iz biodizela, a velika količina sapuna zasićenih masnih kiselina dovodi do geliranja (Lam i sur. 2010.). Pročišćavanjem 1 L biodizela nastaje 10 L otpadne vode koja se sastoji od nečistoća povučenih iz sirovog biodizela, uključujući zaostali biodizel, zaostali katalizator, metanol, glicerol, sapune i neizreagirano ulje (Atadashi i sur., 2011.).

Od heterogenih alkalnih katalizatora ističe se kalcijev oksid (CaO) zbog niske cijene, male topljivosti u metanolu i relativno visoke alkalnosti (Lam i sur., 2010.). Kada se koristi navedeni katalizator reakcija transesterifikacije je sporija, ali je jednostavnije izdvajanje katalizatora iz reakcijske smjese i mogućnost ponovne upotrebe istog što utječe na cijenu konačnog produkta.

Kiselo katalizirana transesterifikacija

Najčešće korišteni homogeni kiseli katalizatori su sumporna kiselina (H₂SO₄), klorovodična kiselina (HCl) i fosforna kiselina (H₃PO₄) (Aransiola i sur. 2014, Lam i sur. 2010). Kiseli katalizatori nisu osjetljivi na prisustvo slobodnih masnih kiselina te istovremeno kataliziraju i transesterifikaciju i esterifikaciju što im daje prednost u odnosu na alkalne katalizatore. Unatoč tome, manje se koriste od alkalnih katalizatora, a razlog tomu je visoka osjetljivost na prisustvo vode, budući maseni udio vode od 5 % zaustavlja reakciju transesterifikacije (Cerveró i sur, 2008.). Kako bi se dobio udio metilnih estera masnih kiselina propisan standardom uz sumpornu kiselinu kao katalizator reakciju transesterifikacije potrebno je provoditi na višim temperaturama i uz veći omjer ulja i alkohola. Osim toga, brzina reakcije je manja u odnosu na reakciju kataliziranu alkalnim katalizatorima. Pored svega navedenog još jedan razlog zbog kojeg se kiseline kao katalizatori izbjegavaju je njihov veliki utjecaj na koroziju procesnog postrojenja.

2.1.3. Enzimski katalizirana transesterifikacija

Velike količine otpadne vode, koje nastaju uslijed uklanjanja glicerola iz kemijski kataliziranog biodizela kao i visoke temperature na kojima je potrebno provoditi transesterifikaciju potakle su na istraživanja biokatalizatora (enzima) za primjenu u proizvodnji biodizela. Biološki katalizatori, enzimi, su proizvodi žive stanice, a po kemijskom sastavu su proteini. Prema tipu reakcije koje kataliziraju klasificiraju se u sedam skupina: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze i translokaze. Za proizvodnju biodizela značajan je enzim lipaza koji pripada skupini hidrolaza te katalizira hidrolizu lipida. Najvažnija karakteristika lipaza je selektivnost/specifičnost prema kojoj se može usmjeriti odvijanje reakcije. Lipaze se dijele obzirom specifičnosti u dvije grupe. Prvu grupu čine pozicijski nespecifične lipaze koje dovode do potpune hidrolize triacilglicerola do glicerola i slobodnih masnih kiselina. Druga grupa su 1,3-specifične lipaze koje kataliziraju samo hidrolizu primarnih esterskih veza, C1 i C3 atomima glicerola (Grbavčić, 2014.).

Za enzimski kataliziranu transesterifikaciju nisu nužne visoko kvalitetne sirovine niskog udjela slobodnih masnih kiselina s obzirom da lipaze kataliziraju i reakcije esterifikacije. Unatoč tome, i dalje je otežana komercijalizacija zbog visoke cijene industrijskih enzima (Aransiola i sur. 2014.)

Lipaza iz *Burkholderia cepacia* kao regionospecifična lipaza, je najčešće korišteni biološki katalizator u procesima esterifikacije, acilacije, hidrolize i transesterifikacije. Razlozi njezine široke primjene su sposobnost prepoznavanja supstrata, termostabilnost i tolerancija na različita organska otapala. Sastoji se od 320 aminokiselinskih ostataka, a aktivna je u pH rasponu od 4,0 do 10,5 i pri temperaturi od 30 do 85 °C (Sanchez i sur., 2018.).

2.2. TEHNIKE PROČIŠĆAVANJA BIODIZELA

Nakon sinteze, bilo kemijske ili enzimske, sirovi biodizel sadrži nečistoće poput metanola, glicerola, sapuna, slobodnih masnih kiselina, vode, zaostalog katalizatora i mono-, di- i triacilglicerola stoga je neophodno provesti određene postupke pročišćavanja (Berrios i Skelton, 2008.; Atadashi i sur., 2011.).

Veliki utjecaj na vrstu i količinu nečistoća u biodizelu uz kvalitetu sirovine ima i tip katalizatora te reakcijski uvjeti. Navedene nečistoće u velikoj mjeri mogu smanjiti termostabilnost i oksidativnu stabilnost biodizela, a tako i štetno utjecati na motore i njihov vijek trajanja

(Fernando i sur., 2006.). Produkti transesterifikacije su biodizel i glicerol uz koje se u smjesi produkata još nalaze neizreagirani tri-, di- i mono- acilgliceroli, metanol, voda, pufer i lipaza. Jedan od prvih koraka ili pred-koraka u pročišćavanju biodizela je provođenje razdjeljivanja smjese produkata nakon sinteze biodizela pomoću gravitacije: biodizelski sloj (gornji sloj - smjesa metilnih estera masnih kiselina) i glicerolski sloj (donji sloj - glicerol, metanol, voda, pufer i lipaza) tzv. vodeni sloj. Nakon razdvajanja biodizelskog i vodenog sloja provodi se daljnje pročišćavanje biodizela u svrhu uklanjanja eventualno zaostalih nečistoća iznad propisanih granica (**Tablica 1**). Pročišćavanje biodizela odvija se, konvencionalno, pomoću dvije metode: mokro i suho pročišćavanje. S obzirom na nedostatke navedenih postupaka potencijalna nova tehnika pročišćavanja biodizela je membranska filtracija, tj. ultrafiltracija.

2.2.1. Mokro pročišćavanje

Za uklanjanje u vodi topljivih nečistoća iz biodizela, kao što su sapuni, katalizatori, glicerol i alkohol (Atadashi i sur., 2011.), mokro pročišćavanje je vrlo učinkovita i najčešće korištena metoda (Veljković i sur., 2015.). Ova metoda uključuje dva koraka, ispiranje zakiseljenom vodom i ispiranje čistom vodom. Za uklanjanje sapuna preporučeno je koristiti pH neutralnu vodu u prvom koraku ispiranja kako bi se izbjegla hidroliza sapuna i zakiseljavanje produkta. Za mokro pročišćavanje koristiti se: miješanje uz pomoć mehaničke miješalice, pročišćavanje raspršivanjem ili ispiranje mjehurićima (Abbaszadeh i sur., 2014.). Miješanje je vrlo jednostavna metoda, ali zbog visokog intenziteta i mogućnosti stvaranja emulzije se ne preporučuje (Feizollahnejad i sur., 2013.). U pročišćavanju raspršivanjem, mlaznice za ispiranje stvaraju aerosol (Abbaszadeh i sur., 2014) koji lebdi po površini biodizela (Fan i sur., 2011.) vežući na sebe nečistoće. Zbog veće gustoće u odnosu na biodizel ta voda prolazi kroz biodizel i tako onečišćena se skuplja na dnu reaktora. (Feizollahnejad i sur., 2013.). Zbog znatne količine vode koja je potrebna, metoda nije isplativa i ekološki prihvatljiva. S druge strane, ispiranje mjehurićima je preporučljivo i može biti lako implementirano u već postojeću tehnologiju gdje postoji aeracija s dna reaktora te može poslužiti i za ispiranje. U ovom slučaju voda se ne skuplja odmah na dnu nego više puta cirkulira kroz biodizel i na sebe veže prisutne nečistoće (Feizollahnejad i sur., 2013.).

Bashir i sur. (2018) su zaključili da manje kontaminirane otpadne vode može nastati ako se prije uobičajenog mokroga pročišćavanja provede pred-pročišćavanje sirovog biodizela s

2- 10 % (m/m) vode. Najbolje odvajanje dijela nečistoća iz biodizela u postupku pred-pročišćavanja pokazalo se kada je dodano 5 % (m/m) vode, pri čemu voda sa sobom „povuče“ određenu količinu nečistoća. Na taj je način količina vode koja se koristi za pročišćavanje u glavnom procesu smanjena za 60 %. Kao završna faza mokrog pročišćavanja biodizela je sušenje koje zahtjeva značajnu količinu energije i vremena.

2.2.2. Suho pročišćavanje

Obzirom na nastajanje velike količine otpadne vode nakon postupka pročišćavanja vodom koju dalje treba zbrinuti provodi se pročišćavanje bez vode tzv. suho pročišćavanje. Pri suhom pranju za uklanjanje nečistoća iz biodizela koriste se adsorbensi i kisele smole. Ta se sredstva mogu koristiti bilo kao nepomični sloj u koloni ili suspendirana u masi biodizela. U slučaju kada su suspendirani u masi biodizela, nakon pročišćavanja se uklanjaju filtracijom. Filtracija, adsorpcija, izmjena iona i interakcija glicerola i sapuna glavni su mehanizmi za pročišćavanje sirovog biodizela suhim metodama pročišćavanja (Veljković i sur., 2015.). Međutim, metanol i glicerol ne mogu se u potpunosti ukloniti sredstvima za pročišćavanje bez vode stoga ih je potrebno ukloniti tijekom prethodnih faza odvajanja i isparavanja što je više moguće.

Uspoređivanjem metode suhog pročišćavanja komercijalnim adsorbensima kao što su Magnesol, silika, Amberlite i Purolite s metodom mokrog pročišćavanja zakiseljenom vodom uočeno je da se većina nečistoća može uspješno ukloniti metodom suhog pročišćavanja te da se anorganski spojevi, Magnesol i silika, uspješno primjenjuju kao adsorbensi za uklanjanje i anorganskih i organskih komponenti (Faccini i sur., 2011.). Da bi se smanjili troškovi te kako bi adsorbensi bili ekološki prihvatljiviji mogu se koristiti prirodni materijali, poput industrijskog otpada ili otpada/nusproizvoda iz poljoprivredne-prehrambene industrije (Manique i sur., 2012.; Gomes i sur., 2015.a; Alves i sur., 2016.; Farid i sur., 2017.; Ott i sur., 2018.).

Unatoč svim dobrim rezultatima, glavni nedostaci procesa suhog pranja za pročišćavanje sirovog biodizela povezani su s cijenama komercijalnih adsorbenasa te njihovom ponovnom uporabom i zbrinjavanjem (Alves i sur., 2016.).

2.2.3. Membranska filtracija kao metoda pročišćavanja biodizela

Kako bi se prevladali svi nedostaci gore spomenutih konvencionalnih metoda pročišćavanja, istraživanja su usmjerena na pronalaženje alternativnih metoda pročišćavanja pri čemu su se

procesi membranske ultrafiltracije pokazali kao obećavajući. Membranska tehnologija pročišćavanja (Hasheminejad i sur., 2011.) jedna je od mogućih novih metoda pročišćavanja biodizela.

Metoda se temelji na primjeni polupropusnih (semipermeabilnih) membrana, određene fizičke i kemijske strukture, koje imaju selektivnu sposobnost propuštanja, odnosno zadržavanja pojedinih molekula i iona (Pichler, 2017.). Otopina koju se pročišćava dolazi na membranu pod tlakom, prilikom čega se odjeljuje na permeat, struju koja prolazi kroz membranu te u kojoj se nalazi manja koncentracija tvari u odnosu na ulaznu otopinu i retentat (koncentrat), dio koji se zadržao na membrani (Mulder, 1996.).

Membranska filtracija je pogodna tehnologija zbog stabilne kvalitete efluenta, nekorištenja kemikalija, niske potrošnje energije, veće efikasnosti odjeljivanja, smanjenog broja koraka u procesu, ekološke prihvatljivosti i velike kvalitete finalnog proizvoda. Za pročišćavanje biodizela najčešće se koriste mikro- (0,2 μm) i ultra- filtracijski (0,05 μm) postupci. Veličina pora membrane ima najznačajniju ulogu. Važno je procijeniti veličinu molekule i kapljica nečistoća u sirovom biodizelu kako bi se odabrala odgovarajuća membrana (Savaliya i sur., 2015.). Membranski procesi pokazali su potencijal za uklanjanje neizreagiranih triacilglicerola, zaostalih mono- i di-acilglicerola, katalizatora, glicerola, metanola i sapuna u slučaju kemijski katalizirane transesterifikacije. Keramičke membrane pogodnije su za pročišćavanje zahvaljujući dobro definiranim porama koje nemaju tendenciju mijenjanja oblika i veličine. S druge strane, celulozne i polietersulfonske membrane tijekom kontinuirane uporabe mijenjanju oblik i veličinu svojih pora, što utječe na njihov vijek trajanja. Jedan od glavnih nedostataka keramičkih membrana je njihova relativno visoka cijena (Atadashi i sur., 2011.).

Obje vrste membrana, polimerne i keramičke, mogu se uspješno upotrijebiti za uklanjanje sapuna kako bi se postigla razina određena normom. Kada je riječ o glicerolu, prikladne su samo ultrafiltracijske membrane veličine pora od 10 kDa kojima je moguće postići konačni udio u biodizelu manji od 0,02 % (m/m) (Alves i sur., 2013.).

Kao i svaka metoda tako i membranska filtracija također ima odgovarajuće nedostatke. Jedan od glavnih je uvećanje procesa na industrijsku razinu pri čemu se javlja problem s održavanjem membrana zbog začepljenja te otpornosti membranskih materijala na kemikalije koje se nalaze u smjesi koja se pročišćava. Spomenuti nedostaci također se odnose i na temperaturna ograničenja provođenja procesa membranske filtracije pri čemu polimerne membrane gube

svoja fizikalna svojstva pri temperaturama iznad 100 °C. No unatoč svemu navedenom, istraživanja u području membranske filtracije pokazala su da tehnologija membranske filtracije može zamijeniti oba do sada korištena procesa pročišćavanja biodizela; mokro i suho pročišćavanje (Atadashi i sur., 2015.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je pročititi sirovi biodizel primjenom fizikalnih metoda pročišćavanja: uparavanje, sušenje i centrifugiranje, i membranskom ultrafiltracijom na membranskom modulu Amicon Stirred Cells preko dvije vrste membrana, celulozne i polietersulfonske, veličina pora 10 kDa te kao parametar uspješnosti pročišćavanja odrediti udio glicerola u uzorcima nakon pročišćavanja.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Sirovine

Za sintezu biodizela kao sirovina korišteno je svježe jestivo suncokretovo ulje (Zorela, Srbija) kupljeno u obližnjem NTL - supermarketu.

3.2.2. Katalizator

Korišteni katalizator za sintezu biodizela je Amano lipaza iz *Burkholderia cepacia*.

3.2.3. Kemikalije

Za provođenje ovog diplomskog rada korištene su sljedeće kemikalije: natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; Sigma Aldrich, Austrija), dinatrijev hidrogen fosfat (Na_2HPO_4 ; ACROS ORGANICS), 1 mol/L fosforna kiselina, 85 % (H_3PO_4 ; Kemika), 1 mol/L natrijev hidroksid (NaOH ; KEFO), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; KEFO), metanol (CH_3OH ; J.T. Baker), *n*- heptan, 99+% (C_7H_{16}), dušik 98% (Messer), F.A.M.E Mix, C4-C24 (Supelco, St. Louis, SAD) glicerol – analitički standard (Sigma Aldrich, Austrija).

3.2.4. Aparatura

Tijekom eksperimentalnog dijela korištena je sljedeća aparatura: analitička vaga (Crystal 200 CE), magnetna miješalica (Ika werk), vibrirajuća miješalica (Tehtnica), centrifuga (Hermle Z 326 K), vodena kupelj (JULABO SW23), uparivač (Buchi rotavapor R-210), ultrafiltracijski modul Amicon stirred cell (Merck Millipore), sušionik (Instrumentaria Zagreb ST-05), plinski kromatograf GC-2010 s FID detektorom, dušik (Messer).

3.3. METODE

3.3.1. Sinteza biodizela

Enzimaska sinteza biodizela provedena je u kotlastom reaktoru (**Slika 2**) uz katalizator Amano lipazu podrijetlom iz *Burkholderia cepacia*. Sinteze biodizela katalizirane lipazom iz *Burkholderia cepacia* provedene su u uvjetima: a) 50°C i pH 10,0 postignut univerzalnim puferom po Britton-Robinsonu-u i b) 50 °C i pH 7,0 postignut natrijevim fosfatnim puferom.

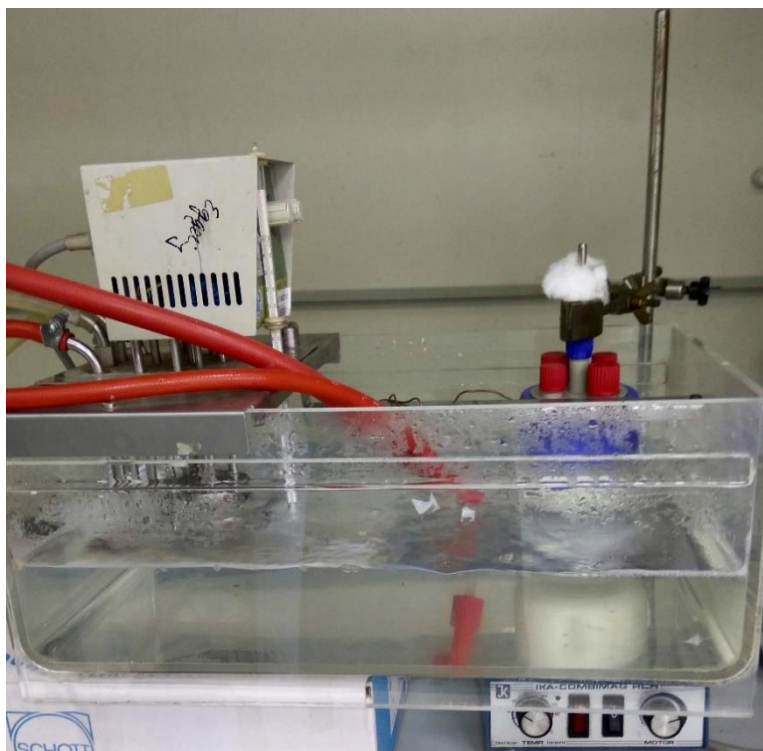
Reakcijska smjesa za sintezu biodizela sastojala se od 163,63 g jestivog suncokretovog ulja, 20,35 g metanola (omjer ulja i metanola 1:3,4) i 16,36 g puferske otopine enzima neophodne za postizanje aktivnosti od 500 U/g reakcijske smjese kao što je prikazano u **Tablici 2**.

U kotlastom reaktoru volumena 250 mL zagrijano je ulje sa metanolom na željenu temperaturu pomoću vodene kupelji uz konstantno miješanje kako bi se postigla homogenost smjese. Reakcija započinje kada se u homogeniziranu smjesu ulja i metanola doda enzim prethodno pripremljen u puferu.

Sinteza je provođena 24 h te je nakon toga reakcijska smjesa kvantitativno prenesena u lijevak za odjeljivanje kako bi se nastali biodizel odvojio od ostalih komponenata (glicerol, voda, lipaza i metanol). Gornju fazu čini biodizel (smjesa metilnih estera masnih kiselina), a donju fazu ostale komponente topljive u vodi (**Slika 3**).

Tablica 2 Sastav reakcijskih smjesa i uvjeta provođenja sinteze biodizela

LIPAZA	SASTAV REAKCIJSKE SMJESE	PUFER	TEMPERATURA	VRIJEME
<i>Burkholderia cepacia</i>	163,63 g jestivog suncokretovog ulja + 20,35g metanola +	Univerzalni pufer po Britton- Robinsonu-u pH 10,0	50 °C	24 h
	16,36 g lipaze u puferu	Natrijev fosfatni pufer pH 7,0		



Slika 2 Sinteza biodizela u kotlastom bioreaktoru

3.3.2. Određivanje udjela metilnih estera masnih kiselina

Udio metilnih estera masnih kiselina određen je na Shimadzu GC-2010 plinskom kromatografu opremljenom plameno-ionizacijskim detektorom (FID) i SH-Rtx-Wax kapilarnom kolonom ($L = 30$ m, $I.D. = 0,25$ mm, $d = 0,25$ μ m) uz dušik kao plin nosioc s konstantnim linearnim protokom brzine 1,33 mL/ min. Uzorci su pripremljeni u *n*-heptanu. Početna temperatura kolone od 120 °C održavana je tijekom 5 min, a zatim se postupno povećavala za 5 °C/min do konačne temperature od 220 °C koja je održavana tijekom 15 min. Temperatura plameno-ionizacijskog detektora iznosila je 300 °C. Da bi se dobilo razrjeđenje 100x u eppendorficu je mikropipetom odmjereno 1980 μ L heptana i 20 μ L biodizela kako bi dobivene vrijednosti bile u rasponu baždarnog dijagrama. Sadržaj eppendorfice je promiješan na vibrirajućoj miješalici i profiltriran na filteru za šprice (nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filteri, pora: 0,45 μ m, promjer: 25 mm) u drugu eppendorficu. Profiltrirani sadržaj u eppendorfici je raspodijeljen u tri vijalice za analiziranje na GC-u. Identifikacija izdvojenih metilnih estera masnih kiselina (FAME) u uzorcima biodizela postignuta je na temelju usporedbe vremena zadržavanja s vremenom zadržavanja certificiranog referentnog standarda (Supelco F.A.M.E. Mix, C4-C24, St. Louis, SAD) analiziranog pod istim uvjetima. Rezultati su izraženi kao postotak identificirane masne kiseline u odnosu na ukupno određene masne kiseline (%).

3.3.3. Određivanje udjela glicerola u biodizelu

Udio glicerola u dobivenom biodizelu određen je na plinskom kromatografu GC-2014 s FID detektorom, na koloni Zebron ZB-WAX ($L=30\text{m}$, $I.D.=0,53\text{ mm}$, $d=1,00\text{ }\mu\text{m}$) uz dušik kao plin nosioc uz etanol kao otapalo. Za razrjeđenje 100x u eppendorficu je mikropipetom odmjereno 1980 μL etanola i 20 μL biodizela da bi dobivene vrijednosti bile u rasponu baždarnog dijagrama. Za miješanje sadržaja eppendorfice korištena je vibrirajuća miješalica, a nakon miješanja uzorak je profiltriran na filteru za šprice (nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filter, veličine pora 45 μm , promjera 25 mm) u drugu eppendorficu iz koje je sadržaj podijeljen u tri vijalice za analiziranje na GC-u.

Za izradu baždarnog dijagrama izvagano je 12,5 mg glicerola i otopljeno u 5 mL etanola, pri čemu je koncentracija dobivene otopine bila 2,5 mg/mL. Pola volumena dobivene otopine je razrijeđeno etanolom do volumena 5 mL pri čemu je dobivena duplo manja koncentracija glicerola, 1,25 mg/mL. Koncentracije glicerola od 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL i 0,15625 mg/mL su dobivene na isti način.

Tako pripremljene otopine su analizirane na GC-u, a zatim je napravljen baždarni dijagram (**Prilog 1**) na temelju dobivenih vrijednosti površine pika kromatograma.

3.3.4. Konvencionalno pročišćavanje biodizela

Reakcijska smjesa je nakon 24 h sinteze kvantitativno prenesena u lijevak za odjeljivanje. Nakon razdvajanja gornjeg (biodizelskog) i donjeg vodenog sloja nakon 24 sata provedeno je pročišćavanje konvencionalnim fizikalnim metodama gornjeg biodizelskog sloja s ciljem uklanjanja glicerola.

Otparavanje metanola

Gornji biodizelski sloj je uparavan na uparivač (BUCHI rotavapor R-210) 30 min pri temperaturi od 80 °C i tlaku od 12 mbar s ciljem uklanjanja metanola. Uvjeti uparivanja su odabrani na uređaju, s obzirom na metanol.

Sušenje

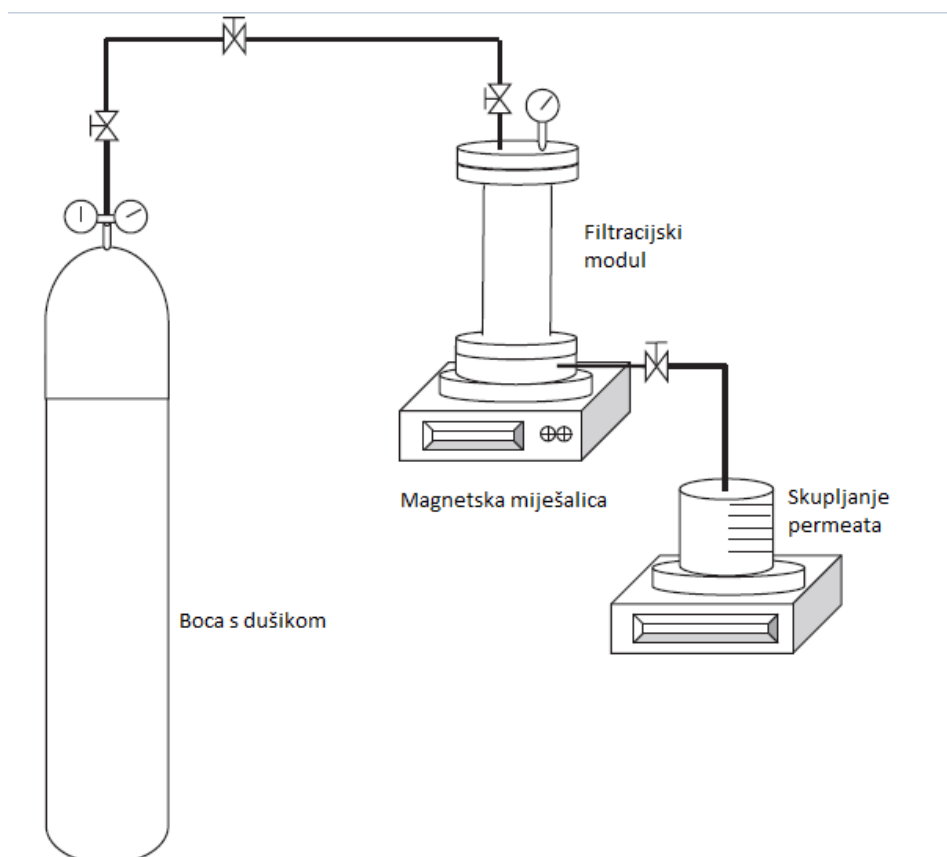
Nakon provedenog uparavanja, čime je uklonjen metanol, biodizel je sušen u sušioniku 3 sata na 80 °C s ciljem uklanjanja vode.

Centrifugiranje

Kao zadnja faza pročišćavanja provedeno je centrifugiranje na 15 000 g, 10 min s ciljem uklanjanja zaostalog glicerola.

3.3.5. Pročišćavanje biodizela membranskom ultrafiltracijom

Za pročišćavanje na filtracijskom modulu Amicon Stirred Cell (Slika 3 i 4) korištene su ultrafiltracijske membrane, polietersulfonska i celulozna, veličina pora 10 kDa, promjera 44,5 mm. Membranske ultrafiltracije provedene su na uzorku od 10 mL i tlaku od 2 do 4 bara koji je reguliran dušikom, na sobnoj temperaturi i 45 °C na obje vrste membrana. Pripremljeno je ukupno šest uzorka biodizela od kojih su dva bila bez, a četiri s dodatkom vode koja, prema literaturnim navodima (Alves i sur., 2013.) pospješuje membransku ultrafiltraciju. Po dva uzorka su sadržavala 0,1 % (m/m) i 0,2 % (m/m) vode. Uzorci su pripremljeni miješanjem s odgovarajućim udjelom vode 1 sat na magnetnoj miješalici.



Slika 3 Shematski prikaz membranske ultrafiltracije (Preuzeto i prilagođeno iz rada Alves i sur., 2013.)



Slika 4 Prikaz membranske ultrafiltracije

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. UDIO METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA U BIODIZELU

U **Tablici 3** prikazan je udio i sastav metilnih estera masnih kiselina u sintetiziranom biodizelu s lipazom iz *Burkholderia cepacia* uz primjenu univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu pH vrijednosti 10,0 pri temperaturi od 50 °C (uzorak 1) i uz primjenu natrijeva fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0 pri temperaturi od 50 °C (uzorak 2).

Tablica 3 Udio i sastav metilnih estera masnih kiselina u sintetiziranom biodizelu s lipazom iz *Burkholderia cepacia*

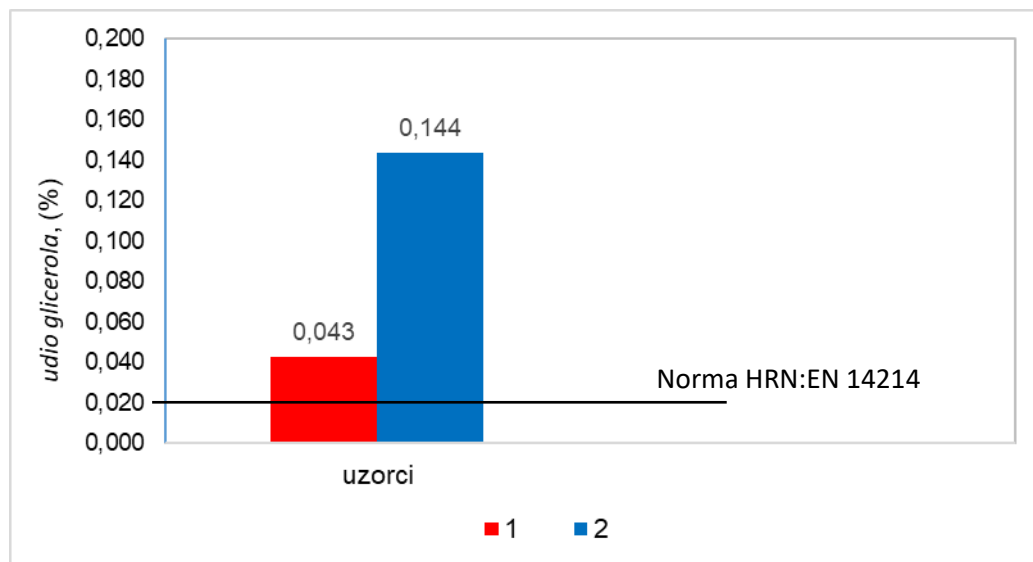
Sastav metilnih estera masnih kiselina (%)	Udio metilnih estera masnih kiselina (%)	
	Uzorak 1	Uzorak 2
C14:0	0,07	0,07
C16:0	6,45	6,42
C16:1	0,12	0,11
C18:0	2,96	2,96
C18:1	28,40	28,20
C18:2	58,17	58,13
C18:3	0,21	0,21
C20:0	0,16	0,05
C20:1	0,06	0,14
C22:1	0,68	0,68
C22:2	0,29	0,31
Ukupno	97,6	97,3

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je veći udio metilnih estera masnih kiselina, 97,6 %, određen u uzorku 1 – biodizel dobiven uz primjenu univerzalnog pufer po Britton-Robinsonu pH vrijednosti 10,0 za pripremu lipaze. Oba uzorka biodizela (**Tablica 3**) prema udjelima metilnih estera masnih kiselina odgovaraju propisanoj vrijednosti prema normi HRN:EN 14214, prema kojoj taj udio treba biti veći ili jednak 96,5 %.

Udio metilnih estera nije se razlikovao prije i nakon provedenog pročišćavanja bez obzira na primijenjenu metodu.

4.2. UDIO GLICEROLA U BIODIZELU

Udio glicerola koji je prikazan na **Slici 5** predstavlja slobodni glicerol u uzorcima sintetiziranog biodizela.



Slika 5 Udio slobodnog glicerola, % (m/m), u uzorcima sintetiziranog biodizela

Prema normi HRN:EN 14214 propisan je maksimalni udio slobodnog glicerola u biodizelu koji je dozvoljeno stavljati u promet i iznosi 0,020 % (m/m). Obzirom da je udio slobodnog glicerola u sintetiziranim uzorcima bio veći od dopuštenog (**Slika 5**) provedeno je pročišćavanje biodizela konvencionalnim metodama i membranskom ultrafiltracijom.

Nakon pročišćavanja biodizela uparavanjem, sušenjem i centrifugiranjem udio glicerola bio je ispod razine detekcije u oba uzorka sintetiziranog biodizela.

4.3. KONVENCIONALNO PROČIŠĆAVANJE BIODIZELA

Konvencionalno pročišćavanje biodizela u okviru ovog diplomskog rada provedeno je fizikalnim metodama: uparavanjem, sušenjem i centrifugiranjem.

Udio uklonjenih nečistoća iz sintetiziranog biodizela, tj. glicerola, metanola i vode koji su zaostali nakon 24 satnog razdjeljivanja faza pomoću gravitacije iz smjese produkata transesterifikacije predstavljen je u **Tablici 4**. Iz tablice je vidljivo, na temelju razlike u masi prije i nakon pročišćavanja, da se ukupni uklonjeni udio nečistoća fizikalnim metodama pročišćavanja kreće u rasponu od 2,2 do 3,5 %.

Tablica 4 Vrijednosti masa uzoraka biodizela tijekom konvencionalnog pročišćavanja

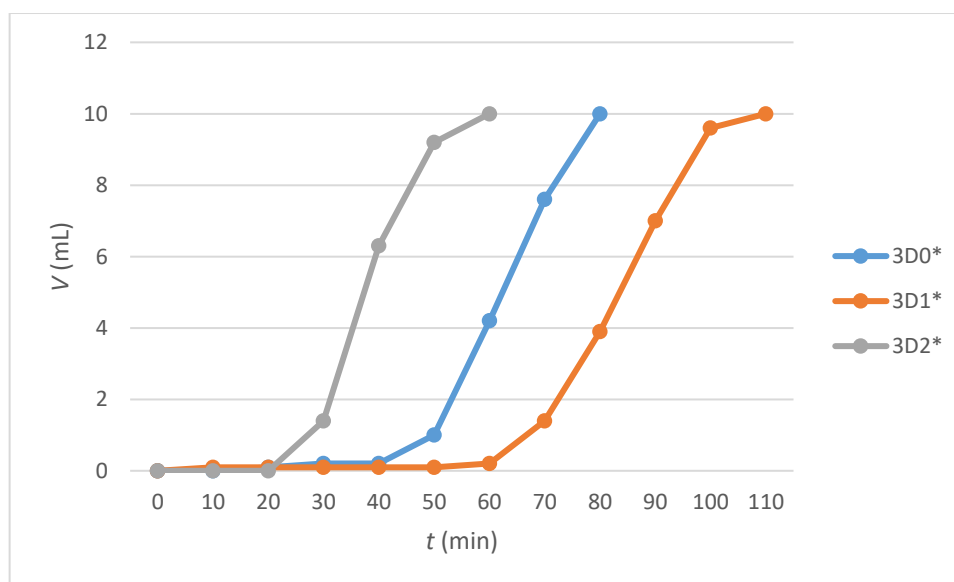
Br. uzorka	Masa uzorka, g	Masa uzoraka biodizela nakon			Ukupna promjena mase uzorka, g	Udio uklonjenih nečistoća, %
		Uparavanja, g	Sušenja, g	Centrifugiranja, g		
1	72,67	72,10	72,05	71,06	1,61	2,2
2	68,48	67,03	67,00	66,08	2,4	3,5

Prema dobivenim rezultatima vidljivo je da je veći udio nečistoća, 3,5 %, uklonjen iz uzorka 2, tj. biodizela sintetiziranom s lipazom iz *Burkholderia cepacia* uz primjenu natrijeva fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0 pri temperaturi od 50 °C.

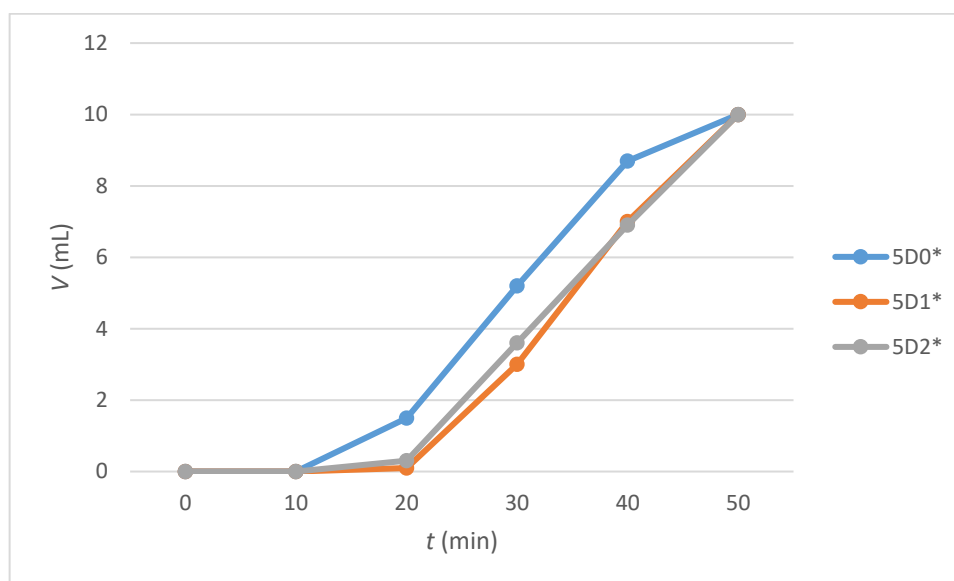
4.4. PROČIŠĆAVANJE BIODIZELA MEMBRANSKOM ULTRAFILTRACIJOM

Uzorci biodizela, sa i bez dodatka vode, pročišćeni su membranskom ultrafiltracijom na dvije vrste membrana, celuloznoj i polietersulfonskoj, veličina pora 10 kDa, promjera 44,5 mm pri tlaku od 2 do 4 bara na sobnoj temperaturi i 45 °C.

Sukladno specifikaciji proizvođača ultrafiltracijskog modula Amicon Stirred Cell i ultrafiltracijskih membrana (**Prilog 2**) za pročišćavanje biodizela membranskom ultrafiltracijom odabrane su celulozne membrane. Međutim, nisu dobiveni očekivani rezultati sukladno publiciranim rezultatima u znanstvenim radovima Saleh i suradnici (2010.), Atadashi i suradnici (2011.), Alves i suradnici (2013.). Kod primjene celulozne membrane za ultrafiltraciju oba uzorka sintetiziranog biodizela, u opisanim uvjetima, nije došlo do uspješne filtracije odnosno nije bilo protoka filtrata. Zanemarujući specifikaciju proizvođača i oslanjajući se na već spomenute rezultate znanstvenih radova u kojem su autori prikazali izvrsne rezultate ultrafiltracije na polietersulfonskim membranama, ultrafiltracija je provedena i na polietersulfonskoj membrani. Kod primjene polietersulfonske membrane došlo je do protoka filtrata (**Slike 6 i 7**).



Slika 6 Promjena volumena filtrata biodizela (*B. cepacia*, pH 10,0, 50 °C) bez dodatka vode (3D0*), s dodatkom 0,1 % (m/m) vode (3D1*) i s dodatkom 0,2 % (m/m) vode (3D2*) u ovisnosti o vremenu filtracije



Slika 7 Promjena volumena filtrata biodizela (*B. cepacia*, pH 7,0, 50 °C) bez (5D0*) dodatka vode, s dodatkom 0,1 % (m/m) vode (5D1*) i s dodatkom 0,2 % (m/m) vode (5D2*) u ovisnosti o vremenu filtracije

Detaljnijom analizom rezultata vidljivo je iz obje slike kako je protok filtrata u početku manji u odnosu na kraj filtracije što nije u skladu s teorijom membranske filtracije pri čemu se brzina filtracije smanjuje s vremenom zbog sve većeg stvaranja sloja nečistoća na površini membrane i konačnog začepljenja pora membrane što iziskuje čišćenje/zamjenu membrane za nastavak korištenja. Pretpostavlja se da je izostanak filtrata u prvih 20 – 30 min potvrda da polietersulfonske membrane nisu prikladne za filtriranje biodizela (**Prilog 2**), te se pojava filtrata nakon tog vremena može objasniti kao posljedica promjene u kemijskoj strukturi same membrane nakon čega dolazi do brzog „puštanja“ biodizela kroz membranu. Ultrafiltracijom na polietersulfonskoj membrani nije uočen utjecaj dodatka vode na trajanje/uspješnost filtracije niti utjecaj tlaka ili temperature.

Analizom rezultata dobivenih na obje ultrafiltracijske membrane može se zaključiti da ovako postavljena membranska ultrafiltracija ne zadovoljava uvjete za primjenu u procesu pročišćavanja sintetiziranog biodizela.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Najveći ukupni udio metilnih estera masnih kiselina od 97,6% postignut je sintezom biodizela uz biokatalizator lipazu iz *Burkholderia cepacia* pripremljenu u puferu po Britton- Robinsonu pH vrijednosti 10,0 pri temperaturi od 50 °C, nakon 24 h.
2. Udio slobodnog glicerola u uzorcima sintetiziranog biodizela kretao se u rasponu od 0,043 do 0,144 % (m/m).
3. Nakon konvencionalnog pročišćavanja biodizela uparavanjem, sušenjem i centrifugiranjem udio slobodnog glicerola je bio ispod razine detekcije u oba uzorka sintetiziranog biodizela.
4. Primjenom celulozne i polietersulfonske ultrafiltracijske membrane u opisanim uvjetima membranske filtracije na modulu Amicon Stirred Cell nije došlo do uspješne filtracije sintetiziranog biodizela.

6. LITERATURA

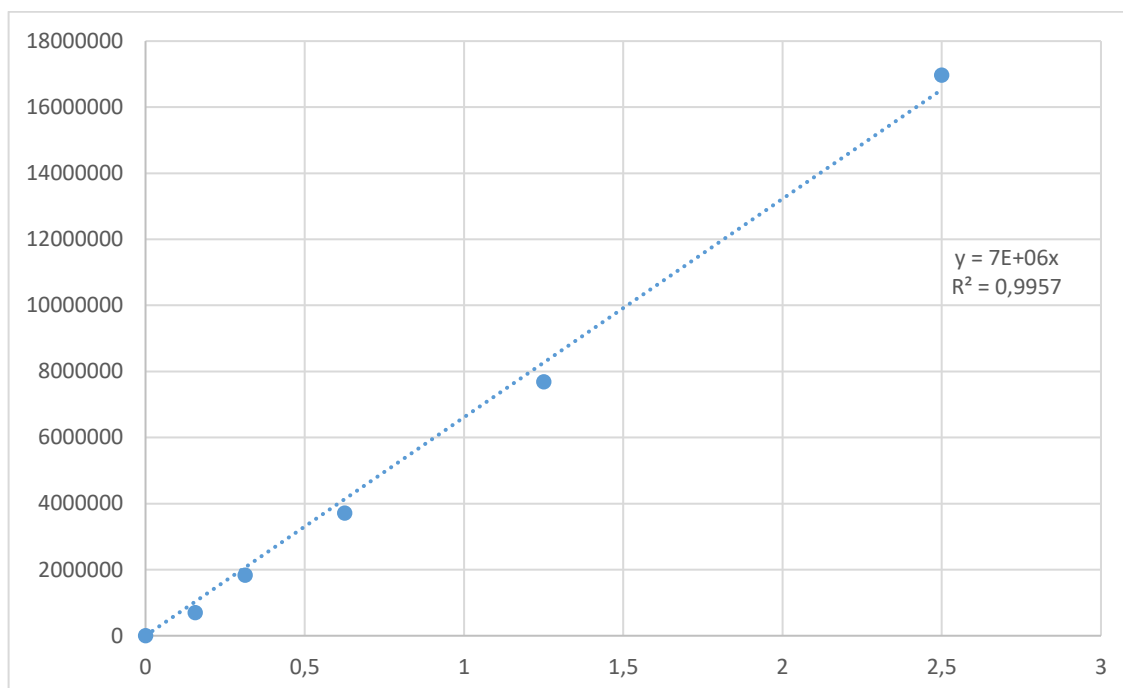
- Abbaszadeh A, Ghobadian B, Najafi G, Yusaf T: An experimental investigation of the effective parameters on wet washing of biodiesel purification. *Int. J. Automot. Mech. Eng.* 9:1525-1537., 2014.
- Ahmad AL, Mat Yasin NH, Derek CJC, Lim JK: Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 584-593, 2011.
- Alves MJ, Cavalcanti ÍV, de Resende MM, Cardoso VL, Reis M.H: Biodiesel dry purification with sugarcane baggase. *Ind. Crops Prod.* 89:119-127, 2016.
- Alves, MJ, Nascimento SM, Pereira IG, Martins MI, Cardoso VL, Reis M: Biodiesel purification using micro and ultrafiltration membranes. *Renewable Energy* 58:15-20, 2013.
- Amini Z, Ong HC, Harrison MD, Kusumo F, Mazaheri H, Ilham, Z: Biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) seed oil. *Energy Conversion and Management*, 132, 82–90, 2017.
- Aransiola E F, Ojumu TV, Oyekola OO, Madzimbamuto TF, Ikhu-Omoregbe DIO: A review of current technology for biodiesel production: *State of the art, Biom. and bioen.*, 61:276–297, 2014.
- Atadashi IM, Aroua MK, Aziz ARA, Sulaiman MNM: Crude biodiesel refining using membrane ultra-filtration process: *An environmentally benign process.* *Egypt. J. Petrol.* 24:383-369, 2015.
- Atadashi IM, Aroua MK, Aziz ARA, Sulaiman MNM: Refining technologies for the purification of crude biodiesel. *Appl. Energy* 88:4239-4251, 2011.
- Bashir MA, Thiri M, Yang X, Yang Y, Safdar AM: Purification of biodiesel via pre-washing of transesterified waste oil to produce less contaminated wastewater. *J. Cleaner Prod.* 180:466-471, 2018.
- Berrios M, Skelton RL: Comparison of purification methods for biodiesel. *Chemical Engineering Journal*, 144(3), 459–465, 2008.
- Canakci M, Gerpen J Van: Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids, 44(6): 1429–1436, 2001.
- Cerveró J M, Coca J, Luque S: Production of biodiesel from vegetable oils, *Grasas y Aceites*, 59 (1): 0017-3495, 2008.
- Demirbaş A : Biodiesel fuels from vegetable oils via catalytic and non-catalytic supercritical alcohol transesterifications and other methods: a survey. *Energy Conversion and Management*, 44(13), 2093–2109, 2003.
- Demirbas A, Karslioglu, S: Biodiesel Production Facilities from Vegetable Oils and Animal Fats. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 29(2):133–141, 2007.

- Faccini CS, da Cunha ME, Moraes MSA, Krause LC, Manique MC, Rodrigues MRA, Benvenuti, EV, Caramão EB: Dry washing in Biodiesel Purification: a Comparative Study of Adsorbents. *J. Braz. Chem. Soc.* 22:558-563, 2011.
- Fan X, Wang X, Chen F: Biodiesel production from crude cottonseed oil: An optimization process using response surface methodology. *Open Fuels Energy Sci.* J. 4:1-8, 2011.
- Farid MAA, Hassan MA, Taufiq-Yap YH, Shirai Y, Hasan MY, Zakaria MR: Waterless purification using oil palm biomass-derived bioadsorbent improved the of biodiesel from waste cooking oil. *J. Cleaner Prod.* 165:262-272, 2017.
- Feizollahnejad M, Ghobadian B, Zenouzi A, Motevali A: Comparison of mist circulation biodiesel water washing with traditional methods. *Int. J. Renew. Energy Technol. Res.* 2:249-257, 2013.
- Fernando S, Hall C, Jha S: NOxReduction from Biodiesel Fuels. *Energy & Fuels*, 20(1), 376–382, 2006.
- Gomes MG, Santos DQ, Morais LC, Pasquini D: Purification of biodiesel by dry washing employing starch and cellulose as natural adsorbents. *Fuel* 155:1-6, 2015a.
- Grbavčić SŽ: Proizvodnja mikrobnih lipaza i proteaza kao aditiva u formulacijama detergenata, Doktorska disertacija, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2014.
- Hasheminejad M, Tabatabaei M, Mansourpanah Y, Khatami far M, Javani A: Upstream and downstream strategies to economize biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 102:461-468, 2011.
- Islam A, Ravindra P: *Biodiesel Production with Green Technologies*, Springer International Publishing Switzerland 2017.
- Kawentar WA, Budiman A: Synthesis of biodiesel from second-used cooking oil, *Energy Procedia* 32 :190–199, 2013.
- Kim D-S, Hanifzadeh M, Kumar A: Trend of biodiesel feedstock and its impact on biodiesel emission characteristics. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, 37(1), 7–19, 2017.
- Lam M K, Lee K T, Mohamed A R: Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review, *Biotech. Adv.*, 28:500–518, 2010.
- Ma F, Hanna MA: Biodiesel production: A review, *Bioresource Technology* 70: 1-15, 1999.
- Manique MC, Faccini CS, Onorevoli B, Benvenuti EV, Caramao EB: Rice husk ash as an adsorbent for purifying biodiesel from waste frying oil. *Fuel* 92:56-61, 2012.
- Mulder M: *Basic Principles of Membrane Technology*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, Boston, 1996.

- Ostojčić M: Sinteza biodizela u mikroreaktorima upotrebom komercijalne i nepročišćene lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*, Diplomski rad, 2018.
- Ott LS, Riddell MM, O'Neill EL, Carini GS: From orchids to biodiesel: Coco coir as an effective drywash material for biodiesel fuel. *Fuel Process. Technol.* 176:1-6, 2018.
- Pichler A: Membranski procesi, Nastavni materijali: Procesi u prehrambenoj industriji Prehrambeno tehnološki fakultet, 2017.
- Predojević Z: Goriva iz biomase bioetanol i biodizel. SP PRINT, Novi Sad, 2010.
- Saleh J, Tremblay AY, Dubé MA: Glycerol removal from biodiesel using membrane separation technology. *Fuel* 89(9):2260-2266, 2010.
- Sanchez DA, Tonetto GM, Ferreira ML: Burkholderia cepacia lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnology and bioengineering* 115(1): 6-24, 2018.
- Savaliya ML, Dhorajiya BD, Dholakiya BZ; Current trends in separation and purification of fatty acid methyl ester. *Sep. Purif. Rev.* 44:28-40, 2015.
- Sinčić, D. Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela. I. Biogoriva, svojstva biodizela i osnove proizvodne tehnologije. *Kemija u industriji* 63(1-2):19-31, 2014.
- Sofilić T: Zdravlje i okoliš, Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Sisak, 2015.
- Veljković VB, Banković-Ilić IB, Stamenković OS: Purification of crude biodiesel obtained by heterogeneously-catalyzed transesterification. *Renewable Sustainable Energy Rev.* 49:500-516, 2015.
- Yücel S, Terzioğlu P, Özcimen D: Lipase Applications in Biodiesel Production. In *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*. IntechOpen, Istanbul, 2012.

7. PRILOZI

Prilog 1 Baždarni dijagram za glicerol



Prilog 2 Proizvođačka specifikacija za ultrafiltracijske membrane



Ultrafiltration Membranes

Operating Instructions

Introduction

The information in this instruction sheet offers general usage guidelines for Millipore ultrafiltration membrane discs. Please see your stirred cell operating instructions for details on installing the membrane discs into your equipment.

NOTE: A label on the package specifies the membrane type, diameter, lot number, and quantity. When making inquiries, please provide the lot number.

Operating Cautions

- Before sterilizing used membranes with formalin, make sure all residual protein is removed.
- Membrane discs can be used in a cold room, but flow rates will be reduced. Specified maximum operating temperatures are for aqueous solutions only.
- Before introducing solvents to the ultrafiltration cell, check chemical compatibility.
- Reduced recoveries and/or lower filtration rates may signal the need for membrane replacement.
- When separating macrosolutes using membranes with NMWL \geq 100,000, keep the protein concentration at $<$ 0.5% to achieve maximum resolution.

Operating Procedure

1. Carefully remove white membrane disc from protective package. Handle the membrane disc by its edge only; avoid scratching the glossy surface. The membrane has an inert substrate that improves handling qualities.
2. All membrane discs are pretreated with glycerine to prevent drying. Sodium azide may be added as a preservative when appropriate. To remove these materials before use, rinse each disc by floating its skin (glossy) side down in a beaker of Milli-Q® water for at least one hour, changing water three times. Alternatively, mount membrane disc in an ultrafiltration cell, glossy side toward solution, and rinse by filtering Milli-Q water for at least five minutes at 379 kPa (55 psi) pressure. Use 69 kPa (10 psi) for membranes with NMWL \geq 100,000. If traces of UV-absorbing material cause interference in a specific experiment, place disc into 5% NaCl for 30 minutes before rinsing, or keep rinsing until there is no more interference.
3. Place the membrane disc into the ultrafiltration device with the skin (glossy) side toward solution.
4. Store discs in a 10% ethanol/water solution and refrigerate.

This product is manufactured by Millipore Corporation ("Millipore").

The M logo is a trademark of Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Millipore, Biomax, Milli-Q, and Ultracel are registered trademarks of Millipore Corporation. Micro is a registered trademark of International Products Corp. Tergazyme is a registered trademark of Alconox, Inc.

© 2011 Millipore Corporation. All rights reserved.
p99101, Rev. ZD, 05/11

Filter Material	REGENERATED CELLULOSE Ultracel® PL and YM Series	POLYETHERSULFONE Biomax® PB Series
Sterilization	5% formalin, 70% ethanol, 2% glutaraldehyde, standard sterilizing gas mixture, or autoclave (YM only) submerged in buffer, saline or water (at 121 °C, 20 minutes)	5% formalin, 2% glutaraldehyde, or standard sterilizing gas mixture
Temperature Limit	PL – 50 °C YM – 121 °C (membrane submerged)	50 °C
Do Not Use With	Amines, $>$ 10% phosphoric acid, $>$ 0.5% phenol, $>$ 0.01 N hydrochloric acid, solutions with pH $<$ 3.0 or $>$ 13	$>$ 10% phosphoric acid, pure aromatic and chlorinated hydrocarbons, ketones, DMF, M-Pyrol, DMSO, polar aromatics, aliphatic esters
Restoration	Rinse for 30 minutes with either 0.1 M NaOH, 100 ppm NaOCl (at 25 °C), or 0.1–0.5% chemical cleaner (Micro® or Tergazyme® cleaners are recommended); then flush membrane thoroughly with distilled or deionized water. For strongly adsorbed proteins, soak membrane in 0.1% protease solution, then rinse thoroughly.	

Operating Pressure

Maximum recommended operating pressure is 483 kPa (70 psi). For membranes with NMWL \geq 100,000, the maximum recommended pressure is 69 kPa (10 psi). Use the discs at the lowest pressure consistent with the desired ultrafiltrate flow. While higher operating pressure initially improves the flow rate, it also promotes increased concentration polarization and membrane compaction, which ultimately limit flow. With very low NMWL membranes, lower operating pressure may also reduce the retention of salts and very low molecular weight species.

Notice

The information in this document is subject to change without notice and should not be construed as a commitment by Millipore Corporation or an affiliate. Neither Millipore Corporation nor any of its affiliates assumes responsibility for any errors that may appear in this document.

Technical Assistance

For more information, contact the office nearest you. In the U.S., call 1-800-MILLIPORE (1-800-645-5476). Outside the U.S., go to our web site at www.millipore.com/offices for up-to-date worldwide contact information. You can also visit the tech service page on our web site at www.millipore.com/techservice.

Standard Warranty

The applicable warranty for the products listed in this publication may be found at www.millipore.com/ec/cp3/terms (within the "Terms and Conditions of Sale" applicable to your purchase transaction).