

Energetska efikasnost enzimske sinteze biodizela

Seletković, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:109:710178>

Rights / Prava: [Attribution-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-05**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Klara Seletković

Energetska efikasnost enzimske sinteze biodizela

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za Procesno inženjerstvo
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj
Franje Kuhača 18, 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 2019./2020. održanoj 21. rujna 2020. godine.
Mentor: prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*
Pomoć pri izradi: *Marta Ostojčić*, mag. ing. proc. asistent

Energetska efikasnost enzimske sinteze biodizela

Klara Seletković, 0119034080

Sažetak: Biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina (*eng.* Fatty Acid Methyl Esters, FAME) nastalih transesterifikacijom biljnih ulja i/ili životinjskih masti s metanolom, uz prisustvo katalizatora. Biodizel se može proizvoditi kemijskim i enzimskim putem. Cilj ovoga rada bio je u enzimski kataliziranoj reakciji transesterifikacije sintetizirati biodizel te procijeniti energetska efikasnost procesa. Za sintezu je korišteno svježe jestivo suncokretovo ulje i metanol te Amano lipaza podrijetlom iz bakterije *Burkholderia cepacia* gdje je aktivnost enzima bila 250 i 750 U/g reakcijske smjese, a različite koncentracije i pH vrijednosti fosfatnog (200 mmol/L, pH 7 i 8) i univerzalnog Britton-Robinsonovog pufera (40 i 200 mmol/L, pH 10). Reakcije su provedene u trajanju od 24 sata, a uzorci biodizela su uzimani nakon 1, 2, 3, 6, 12 i 24 sata. Udio FAME određena je plinskom kromatografijom. Optimalni uvjeti za provedbu enzimske sinteze biodizela (udio metilnih estera masnih kiselina u sirovom biodizelu veći od 99 %) uz *B. cepacia* lipazu tijekom prvog sata sinteze su 50 °C, molarni omjer ulja i metanola 1:3,4, aktivnost lipaze od 250 U/g reakcijske smjese uz 200 mmol/L Britton-Robinsonov pufer pH 10. Enzimski katalizirana transesterifikacija se pokazala energetska efikasna (EROEI > 1), uz omjer dobivene i utrošene toplinske energije od 1,16.

Ključne riječi: *biodizel, transesterifikacija, lipaza iz Burkholderia cepacia, energetska efikasnost*

Rad sadrži: 37 stranica
8 slika
5 tablica
26 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. prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i> | član |
| 4. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 30. rujna 2021.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Energy, Environment and Sustainable Development
Franje Kuhača 18, 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. X held on September 21, 2020.

Mentor: *Sandra Budžaki*, PhD, full prof.

Technical assistance: Marta Ostožčić, assistant

Energy efficiency of the Enzymatic Synthesis of Biodiesel

Klara Seletković, 0119034080

Summary: Biodiesel is a mixture of Fatty Acid Methyl Esters (FAME) formed by transesterification of vegetable oils and / or animal fats with methanol, in the presence of a catalyst. Biodiesel can be produced chemically and enzymatically. The aim of this work was to synthesize biodiesel in an enzymatically catalyzed transesterification reaction and to evaluate the energy efficiency of the process. For synthesis is used fresh edible sunflower oil, methanol and Amano lipase originating from *Burkholderia cepacia* at activity loads of 250 and 750 U/g of reaction mixture, whereas were used different concentrations and pH values of phosphate (200 mmol / L, pH 7 and 8) and universal Britton – Robinson's buffer (40 and 200 mmol/L, pH 10). Reactions were performed for 24 hours, and biodiesel samples were taken after 1, 2, 3, 6, 12, and 24 hours. The proportion of FAME was determined by gas chromatography. Optimal conditions for the implementation of enzymatic synthesis of biodiesel (content of fatty acid methyl esters in crude biodiesel greater than 99%) with *B. cepacia* lipase during the first hour of synthesis are 50 °C, molar ratio of oil and methanol 1: 3.4, lipase activity load of 250 U/g of the reaction mixture with 200 mmol/L Britton-Robinson buffer pH 10. Enzyme-catalyzed transesterification proved to be energy efficient (EROEI > 1), with an energy output to energy input ratio of 1.16.

Key words: *Biodiesel, transesterification, lipase from Burkholderia cepacia, energy efficiency*

Thesis contains: 37 pages
8 figures
5 tables
26 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: September 30, 2021.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj „IP-2020-02-6878.“

SADRŽAJ

| | | |
|--------|--|----|
| 1. | UVOD | 1 |
| 2. | TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. | Biodizel..... | 4 |
| 2.1.1. | Sinteza biodizela | 4 |
| 2.1.2. | Kemijska kataliza | 6 |
| 2.1.3. | Enzimski kataliza | 9 |
| 2.2. | Energetska efikasnost | 12 |
| 3. | EKSPERIMENTALNI DIO..... | 15 |
| 3.1. | ZADATAK | 16 |
| 3.2. | MATERIJALI | 16 |
| 3.2.1. | Sirovine | 16 |
| 3.2.2. | Lipaza | 16 |
| 3.2.3. | Kemikalije | 16 |
| 3.2.4. | Aparatura..... | 17 |
| 3.3. | METODE | 18 |
| 3.3.1. | Sinteza biodizela | 18 |
| 3.3.2. | Analiza metilnih estera masnih kiselina | 19 |
| 4. | REZULTATI I RASPRAVA | 21 |
| 4.1. | UDIO METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA U SIROVOM BIODIZELU | 22 |
| 4.2. | ENERGETSKA EFIKASNOST PROCESA SINTEZE BIODIZELA | 27 |
| 5. | ZAKLJUČCI | 32 |
| 6. | LITERATURA | 34 |

1. UVOD

Svaki dan sve više raste potreba za energijom jer se populacija konstantno povećava i usporedno s tim dolazi do stalnog industrijskog razvitka. Upravo zbog toga, energetska efikasnost je od velike važnosti ona doprinosi smanjenju potrošnje energije i racionalnim upravljanjem energetske resursima kao i smanjenju emisije ugljikovog dioksida. Pored navedenog, energetska efikasnost je jedan od koraka ka postizanju ciljeva održivog razvoja.

Iako se još uvijek najveća količina energije proizvodi iz fosilnih goriva, javlja se sve veća tendencija zamjene fosilnih izvora obnovljivim izvorima energije, kao što su biodizel i bioetanol, odnosno onih koji manje zagađuju okoliš (Fu i sur., 2014). Fosilni izvori energije kao što su nafta, zemni plin i ugljen nastaju u zemljinoj kori prilikom anaerobnog raspada mrtvih organizama. Iz zemljine kore izvlače se na zemljinu površinu i obrađuju do goriva koja nalazimo u konvencionalnoj uporabi. Pri njihovom izgaranju nastaju nove velike količine štetnih i otrovnih plinova, poput ugljikovog dioksida, koji su do tada bili zarobljeni u zemljinoj kori u obliku ugljika i ugljikovodika. Oni na ovaj način doprinose u atmosferu gdje doprinose globalnom zagrijavanju. S druge strane, biogoriva poput biodizela svojim izgaranjem ne otpuštaju u atmosferu nove količine CO₂, jer količina ugljikovog dioksida koja nastaje reakcijom izgaranja je ona ista količina koju biljka potroši za svoj rast i razvoj (Al-Zuhair, 2011).

Čak i djelomična zamjena fosilnih goriva obnovljivim gorivima bitno smanjuje onečišćenja. Kako se naftne rezerve brzo troše, planira se smanjenje uporabe fosilnih goriva i uvođenje sve veće količine biogoriva na tržište. Biodizel koji sadrži monoalkilne estere dugolančanih masnih kiselina dobivene iz obnovljivih izvora je atraktivno alternativno gorivo. Uspoređujući s konvencionalnim fosilnim dizelom, biodizel ima mali utjecaj na okoliš, biorazgradiv je, nije otrovan i ima nisku vrijednost emisije ugljikovog dioksida.

U ovom radu provedena je enzimska sinteza biodizela iz svježeg suncokretovog ulja i metanola pomoću Amano lipaze podrijetlom iz bakterije *Burkholderia cepacia* u ovisnosti o koncentraciji i pH pufera i aktivnosti lipaze izražene kao U/g reakcijske smjese te procijenjena energetska efikasnost enzimске sinteze biodizela.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biodizel

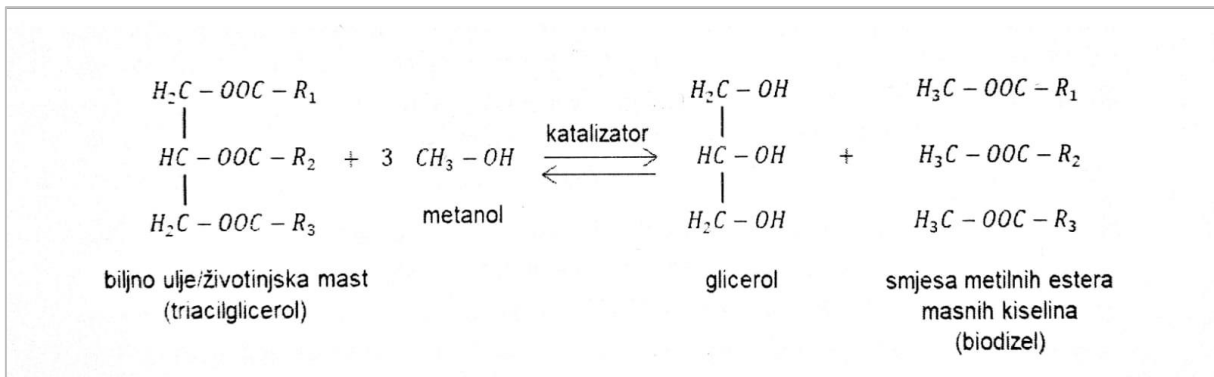
Biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina (Fatty Acid Methyl Esters – FAME) koji se proizvodi od biljnog i/ili životinjskog ulja i/ili masti, a ima svojstva fosilnog dizela i može se koristiti kao biogorivo. Biodizel dolazi u obliku čistoga biogoriva ili je umiješan u fosilni dizel u različitim omjerima te udovoljava propisanim graničnim vrijednostima značajki kakvoće navedenoj u Uredbi o kakvoći biogoriva (NN, 33/2011). Sukladno europskoj normi (EN 14214:2012/A2:2019) udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu trebao bi iznositi minimalno 96,5 % (m/m) da bi se smjesa FAME smatrala biodizelom.

Korištenje biljnih ulja kao pogonskih goriva predstavio je još Rudolf Diesel na Svjetskoj izložbi u Parizu 1900. godine gdje je demonstrirao rad motora s unutrašnjim izgaranjem na ulje od kikirikija. No ta ideja nije zaživjela jer u to vrijeme dolazi do ekspanzije proizvodnje i korištenja nafte, a i biljno ulje je imalo razne nedostatke poput velike viskoznosti i prisustva nezasićenih masnih kiselina da bi se koristilo u tadašnjim motorima. Ove nedostatke nastojalo se riješiti razblaživanjem biljnih ulja s dizelom, no to je dugoročno dovodilo do negativnih posljedica na samom motoru. Ipak, nakon niza godina i potrebe za zamjenom fosilnog dizela alternativnim gorivom, proizvodnja biodizela transesterifikacijom triacilglicerola iz biljnih i životinjskih masti i/ili ulja postaje sveopće prihvaćena (Predojević, 2010).

Prednosti biodizela kao što su netoksičnost, nezapaljivost, biorazgradivost, odsustvo sumpora i aromata čine ga ekološki prihvatljivijim gorivom. Također njegovom proizvodnjom i korištenjem smanjuje se ovisnost zemalja o uvozu nafte kao pogonskog goriva.

2.1.1. Sinteza biodizela

Početak korištenja biljnog ulja za pokretanje dizelskih motora imala je puno nedostataka stoga se pribjegavalo kemijskom modificiranju sirovine, odnosno biljnog ulja, do derivata koji je svojstvima najbliži konvencionalnom dizelu sve dok nije proizveden biodizel. Tri poznate metode proizvodnje biodizela su piroliza, mikroemulzifikacija i transesterifikacija. Najjednostavnija i najisplativija metoda je transesterifikacija (**Slika 1**), gdje je onečišćavanje okoliša najmanje, a proizvedeni biodizel ima veći prinos za razliku od metoda pirolize i mikroemulzifikacije koje su i znatno skuplje (Ghaly i sur., 2010).



Slika 1 Reakcija transesterifikacije (Budžaki i Miljić, 2017)

U reakciji transesterifikacije metanol djeluje na triacilglicerole iz ulja/masti, sa ili bez prisutnosti katalizatora, pri čemu je produkt reakcije smjesa metilnih estera masnih kiselina (FAME), a nusprodukt je glicerol. Razlikuje se katalitička i nekatalitička reakcija transesterifikacije, odnosno ona gdje je katalizator prisutan i ona bez katalizatora. Nekatalitički postupak temelji se na transesterifikaciji u odsutnosti katalizatora pri visokom tlaku i temperaturi. Zbog velikih energetske utroška, ovaj postupak nije zaživio u industriji proizvodnje biodizela. Katalitička transesterifikacija je s druge strane sveprisutna u industrijskoj proizvodnji biodizela, gdje se proizvodnja u većini slučajeva odvija u kotlastim (šaržnim) kemijskim reaktorima (Budžaki i Miljić, 2017).

Sirovine za proizvodnju biodizela predstavljaju najveći trošak proizvodnje biodizela. One se dijele na: biljna ulja i životinjske masti, otpadna ulja od kuhanja, nejestiva ulja i masti te ulja koja zaostaju neiskorištena u tehnološkom procesu prerade uljarica. Otpadna ulja postaju prihvaćenima kao sirovina jer su jestiva ulja zapravo hrana te se obavezno postavlja pitanje - trebaju li se jestiva biljna ulja i životinjske masti koristiti kao sirovine za proizvodnju biodizela ili prvenstveno kao prehrambeni proizvod? Tome potpomaže i činjenica da je cijena otpadnih i nejestivih ulja u odnosu na cijenu biljnih ulja niža za oko 50 % što snižava ukupnu cijenu proizvodnje biodizela. Međutim, otpadna ulja od kuhanja su lošije kvalitete u pogledu sirovinske uvjetnosti za proizvodnju biodizela. Također otpadna ulja zahtijevaju dodatnu pripremu za konvencionalnu industrijsku proizvodnju uz lužine kao katalizatore, jer sadrže razne nečistoće, slobodne masne kiseline i vodu. Jestiva biljna ulja s druge strane ne trebaju dodatne pripreme već predstavljaju idealnu sirovinu. Najznačajnije uljarice od kojih se proizvode biljna ulja su uljana repica, suncokret i soja u Europi, soja u Americi, a u Azijskim zemljama uljana palma, stoga njihova ulja predstavljaju i najznačajnije sirovine za proizvodnju

biodizela. Neovisno o vrsti sirovine, s današnjeg stajališta teško je prognozirati hoće li se u budućnosti troškovi proizvodnje biodizela smanjiti budući da se naglo može povećati cijena sirovine ili pasti cijena nusprodukta glicerola. Ipak, od velike je važnosti ulaganje znanja i sredstava u napredak industrije proizvodnje biodizela, jer se naftne rezerve troše velikom brzinom, stoga je vrlo bitno pronaći alternativu, jer je teško točno procijeniti preostale zalihe fosilnog goriva (Predojević, 2010).

2.1.2. Kemijska kataliza

Transesterifikacija je reverzibilna reakcija u kojoj dolazi do postupne proizvodnje estera i glicerola iz alkohola i triglicerida (ulja/masti). Kako je reakcija reverzibilna alkohol se dodaje u suvišku da bi se ravnoteža pomaknula prema stvaranju estera, a najčešće korišten alkohol je metanol zbog relativno niske cijene u usporedbi s ostalim alkoholima. Sama reakcija transesterifikacije sastoji se od tri koraka. U prvom koraku od triglicerida nastaju digliceridi, u drugom koraku od diglicerida nastaju monogliceridi, a u trećem koraku od monoglicerida molekule glicerola.

Sirovine za proizvodnju biodizela dijele se na: biljna ulja i životinjske masti, te otpadna ulja od kuhanja, nejestiva ulja i masti i ulja koja zaostaju neiskorištena u tehnološkom procesu prerade uljarica u jestiva ulja. Biljna ulja predstavljaju idealnu sirovinu s obzirom na čistoću i nizak udio slobodnih masnih kiselina. S druge strane otpadna ulja od kuhanja su odlična sirovina jer bi se njihovim iskorištenjem riješio ekološki problem koji ona predstavljaju. Otpadna ulja su problematična zbog visokog udjela slobodnih masnih kiselina. Naime, sirovine s višom koncentracijom slobodnih masnih kiselina (FFA – Free Fatty Acids) mogu uzrokovati probleme zbog reakcije saponifikacije što vodi do neproreagiranosti materijala i slijedno s time smanjenja iskorištenja. Ipak dopuštena količina slobodnih masnih kiselina je količina niža od 2,5 %, sve iznad te količine zahtjeva predtretman sirovine.

Kemijski katalizirana reakcija transesterifikacije katalizirana je kiselinama ili lužinama no da bi reakcija bila još brža potrebno ju je održavati na temperaturi od 60 – 80 °C, odnosno bitno je da je reakcijska smjesa održavana ispod temperature vrenja alkohola. Proces je vrlo intenzivan, a kako se odvija pri višim temperaturama dolazi do visokog utroška energije (Ghaly i sur., 2010).

Kemijski katalizatori su heterogeni ili homogeni, a obje vrste mogu biti kisele i alkalne. Obje vrste imaju svoje prednosti i nedostatke (Sinčić, 2014).

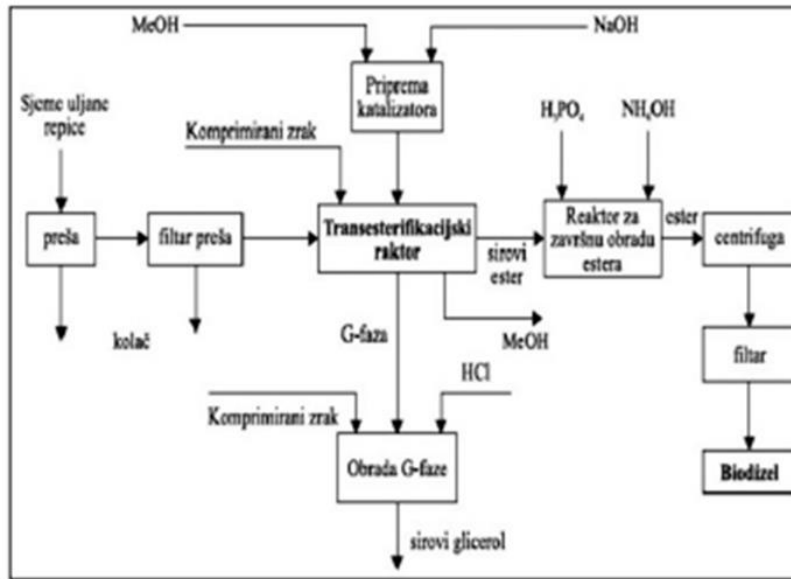
Homogeno katalizirana alkalna proizvodnja biodizela je današnji glavni komercijalni proces za proizvodnju biodizela. Reakcija je nukleofilna adicija, a katalizatori korišteni u procesu su natrijevi i magnezijevi hidroksidi i metoksidi. U alkalno kataliziranoj reakciji vrlo je važno da sirovina ima što je moguće manje vode i manji udio slobodnih masnih kiselina jer one prelaze u sapune (reakcija saponifikacije) pa je onda odvajanje glicerolnog sloja teže. Osim toga slobodne masne kiseline „potroše“ katalizator stvaranjem sapuna, pa je potrebna i veća količina katalizatora.

Homogeno katalizirana kisela proizvodnja biodizela se katalizira jakim kiselim katalizatorom, kao što je sumporna kiselina ili *p*-toluen sulfonska kiselina. Prednost ovog postupka je simultano pretvaranje slobodnih masnih kiselina u estere, pa se ovaj postupak koristi za sirovine s višim udjelom slobodnih masnih kiselina (palmino ulje). No s druge strane, korišteni katalizator je vrlo korozivan i pri tome opasan za okoliš, pa se vrlo rijeko koristi u komercijalne svrhe.

Heterogeno katalizirana alkalna proizvodnja biodizela predstavlja pojednostavljeni proces i troškove pročišćavanja biodizela i glicerola. Heterogeni alkalni katalizatori su alkalijski i zemnoalkalijski metali i soli njihovih metala. Kako bi se ostvarila konverzija kao s homogenim katalizatorom, kod heterogene reakcije temperatura mora biti viša, veći molarni udio metanola, duže reakcijsko vrijeme i potrebna veća količina katalizatora. S druge strane moguće je ponovno korištenje katalizatora primjenom filtracije i dekantiranjem pri čemu je postupak odvajanja katalizatora od glicerola i biodizela lakši, a dobiveni biodizel je vrlo visoke kvalitete.

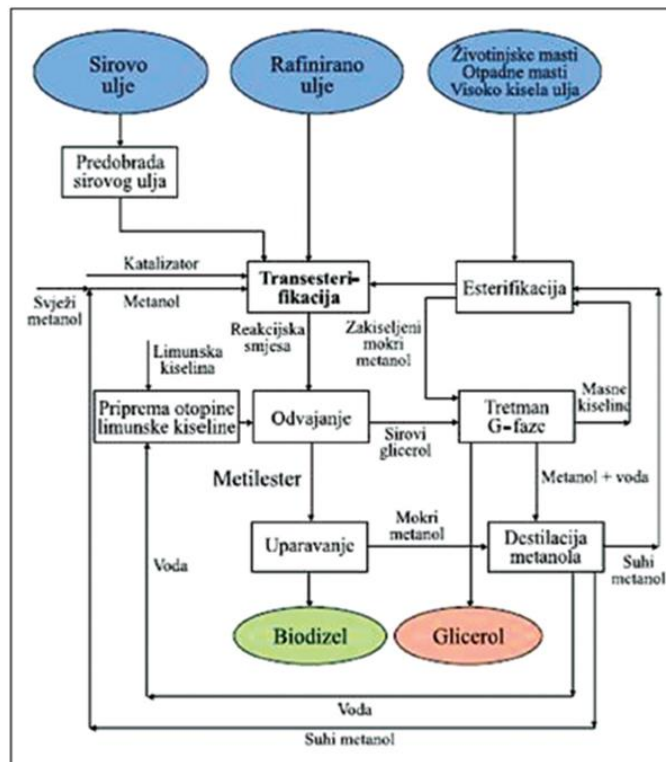
Heterogeno katalizirana kisela proizvodnja biodizela koristi sirovine lošije kvalitete. Kao što su životinjske masti, otpadno ulje od kuhanja, destilati masnih kiselina i biljno ulje visoke kiselosti. Kao katalizator služe kisele smole, no one su još uvijek u fazi istraživanja. Ovaj model proizvodnje biodizela se vrlo rijeko koristi u proizvodnji (Loteri i sur., 2006).

Kemijski katalizirana reakcija transesterifikacije prikazana shemom na **Slici 2** u industriji se uglavnom izvodi u kotlastim (šaržnim) reaktorima uz alkalne katalizatore, a to je najčešće NaOH, dok temperatura reakcije uglavnom doseže 55 °C (Sinčić, 2009).



Slika 2 Shema šaržnog postupka Cvengoša i Povžaneca (Cvengoš i Povžanec, 1996)

Kontinuirani postupci u upotrebi su za veće kapacitete. Na Slici 3 prikazana je shema kontinuiranog postupka (tvrtke Ballestra) gdje je reakcijska temperatura ispod 60 °C, uz tlak od 1,5 bara i katalizator natrijev metoksid (Sinčić, 2009).



Slika 3 Shema kontinuiranog postupka proizvodnje biodizela tvrtke Ballestra (Sinčić, 2009)

Neposredno nakon reakcije transesterifikacije biodizel, tzv. sirovi biodizel, još nije za direktnu upotrebu u motorima, jer sadrži dosta nečistoća, najviše u obliku zaostalog katalizatora, a taj problem rješava se ispiranjem biodizela s vodom. Pri tome dolazi do stvaranja prilično velike količine vode koja doseže čak do 0,2 tone po toni proizvedenog biodizela. Nakon tog koraka u procesu je došlo do stvaranja još jednog nusprodukta proizvodnje biodizela o čijem se skladištenju i daljnjem procesuiranju treba brinuti. Zato se proces komercijalne alkalne transesterifikacije svodi na skup i energetski i ekološki neodrživ proces.

2.1.3. Enzimska kataliza

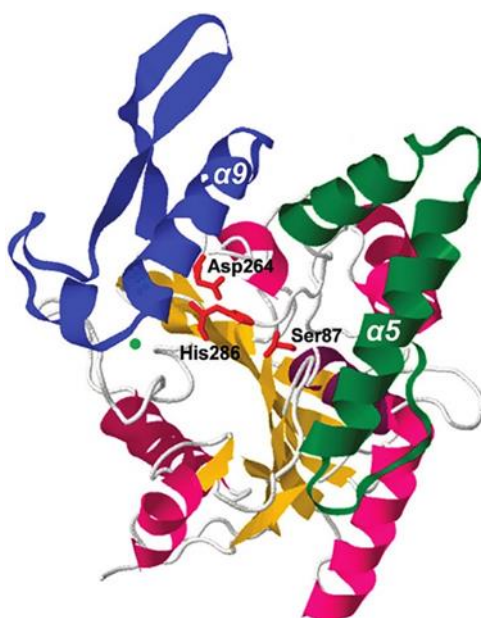
Ograničene rezerve fosilnih goriva, politička, ekonomska, zdravstvena pitanja i pitanja očuvanja okoliša (oštećenje ozonskog omotača, globalno zagrijavanje, staklenički plinovi) promaknule su biodizel na mjesto alternativnog, obnovljivog i ekološki prihvatljivog gorivo (Ghaly i sur., 2010).

Lipaze, odnosno triacilglicerol acilhidrolaze predstavljaju vrlo važnu skupinu biokatalizatora koji imaju značajnu ulogu u biotehnološkim procesima. One se ubrajaju u skupinu hidrolitičkih enzima koji kataliziraju hidrolizu, esterifikaciju (slobodnih masnih kiselina u metilne estere masnih kiselina) i transesterifikaciju (triacilglicerola u metilne estere masnih kiselina) (Budžaki i sur., 2017). Lipaza triacilglicerole prvo hidrolizira i prevodi u slobodne masne kiseline, a onda reakcijama esterifikacije i transesterifikacije iz slobodnih masnih kiselina i metanola nastaju metilni esteri masnih kiselina i glicerol (Shah i sur., 2003). Lipaze mogu biti ekstrahirane iz nekoliko izvora, kao što su gljive, bakterije i kvasci te prema tome imati drugačiju svojstva/karakteristike (regioselektivnost, specifičnost i katalitičku aktivnost) (Norjannah i sur., 2016).

Mogu se upotrebljavati u slobodnom ili imobiliziranom obliku. Lipaze u imobiliziranom obliku imaju niz prednosti, no glavni nedostatak im je znatno viša cijena od onih u slobodnom obliku.

Prema regiospecifičnosti lipaze se mogu podijeliti u dvije grupe: 1,3-specifične, koje kataliziraju hidrolizu primarne esterske veze pozicionirane na C1 i C3 atomu, te nespecifične koje kataliziraju cijepanje sve tri esterske veze, gdje dolazi do potpune razgradnje triacilglicerola (Baadhe i sur., 2014).

Lipaza iz *Burkholderia cepacia* prikazana na **Slici 4**, poznata i kao *Pseudomonas cepacia* je ekstracelularna lipaza, koja pripada skupini nespecifičnih lipaza. Ona ima vrlo široku primjenu u biotehnološkim procesima zbog svoje sposobnosti prepoznavanja širokog spektra supstrata, tolerancije na različita otapala, uključujući i one s kratkim lancem (1-4 ugljikova atoma) te otpornosti na toplinu. Optimalna temperatura pri kojoj postiže maksimalnu aktivnost je 50 °C (Sugihara i sur., 1992), no zadržava aktivnost i pri 75 °C. Lipaza iz *Burkholderia cepacia* je najčešće korištena lipaza pri proizvodnji biodizela jer zadržava svoju nativnu strukturu i aktivnost nakon duljih inkubacija pri visokim koncentracijama metanola, što je vrlo bitno jer metanol inhibira ostale lipaze (Sanchez i sur., 2017).



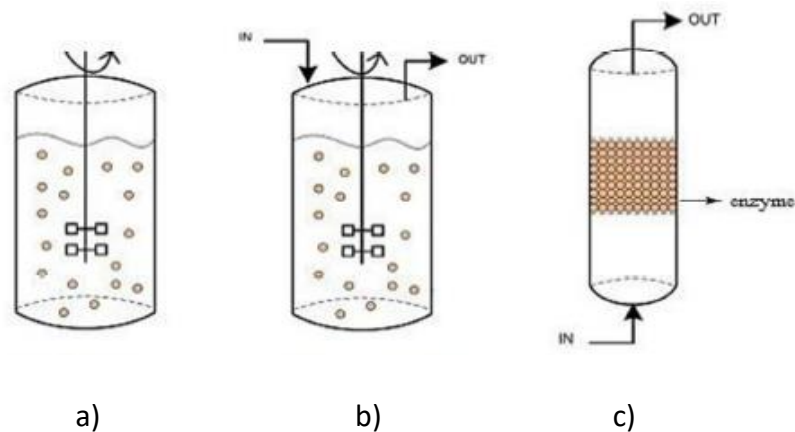
Slika 4 Struktura lipaze iz *Burkholderia cepacia* (Liu et al., 2015)

Proizvodnja biodizela uz enzime kao biokatalizatore obično traje od 12 do 24 sata, a to uglavnom ovisi o vrsti lipaze koja se koristi u reakciji. Trajanje reakcije se obično može smanjiti dodatkom veće koncentracije lipaze no to znatno povisuje troškove procesa, a i ne daje u svim slučajevima željene rezultate. Stoga je preporučljivo optimizirati proces, što uključuje i primjenu optimalne koncentracije lipaze kako bi se postigla zadovoljavajuća konverzija (Norjannah i sur., 2016).

Enzimska proizvodnja biodizela je u prednosti u usporedbi s drugim metodama zbog svojih blagih reakcijskih uvjeta, odnosno olakšanog pročišćavanja produkta, mogućnosti enzima da

kataliziraju esterifikaciju slobodnih masnih kiselina i triacilglicerola bez potrebe ispiranja vodom odnosno stvaranja otpadne vode, bez stvaranja sapuna i općenito veće kvalitete produkta i to sve uz manju potrošnju energije zbog odvijanja reakcije pri nižoj temperaturi (20 – 60 °C) (Ghaly i sur., 2010).

Biodizel se može proizvoditi u kontinuiranim (**Slika 5a**) i šaržnim (**Slika 5b**) uvjetima. No, za ovu vrstu procesa, osim spomenutih, najbolje se pokazao reaktor s pakirajućim slojem (Norjannah i sur., 2016) (**Slika 5c**). Najjednostavniji oblik reaktora je šaržni reaktor s miješalom (**Slika 5a**), gdje se reaktanti uvedu u reaktor, zatim se katalizatorom i/ili toplinom inicira reakcija. Kad je reakcija počela tada se počinje smanjivati koncentracija reaktanata i dolazi do rasta koncentracije produkata, a tijekom trajanja reakcije kontroliraju se temperatura i tlak. Nakon što je reakcija završena sadržaj reaktora se prazni i ide na daljnju obradu (Luyben, 2007). Šaržni reaktor sadrži uređaje za kontrolu temperature i miješalo, a na kraju se lipaza izdvoji centrifugiranjem ili filtracijom. Alternativniji od šaržnog je kontinuirani reaktor s miješalom (**Slika 5b**). Kontinuirani reaktor podrazumijeva kontinuirani dovod sirovine i kontinuirani odvod produkata iz reaktora. Njegova prednost je relativno nisko vrijeme zadržavanja, a time je i sama brzina reakcije veća. Reaktori s miješalom imaju problem s osjetljivošću lipaze na visoke intenzitete miješanja, zbog toga miješanje treba optimirati na brzinu pri kojoj će lipaza biti stabilna, a produktivnost visoka. S druge strane u reaktoru s pakirajućim slojem lipaza je manje izložena mehaničkom stresu u usporedbi s reaktorima s miješalom. Temperatura i tlak su kontrolirani, a reakcijska smjesa se pumpa specifičnim protokom koji određuje vrijeme zadržavanja. Kontinuirani postupci ipak imaju prednost zbog toga što ne zahtijevaju ponovno punjenje, čišćenje i pražnjenje (Norjannah i sur., 2016).



Slika 5 Reaktorski sustavi za proizvodnju biodizela a) šaržni reaktor b) kontinuirani reaktor c) reaktor s pakirajućim slojem (preuzeto i modificirano prema Norjannah i sur. 2016)

Osim ovih konvencionalnih reaktora u fazi istraživanja su i mikroreaktori za enzimsku proizvodnju biodizela koji predstavljaju procese koji su ekološki prihvatljiviji. Mikroreaktori imaju niz prednosti zbog reducirane veličine: manje količine reaktanata i energije, precizna kontrola temperature, smanjeno vrijeme zadržavanja i reducirani otpad. U slučaju sinteze biodizela u mikroreaktorima, na kvalitetu krajnjeg produkta, odnosno biodizela, najznačajnije utječe kvaliteta sirovine. Bez obzira na inovaciju i zeleniji pristup proizvodnji biodizela mikroreaktori još nisu konkurentna tehnologija za proizvodnju biodizela zbog problema pada tlaka, akumulacije glicerola, a najviše zbog negativne ekonomske bilance (Budžaki i sur., 2017).

2.2. Energetska efikasnost

Od početka industrijske revolucije sve je podređeno preradi, distribuciji i potrošnji fosilnih goriva. Trenutačno svijet još uvijek ovisi o zalihama i potrošnji fosilnih goriva. Ipak, na tržištu se pojavljuju alternativna goriva koja postaju sve bolja s namjerom da u budućnosti u potpunosti istisnu fosilna goriva iz upotrebe. No upitna je njihova isplativosti te neto proizvedena energija, a samim time i njihova održivost.

Energetska efikasnost je jedan od najvažnijih elemenata koji analiziraju održivost proizvodnje. Pojednostavljeno bi energetska efikasnost značila obavljanje istog posla uz korištenje manje količine energije, odnosno u nekom procesu značila bi smanjivanje utroška energije i reduciranje onečišćenja. Biogorivima se postiže smanjenje onečišćenja, no jesu li i koliko su

procesi proizvodnje biogoriva energetski efikasni vrlo je upitno. Najčešće se nalaze na samoj granici isplativosti. U proizvodnji biodizela postoji tendencija proizvodnje energije iz otpadaka i nusprodukata, kao što je pogača od tiještenja uljarice ili glicerol, kako bi se proizvodnja dovela do održivijeg procesa i povećala neto proizvedena energija (Brondani i sur., 2015). Koliko su određeni procesi energetski održivi, a samim time i ekonomski održivi vrlo je bitan faktor komercijalizacije procesa. Kao najbitniji indikator energetske efikasnosti pokazao se EROIE (*eng.* Energy Return on Energy Investment – EROI ili EROEI), odnosno omjer utrošene i dobivene/proizvedene energije i računa se prema **jednadžbi (1)** kako slijedi

$$EROIE = \frac{E_{dobivena}}{E_{utrošena}} \quad (1)$$

gdje je $E_{dobivena}$ količina energije koja je proizvedena, a $E_{utrošena}$ količina energije koju je bilo potrebno uložiti u procesu proizvodnji. Vrijednost omjera dobivene i utrošene energije u procesu bi trebala biti veća od 1. Ukoliko je manja ili jednaka 1 proces nije energetski efikasan. Prema radu Halla i sur. (2009) stoji da bi se neki proces proizvodnje energije podupro s ekonomskog i socijalnog aspekta, najmanji broj koji bi se trebao dobiti izračunavanjem EROIE je 3, jer smatra da se puno energije troši na transport tog goriva i na korištenje istog, te da samo goriva kojima je EROIE veći od broja 3 mogu zamijeniti fosilni izvor energije. Ovaj kriterije nije sveopće prihvaćen jer je navedeni omjer dobivene i utrošene energije vrlo teško dostići i njime se favoriziraju samo proizvodni procesi s vrlo niskim ulogom energije.

Za izračunavanje energije u nekom procesu bilo da je ona dobivena ili utrošena, kao i za izračunavanje/procenu energetske efikasnosti vrlo je bitno izračunati reakcijsku toplinu. Bilo da se radi o egzotermnoj ili endotermnoj reakcije, ona predstavlja standardnu molarnu reakcijsku entalpiju, a može se izračunati pomoću toplina stvaranja sudionika kemijske reakcije pri standardnim uvjetima (101,325 kPa, 25 °C). Isto vrijedi i za toplinu transesterifikacije kao reakcije na kojoj se temelji sinteza biodizela, a računa se prema **jednadžbi (2)**

$$Q_i = G_m \cdot c_p \cdot \Delta T \text{ [kJ]} \quad (2)$$

gdje G_m predstavlja masu (kg), c_p predstavlja specifični toplinski kapacitet (kJ/kgK), a ΔT predstavlja temperaturnu razliku od početne temperature do temperature na kojoj se odvija reakcija (K).

Općenito, energetska efikasnost sukladno **jednadžbi (1)** nije jednostavno procijeniti. Ona ovisi o niz faktora koje treba uzeti u obzir prilikom izračuna. Tako se za dobivenu energiju uzima u obzir termodinamička pozadina procesa koja uključuje produkt(e) i nusprodukt(e). Konkretno u slučaju proizvodnje biodizela proizvedenu energiju predstavlja biodizel i glicerol koji se mogu stavljati na tržište. U slučaju utrošene energije, svakako prvenstveno treba uzeti u obzir toplinu koje se troše ili dobivaju tijekom reakcije transesterifikacije kao reakcije na kojoj se temelji trenutna proizvodnja biodizela. Nadalje, ukoliko se u cijelosti sagledava proces proizvodnje biodizela, a ne laboratorijska sinteza, svakako se moraju uzeti u obzir tzv. poljoprivredni čimbenici (prinos sirovine po hektaru što zahtjeva pripremu zemljišta, sjetvu, uzgoj i žetvu; primjena agrobiotehničkih mjera tijekom uzgoja) zatim utrošak energije za transport, ekstrakciju ili proizvodnju uljne sirovine, rafinaciju (ukoliko je primjenjivo) kao i predtretman sirovine i na kraju već spomenutu transesterifikaciju. Od navedenog, sukladno objavljenim rezultatima istraživanja prema Brondani i sur. (2015) i Firrisa i sur. (2014) jedino u slučaju procjene energetske efikasnosti cjelokupnog procesa jasnu energetska efikasnost ima poljoprivredni sektor sa omjerom EROI od 12,43 dok je, s druge strane, energetska najzahtjevniji proces ekstrakcije (EROI od 0,51). Transesterifikacija je nešto ispod granice isplativosti. Razlog zašto je poljoprivredni sektor energetska isplativiji od industrijskog leži u tome što iz poljoprivrednog sektora osim biodizela i glicerola na izlazu stoje i svi drugi nusprodukti iz poljoprivredne proizvodnje tijekom uzgoja uljarice koje se potencijalno može plasirati na tržište, kao što su stabljika, pogača i sačma (Firrisa i sur., 2014).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Zadatak ovog diplomskog rada bio je provesti enzimsku sintezu biodizela iz svježeg suncokretovog ulja i metanola pomoću Amano lipaze podrijetlom iz bakterije *Burkholderia cepacia*, izraditi bilancu tvari i energije te na temelju toga procijeniti energetska efikasnost enzimске sinteze biodizela.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Sirovine

Sirovina korištena pri sintezi biodizela je svježe jestivo suncokretovo ulje (Zorela, Srbija).

3.2.2. Lipaza

Amano lipaza iz *Burkholderia cepacia* (Sigma – Aldrich; SAD) korištena je kao biokatalizator za sintezu biodizela.

3.2.3. Kemikalije

U ovom diplomskom radu korištene su slijedeće kemikalije: fosforna kiselina 85 % (H_3PO_4 ; Kemika, Hrvatska), ledena octena kiselina (CH_3COOH ; Macron fine chemicals; SAD), borna kiselina (H_3BO_3 ; Gram-mol; Hrvatska), natrijev hidroksid (NaOH; Kefo; Hrvatska), metanol (CH_3OH ; J.T. Baker; Poljska), natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4 \times 2H_2O$; Sigma-Aldrich, SAD), dinatrijev fosfat (Na_2HPO_4 ; Acros Organics; Ujedinjeno Kraljevstvo), n-heptan (Carlo Erba; C_7H_{16} , Španjolska).

3.2.4. Aparatura

Za izradu ovog diplomskog rada korištena je slijedeća aparatura: analitička vaga (Crystal 200 CE, Gibertini, Italija), pH metar (Hanna Instruments, SAD), magnetna miješalica (Ika Werke, Njemačka), vibrirajuća miješalica (Tehtnica, Slovenija), centrifuga (Hermle Z 326 K, Švicarska), vodena kupelj (Thermomix_1420, Njemačka), Shimadzu plinski kromatograf GC-2010 s FID detektorom uz kolonu: SH-Rtx-Wax ($L = 30$ m, $I.D. = 0,25$ mm, $d = 0,25$ μ m) i plin nosioc: dušik.

Za potrebe ovog diplomskog rada korišten je kotlasti reaktor proizvođača DURAN® (Njemačka) volumena 250 mL, koji je izveden u obliku zatvorenog kotla s magnetskim miješalom. Na čepu se nalaze otvori za punjenje, pražnjenje i/ili uzimanje uzorka kao i otvor za miješalo (**Slika 5**).

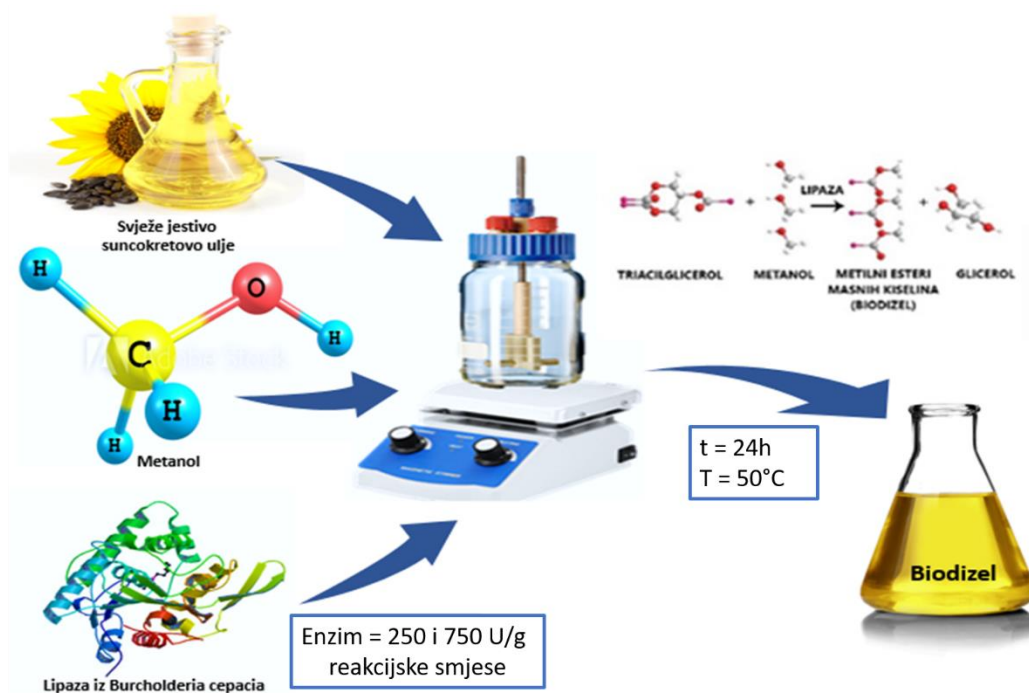


Slika 5 Reaktor korišten u istraživanju

3.3. METODE

3.3.1. Sinteza biodizela

Sinteza biodizela je provedena u kotlastom reaktoru ($V=250$ mL) s kontinuiranim miješanjem pri 850 o/min u vodenoj kupelji pri temperaturi od 50 °C (**Slika 6**). Sinteza provedena u laboratoriju prikazana je na **Slici 7**. Reakcijska smjesa sadržavala je 163,63 g svježeg suncokretovog ulja, 20,35 g metanola (molarni omjer ulja i metanola je bio 1:3,4) i 16,36 g lipaze pripremljene u puferu različitog sastava i pH vrijednosti. Lipaza pripremljena u puferu dodana je u 10 %-tnom udjelu na masu ulja u reakcijskoj smjesi. Otopine lipaza u fosfatnom i Britton-Robinsonovom puferu su pripremljene kako bi odgovarale željenoj aktivnosti po gramu reakcijske smjese (250 i 750 U/g). Reakcija transesterifikacije započela je dodavanjem otopine enzima pripremljenog u puferu, nakon što se reakcijska smjesa koja se sastojala od ulja i metanola homogenizirala i postigla jednoliku željenu temperaturu (50 °C) tj. optimalnu temperaturu za aktivnost lipaze *B. cepacia*. Sinteza je provedena u trajanju od 24 h. Uzorci za određivanje metilnih estera masnih kiselina (FAME) su uzimani tijekom sinteze nakon 1, 2, 3, 6, 12 i 24 h, filtrirani kroz filter za šprice (PTFE, veličina pora: 0.45 μ m, *i.d.* = 25 mm), centrifugirani na 2100 o/min 5 minuta (**Slika 8**) i onda razrijeđeni s *n*-heptanom uz faktor razrjeđenja 100 prije određivanja FAME.



Slika 6 Grafički sažetak procesa proizvodnje biodizela



Slika 7 Sinteza biodizela



Slika 8 Razlika centrifugiranog i necentrifugiranog uzorka

3.3.2. Analiza metilnih estera masnih kiselina

Analiza FAME je provedena na plinskom kromatografu Shimadzu GC-2010 Plus, koji je opremljen s plameno-ionizacijskim detektorom (eng. Flame Ionisation Detector, FID) s pripadajućom SH-Rtx-Wax kapilarnom kolonom (30 m, 0.25 mm *i.d.* i 0.25 μm debljinom filma stacionarne faze). Dušik, korišten kao plin nosioc, tekao je konstantnom linearnom brzinom od 1,33 ml/min. Injektor je podešen na 250 ° C, uz omjer razdvajanja 1:50, a volumen

injektiranja bio je 2 μ l. Početna temperatura kolone od 120 °C održavala se 5 minuta, a zatim se postupno povećavala za 5 °C/min dok se konačna temperatura od 220 °C održavala 17 minuta. Temperatura plameno-ionizacijskog detektora postavljena je na 300 °C. Identifikacija odvojenih FAME postignuta je na temelju usporedbe vremena zadržavanja s onima certificiranog referentnog standarda (Supelco F.A.M.E. Mix, C4-C24, SAD) analiziranog pod istim uvjetima. Rezultati su izraženi kao postotak identificirane masne kiseline u odnosu na ukupne masne kiseline (%).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog diplomskog rada bio je provesti enzimsku sintezu biodizela iz svježeg suncokretovog ulja i metanola u omjeru 1:3,4 i to pomoću Amano lipaze porijeklom iz bakterije *Burkholderia cepacia* pripremljene u dva pufera. Fosfatni pufer je bio koncentracije 200 mmol/L pH 7 i 8 dok je univerzalni Britton-Robinsonov pufer bio koncentracije 40 mmol/L i 200 mmol/L uz pH 10. Osim različitih koncentracija pufera i različitih vrijednosti pH, tijekom eksperimenata mijenjala se je i aktivnost lipaze izražena po masi reakcijske smjese (U/g). Lipaza je pripremljena u puferima te dodana u reakcijsku smjesu u 10 % udjelu obzirom na masu ulja pri čemu je koncentracija lipaze bila 250 i 750 U/g reakcijske smjese. Utjecaj koncentracije i pH vrijednosti pufera te aktivnost lipaze na udio metilnih estera masnih kiselina u sirovom biodizelu praćen je tijekom vremena tako što su uzorci uzimani tijekom sinteze nakon 1, 2, 3, 6, 12 i 24 sata. Nakon provedenih sinteza na temelju analize metilnih estera masnih kiselina, a sukladno zahtjevima za kvalitetu biodizela propisanih normom EN 14214:2012/A2:2019 (2019) zaključeno je koji uvjeti sinteze su se pokazali kao najoptimalniji. Pored provedbe enzimске sinteze biodizela, cilj ovog diplomskog rada bio je i procijeniti energetska efikasnost enzimске sinteze biodizela koja je izvedena na temelju izračuna.

Rezultati su prikazani u tablicama i dijagramima te uspoređeni s rezultatima objavljenim u znanstvenim radovima.

4.1. UDIO METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA U SIROVOM BIODIZELU

Profil masnih kiselina sadržanih u suncokretovom ulju iz rada Dorni i sur. (2018) poklapa se s profilom nastalih FAME u okviru ovog diplomskog rada. Rezultati pokazuju da je najveći prinos FAME nastao iz nezasićenih dugolančanih masnih kiselina C18:2, nakon kojih slijede C18:1 (**Tablica 1 i 2**).

Tablica 1 prikazuje profil metilnih estera masnih kiselina kao i njihov konačni udio u sirovom biodizelu tijekom i nakon enzimске sinteze biodizela gdje je kao pufer korišten 200 mmol/L fosfatni pufer pH 7 i pH 8 uz aktivnost lipaze od 250 i 750 U/g reakcijske smjese. Glavni razlog zbog kojeg je korišten fosfatni pufer različitih pH vrijednosti je u tome što je optimalni pH za lipazu iz *B. cepacia* koji navodi proizvođač 7 dok je u preliminarnim istraživanjima nađeno da je optimalni pH 8. Iz **Tablice 1** jasno je vidljivo da sinteza biodizela pri pH 8 daje bolje rezultate u odnosu na sintezu koja je provedena s lipazom pripremljenom u fosfatnom puferu pH 7.

Ipak, neovisno o pH pufera korištenom u sintezi, vidljivo je da je prinos FAME veći od 92 % već nakon prvog sata sinteze, a čak više od 99 % kada je korišten fosfatni pufer pH 8. Povećanje koncentracije lipaze u reakcijsko smjesi pokazala se negativnom u smislu udjela nastalih metilnih estera masnih kiselina, što je vidljivo iz **Tablice 1**, a što je u korelaciji s rezultatima koje su objavili Chattopadhyay i sur. (2011). Veći udio FAME je zabilježen u slučaju kada je aktivnost lipaze bila 250 U/g reakcijske smjese nego 750 U/g reakcijske smjese pri pH 7 fosfatnog pufera. Isto se može uočiti i uz fosfatni pufer pH 8 iako ta razlika nije toliko izražena koliko uz fosfatni pufer pH 7. Naposljetku se može zaključiti da je 1 sat sinteze biodizela iz suncokretovog ulja dovoljan da se proizvede više od 99 % FAME s *Burkholderia cepacia* lipazom aktivnosti 250 U/g reakcijske smjese pri 50 °C uz fosfatni pufer pH 8.

Tablica 1 Profil i konačni udio FAME u sirovom biodizelu kao funkcija koncentracije i pH fosfatnog pufera tijekom sinteze biodizela iz suncokretovog ulja pri 50 °C uz *B. cepacia* lipazu

| Aktivnost lipaze [U/g] | Pufer | Vrijeme [h] | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C20:0 | C22:0 | C22:2 | Ukupni udio FAME (%) |
|------------------------|--------------------------------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|
| 750 | 200 mmol/L fosfatni pufer pH 7 | 1 | 10,30 | 0,17 | 2,25 | 19,80 | 59,31 | 0,04 | 0,08 | 0,89 | 92,8 |
| | | 2 | 11,03 | 0,12 | 2,18 | 17,76 | 60,21 | - | 0,09 | 0,94 | 92,3 |
| | | 3 | 11,68 | - | 2,18 | 15,62 | 59,72 | - | - | 1,43 | 90,6 |
| | | 6 | 12,37 | - | 2,27 | 14,90 | 59,68 | - | - | 1,43 | 90,6 |
| | | 12 | 11,81 | - | 2,69 | 15,06 | 54,52 | - | - | 2,77 | 86,9 |
| | | 24 | 12,24 | - | 2,61 | 14,46 | 55,09 | - | - | 2,81 | 87,2 |
| 250 | | 1 | 8,59 | 0,30 | 2,21 | 24,93 | 59,98 | 0,07 | 0,08 | 0,49 | 96,7 |
| | | 2 | 9,71 | 0,21 | 2,01 | 21,71 | 62,58 | - | 0,09 | 0,55 | 96,9 |
| | | 3 | 10,20 | 0,22 | 1,98 | 20,43 | 63,20 | - | 0,07 | 0,59 | 96,7 |
| | | 6 | 10,84 | 0,19 | 2,22 | 18,94 | 63,19 | - | 0,07 | 0,77 | 96,2 |
| | | 12 | 10,78 | 0,17 | 2,61 | 19,23 | 61,95 | - | 0,06 | 0,76 | 95,6 |
| | | 24 | 9,71 | 0,41 | 2,73 | 22,08 | 60,42 | 0,07 | 0,27 | 0,41 | 96,1 |
| 750 | 200 mmol/L fosfatni pufer pH 8 | 1 | 7,46 | 0,11 | 2,94 | 27,76 | 59,90 | 0,08 | 0,35 | 0,54 | 99,1 |
| | | 2 | 8,17 | 0,12 | 3,07 | 27,77 | 59,03 | 0,10 | 0,30 | 0,51 | 99,1 |
| | | 3 | 8,94 | 0,13 | 2,96 | 26,70 | 59,14 | 0,12 | - | 0,64 | 98,6 |
| | | 6 | 9,63 | 0,14 | 2,37 | 23,61 | 62,22 | - | - | 0,97 | 98,9 |
| | | 24 | 13,67 | - | 2,89 | 16,60 | 62,53 | - | - | 4,31 | 100,0 |
| 250 | | 1 | 9,19 | 0,14 | 2,37 | 24,62 | 62,20 | - | - | 0,65 | 99,2 |
| | | 2 | 10,09 | 0,14 | 2,35 | 22,26 | 63,63 | - | - | 0,91 | 99,4 |
| | | 3 | 10,60 | - | 2,23 | 21,18 | 64,72 | - | - | 1,13 | 99,9 |
| | | 6 | 12,09 | - | 2,31 | 16,73 | 64,58 | - | - | 4,29 | 100,0 |
| | | 24 | 14,88 | - | 3,12 | 16,05 | 61,63 | - | - | 4,33 | 100,0 |

U **Tablici 2** prikazani su rezultati određivanja udjela FAME tijekom enzimske sinteze biodizela s lipazom iz *B. cepacia* uz dvije različite aktivnosti, 250 i 750 U/g reakcijske smjese, pri čemu je kao pufer korišten univerzalni pufer po Britton – Robinsonu pH 10. Koncentracija pufera bila je 40 i 200 mmol/L. Povećana koncentracija pufera rezultirala je povećanim udjelom metilnih estera masnih kiselina bez obzira na aktivnost lipaze. Više od 99 % FAME je postignuto kada je korišten 200 mmol/L pufer po Britton – Robinsonu, dok je korištenje 40 mmol/L koncentracije pufera rezultiralo 94 do 97 %-tnim udjelom FAME u sirovom biodizelu. Iz rezultata prikazanih u Tablici 2, može se zaključiti da je koncentracija od 40 mmol/L Britton – Robinsonovog pufera nedovoljna kako bi se održavao odgovarajući pH reakcijske smjese obzirom na to da se tijekom reakcije transesterifikacije pH reakcijske smjese pomiče ka kiselom području (Vipin i sur., 2016). Za razliku od fosfatnog pufera, kod Britton – Robinsonovog pufera utjecaj aktivnosti lipaze nije zabilježen na konačni udio FAME u sirovom biodizelu. Naposljetku se može zaključiti da je nakon 1 sata provođenja enzimske sinteze biodizela s *B. cepacia* lipazom aktivnosti od 250 U/g reakcijske smjese moguće postići 99 %-tni udio FAME u sirovom biodizelu korištenjem Britton – Robinsonovog pufera koncentracije 200 mmol/L pH 10 na 50 °C.

Tablica 2 Profil i konačni udio FAME u sirovom biodizelu kao funkcija koncentracije i pH Britton – Robinsonovog pufera tijekom sinteze biodizela iz suncokretovog ulja pri 50 °C uz *B. cepacia* lipazu

| Aktivnost lipaze [U/g] | Pufer | Vrijeme [h] | C16:0 | C16:1 | C18:0 | C18:1 | C18:2 | C20:0 | C22:0 | C22:2 | Ukupni udio FAME (%) |
|------------------------|---|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|
| 750 | 40 mmol/L Britton-Robinsonov pufer pH 10 | 1 | 8,27 | 0,32 | 3,26 | 26,19 | 55,01 | 0,17 | 0,37 | 0,50 | 94,1 |
| | | 2 | 8,28 | 0,54 | 3,86 | 26,68 | 54,57 | 0,14 | 0,62 | 0,38 | 95,1 |
| | | 3 | 7,91 | 0,52 | 3,71 | 26,19 | 55,99 | 0,15 | 0,67 | 0,34 | 95,5 |
| | | 6 | 7,63 | 1,60 | 3,44 | 26,88 | 56,62 | 0,15 | 0,65 | 0,28 | 97,3 |
| | | 12 | 6,58 | - | 2,89 | 27,36 | 57,82 | 0,14 | 0,63 | 0,33 | 95,8 |
| | | 24 | 6,34 | - | 2,83 | 27,48 | 58,06 | 0,14 | 0,64 | 0,36 | 95,9 |
| 250 | | 1 | 8,85 | 0,33 | 2,34 | 25,23 | 58,00 | 0,07 | 0,07 | 0,52 | 95,4 |
| | | 2 | 9,20 | 0,40 | 3,08 | 26,98 | 55,68 | 0,11 | 0,26 | 0,39 | 96,1 |
| | | 3 | 9,31 | 0,47 | 3,54 | 26,96 | 55,00 | 0,14 | 0,36 | 0,36 | 96,1 |
| | | 6 | 8,74 | 0,37 | 3,90 | 27,66 | 55,29 | 0,13 | 0,55 | 0,28 | 96,9 |
| | | 12 | 7,97 | 0,12 | 3,62 | 27,16 | 56,56 | 0,14 | 0,61 | 0,26 | 96,4 |
| | | 24 | 7,08 | 0,68 | 3,08 | 27,28 | 57,35 | 0,13 | 0,59 | 0,27 | 96,5 |
| 750 | 200 mmol/L Britton-Robinsonov pufer pH 10 | 1 | 7,76 | 0,11 | 3,60 | 26,96 | 59,53 | 0,16 | 0,69 | 0,77 | 99,6 |
| | | 2 | 8,68 | 0,12 | 4,05 | 27,10 | 57,55 | 0,17 | 0,63 | 0,79 | 99,1 |
| | | 3 | 8,68 | 0,12 | 4,09 | 27,18 | 57,65 | 0,17 | 0,63 | 0,68 | 99,2 |
| | | 6 | 7,81 | 0,09 | 3,57 | 27,07 | 59,25 | 0,12 | 0,59 | 1,09 | 99,6 |
| | | 24 | 6,33 | 0,10 | 2,94 | 28,99 | 59,79 | 0,12 | 0,67 | 0,63 | 99,6 |
| 250 | | 1 | 8,57 | 0,11 | 3,80 | 31,00 | 54,44 | 0,15 | 0,56 | 0,65 | 99,3 |
| | | 2 | 8,51 | 0,11 | 4,11 | 30,91 | 54,26 | 0,16 | 0,66 | 0,58 | 99,3 |
| | | 3 | 8,66 | 0,11 | 4,13 | 30,78 | 54,26 | 0,16 | 0,65 | 0,58 | 99,3 |
| | | 6 | 8,04 | 0,10 | 3,97 | 30,95 | 55,19 | 0,15 | 0,68 | 0,44 | 99,5 |
| | | 24 | 6,50 | 0,09 | 3,12 | 31,26 | 57,24 | 0,13 | 0,71 | 0,49 | 99,5 |

4.2. ENERGETSKA EFIKASNOST PROCESA SINTEZE BIODIZELA

U svrhu procjene energetske efikasnosti enzimske sinteze biodizela te usporedbe s kemijskom sintezom, napravljen je izračun iskorištenja koji se temelji na stehiometrijskim odnosima reakcije transesterifikacije. Obzirom na to da se najčešće koristi repičino, sojino i suncokretovo ulje iz literature su preuzeti podaci (Sinčić, 2014b) prema kojima se količina nastalih metilnih estera masnih kiselina, koje se nalaze u sastavu sirovine, vrlo malo međusobno razlikuju. No bez obzira na to za proračun energetske efikasnosti i usporedbu rezultata, enzimska i kemijska sinteza, korišteni su podaci za svaku sirovinu posebno.

Iskorištenje

U slučaju 100 % iskorištenja teorijske količine reaktanata i produkata pri kemijski kataliziranoj reakciji transesterifikacije slijede iz **Tablice 3**.

Tablica 3 Prikaz iskorištenja sinteze biodizela na bazi 1000 kg sirovine (Sinčić, 2014b)

| Sirovina | Metanol (kg) | Biodizel (kg) | Glicerol (kg) |
|-------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| Repičino ulje | 109,36 | 1004,59 | 104,77 |
| Sojino ulje | 110,29 | 1004,63 | 105,66 |
| Suncokretovo ulje | 109,68 | 1004,60 | 105,08 |

Reakcijska toplina

Za izračun topline transesterifikacije, zbog nedostatka drugih podataka, korišteni su podaci o toplinama sagorijevanja sudionika reakcije i topline nastajanja metanola i glicerola uz pretpostavku da se ulje sastoji samo od jednog sastojka uzevši u obzir samo onaj s najvećim udjelom u pojedinom ulju. Za repičino ulje to je glicerol-trioleat, a za sojino i suncokretovo ulje to je glicerol-trilinoleat. Sukladno izračunu prikazanom u radu Sinčić (2014c), za glicerol-trioleat, vrijednosti utrošene topline u procesu transesterifikacije po masi produkta (1000 kg biodizela), tj. ukupna toplina za zagrijavanje reakcijske smjese, iznose 100 722,3 kJ/1000 kg za repičino ulje i 118 082,1 kJ/1000 kg za sojino ulje.

Za suncokretovo ulje ukupna toplina za zagrijavanje reakcijske smjese po masi produkta gdje je baza 1000 kg biodizela računa se iz **jednadžbe (2)** pri čemu je masa ulja 995,4 kg (sukladno podacima iz **Tablice 3**) za prvi stupanj transesterifikacije

$$Q_{SU} = 994,5 \text{ kg} \cdot 1,833 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}} \cdot 40 \text{ K} = 72\,982,7 \text{ kJ}/1000 \text{ kg produkta}$$

Obzirom da se kod kemijski katalizirane reakcije katalizator priprema u metanolu, u slučaju kemijski katalizirane reakcije s NaOH u ukupnoj količini topline koju je potrebno osigurati za kemijski kataliziranju reakciju transesterifikacije potrebno je uračunati i toplinu potrebnu za pripremu katalizatora. Količina topline potrebna za pripremu katalizatora, prema Sinčiću, (2014c) iznosi 25 217,5 kJ/t produkta. Nadalje, kemijski katalizirana reakcija provodi se u dva stupnja pri čemu je toplina potrebna za drugi stupanj transesterifikacije stvarno količina topline koja se troši samo na zagrijavanje dodatnih količina katalizatora i metanola i iznosi 2 522,1 kJ/t produkta. Dakle, ukupno potrebna količina topline za zagrijavanje reakcijske smjese na potrebnu temperaturu (60 °C) za reakciju transesterifikacije suncokretovog ulja u slučaju kemijski katalizirane reakcije s NaOH, iznosila bi 100 722,33 kJ/1000 kg biodizela.

Izračunata ukupno potrebna toplina za provedbu kemijski katalizirane reakcije transesterifikacije, nadalje se može umanjiti za oslobođenu toplinu tijekom pripreme katalizatora kao i transesterifikacije i prema Sinčiću (2014c) u konačnici proizlazi da je stvarna količina topline koja je potrebna za zagrijavanje reakcijske smjese na temperaturu provođenja sinteze katalizirane natrijevim hidroksidom, puno manja. Vrijednosti su prikazane u **Tablici 4**.

Tablica 4 Prikaz toplina u procesu transesterifikacije po masi biodizela (modificirano prema Sinčić, 2014c)

| Procesna jedinica, proces | | Toplina, (kJ/t) | | |
|-----------------------------------|---------------------|-----------------|-------------|-------------------|
| | | Repičino ulje | Sojino ulje | Suncokretovo ulje |
| Prvi stupanj transesterifikacije | | 98 200,2 | 115 560 | 98 200,2 |
| Drugi stupanj transesterifikacije | | 2 522,1 | 2 522,1 | 2 522,1 |
| Ukupno potrebna energija | | 100 722,1 | 118 082,1 | 100 722,1 |
| Razvijena toplina | Otapanje metoksida | 33 972,2 | 33 972,2 | 33 972,2 |
| | Transesterifikacija | 26 244 | 26 244 | 26 244 |
| Stvarno potrebna energija | | 40 506,1 | 57 866,1 | 40 506,1 |

Sukladno navedenom, po istom principu se može izračunati ukupno potrebna količina topline za enzimski kataliziranu reakciju transesterifikacije suncokretovog ulja do biodizela. U slučaju enzimski katalizirane reakcije transesterifikacije ukupno potrebna količina topline za zagrijavanje reakcijske smjese odgovara stvarno potrebnoj količini topline jer nema dodatne pripreme katalizatora (lipaze) u metanolu i reakcija se odvija u jednom stupnju. Ona se izračunava prema **jednadžbi (3)**

$$Q_{SU} = 995,4 \text{ kg} \cdot 1,833 \frac{\text{kJ}}{\text{kgK}} \cdot 30 \text{ K} = 54 737,04 \text{ kJ}/1000 \text{ kg produkta} \quad (3)$$

Uspoređujući dobivenu vrijednosti za stvarno potrebnu toplinu za zagrijavanje reakcijske smjese na temperaturu reakcije za suncokretovo ulje u slučaju kemijski katalizirane reakcije transesterifikacije (40 506,1 kJ/t biodizela) i enzimski katalizirane reakcije (28 493,04 kJ/t biodizela) koja je korigirana samo za toplinu koja se oslobodi tijekom transesterifikacije može se zaključiti da za enzimsku sintezu treba utrošiti manje topline što je bilo i za očekivati obzirom da je opće poznato da se enzimске reakcije, općenito, odvijaju u blažim reakcijskim uvjetima i manje energetski zahtjevnim. Međutim, za precizniji izračun potrebno je provesti detaljnija mjerenja i izračune temeljem toga što eksperimentalno dokazano (Sinčić, 2014c) da se u reaktorima na račun egzotermne reakcije temperatura može podići za čak 12,4 °C.

Energetska efikasnost

Energetska efikasnost procesa izračunava se preko **jednadžbe (1)** kao omjer toplinske energije koja je utrošena za provedbu procesa u odnosu na energiju koju stvaramo takvim procesom. Kod, općenito, sinteze biodizela stvorenu energiju predstavlja nastali biodizel te će se u okviru ovoga izračuna energetske efikasnosti enzimske sinteze biodizela uzeti u obzir energija koja se proizvede po jedinici mase sintetiziranog produkta. Kako je energetska vrijednost biodizela manja od energetske vrijednosti fosilnog biodizela, tj. 1,08 kg biodizela odgovara sadržaju energije 1 kg fosilnog dizela, proizlazi relacija

$$1 \text{ kg biodizela} = 0,926 \text{ kg fosilnog dizela}$$

Dakle, toplina koju sadrži 1 kg fosilnog dizela od 35,9 MJ odgovara 33,2 MJ/kg biodizela. Točnijim izračunom proizlazi da toplina koja se dobije reakcijom transesterifikacije po 1 kg biodizela iznosi 33 243,4 kJ. Ukoliko se, iz prethodnog izračuna, stvarno potrebna količina topline za enzimsku sintezu biodizela i toplina koja se dobije po 1 kg biodizela stave u omjer prema **jednadžbi (1)** može se procijeniti energetska efikasnost enzimske sinteze biodizela kako slijedi:

$$EROEI = \frac{33\,243,4 \text{ J/kg}}{28\,493,04 \text{ J/kg}} = 1,16$$

Prema istoj jednadžbi izračunate su energetske efikasnosti i za kemijski katalizirane transesterifikacije iz repičinog, sojinog i suncokretovog ulja i prikazane u **Tablici 5**.

Tablica 5 Prikaz rezultata energetske efikasnosti procesa sinteze biodizela iz različitih sirovina obzirom na korišteni katalizator

| Sirovina | Energetska efikasnost (EROEI) | |
|-------------------|-------------------------------|-------------------|
| | Kemijska kataliza | Enzimski kataliza |
| Repičino ulje | 0,82 | - |
| Sojino ulje | 0,57 | - |
| Suncokretovo ulje | 0,82 | 1,16 |

Iz prikazanih rezultata (**Tablica 5**) jasno je vidljivo da je energetska efikasna jedino enzimski katalizirana transesterifikacija (EROEI > 1), uz omjer dobivene i utrošene toplinske energije od 1,16. Najviše energetska zahtjevna sinteza je iz sojinog ulja.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata u ovom diplomskom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- ✓ Jedan sat sinteze biodizela iz suncokretovog ulja dovoljan je da se proizvede više od 99 % metilnih estera masnih kiselina s *B. cepacia* lipazom aktivnosti 250 U/g reakcijske smjese pri 50 °C uz koncentraciju fosfatnog pufera od 200 mmol/L pH 8.
- ✓ Nakon 1 sata provođenja enzimske sinteze biodizela s *B. cepacia* lipazom i aktivnosti od 250 U/g reakcijske smjese moguće je postići 99 %-tni udio FAME u sirovom biodizelu korištenjem Britton – Robinsonovog pufera koncentracije 200 mmol/L pH 10 na 50 °C.
- ✓ Optimalni uvjeti za provedbu enzimske sinteze biodizela (udio metilnih estera masnih kiselina u sirovom biodizelu veći od 99 %) uz *B. cepacia* lipazu tijekom prvog sata sinteze su 50 °C, molarni omjer ulja i metanola 1:3,4, aktivnost lipaze od 250 U/g reakcijske smjese uz 200 mmol/L Britton-Robinsonov pufer pH 10.
- ✓ Energetski efikasna je jedino enzimski katalizirana transesterifikacija (EROEI > 1), uz omjer dobivene i utrošene toplinske energije od 1,16. Najviše energetski zahtjevna sinteza je iz sojinog ulja.

6. LITERATURA

- Al-Zuhair S: Biochemical catalytic production of biodiesel. U *Handbook of Biofuels Production*, str. 134-159. Woodhead Publishing, UAE, 2016.
- Brondani M, Hoffman R, Mayer FD, Schmidt Kleinert J: Environmental and energy analysis of biodiesel production in Rio Grande do Sul, Brazil. *Clean Tech Environ Policy* 17: 129-143, 2015.
- Budžaki S, Miljić G: Otpadno ulje i nusproizvodi prehrambene industrije kao sirovine za proizvodnju biodizela. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije*, str. 1-13. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2017.
- Budžaki S, Miljić G, Tišma M, Sundaram S, Hessel V: Is there a future for enzymatic biodiesel industrial production in microreactors? *Applied Energy* 201: 124-134, 2017.
- Baadhe RR, Potumarthi R, Gupta VK: Lipase- Catalysed Biodiesel Production: Technical Challenges, U *Bioenergy Research: Advances and Applications*, str. 119-129, 2014.
- Chattopadhyay S, Karemore A, Das S, Deysarkar A, Sen R: Biocatalytic production of biodiesel from cottonseed oil: standardization of process parameters and comparison of fuel characteristics. *Appl Energy*, 88:1251-1256, 2011.
- Cvengroš J, Povžanec F: Production and treatment of rapeseed oil methyl esters as alternative fuels for diesel engines, *Bioresource Technol.* 55:145, 1996.
- Dorni C, Sharma P, Saikia G, Longvah T: Fatty acid profile of edible oils and fats consumed in India. *Food Chem*, 238:9-15, 2018.
- EN 14214:2012/A2:2019 Automotive Fuels 2019 Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engines-Requirements and Test Methods. *Comité Européen de Normalisation*, 2011.
- Firrisa TM, van Duren I, Voinov A: Energy Efficiency for rapseed biodiesel production in different farming systemy. *Energy Efficiency* 7: 79-95, 2014.
- Fu Q, Song C, Kansha Y, Liu Y, Ishozuka M, Tsutsumi A: Energy saving in a biodiesel production process based on self-heat recuperation technology. *Chemical Engineering Journal*, 2014.

- Ghaly AE, Dave D, Brooks MS, Budge S: Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 6(2):54-76, 2010.
- Hall C, Balogh S, Murphy, D: What is the minimum EROI that a sustainable society must have? *Energies* 2(1): 25-47, 2009.
- Liu J, Yang Q, Li C: Towards efficient chemical synthesis via engineering enzyme catalysis in biomimetic nanoreactors. *Chem commun* 51(72):13731-13739, 2015.
- Lotero E, Goodwin JG, Bruce DA, Suwannakarn K, Liu Y, Lopez DE: The catalysis of biodiesel synthesis. *Catalysis* 19:42, 2006.
- Luyben WL: *Chemical reactor design and control*. Lehigh University, Bethlehem, Pennsylvania, 2007.
- NN 33/2011 Uredba o izmjenama Uredbe o kakvoći biogoriva. *Narodne novine*, 2011.
- Norjannah B, Ong HC, Masjuki HH, Juan JC, Chong WT: Enzymatic transesterification for biodiesel production: A comprehensive review. *RSC Advances* 6(65), 2016.
- Predojević Z: *Goriva iz biomase – bioetanol i biodizel*. Tehnološki fakultet Univerziteta Novom Sadu, Novi Sad, 2010.
- Sanchez, D.A., Tonetto, G.M., Ferreira, M.L. Burkholderia cepacia lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnology and bioengineering* 115(1): 6-24, 2018.
- Sinčić D: Industrijski procesi dobivanja biodizela. *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, 4(1-2):10-17, 2009.
- Sinčić D: Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela, I. Biogoriva, svojstva biodizela i osnove proizvodne tehnologije. *Kemija u industriji* 63:19-31, 2014a.
- Sinčić D: Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela, II. Svojstva reakcijskog produkta, kinetika procesa i bilance mase. *Kemija u industriji* 63:33-39, 2014b.
- Sinčić D: Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela, III. Bilance topline i nove tehnologije proizvodnje biodizela. *Kemija u industriji* 63:83-91, 2014c.

Sugihara A, Ueshima M, Shimada Y, Tsunasawa S, Tominaga Y: Purification and Characterization of a Novel Thermostable Lipase from *Pseudomonas cepacia*. *The Journal of Biochemistry* 112(5): 598-603, 1992.

Vipin VC, Sebastian J, Muraleedharan C, Santiago A: Enzymatic transesterification of rubber seed oil using *Rhizopus Oryzae* lipase. *Proc Technol*, 25:1014-1021, 2016.