

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Matea Bačić
Anabela Ljubić

**OPTIMIZACIJA INTEGRIRANOG PROCESA SINTEZE BIODIZELA I
EKSTRAKCIJE GLICEROLA EUTEKTIČKIM OTAPALIMA**

Zagreb, kolovoz 2020.

Ovaj rad smo izradile samostalno u laboratoriju Zavoda za reakcijsko inženjerstvo i katalizu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Bruna Zelića. Rad je predan na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.

Nomenklatura

Simboli

c	množinska koncentracija [mol L^{-1}]
I	iskorištenje [%]
T	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
V	volumen [mL]
$V.A.$	volumna aktivnost [U mL^{-1}]
w	maseni udio [%]

Grčka slova

γ	masena koncentracija [mg mL^{-1}]
η	efikasnost [%]

Kratice

B	biodizel
ChCl:EG	kolin klorid: etilen-glikol
ChCl:Gly	kolin klorid: glicerol
DES	eutektičko otapalo
FAME	metilni esteri masnih kiselina
G	glicerol
GC	plinska kromatografija
ost	ostatak
RSM	metodologija odzivnih površina
teor	teorijski
TG	trigliceridi

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio	3
2.1. Biodizel.....	3
2.2. Proizvodnja biodizela	4
2.2.1. Transesterifikacija	5
2.3. Enzimi.....	7
2.3.1. Enzim lipaza podrijetlom iz <i>Thermomyces lanuginosus</i>	8
2.4. Pročišćavanje biodizela	8
2.4.1. Eutektička otapala	10
2.4.2. Kapljevinska ekstrakcija glicerola eutektičkim otapalima.....	10
2.4.3. Eutektička otapala kao reakcijski mediji.....	12
2.5. Optimizacija procesa	13
2.5.1. Metoda odzivnih površina	13
2.5.2. Optimizacija integriranog procesa sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola eutektičkim otapalima	16
3. Eksperimentalni dio	17
3.1. Materijali	17
3.1.1. Kemikalije	17
3.1.2. Aparatura	18
3.1.3. Priprema otopina	18
3.2. Metode	19
3.2.1. Priprema eutektičkih otapala	19
3.2.2. Optimiranje procesa sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola	20
3.2.3. Integrirani proces proizvodnje i pročišćavanje biodizela u šaržnom sustavu	22
3.2.4. Ispitivanje utjecaja temperature na učinkovitost ekstrakcije glicerola.....	22
3.2.5. Mjerenje koncentracije metilnih estera masnih kiselina i glicerola plinskom kromatografijom	23

3.2.6.	Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije glicerola	24
3.2.7.	Mjerenje aktivnosti enzima lipaze.....	24
4.	Rezultati i rasprava.....	26
4.1.	Optimiranje procesa sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola.....	26
4.2.	Proizvodnja i pročišćavanje biodizela u šaržnom reaktoru	41
5.	Zaključak.....	43
6.	Zahvale.....	44
7.	Literatura.....	45
8.	Prilozi.....	49
	Sažetak	52
	Summary	53
	Životopis.....	54

1. Uvod

Kako bi se smanjilo prekomjerno iscrpljivanje zaliha fosilnih goriva i njihov negativan utjecaj na okoliš, sve se više istražuju ekološki prihvatljivija alternativna goriva.¹ Kao pogodna zamjena za fosilni dizel ističe se biodizel, odnosno smjesa metilnih estera masnih kiselina, čijim se izgaranjem znatno smanjuju emisije stakleničkih plinova i raznih nečistoća u odnosu na izgaranje čistog fosilnog dizela.² Korištenje biodizela kao komponente s udjelom od 7 % u smjesi s fosilnim dizelom (B7) postalo je uobičajeno u Europi, a u nekim modernim motorima s unutarnjim izgaranjem moguće je i korištenje čistog biodizela (B100).³ Također se u literaturi navodi da 60 % novih automobila te gotovo sva teretna vozila koriste biodizel u nekom od dvaju prethodno navedenih oblika.⁴ S obzirom na te podatke jasno je da je potrebno proizvesti znatne količine biodizela uz što nižu moguću cijenu kako bi njegova proizvodnja bila, osim ekološki, i ekonomski opravdana.⁵

Transesterifikacija biljnih ulja metanolom uz bazični katalizator u šaržnom reaktoru danas je najzastupljeniji industrijski postupak proizvodnje biodizela. Pri tome je potrebno i po nekoliko sati za postizanje značajnijeg iskorištenja te zbog toga ovaj proces nije dovoljno učinkovit, a posljedično je i cijena proizvodnje biodizela velika.⁶ Osim same sinteze, troškovima proizvodnje biodizela doprinose i procesi njegova pročišćavanja, odnosno uklanjanja glicerola koji se provode kako bi biodizel bio pogodan za upotrebu, odnosno kako bi mu sastav bio usklađen s odgovarajućim normama (Liquid petroleum products – Fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and heating applications – Requirements and test methods (EN 14214:2012+A2:2019)). Najčešće se pročišćavanje biodizela provodi pranjem vodom uz veliko opterećenje okoliša. U svrhu smanjenja proizvodnih troškova, provode se brojna istraživanja kako bi se navedeni postupci sinteze biodizela i njegova pročišćavanja zamijenili drugim, učinkovitijim i jeftinijim postupcima.¹

Pokazano je da se znatne uštede pri proizvodnji i pročišćavanju biodizela mogu postići primjenom enzima kao biokatalizatora u reakciji transesterifikacije te korištenjem eutektičkih otapala za pročišćavanje sintetiziranog biodizela. S obzirom na visoku cijenu enzima kao katalizatora potrebno je pronaći optimalne reakcijske uvjete kako bi taj proces bio ekonomičan i pogodan za primjenu u industriji.⁶ Također, smanjenju troškova proizvodnje biodizela može pridonijeti korištenje eutektičkog otapala, ne samo kao ekstrakcijskog medija, već i kao reakcijskog medija, što je zasada neistražen, no obećavajući pristup razvoju procesa proizvodnje biodizela pogotovo zbog dokazanog povoljnog utjecaja eutektičkih otapala na stabilnost enzima.³

U ovom radu provedena je optimizacija procesa transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja katalizirana komercijalnim enzimom lipaza uz integriranu ekstrakciju glicerola, odnosno uz integrirano pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom. U svrhu optimizacije korištena je metodologija odzivnih površina, a kao funkcija cilja analizirani su iskorištenje biodizela i učinkovitost ekstrakcije glicerola iz proizvedenog biodizela. Dva različita eutektička otapala korištena su kao reakcijski i ekstrakcijski medij kako bi se ocijenilo koje je od ovih dvaju otapala pogodnije za provedbu integriranog procesa. Također, za svako od korištenih eutektičkih otapala određene su optimalne vrijednosti udjela vode i omjera faza u sustavu (biodizel: eutektičko otapalo), kao i molarnog omjera komponenti koje čine eutektičko otapalo.

2. Teorijski dio

2.1. Biodizel

Svijet se suočava s vrlo ozbiljnom energetsom krizom iscrpljivanja fosilnih goriva i degradacijom okoliša. U razdoblju do 2020. godine ubrzana urbanizacija i industrijalizacija rezultirale su povećanjem potrošnje rezervi fosilnih goriva što je dovelo do naglog pada rezervi nafte.⁷ Rast potražnje energije i posljedično potražnje za fosilnim gorivima (konvencionalno gorivo) zajedno s rastućom brigom za okoliš potaknuli su istraživače na pronalaženje alternativnih goriva među kojima se ističu biogoriva, posebice biodizel i bioetanol. Biodizel se smatra alternativnim gorivom koje je netoksično te ga odlikuje niska emisija CO₂ u atmosferu u usporedbi s konvencionalnim dizelom. Biodizel se može proizvoditi i od jestivih i od nejestivih sirovina transesterifikacijom u prisutnosti alkohola i katalizatora.⁸ Američka norma ASTM D 6751 klasificira biodizel kao monoalkilni ester nižih alkohola i dugolančanih masnih kiselina iz ulja ili masti biljnog ili životinjskog podrijetla. Prisutnost zasićenih i nezasićenih alkilnih estera masnih kiselina utječe na sveukupna svojstva biodizelskog goriva. Duljina i razgranatost lanaca masnih estera te stupanj nezasićenosti ključne su strukturne značajke biodizela jer one određuju fizikalna i kemijska svojstva goriva. Presudan faktor o kojem ovise svojstva biljnih i životinjskih ulja te kvaliteta samog biodizela koji se iz njih proizvodi je udio pojedine masne kiseline u sirovini.⁵

Biodizel, bistra, jantarno žuta tekućina, koristi se čist (B100) ili po mogućnosti u smjesi (B5, B20) s fosilnim dizelom. Viskoznost biodizelskog goriva (BDF) je otprilike dvostruko veća od fosilnog dizela što rezultira boljim svojstvom podmazivanja. Danas se biodizel obično dodaje fosilnom dizelu u svrhu povećanja mazivosti čistog dizela s vrlo niskim udjelom sumpora (ULSD).⁹ Uz prethodno navedene (manji negativan utjecaj na okoliš u odnosu na fosilni dizel i mazivost), dodatne prednosti korištenja biodizela su biorazgradivost, netoksičnost, proizvodnja iz obnovljivih izvora, visoka točka vrelišta (iznad 120 °C) i smanjena emisija štetnih plinova. Također, biodizel u usporedbi s fosilnim dizelom karakteriziraju i neki nedostaci kao što su manja radna snaga motora (5 – 9 %) i veća potrošnja kisika pri izgaranju (7 – 10 %). Negativna strana korištenja biodizela očituje se još i kroz lošija fizikalno-kemijska svojstva na nižim temperaturama uzrokovana relativno visokom viskoznošću te lošiju termičku i oksidacijsku stabilnost kao posljedice prisutnosti nezasićenih veza.¹⁰

2.2. Proizvodnja biodizela

Zbog konkurentnosti jestivih ulja između hrane i industrijske uporabe kao biogoriva te visoke cijene jestivih ulja, posebice sojinog ulja, proizvodnja biodizela zahtijeva subvencije kako bi se osigurala njena ekonomska održivost. Jedan od glavnih razloga ove nekonkurentnosti biodizela su troškovi sirovina potrebnih za njegovu proizvodnju.¹¹ Glavna prepreka komercijalizaciji biodizela je cijena sirovina, koja čini 70 % proizvodnih troškova biodizela, odnosno tehnologije proizvodnje biodizela. Važni čimbenici procesa proizvodnje biodizela su dostupnost sirovina, vrsta i koncentracija katalizatora, molarni omjer ulje:alkohol, reakcijska temperatura, trajanje reakcije, intenzitet i brzina miješanja (kod šaržne proizvodnje) te sadržaj vode.¹² Glavno pitanje vezano uz proizvodnju biodizela je povezano s uporabom temeljnih sirovina, odnosno s postizanjem ravnoteže između korištenja ulja i masti kao izvora hrane te kao sirovina za proizvodnju goriva. U zadnje vrijeme intenzivirana su istraživanja povezana s razvojem biodizela koja prvenstveno obuhvaćaju razvoj sirovina, optimalan način proizvodnje, poboljšanje kvalitete i količine biodizela i ekonomiju bez ugljika. Prema izvještaju EASAC-a za 2012. godinu razlikuju se prva, druga i treća generacija biodizela, a ova podjela se prvenstveno temelji na podrijetlu sirovina za proizvodnju biodizela, dok biodizel četvrte generacije uključuje različite biološke alate koji se koriste za proizvodnju biodizela, a povezana istraživanja su još uvijek na razini temeljnih i bez primjene u industrijskoj proizvodnji. Najvažnije sirovine za proizvodnju biodizela po generacijama prikazane su u Tablici 1.¹³

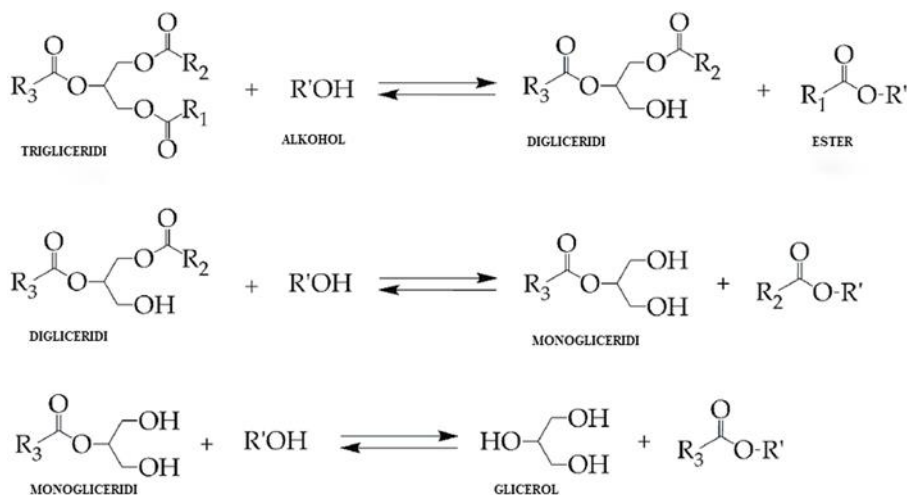
Tablica 1. Sirovine za proizvodnju biodizela različitih generacija¹³

Jestiva ulja (1. generacija)	Palmino
	Suncokretovo
	Sojino
	Kokosovo
Nejestiva ulja (2. generacija)	Sjeme pamuka
	Jatrofa
	Ulje neema
Otpadna ulja (3. generacija)	Otpadno jestivo ulje
	Piroliza biomase
	Mikroalge (<i>Botryococcus braunii</i>)
Biodizel dobiven solarnom energijom (4. generacija)	Fotobiološki solarni biodizel
	Elektrobiogoriva
	Sintetičke stanice

2.2.1. Transesterifikacija

Danas se biodizel proizvodi na nekoliko načina, a najčešći su procesi mikroemulzifikacije, pirolize i transesterifikacije pri čemu je potonji proces i najzastupljeniji.¹ Transesterifikacija je reverzibilna reakcija koja se odvija postupno, u tri koraka. Prvo se odvija pretvorba triglicerida prisutnih u ulju i/ili mastima do diglicerida, zatim slijedi pretvorba diglicerida u monogliceride, dok je posljednji korak pretvorba monoglicerida u glicerol (Slika 1). Za postizanje stehiometrijske količine reaktanata u procesu proizvodnje biodizela transesterifikacijom, potrebno je osigurati molarni omjer alkohola i ulja/masti od 3:1. Najčešće se alkohol dodaje u suvišku kako bi se ravnoteža reakcije transesterifikacije pomaknula u smjeru nastajanja produkta. Na kraju provedbe procesa transesterifikacije, u struji produkta se formiraju dva potpuno odvojena sloja: faza biodizela (gornji sloj) i faza bogata glicerolom (donji sloj).

Reakcija transesterifikacije se odvija u prisutnosti katalizatora, koji ubrzava reakciju te pomiče ravnotežu reakcije u desno, odnosno k povećanju količine željenog produkta. Primarni i sekundarni alifatski alkoholi koji imaju 1-8 ugljikovih atoma, posebice metanol i etanol, najučestaliji su alkoholi u proizvodnji biodizela transesterifikacijom. Metanol je više upotrebljavan kao reaktant zbog svojih boljih fizikalnih i kemijskih karakteristika, a uz to je jeftiniji i dostupniji na tržištu.¹⁴



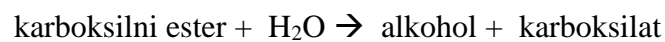
Slika 1. Shematski prikaz reakcije transesterifikacije

Procesi transesterifikacije dijele se na katalitičke i nekatalitičke pri čemu se nekatalitički provode pri visokim temperaturama i tlakovima (superkritičnim uvjetima), dok katalitički procesi obuhvaćaju procese homogene i heterogene katalize.¹ U procesima homogene katalize koriste se alkalni katalizatori kao što su natrijev (NaOH) i kalijev (KOH) hidroksid te kiseli katalizatori poput natrijevog (CH₃NaO) i kalijevog (CH₃KO) metoksida. U procesima heterogene katalize najčešći su čvrsti katalizatori, alkalnog (oksidi, karbonati, alkalijski i zemnoalkalijski spojevi) ili kiselog podrijetla (kiseli ionski izmjenjivači, zeoliti).¹⁴ Enzimski katalizirane reakcije također su vrsta heterogenih katalitičkih reakcija od kojih se kao primjer ističe korištenje enzima lipaze porijeklom iz gljive *Thermomyces lanuginosus*.⁶ U novije vrijeme sve se više koriste i nanokatalizatori, među kojima prevladavaju oksidi kao što su kalcijev oksid (CaO) i magnezijev oksid (MgO).

2.3. Enzimi

Enzimski transesterifikacija, posebice ona u kojoj se koristi enzim lipaza, u posljednjem je desetljeću privukla pozornost istraživača zbog sve većih problema povezanih s obradom biodizela proizvedenog kemijskom transesterifikacijom. Velike količine otpadnih voda te poteškoće u regeneraciji glicerola povećavaju ukupne proizvodne troškove procesa proizvodnje biodizela kemijskom transesterifikacijom, a predstavljaju i značajan negativan utjecaj na okoliš. Nasuprot tome, enzimski transesterifikacija svojim prednostima pokazuje velik potencijal kao ekološki prihvatljiv i učinkovit proces te je odlična alternativa kemijskoj transesterifikaciji.¹⁵

Najčešći enzimi koji se koriste za proizvodnju biodizela transesterifikacijom su lipaze. Lipaze hidrolizom pretvaraju trigliceride u glicerol i masne kiseline te su prema tome klasificirani kao hidrolaze.¹⁶ Općenito, karboksilesteraza ili karboksil-ester hidrolaza (EC 3.1.1.1) je enzim koji katalizira sljedeću kemijsku reakciju:



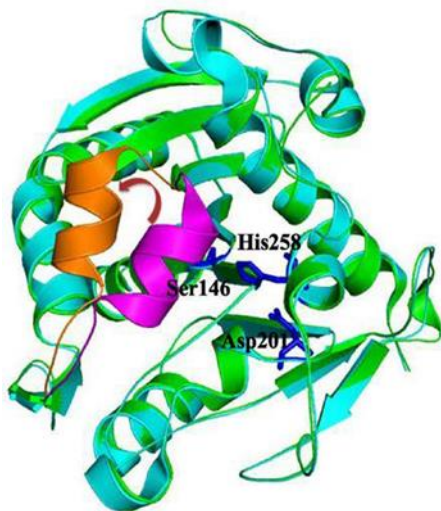
Usporedbom gornjeg predloška s primjenom lipaza u procesu proizvodnje biodizela, može se zaključiti da se lipaze mogu kategorizirati pod karboksilesteraze jer kataliziraju obje reakcije, hidrolizu i sintezu dugolančanih acilglicerola.¹⁷

Lipaze se često koriste zbog svojih različitih biokatalitičkih svojstava kao što su: stabilnost u raznim uvjetima i reakcijskim medijima, selektivnost prema različitim supstratima i kataliziranje različitih reakcija. Pri tome se upotrebom lipaza postiže visoka regio- ili enantioselektivnost i/ili specifičnost. Lipaze su enzimi koji se mogu naći u svim živim organizmima, a smatraju se interfacijalnim enzimima zbog sposobnosti adsorpcije u kapi ulja te djelovanja na površini kapi/medija uz korištenje konformacijske fleksibilnosti mobilnog polipeptidnog lanca koji se naziva "poklopcem". Prethodno opisano predstavlja takozvani mehanizam međufazne aktivacije sustava lipaze.¹⁸

Imobilizacija lipaza je u većini slučajeva nužna kako bi se olakšalo njihovo ponovno korištenje, odnosno kako se omogućila njihova ponovna uporaba. Pravilno dizajnirana strategija imobilizacije može se uz prethodno navedeno koristiti i za poboljšanje mnogih svojstva lipaza, poput aktivnosti, selektivnosti, specifičnosti, stabilnosti te otpornosti na inhibitore i kemikalije.¹⁹

2.3.1. Enzim lipaza podrijetlom iz *Thermomyces lanuginosus*

Enzim lipaza podrijetlom iz gljive *Thermomyces lanuginosus* (ranije poznata kao *Humicola lanuginosa*) je protein molekulske mase $31.700 \text{ g mol}^{-1}$ koji sadrži 269 aminokiselina. Struktura mu je sferičnog oblika s katalitičkom trijadom sastavljenom od serina (Ser146), histidina (His258) i asparaginske kiseline (Asp201) unutar hidrofobnog dijela koji je blokiran “poklopcem” načinjenim od 85 do 93 aminokiseline (Slika 2). Enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* (TLL) svoju aktivnost pokazuje i na temperaturama $55\text{-}60 \text{ }^\circ\text{C}$, dok inaktivna postaje pri temperaturama većim od $80 \text{ }^\circ\text{C}$. Produktivnost i termostabilnost enzima lipaze razlikuje se ovisno o njenom podrijetlu, no utvrđeno je da je TLL stabilna u pH području od 4 do 11 dok je njena optimalna aktivnost pri pH od 8,0. TLL je komercijalnog značaja, te ima potencijal uporabe u industriji za provedbu organskih sinteza, razdvajanje racemičnih smjesa, kemijske analize te hidrolizu masti i ulja. Zbog svojih atraktivnih i poželjnih svojstava, visoke aktivnosti i termostabilnosti TLL je našao široku primjenu u većini dostupnih reakcijskih medija, dvofaznim sustavima voda-organsko otapalo, reakcijskim medijima bez otapala, u ionskim kapljevinama, superkritičnim fluidima te u mikroemulzijama.²⁰



Slika 2. Grafički prikaz strukture enzima lipaze podrijetlom iz *Thermomyces lanuginosus*

2.4. Pročišćavanje biodizela

Prije nego što se primjeni kao gorivo, biodizel mora zadovoljiti parametre kvalitete propisane američkim standardom ASTM D 6751, odnosno europskim standardom EN 14214:2012+A2:2019.¹ Prema navedenom europskom standardu čistoća biodizela mora biti veća od 96,5 %, a udio glicerola manji od 0,02 %.^{1,21} S obzirom na to da je transesterifikacija najčešći način sinteze biodizela, njegovo je pročišćavanje neizbježan korak u procesu

proizvodnje jer biodizel nakon transesterifikacije uglavnom sadrži više od 3,7 % nečistoća kao što su neizreagirani reaktanti, katalizator, odnosno enzim, i sporedni produkti.¹ Pritom u najvećoj količini nastaje glicerol čije je prisustvo u biodizelu problematično ukoliko se takav biodizel koristi jer izaziva koroziju i začepljenje motora uslijed velike viskoznosti, kao i moguću emisiju otrovnog akroleina te je, prema tome, uklanjanje glicerola ključno za postizanje dobre kvalitete biodizela.²²

Za pročišćavanje biodizela trenutno se u industriji najčešće koristi metoda mokrog pranja, odnosno pranje vodom, a ovim postupkom se može dobiti biodizel vrlo visoke čistoće. S druge strane, pri tome može doći do gubitka biodizela, a također nastaje velika količina otpadnih voda što može uzrokovati visoke troškove i opterećenje okoliša (do 10 L otpadne vode po 1 L proizvedenog biodizela). Kako bi se to izbjeglo, razvijene su alternativne metode u kojima se umjesto vode za pročišćavanje biodizela koriste razni apsorbenzi, adsorbensi i otapala te ionski izmjenjivači na bazi smola. Nedostatak ovih metoda je otežana, a kod ionskih izmjenjivača čak i nemoguća regeneracija što ove procese često čini skupima i ekološki nepovoljnima.^{1,6} Skup ekološki prihvatljivijih metoda za pročišćavanje biodizela koji se sve više istražuje temelji se na korištenju membrana od raznih materijala koje su kemijski i termički stabilne te provedbi mikro-, ultra- i nano-filtracije, no ovi procesi su također povezani s visokim troškovima.¹

Pročišćavanje biodizela općenito je vrlo skup i kompliciran proces koji biodizelu znatno podiže cijenu zbog čega biodizel još uvijek ne može konkurirati fosilnom dizelu. Naime, prema literaturnim podacima²³, pročišćavanje biodizela, u ukupnoj cijeni procesa njegove proizvodnje, čini 60–80 % ukupnog troška. Iz tog je podatka vidljiva potreba razvoja učinkovitih i ekonomičnih procesa te pronalaženje novih i boljih metoda pročišćavanja kako bi se ukupni troškovi proizvodnje biodizela i s ovim povezana tržišna cijena biodizela smanjili.²³ Kao potencijalno rješenje, sve više pažnje privlače eutektička otapala (engl. *deep eutectic solvents*, DES) kao otapala za pročišćavanje biodizela u procesu kapljevinske ekstrakcije.⁶

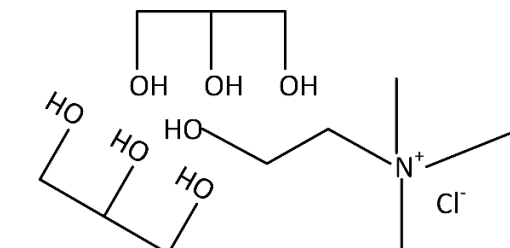
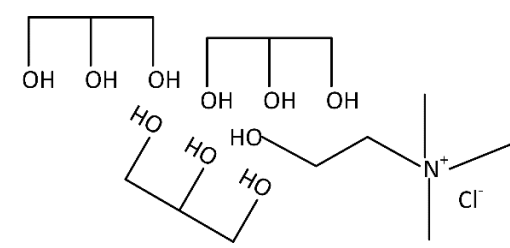
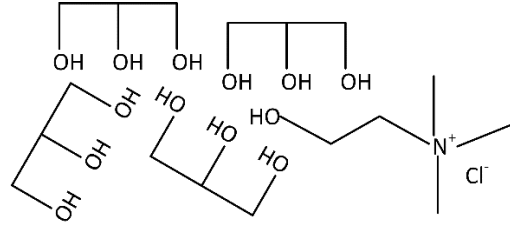
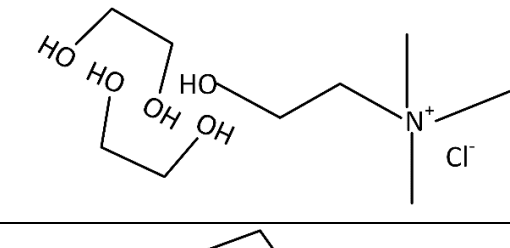
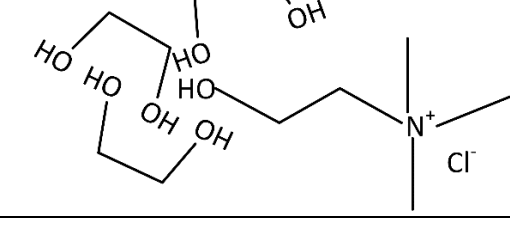
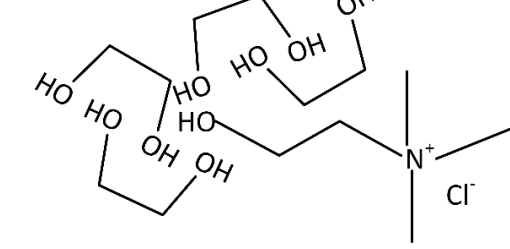
2.4.1. Eutektička otapala

Eutektička otapala su binarne ili ternarne smjese koje se sastoje od donora i akceptora vodikove veze pri čemu je akceptor uglavnom kvaterna amonijeva sol. Formiranjem vodikove veze dobiva se najčešće kapljevita smjesa čije je talište niže u odnosu na talište svake pojedine komponente.²⁴ Eutektička otapala su posebno atraktivna zbog svojstava kao što su stabilnost, biorazgradivost, netoksičnost i niska hlapivost kojima se uklapaju u koncept *zelene kemije* te se prema tome smatraju *zelenim otapalima*, odnosno ekološki prihvatljivijim otapalima od konvencionalnih organskih otapala. Još jedna prednost eutektičkih otapala je ta da su njegove sastavnice jeftine, lako dostupne i, također, netoksične komponente kao što su primjerice kvaterna amonijeva sol kolin klorid i prirodno dobiveni donori vodikovih veza poput raznih šećera, alkohola i amida.²⁵ Proizvodnja eutektičkih otapala vrlo je jednostavna i jeftina, a važno je istaknuti i da se svojstva eutektičkih otapala mogu podešavati različitim kombinacijama donora i akceptora vodikove veze što ih čini pogodnima za upotrebu u mnogim industrijskim i istraživačkim područjima.²⁶

2.4.2. Kapljevinska ekstrakcija glicerola eutektičkim otapalima

Kao što je prethodno spomenuto, jedna od alternativnih metoda koja privlači sve više pažnje u procesu pročišćavanja biodizela, odnosno uklanjanju glicerola iz biodizela nakon procesa transesterifikacije je kapljevinska ekstrakcija pomoću eutektičkih otapala.²⁷ Za tu svrhu najviše se koriste eutektička otapala na bazi kolin klorida uz glicerol ili etilen glikol kao donore vodikove veze. Razlog tome je njihova učinkovitost pri uklanjanju glicerola te mali omjer eutektičkog otapala i biodizela koji je pri tome potreban.²¹ Osim što učinkovito uklanjaju glicerol, u brojnim istraživanjima pokazano je da uspješno uklanjaju i ostala onečišćenja (neizreagirane reaktante i katalizator) prisutna u proizvedenom biodizelu.²⁷ Strukture raznih eutektičkih otapala koja se mogu pripremiti promjenama molarnih omjera kolin klorida i donora vodikove veze prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Strukture eutektičkih otapala s različitim donorima vodikove veze i molarnim omjerima s kolin kloridom

Ime	Skraćenica	Struktura
kolin klorid: glicerol (1:2)	ChCl:Gly2	
kolin klorid: glicerol (1:3)	ChCl:Gly3	
kolin klorid: glicerol (1:4)	ChCl:Gly4	
kolin klorid: etilen glikol (1: 2)	ChCl:EG2	
kolin klorid: etilen glikol (1: 3)	ChCl:EG3	
kolin klorid: etilen glikol (1: 4)	ChCl:EG4	

Visoku učinkovitost ekstrakcije glicerola iz biodizela pri upotrebi eutektičkih otapala koja sadrže etilen glikol dokazali su Šalić i sur.⁶, budući da je udio glicerola nakon takvog pročišćavanja bio manji od normama propisanih 0,02 %. Također, Homan i sur.²⁸ ispitali su mogućnost separacije kolin klorida iz eutektičkih otapala s etilen glikolom te se pokazalo da je pomoću acetona kao antiotapala moguće reciklirati i do 70 % kolin klorida. Takvi rezultati daju još jednu prednost ove metode pročišćavanja biodizela i potencijalnu uštedu ukoliko se koriste eutektička otapala na bazi etilen glikola.

Nadalje, eutektička otapala koja sadrže glicerol pokazala su se učinkovitima u istraživanju koje su proveli Hayyan i sur.²² gdje je pročišćeni biodizel također zadovoljio propisane norme. Osim toga, kolin klorid djelomično je recikliran pomoću 1-butanola čime je ostvarena mogućnost znatne uštede ponovnom pripremom eutektičkog otapala iz recikliranog kolin klorida i ekstrahiranog glicerola, odnosno kruženjem sirovina i otpadnih produkata u procesu pročišćavanja biodizela.

2.4.3. Eutektička otapala kao reakcijski mediji

S obzirom na znatnu stabilnost enzima lipaze u raznim nekonvencionalnim medijima, u brojnim je istraživanjima promatran utjecaj eutektičkih otapala kao medija na aktivnost i stabilnost enzima lipaze.²³ Pokazalo se da mnoge hidrolaze, pa tako i lipaze, imaju vrlo visoku aktivnost u eutektičkim otapalima na bazi kolin klorida ukoliko je u sustavu prisutan određen udio vode. Kao razlog tome navodi se formiranje vodikovih veza između eutektičkog otapala i komponenti koje utječu na pad aktivnosti enzima, poput kratkolančanih alkohola, čime je enzim “zaštićen” od prodora tih komponenti na aktivna mjesta.^{3,25} Također, formiranje vodikovih veza između samog enzima i komponenti eutektičkog otapala stabilizira enzim, a pretpostavlja se da eutektičko otapalo svojim sastavom reproducira staničnu okolinu, odnosno metabolite u kojima je proteinska struktura lipaze očuvana čak i u odsutnosti vode. Zbog svega toga, osim što se istražuju u kontekstu pročišćavanja biodizela, sve se više ispituje i korištenje eutektičkih otapala u biokatalizi, pa tako i enzimskoj sintezi biodizela.^{3,24}

2.5. Optimizacija procesa

U svrhu poboljšanja provedbe procesa, odnosno povećanja njegovog iskorištenja bez povećanja troškova, koristi se metoda koja se naziva optimizacija. S obzirom na to da brojni parametri utječu na proces, promjenom jednog parametra, uz držanje ostalih konstantnima, ne može se odrediti potpuna slika učinka procesnih parametara na proces.²⁹ Razlog tome je taj što procesne veličine mogu imati sinergistički utjecaj te i na taj način djelovati na proces. Zbog toga se za optimiranje procesa često koriste statističke i matematičke tehnike kojima se razmatra ponašanje sustava pod utjecajem većeg broja parametara, odnosno multiparametarske tehnike. Na taj se način, osim uključivanja interaktivnog učinka parametra, znatno smanjuje broj potrebnih eksperimenata što donosi dodatne uštede na vremenu i sirovinama.³⁰ Također, smanjivanju broja eksperimenata pridonosi i planiranje pokusa jer se tako može dobiti veći broj ciljanih informacija nakon utvrđivanja procesnih parametara koji utječu na proces.³¹

2.5.1. Metoda odzivnih površina

Metoda odzivnih površina (engl. *Response Surface Methodology*, RSM) razvijena je 1950-ih godina te se često koristi pri dizajnu, razvoju i unaprjeđenju proizvoda. Pri tome se određuje funkcijska ovisnost odziva procesa o nezavisnim varijablama matematičkim i statističkim tehnikama čime se proučava utjecaj nezavisnih varijabli na proces. Osim toga, na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka generira se i matematički model procesa koji se može koristiti za numeričko optimiranje procesa.

Metoda odzivnih površina se sastoji od triju faza. Prva faza je izbor nezavisnih varijabli koje znatno utječu na proces na temelju preliminarnih istraživanja, druga faza obuhvaća dizajn eksperimenata, njihovu provedbu te obradu eksperimentalnih podataka i ocjenu valjanosti modela procesa, dok se u trećoj fazi provjerava mogućnost pomaka prema optimumu te dobivaju optimalne vrijednosti nezavisnih varijabli.^{29,30}

Kako bi optimizacija bila uspješna, potrebno je odabrati nezavisne varijable koje imaju velik utjecaj na proces budući da je varijable s manjim utjecajem gotovo nemoguće razlučiti i kontrolirati.³⁰ S obzirom na nezavisne varijable, bira se model koji će se koristiti i procjenjuju njegovi parametri, a najčešće se koristi model drugog reda:

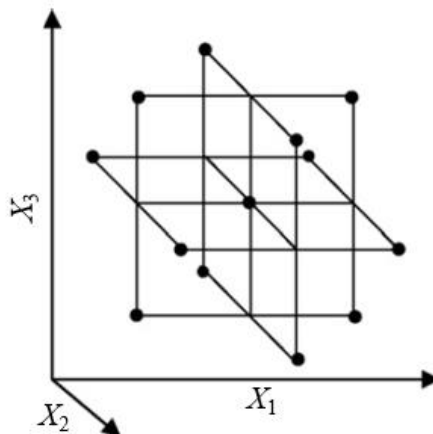
$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

gdje su $\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$ i β_{ij} regresijski koeficijenti, y odziv, a X_i i X_j nezavisne varijable. Kako bi se moglo izračunati koeficijente polinoma (Jednadžba (1)), svaka se varijabli mora izvoditi na najmanje tri razine, što znači da se eksperimenti moraju provoditi pri barem tri različite vrijednosti svih varijabli.^{29,30} Zatim se odabire eksperimentalni dizajn kojim se pomoću matrice kreira niz eksperimenata unutar eksperimentalne domene definirane maksimalnim i minimalnim vrijednostima pojedinih varijabli. Neki od mogućih eksperimentalnih dizajna drugog reda s varijablama na tri razine su Box-Behnken, centralni kompozitni i Doehlert dizajn te se ti dizajni razlikuju prema odabiru eksperimentalnih točaka i broju pokusa.^{29,30}

Zbog svoje ekonomičnosti i učinkovitosti uslijed malog broja potrebnih eksperimenata, a i zbog jednostavnosti, često se koristi Box-Behnken dizajn. Ovaj dizajn je prikazan Slikom 3. za slučaj tri varijable i tri razine varijabli te je vidljivo da se eksperimentalne točke nalaze na jednakim udaljenostima od centralne točke, a njihov broj računa se prema jednadžbi (Jednadžba (2)):

$$N = 2k \cdot (k - 1) + c_p \quad (2)$$

gdje je k broj nezavisnih varijabli, a c_p broj centralnih točaka pri čemu taj broj za ovaj slučaj iznosi 13.³⁰



Slika 3. Box-Behnken eksperimentalni dizajn i eksperimentalne točke za slučaj dizajna s tri varijable i tri razine varijabli²

Nakon provedbe potrebnih eksperimenata potrebno je izračunati koeficijente polinoma kako bi se jednadžba prilagodila dobivenim eksperimentalnim podacima pri čemu se najčešće koristi metoda najmanjih kvadrata (engl. *Least Square Method*). To je višestruka regresijska

tehnika kojoj je kriterij izbora koeficijenata najmanja razlika između izračunatih i eksperimentalnih vrijednosti odziva, odnosno dobivenog ostatka. Za dobivanje vrijednosti odstupanja računa se suma kvadrata ostataka (engl. *Sum of the Squares of the Errors*, SSE) za svaku vrijednost odziva prema jednadžbi (Jednadžba (3)):

$$SSE = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (3)$$

gdje je ε_i ostatak, y_i eksperimentalno određen odziv, a \hat{y}_i odziv izračunat iz modela pri čemu vrijednost SSE mora biti minimalna.²⁹

Kako bi se utvrdilo poklapanje modela s eksperimentalnim podacima, provjerava se jesu li odstupanja od modela uzrokovana slučajnim pogreškama ili su posljedica nepoklapanja modela i eksperimentalnih podataka. Ukoliko je model dobar, ostatci su normalno distribuirani kao posljedica slučajnih pogrešaka te model pokazuje znatnu regresiju, a ukoliko nije moći će se uočiti slabo poklapanje. Taj se postupak provodi analizom varijance (engl. *ANalysis Of VAriance*, ANOVA).

Iz dobivenog modela mogu se odrediti optimalni uvjeti izračunom prve derivacije modela, čime se dobije odzivna površina, te izjednačavanjem derivacije s nulom. Na taj način pronalaze se kritične točke koje mogu biti maksimum, minimum ili sedlo pri čemu sedlo kao točka infleksije između relativnog maksimuma i minimuma ne može služiti kao optimalna vrijednost ako se želi postići maksimalni ili minimalni odziv procesa.

Ukoliko je cilj optimirati više odziva odjednom, poželjno je da se dobivene površine preklapaju u nekim dijelovima jer je u tom području moguće pronaći optimum za oba odziva. Što su odzivne površine udaljenije, teže je, a vrlo često i nemoguće odrediti optimum za oba odziva pri istim eksperimentalnim uvjetima. Za provedbu optimizacije više odziva koristi se višekriterijska metodologija koja se zasniva na postavljanju funkcije poželjnosti za svaki odziv što znači da se odziv transformira u bezdimenzijski oblik, odnosno skalu koja pokriva područje od potpuno nepoželjenog do potpuno poželjnog odziva iz kojih se zatim izračunava geometrijska sredina, odnosno optimum.³⁰

2.5.2. Optimizacija integriranog procesa sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola eutektičkim otapalima

Kako bi biodizel postao konkurentan fosilnom dizelu, potrebno je što više smanjiti troškove njegove proizvodnje i pročišćavanja. Uštede pri tim procesima moguće je postići korištenjem enzima lipaze kao katalizatora te eutektičkih otapala kao sredstava za kapljevinsku ekstrakciju u postupku pročišćavanja biodizela. U svrhu dodatnih ušteda nameće se ideja o provedbi sinteze i pročišćavanja biodizela u jednom koraku, odnosno integriranog procesa sinteze i pročišćavanja biodizela. Kako bi se postigla veća učinkovitost ovakvog procesa može se provesti optimizacija npr. pomoću spomenute RSM metode te je prvi korak u ovom postupku odabir odziva koji će se optimirati te nezavisnih varijabli koje znatno utječu na te odzive. Budući da je cilj provesti optimizaciju procesa sinteze biodizela i njegovog pročišćavanja u jednom koraku, odzivi koji se u tom slučaju prate su iskorištenje biodizela i učinkovitost ekstrakcije glicerola.

U istraživanju koje su proveli Merza i sur.³² uočeno je da udio vode u sustavu može znatno utjecati na iskorištenje biodizela tijekom njegove sinteze katalizirane enzimom lipaza te se vrijednosti oko 4 % navode kao potencijalno optimalne. Također, u istraživanju Gojun i sur.³ pokazano je da je u sustavima s udjelima vode oko 0,7 % iskorištenje znatno niže u odnosu na sustave s većim udjelima vode. Razlog tome je što je enzimu lipazi potrebna voda u određenom postotku kako bi se očuvala njegova 3D struktura, no s druge strane, preveliki udio vode može dovesti do pojačane hidrolize čime pada iskorištenje biodizela.⁶ Zbog svega toga je kao jedna od varijabli u procesu optimizacije integriranog procesa sinteze i pročišćavanja biodizela odabran udio vode u sustavu.

Prema Hayyan i sur.²², na učinkovitost ekstrakcije znatan utjecaj imaju molarni omjer biodizela i DES-a kojim se on pročišćava. U spomenutom istraživanju najviše glicerola ekstrahirano je pri omjeru 1: 1. Također, Šalić i sur.²¹ u svom istraživanju ističu utjecaj molarnog omjera kolin klorida i donora vodikove veze u DES-u te porast učinkovitosti ekstrakcije pri promjenama tog omjera od 1: 1 do 1: 3. Obzirom na spomenuto, kao druga i treća varijabla za optimizaciju integriranog procesa sinteze i pročišćavanja biodizela odabrane su omjer biodizela i DES-a, odnosno omjer faza, te molarni omjer kolin klorida i glicerola, odnosno etilen glikola.

3. Eksperimentalni dio

U svrhu optimizacije procesa transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja katalizirane komercijalnim enzimom lipaza uz integrirano pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalima proveden je niz eksperimenata integrirane sinteze i pročišćavanja biodizela. Prethodno su pripremljena eutektička otapala s različitim molarnim omjerima kolin klorida i glicerola, odnosno etilen glikola kako bi se utvrdilo i koji je od dvaju donora vodikove veze prikladniji u spomenutom integriranom procesu. Broj eksperimenata i eksperimentalni uvjeti niza eksperimenata određeni su prema Box-Behnkenovom dizajnu uz definirane granične vrijednosti triju parametara (masenog udjela vode, omjera faza i sastava DES-a) kako bi se odredio njihov utjecaj na iskorištenje biodizela i učinkovitost ekstrakcije glicerola. Nakon procesa optimizacije, sinteza i pročišćavanje biodizela provedeni su pri optimalnim uvjetima, a dobiveni rezultati su uspoređeni s rezultatima dobivenima prije optimizacije procesa.

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Za provedbu eksperimenata korištene su sljedeće kemikalije:

- acetalacetone, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- acetonitril, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- amonijev acetat, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- etanol, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- etilen-glikol, Lach-Ner, Češka Republika
- F.A.M.E. mix GLC-10, Sigma-Aldrich, Austrija
- glicerol, Kemika, Hrvatska
- *n*-heksan, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- *n*-heptan, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- jestivo suncokretovo ulje, Zvijezda, Hrvatska
- klorovodična kiselina, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- kolin klorid, Acros Organics, Belgija
- lipaza porijeklom iz *Thesmomycetes lanuginosus* (Lipolase 100L), Sigma-Aldrich, Njemačka
- metanol, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo

- natrijev perjodat, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- 4-nitrofenil acetat, Acros Organics, Belgija
- octena kiselina, Carlo Erba Reagents, Španjolska
- tris(hidroksimetil)aminometal (TRIS), VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo

3.1.2. Aparatura

Za provedbu eksperimenata korištena je sljedeća aparatura:

- centrifuga (Universal 320 R, Hettich, SAD)
- magnetska miješalica (MS-H-S, DLAB, SAD)
- plinski kromatograf (Shimadzu GC-2014, Japan) s FID detektorom i Zebron ZB-Wax GC kapilarnom kolonom (dužina 30 m, ID 0,53 mm i debljina filma 1,00 μm , Phenomenex, SAD).
- spektrofotometar (UV-1800, Shimadzu, Japan)
- spektrofotometar (UV-1601, Shimadzu, Japan)
- tresilica (Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, SAD)
- vodena kupelj (Thermomix 1420, Braun, Njemačka)
- homogenizator (Vibromix 10, Tehnica, Slovenija)

3.1.3. Priprema otopina

- TRIS/HCl pufer, $c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0

Pufer je pripremljen otapanjem 0,607 g TRIS-a u 100 mL destilirane vode i podešavanjem pH-vrijednosti postupnim dodatkom otopine klorovodične kiseline koncentracije 1 mol L^{-1} .

- otopina 4-nitrofenil acetata u acetonitrilu

Otopina je pripremljena otapanjem 0,054 g 4-nitrofenil acetata u 200 μL acetonitrila čime se dobije otopina koncentracije $1,5 \text{ mol L}^{-1}$. Nakon toga dobivena otopina razrijedi se 40 puta acetonitrilom čime se dobiva tražena koncentracija od $0,0375 \text{ mol L}^{-1}$.

- otopina octene kiseline

Otopina je pripremljena otapanjem 9,6 g octene kiseline u 100 mL destilirane vode čime se dobije otopina koncentracije $1,6 \text{ mol L}^{-1}$.

- otopina amonijevog acetata

Otopina je pripravljena otapanjem 30,8 g amonijeva acetata u 100 mL destilirane vode čime se dobije otopina koncentracije $4,0 \text{ mol L}^{-1}$.

- otopina acetilacetona

Otopina je pripravljena otapanjem 200 μL (195 mg) acetilacetona u 5 mL octene kiseline i 5 mL otopine amonijeva acetata čime se dobije otopina koncentracije $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Otopinu je potrebno pripremati svaki dan.

- otopina natrijevog perjodata

Otopina je pripravljena otapanjem 0,21 mg natrijeva perjodata u 5 mL octene kiseline te zatim homogenizirana na vortex miješalici. Potom je u otopinu potrebno dodati 5 mL otopine amonijeva acetata čime se dobije otopina koncentracije 10 mmol L^{-1} . Otopinu je potrebno pripremati svaki dan.

- radno otapalo

Otopina je pripravljena miješanjem jednakih volumena destilirane vode i 95 % etanola.

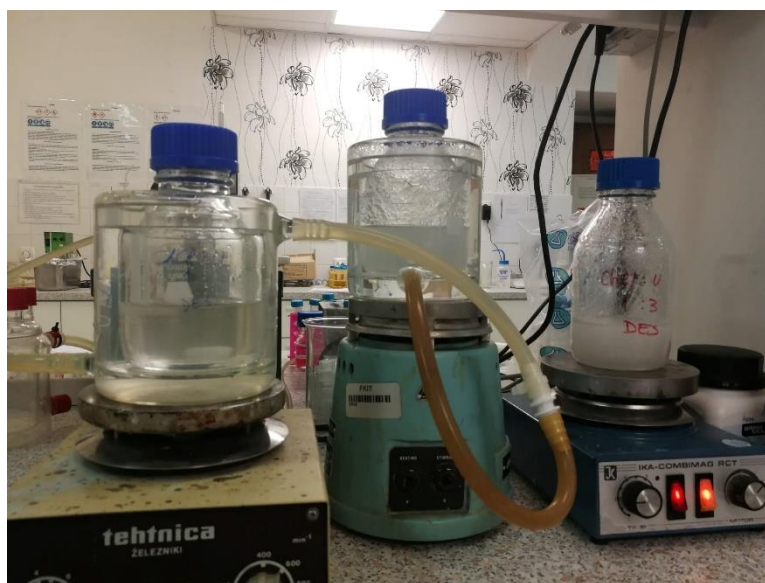
3.2. Metode

3.2.1. Priprema eutektičkih otapala

Za pripremu bezvodnog DES-a upotrijebljeni su kolin klorid (ChCl) i glicerol (Gly) te kolin klorid i etilen glikol (EG) u različitim molarnim omjerima (Tablica 3). Nakon vaganja svake komponente za željeni molarni omjer, komponente se stavljaju u čašu i miješaju na magnetskoj miješalici (200 okr min^{-1}) pri temperaturi $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (Slika 4). Proces se provodi 30-60 min dok se ne dobije homogena, bezbojna i prozirna kapljevina koja se potom hladi na sobnu temperaturu.

Tablica 3. Prikaz molarnih omjera ChCl: Gly i ChCl: EG korištenih za priprevu eutektičkih otapala

Naziv DES-a	Molarni omjer komponenti ChCl: Gly	Molarni omjer komponenti ChCl: EG
ChCl: Gly _{1:2,0:0}	1 : 2,0	-
ChCl: Gly _{1:3,0:0}	1 : 3,0	-
ChCl: Gly _{1:3,5:0}	1 : 3,5	-
ChCl: Gly _{1:4,0:0}	1 : 4,0	-
ChCl: EG _{1:2,0:0}	-	1 : 2,0
ChCl: EG _{1:3,0:0}	-	1 : 3,0
ChCl: EG _{1:4,0:0}	-	1 : 4,0



Slika 4. Priprema eutektičkih otapala

3.2.2. Optimiranje procesa sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola

Eksperimenti u svrhu optimiranja promatranih procesa provedeni su sukladno definiranim planovima eksperimenata pri čemu su mijenjani omjeri reakcijske smjese i ekstrakcijske faze, udjeli vode te molarni omjeri sastavnica DES-a. U određeni broj Falcon epruveta ($V = 15 \text{ mL}$) izvagane su potrebne mase ulja i metanola pri čemu je njihov molarni omjer uvijek bio 1:3,4.³³ Sadržaj Falcon epruveta je dobro homogeniziran na homogenizatoru te je zatim sukladno planu pokusa u svaku epruvetu dodana odgovarajuća količina DES-a.

Sadržaj epruveta je ponovno dobro homogeniziran na homogenizatoru nakon čega je dodana potrebna masa vode i enzima lipaze na način da je početna koncentracija enzima lipaze u svim epruvetama bila jednaka i iznosila $\gamma_{E,0} = 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Nakon ponovnog intenzivnog homogeniziranja, epruvete su pričvršćene na stalak kako je prikazano na Slici 5. i stavljene u tresilicu na 2 sata pri 400 okr min^{-1} i temperaturu od $40 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 5. Falcon epruvete s reakcijskom smjesom pričvršćene na stalak u tresilici

Nakon 2 sata intenzivnog miješanja u tresilici, epruvete su izvađene i odmah centrifugirane 10 minuta pri $4000 \text{ okr min}^{-1}$ i $40 \text{ }^\circ\text{C}$ u centrifugi nakon čega su se formirala dva jasno vidljiva sloja. Volumeni slojeva su izmjereni te je gornji sloj koji je sadržavao biodizel odvojen u zasebne plastične epruvete. Plastične epruvete s biodizelom (gornji sloj) ponovno su centrifugirane 10 minuta pri $14000 \text{ okr min}^{-1}$ i $40 \text{ }^\circ\text{C}$ kako bi se DES koji je eventualno zaostao pri prvom centrifugiranju u potpunosti istaložio na dnu i tako izdvojio iz biodizela. Uzorci biodizela dobiveni na taj način analizirani su plinskom kromatografijom u svrhu određivanja koncentracije biodizela i glicerola te spektrofotometrijski u svrhu određivanja niskih koncentracija glicerola koje nije bilo moguće detektirati na plinskom kromatografu. Na temelju izmjerenih koncentracija biodizela i glicerola u uzorcima izračunata su iskorištenja biodizela (I), učinkovitost ekstrakcije glicerola (η) te maseni udjeli glicerola (w_G) u biodizelu prema sljedećim jednadžbama (Jednadžbe (4)-(6)):

$$I = \frac{\gamma_B}{\gamma_{B,teor}} \quad (4)$$

$$EF = 1 - \frac{\gamma_{G,ost}}{\gamma_{G,teor}} \quad (5)$$

$$w_G = \frac{\gamma_{G,ost} \cdot V_B}{m_B} \quad (6)$$

3.2.3. Integrirani proces proizvodnje i pročišćavanje biodizela u šaržnom sustavu

Nakon određivanja optimalnih uvjeta, proces proizvodnje i pročišćavanja biodizela proveden je na laboratorijskoj tresilici ($t = 2$ h, 400 okr min^{-1} i $T = 40$ °C) u tri eksperimenta pri različitim uvjetima. Svi eksperimenti provedeni su pri istom molarnom omjeru ulja i metanola (1:3,4) te pri istoj koncentraciji enzima ($\gamma_{E,0} = 0,1$ mg mL^{-1}) kao i u pokusima provedenima u svrhu optimizacije. U eksperimentu I provedena je samo sinteza biodizela bez pročišćavanja (bez DES-a) pri masenom udjelu vode od 4,6%. Eksperiment II proveden je pri početnim uvjetima, odnosno uvjetima određenima početnom pretpostavkom optimuma, dok je eksperiment III proveden pri optimalnim uvjetima određenima optimizacijom. Eksperimenti su provedeni samo s onim DES-om koji se pri optimizaciji pokazao boljim uzevši kao kriterij veće iskorištenje biodizela.

3.2.4. Ispitivanje utjecaja temperature na učinkovitost ekstrakcije glicerola

Kako bi se ispitao utjecaj temperature na učinkovitost ekstrakcije, provedena su 3 eksperimenta pri 3 različite temperature pri čemu su udio vode, omjer faza i molarni omjer u DES-u bili oni koju su kao optimalni određeni optimizacijskim metodama. Pokusi su provedeni pri temperaturama 40, 50 i 60 °C. Integrirani proces proizvodnje i pročišćavanja biodizela u šaržnom sustavu proveden je na način da su nakon dodatka odgovarajuće odvage ulja i metanola (molarni omjer 1:3,4) u stakleni šaržni reaktor s dvostrukom stijenkom (Slika 6.) dodani eutektičko otapalo, a potom voda i enzim na način da je početna koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi bila $\gamma_{E,0} = 0,1$ mg mL^{-1} . Reaktor je stavljen na magnetsku miješalicu uz miješanje pri 400 okr min^{-1} . Reakcija se odvijala 48 sati nakon čega je reakcijska smjesa prebačena u lijevak za odjeljivanje kako bi se biodizel odvojio od eutektičkog otapala te je uzorak tako dobivenog biodizela analiziran plinskom kromatografijom.



Slika 6. Stakleni šaržni reaktor korišten u integriranom procesu proizvodnje i pročišćavanja biodizela

3.2.5. Mjerenje koncentracije metilnih estera masnih kiselina i glicerola plinskom kromatografijom

Koncentracija metilnih estera masnih kiselina (FAME) i glicerola određena je na plinskom kromatografu s FID detektorom i Zebron ZB-Wax GC kapilarnom kolonom (dužina 30 m, ID 0,53 mm i debljina filma 1,00 μm). Koncentracije FAME i glicerola su određene na način kako je opisano u radu Budžaki i sur.³³ Za vrijeme od 1 minute provodi se zagrijavanje kolone počevši s temperaturom 180 °C, uz grijanje do 230 °C, brzinom od 5 °C min^{-1} , dok FID detektor radi na 240 °C. Prema metodi, ukupno trajanje analize za svaki uzorak je 15 min, a kao plin nosilac korišten je dušik s protokom od 1,97 mL min^{-1} . Smjesa F.A.M.E. mix GLC-10 korištena je kao standard za identificiranje odgovarajućih estera masnih kiselina. Uzorak za analizu je razrijeđen 100 puta kako bi se dobile koncentracije u području pokrivenom kalibracijskim dijagramom. Kao otapalo za pripremu uzorka za određivanje koncentracije FAME korišten je *n*-heptan, dok je kod analize glicerola kao otapalo za pripremu uzorka korišten etanol. Nakon homogenizacije, uzorak je filtriran i analiziran. Vremena zadržavanja za pojedine komponente bila su sljedeća: 7,74 min za palmitinske, 10,59 min za stearinske, 10,87 min za oleinske, 11,58 min za linolne i 12,62 min za α -linolne (linolenske) estere. Vrijeme zadržavanja za glicerol je iznosilo 9,02 min, primjenjujući istu metodu. Koncentracije komponenata u uzorcima su određene na temelju baždarnih dijagrama (Prilozi 1-5.). Kako bi se utvrdila ponovljivost, sva su mjerenja provedena tri puta.

3.2.6. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije glicerola

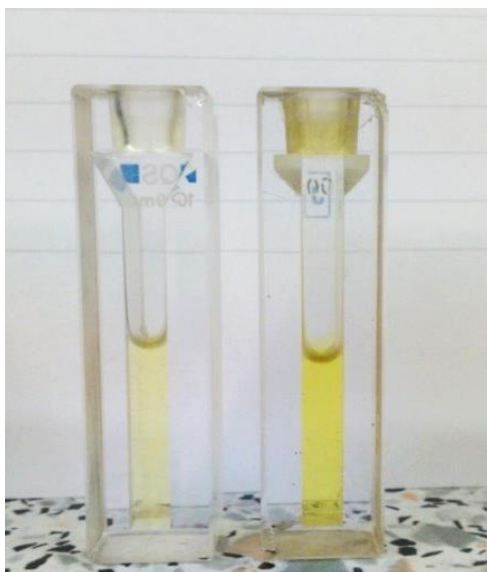
Koncentracija glicerola u uzorku određena je na način opisan u radu Bondioli i Della Bella.³⁴ U epruvetu od 10 mL izvagano je 0,5 g uzorka biodizela ($\pm 0,1$ mg). Uzorak je potom otopljen u 2 mL heksana te mu je dodano 2 mL radnog otapala. Potom je smjesa homogenizirana na homogenizatoru 5 min i centrifugirana 15 min pri 2000 okr min^{-1} i 25 °C. Nakon centrifugiranja uklonjen je gornji sloj (biodizel), a 0,5 mL donjeg sloja je preneseno u epruvetu od 10 mL. U tako odvojen uzorak donjeg sloja dodan je 1,5 mL radnog otapala i 1,2 mL otopine natrijevog perjodatata te je tako dobiveni uzorak homogeniziran 30 s na homogenizatoru. Nakon toga u uzorak je dodano 1,2 mL 0,2 mol L^{-1} otopine acetilacetona. Epruvete su stavljene 1 min u prethodno termostatiranu vodenu kupelj na 70 °C, uz ručno miješanje. Nakon termostatiranja pri 70 °C uzorak je prenesen u vodenu kupelj pri 20 °C na 2 min uz ručno miješanje. Potom su uzorci stavljeni 1 min na centrifugiranje pri 2000 okr/min i 25 °C. Po 1 mL tako dobivenog uzorka je preneseno u plastične kivete te je spektrofotometrijski analiziran pri valnoj duljini $\lambda = 410$ nm. Kako bi se utvrdila ponovljivost, sva su mjerenja provedena tri puta, a koncentracija glicerola određena je prema baždarnom dijagramu (Prilog 6.).

3.2.7. Mjerenje aktivnosti enzima lipaze

Mjerenje aktivnosti enzima lipaze zasniva se na solvolizi 0,0375 mol L^{-1} 4-nitrofenil acetata. Najprije je 100 μL uzorka dodano u 3900 μL 0,05 mol L^{-1} TRIS-HCl pufera pH 8, a zatim je smjesa homogenizirana. Po homogenizaciji, 950 μL smjese je prebačeno u UV-kivetu koja je prethodno termostatirana na 40 °C u vodenoj kupelji. Reakcija je započeta dodavanjem 50 μL 0,0375 mol L^{-1} 4-nitrofenil acetata koji je prethodno otopljen u acetonitrilu. Aktivnost enzima određena je spektrofotometrijski mjerenjem promjene apsorbancije na valnoj duljini $\lambda = 400$ nm, s ukupnim vremenom određivanja 20 s (Slika 7). Kako bi se utvrdila ponovljivost, sva su mjerenja provedena tri puta. Vrijednosti volumne aktivnosti enzima lipaze izračunate su prema sljedećoj jednadžbi (Jednadžba (7)):

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon d V_E} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (7)$$

gdje je V_r ukupni volumen smjese, V_E volumen enzima lipaze dodanog u smjesu, d duljina kivete, ε molarni apsorpcijski koeficijent 4-nitrofenil acetata i $\Delta A/\Delta t$ promjena apsorbancije u vremenu.



Slika 7. Promjena boje tijekom određivanja aktivnosti enzima lipaza kao posljedice dodatka 4-nitrofenil acetata (lijeva kiveta prije, desna kiveta nakon dodatka 4-nitrofenil acetata)

4. Rezultati i rasprava

U ovom radu provedena je optimizacija integriranog procesa sinteze biodizela iz jestivog suncokretovog ulja i metanola katalizirane enzimom lipaza podrijetlom iz *Thermomyces lanuginosus* te ekstrakcije nusprodukta glicerola, odnosno pročišćavanja biodizela pomoću dvaju eutektičkih otapala u svrhu dobivanja biodizela pogodnog za direktnu upotrebu. Pri tome je praćen utjecaj masenog omjera reakcijske faze (ulje, metanol, enzim i voda) i eutektičkog otapala (ChCl:Gly ili ChCl:EG), masenog udjela vode u reakcijskoj smjesi i molarnog omjera kolin klorida i donora vodikove veze u eutektičkom otapalu na iskorištenje biodizela te učinkovitost ekstrakcije glicerola. Optimizacija je provedena metodologijom odzivnih površina (RSM). Nakon procesa optimizacije, integrirani proces sinteze i pročišćavanja biodizela proveden je pri optimalnim uvjetima, a dobiveni rezultati su uspoređeni s rezultatima integriranog procesa dobivenima prije optimizacije procesa.

4.1. Optimiranje procesa sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola

Primjenom Box-Behnken dizajna integriranog u programski paket Design-Expert kreiran je plan pokusa na tri razine za tri analizirane varijable. Kao što je prethodno navedeno, a temeljem literaturnih podataka^{21,22,32}, tri varijable koje su odabrane za optimizaciju bile su maseni udio vode (X_1), omjer kolin klorida i donora vodikove veze u DES-u (X_2) te maseni omjer faza (X_3). Razine odabranih parametara prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Razine analiziranih varijabli prilikom optimizacije procesa

Varijable	Razine		
	-1	0	1
X_1 - w_{voda} (% mas.)	0,6	4,6	8,6
X_2 - ChCl:Gly ili ChCl:EG (1:X)	2,0	3,0	4,0
X_3 - omjer faza (reakcijska faza:DES)	90:10	50:50	10:90

Vrijednost masenog udjela vode (X_1) u centralnoj točki definirana je na temelju istraživanja Merza i sur.³² koji su pokazali da je u procesu sinteze biodizela optimalni maseni udio vode približno 4 % te na temelju prethodnih preliminarnih istraživanja (rezultati nisu prikazani) koji su pokazali da je optimalna vrijednost oko 4,6 %. Donja razina udjela vode, definirana je na temelju količine vode koja je sadržana u izvornom uzorku enzima (0,6 %) što je ujedno i minimalna vrijednost koju je moguće postići u smjesi komponenata integriranog

procesa. Kako bi isti korak bio zadržan (4 %), maseni udio vode na gornjoj granici definiran je kao 8,6 %.

U svojim istraživanjima Hayyan i sur.²² te Šalić i sur.²¹ pokazali su da na učinkovitost ekstrakcije znatan utjecaj imaju molarni omjer biodizela i DES-a (X_2) kojim se on pročišćava. Šalić i sur.²¹ pokazali su porast učinkovitosti ekstrakcije pri promjenama molarnog omjera od 1 : 1 do 1 : 3. Zbog toga je molarni omjer 1 : 3 izabran kao centralna točka s korakom 1 za donju i gornju razinu (1 : 2 i 1 : 4).

Kao posljednja varijabla odabran je maseni omjer faza (X_3). Kako bi se obuhvatio cijeli raspon mogućih omjera faza, odabrane su vrijednosti gornje i donje granice (10:90 i 90:10) te srednja vrijednost, odnosno jednaki omjer faza (50:50).

Navedeno je rezultiralo planom pokusa koji je sastojao od 13 eksperimenata i dva dodatna kontrolna pokusa koja su identična procesnim uvjetima centralnog pokusa (pokusa 13) na način kako je prikazano Tablicom 5.

Tablica 5. Plan pokusa prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu

pokus	X_1	X_2	X_3
	w_{voda} (% mas.)	ChCl:Gly ili ChCl:EG (1:X)	omjer faza (reakcijska faza:DES)
1	0,6	2,0	50:50
2	8,6	2,0	50:50
3	0,6	4,0	50:50
4	8,6	4,0	50:50
5	0,6	3,0	10:90
6	8,6	3,0	10:90
7	0,6	3,0	90:10
8	8,6	3,0	90:10
9	4,6	2,0	10:90
10	4,6	4,0	10:90
11	4,6	2,0	90:10
12	4,6	4,0	90:10
13	4,6	3,0	50:50
14	4,6	3,0	50:50
15	4,6	3,0	50:50

Na temelju izmjerenih koncentracija biodizela i glicerola u uzorcima za pokuse provedene u svakoj točki eksperimentalnog plana izračunate su vrijednosti iskorištenja biodizela i učinkovitosti ekstrakcije glicerola (izlazne varijable). Odgovarajući rezultati prikazani su u Tablici 6. za ChCl:Gly DES, a u Tablici 7. za ChCl:EG DES.

Tablica 6. Iskorištenja biodizela i učinkovitosti ekstrakcije glicerola za točke eksperimentalnog plana prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu u pokusima provedenima s ChCl:Gly DES-om

pokus	w_{voda} (% mas.)	ChCl:Gly (1:X)	omjer faza (reakcijska faza:DES)	I, %	η, %
1	0,6	2,0	50:50	6,96	86,36
2	8,6	2,0	50:50	40,82	86,92
3	0,6	4,0	50:50	14,31	89,97
4	8,6	4,0	50:50	44,55	91,63
5	0,6	3,0	10:90	21,12	98,54
6	8,6	3,0	10:90	30,37	54,13
7	0,6	3,0	90:10	3,82	81,06
8	8,6	3,0	90:10	33,40	98,82
9	4,6	2,0	10:90	33,42	99,29
10	4,6	4,0	10:90	29,40	99,02
11	4,6	2,0	90:10	25,18	99,80
12	4,6	4,0	90:10	28,80	98,73
13	4,6	3,0	50:50	45,41	94,47
14	4,6	3,0	50:50	40,59	87,56
15	4,6	3,0	50:50	45,11	91,94

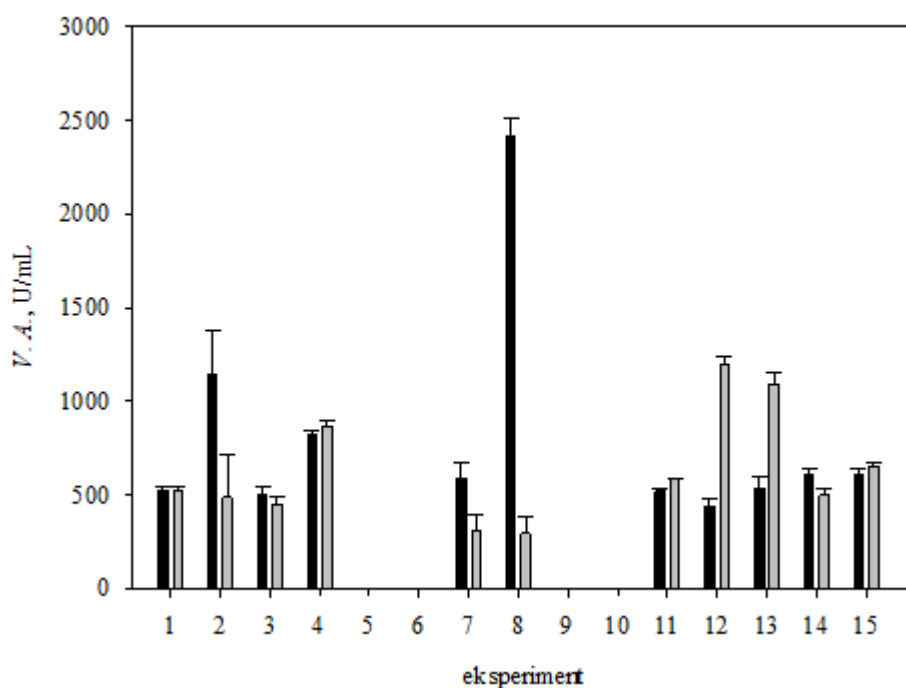
Tablica 7. Iskorištenja biodizela i učinkovitosti ekstrakcije glicerola za točke eksperimentalnog plana prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu u pokusima provedenim s ChCl:EG DES-om

pokus	w_{voda} (% mas.)	ChCl:EG (1:X)	omjer faza (reakcijska faza:DES)	I, %	η, %
1	0,6	2,0	50:50	1,15	58,65
2	8,6	2,0	50:50	12,15	33,52
3	0,6	4,0	50:50	1,18	40,66
4	8,6	4,0	50:50	13,05	95,93
5	0,6	3,0	10:90	0,35	55,39
6	8,6	3,0	10:90	4,04	64,47
7	0,6	3,0	90:10	1,90	67,97
8	8,6	3,0	90:10	30,38	95,04
9	4,6	2,0	10:90	3,55	57,37
10	4,6	4,0	10:90	3,56	92,15
11	4,6	2,0	90:10	9,87	55,19
12	4,6	4,0	90:10	13,92	96,03
13	4,6	3,0	50:50	9,02	41,68
14	4,6	3,0	50:50	4,79	39,13
15	4,6	3,0	50:50	7,00	89,65

Iz ovih rezultata se mogu vidjeti znatno veće vrijednosti iskorištenja biodizela i učinkovitosti ekstrakcije za ChCl:Gly DES. Naime, najveća iskorištenja, čije vrijednosti znatno odskakuju od ostalih i veća su od 40 %, u slučaju ChCl:Gly DES-a postignuta su u pokusima 2, 4, 13, 14 i 15, a učinkovitosti ekstrakcije su u čak 9 pokusa imale vrijednosti iznad 90 %. S druge strane, u slučaju ChCl:EG DES-a iskorištenje veće od 30 % uočeno je samo u pokusu 8, a učinkovitost ekstrakcije iznad 90 % tek u 4 pokusa. Treba istaknuti da je u pokusima 5, 6, 9 i 10 provedenim s ChCl:Gly DES-om uočen nastanak gela u području reakcijske faze što je znatno otežalo uzimanje uzorka i provedbu analize. Kod pokusa provedenih s ChCl:EG DES-om ista pojava opažena je samo u pokusu 5. Opaženo formiranje gela vjerojatno je posljedica veće količine DES-a korištene u tim pokusima (omjer reakcijske faze i DES-a 10:90) što je rezultiralo navedenim problemima u uzimanju uzoraka i provedbi analiza.

Nakon provedbe pokusa izmjerene su aktivnosti enzima u fazi koja je sadržavala eutektička otapala budući da se enzim, kao i glicerol te eventualni sporedni produkti reakcije transesterifikacije, izdvaja eutektičkim otapalima. Iz rezultata prikazanih na Slici 9. vidljivo je da je aktivnost enzima u nekoliko pokusa viša u DES-u ChCl:Gly, a u nekoliko u DES-u

ChCl:EG, iako u većini eksperimenata nisu primijećene znatne razlike. Drugim riječima, ne može se uočiti nikakav određeni trend koji bi ukazao da je jedan medij pogodniji od drugog za očuvanje aktivnosti enzima. Međutim, najveća volumna aktivnost enzima izmjerena je u pokusu 8, gdje je omjer faza 90:10, udio vode 8,6 % (mas.) te omjer kolin klorida i glicerola 1:3. To se može objasniti već spomenutim utjecajem vode na 3D strukturu enzima lipaze te je na ovaj način pokazano da voda doprinosi aktivnosti i stabilnosti enzima čak u nešto višim masenim postotcima u odnosu na pretpostavljeni optimum od 4,6 %. Budući da je takva visoka vrijednost aktivnosti izmjerena samo u slučaju DES-a ChCl:Gly, a također uzevši u obzir općenito veća iskorištenja postignuta u tom mediju, isti se može smatrati prikladnijim reakcijskim medijem u odnosu na drugi razmatrani DES. Nasuprot tome, u pokusima 5, 6, 9 i 10 nije izmjerena volumna aktivnost enzima. Naime, u tim pokusima korišten je omjer faza 10:90, što je, vjerojatno uslijed velikog suviška DES-a, dovelo do svojevrsnih interakcija te stvaranja krute faze – gela zbog kojeg nije bilo moguće provesti potrebnu analizu.



Slika 9. Volumne aktivnosti enzima za točke eksperimentalnog plana prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu izmjerene u pokusima provedenim s ChCl:Gly (●) i ChCl:EG (●)

Normom (Liquid petroleum products – Fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and heating applications – Requirements and test methods (EN 14214:2012+A1:2019)) je propisano da maseni udio glicerola u biodizelu ne smije biti viši od

0,02 %. Iz određenih masenih udjela glicerola u uzorcima biodizela nakon provedenih eksperimenata s eutektičkim otapalima (ChCl:Gly i ChCl:EG) (Tablica 8) vidljivo je da ni u jednom slučaju nije postignut potreban udio glicerola za upotrebu biodizela. Ovi rezultati dodatno ukazuju na nužnost optimizacije procesa. Osim toga, obzirom da su eksperimenti provedeni u vremenskom intervalu od dva sata, postoji mogućnost da bi se vrijednosti udjela glicerola u biodizelu kakve propisuje odgovarajuća norma, kao i veće vrijednosti iskorištenja biodizela postigle uz dužu provedbu pokusa, posebice jer se mnoge vrijednosti približavaju tom udjelu.

Tablica 8. Maseni udjeli glicerola

pokus	$w_G, \%$	
	ChCl:Gly	ChCl:EG
1	0,129	0,065
2	5,629	1,098
3	0,195	0,095
4	0,507	0,072
5	0,042	0,021
6	1,894	0,195
7	0,098	0,083
8	0,054	0,205
9	0,032	0,206
10	0,039	0,038
11	0,007	0,601
12	0,050	0,075
13	0,341	0,715
14	0,687	0,396
15	0,495	0,099

Korištenjem programskog paketa Design-Expert određeni su koeficijenti modela (polinom 2. reda koji obuhvaća linearni i kvadratni član te međudjelovanje varijabli) koji povezuje varijable (udio vode – X_1 , sastav DES-a – X_2 i omjer faza – X_3) i odzive (iskorištenje biodizela i učinkovitost ekstrakcije glicerola) te je provedena statistička analiza usporedbe rezultata pokusa i rezultata simulacije modela.

Kako bi se ispitala važnost pojedine odabrane varijable, kao mjerilo odabrana je p -vrijednost. Naime, prema Teng i sur.³⁵ vrijednost $p < 0,05$ općenito ukazuje na značajan utjecaj

člana na promatrani odziv. U slučaju da je p -vrijednost veća od 0,1 utjecaj varijable može se smatrati zanemarivim. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 9.

Tablica 9. Parametri modela odzivnih površina za optimiranje iskorištenja biodizela uz korištenje ChCl:Gly

Parametar	Utjecaj	p -vrijednost
Odsječak	17,988	0,000717
X_1 (linearni član)	49,803	0,000422
X_1 (kvadratni član)	24,067	0,004750
X_2 (linearni član)	2,670	0,465746
X_2 (kvadratni član)	5,013	0,100255
X_3 (linearni član)	-5,777	0,148495
X_3 (kvadratni član)	9,494	0,012470
međudjelovanje X_1 - X_2	-1,815	0,720103
međudjelovanje X_1 - X_3	10,167	0,087019
međudjelovanje X_2 - X_3	3,825	0,460445

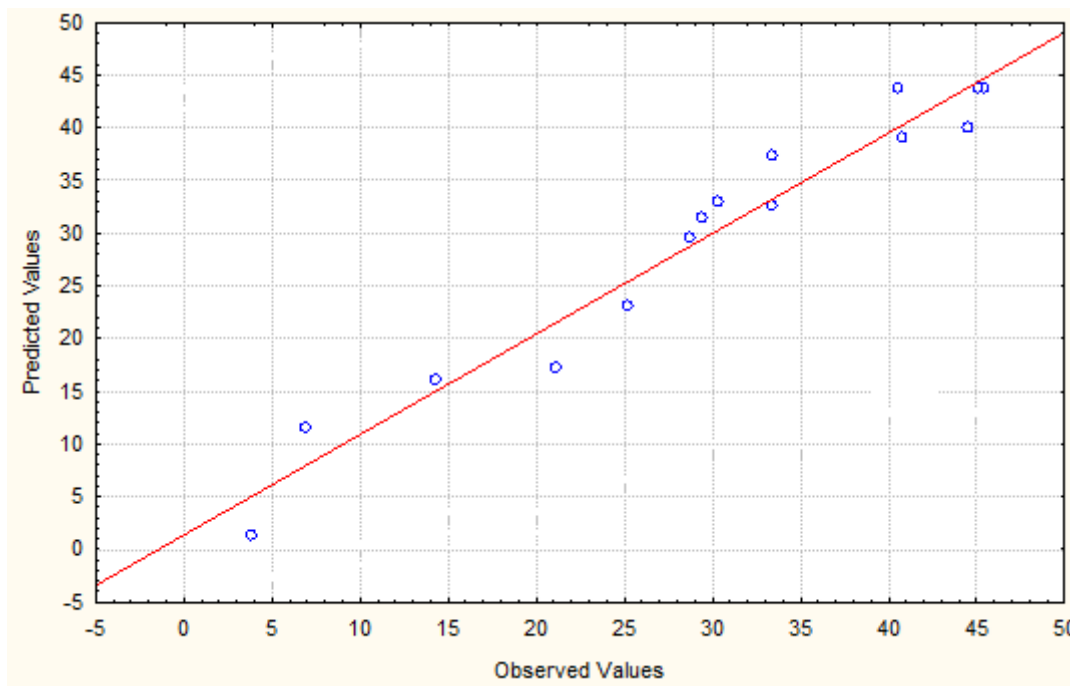
Kao što je vidljivo, udio vode (X_1 , X_1^2) i omjer faza (X_3) imaju značajan utjecaj na iskorištenje procesa. Također, svi navedeni koeficijenti imaju pozitivan predznak što znači da je utjecaj pripadajućih parametara pozitivan, odnosno da povećanjem udjela vode i omjera faza iskorištenje biodizela raste. Između tih dvaju parametara, značajniji utjecaj svakako ima udio vode s obzirom na veću vrijednost koeficijenata u odnosu na kvadratni član uz omjer faza. Nadalje, može se uočiti da sastav DES-a nema značajan utjecaj na iskorištenje biodizela, kao ni međudjelovanja između pojedinih parametara.

Na temelju dobivenih vrijednosti razvijen je polinom kojim je opisano iskorištenje biodizela (Jednadžba (8)) pri čemu su dodatno naglašene značajne varijable (jače otisnute/bold):

$$I = \mathbf{17,988} + \mathbf{49,803} \cdot X_1 + 2,670 \cdot X_2 - 5,777 \cdot X_3 + \mathbf{24,067} \cdot X_1^2 + 5,013 \cdot X_2^2 + \mathbf{9,494} \cdot X_3^2 - 1,815 \cdot X_1X_2 + 10,167 \cdot X_1X_3 + 3,825 \cdot X_2X_3 \quad (8)$$

Na Slici 10. prikazana je usporedba rezultata simulacije modela i eksperimentalnih podataka, a s obzirom na vrijednost $R^2 = 0,9541$ može se zaključiti da je njihovo slaganje dobro.

Također, budući da se u radu Le Man i sur.³⁶ kao prihvatljivima navode modeli čiji je $R^2 > 0,75$ pri usporedbi rezultata simulacije modela i eksperimentalnih podataka, može se zaključiti da je model pogodan za opis ovisnosti iskorištenja biodizela o promatranim parametrima.



Slika 10. Odnos vrijednosti dobivenih simulacijom modela i eksperimentalnih rezultata za točke eksperimentalnog plana prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu na primjeru iskorištenja biodizela u pokusima provedenima s ChCl:Gly

Osim na iskorištenja, promatran je utjecaj odabranih varijabli i na učinkovitost procesa, a dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 10.

Tablica 10. Parametri modela odzivnih površina za optimiranje procesa ekstrakcije glicerola uz korištenje ChCl:Gly

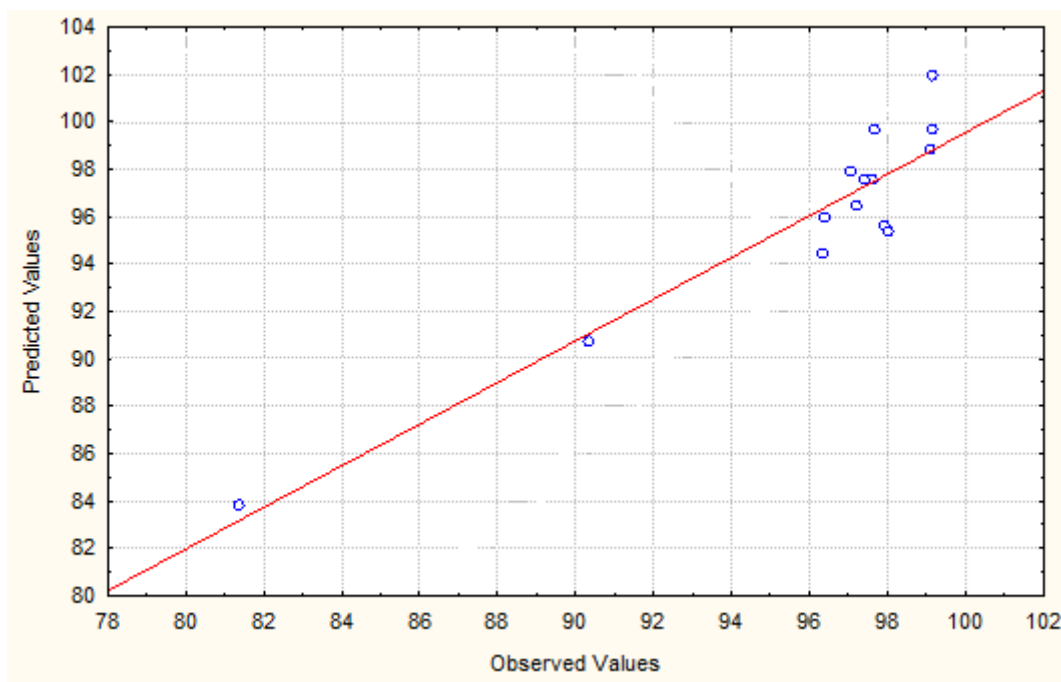
Parametar	Utjecaj	<i>p</i> -vrijednost
Odsječak	93,694	0,000000
X_1 (linearni član)	13,049	0,011883
X_1 (kvadratni član)	6,419	0,070181
X_2 (linearni član)	1,439	0,482878
X_2 (kvadratni član)	-1,589	0,307291
X_3 (linearni član)	-5,154	0,042137
X_3 (kvadratni član)	0,903	0,546962
međudjelovanje X_1 - X_2	-2,283	0,434282
međudjelovanje X_1-X_3	7,480	0,038721
međudjelovanje X_2 - X_3	-0,823	0,771794

Na temelju izračunatih *p*-vrijednosti te kriterija $p < 0,05$, kao parametri koji imaju značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije glicerola prepoznati su udio vode (X_1) i omjer faza (X_3). Također, značajan je i utjecaj međudjelovanja udjela vode i omjera faza ($X_1 - X_3$) na učinkovitost ekstrakcije. Shodno predznacima uz ova tri člana vidljivo je da udio vode te međudjelovanje udjela vode i omjera faza ima pozitivan, a omjer faza negativan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije. Navedeno znači da se povećanjem udjela vode i smanjenjem omjera faza učinkovitost ekstrakcije povećava, dok istovremeno povećanjem oba parametra raste i utjecaj interakcija na učinkovitost. Kao i u slučaju iskorištenja biodizela, sastav DES-a ni pri ekstrakciji glicerola nema značajan utjecaj na učinkovitost iste te ne utječe na proces ni kroz međudjelovanja s preostala dva parametra.

Matematički model koji opisuje ovisnost učinkovitosti ekstrakcije o analiziranim procesnim varijablama u pokusima provedenim s ChCl:Gly prikazan je sljedećom jednačbom (Jednačba (9)) pri čemu su značajni utjecaji dodatno naglašeni:

$$\eta = 93,694 + 13,049 \cdot X_1 + 1,439 \cdot X_2 - 5,1539 \cdot X_3 + 6,419 \cdot X_1^2 - 1,589 \cdot X_2^2 + 0,903 \cdot X_3^2 - 2,283 \cdot X_1X_2 + 7,480 \cdot X_1X_3 - 0,8227 \cdot X_2X_3 \quad (9)$$

Na Slici 11. prikazana je usporedba rezultata simulacije modela i eksperimentalnih podataka za učinkovitost ekstrakcije. Vidljivo rasipanje rezultata simulacije modela i eksperimentalnih podataka potvrđeno je i manjom vrijednošću korelacijskog koeficijenta koji je u ovoj analizi bio $R^2 = 0,8781$. Unatoč tome, s obzirom na kriterij $R^2 > 0,75$ može se zaključiti da je model ipak pogodan za opis ovisnosti učinkovitosti ekstrakcije glicerola o promatranim parametrima.



Slika 11. Odnos vrijednosti dobivenih simulacijom modela i eksperimentalnih rezultata za točke eksperimentalnog plana prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu na primjeru učinkovitosti ekstrakcije glicerola u pokusima provedenima s DES ChCl:Gly

Ista metodologija primijenjena je i za drugi korišteni DES. U tablici 11. prikazani su parametri modela odzivnih površina za optimiranje procesa sinteze biodizela uz korištenje ChCl:EG.

Tablica 11. Parametri modela odzivnih površina za optimiranje procesa sinteze biodizela uz korištenje ChCl:EG

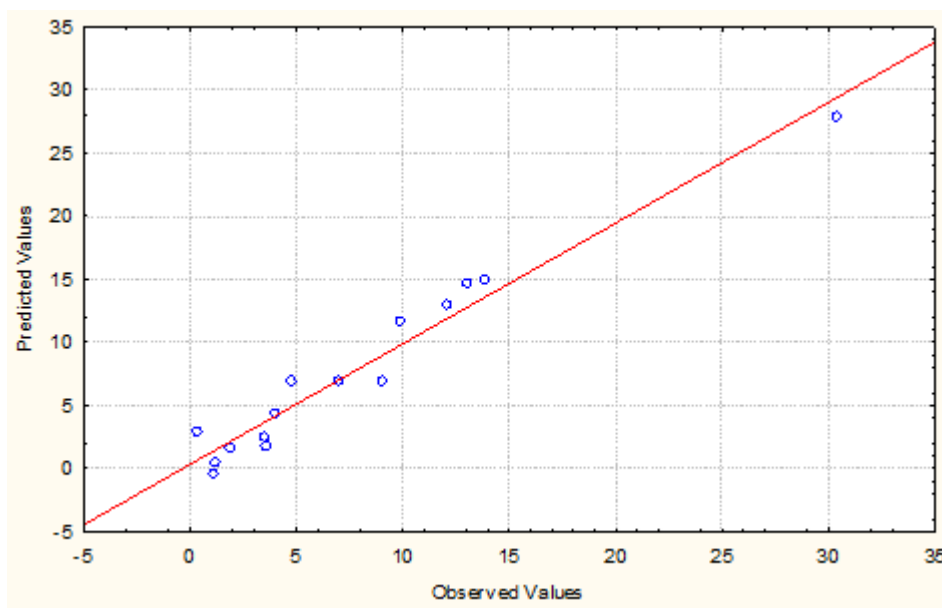
Parametar	Utjecaj	<i>p</i> -vrijednost
Odsječak	8,389	0,001737
X_1 (linearni član)	12,368	0,015089
X_1 (kvadratni član)	-1,390	0,642900
X_2 (linearni član)	1,249	0,543138
X_2 (kvadratni član)	0,745	0,619639
X_3 (linearni član)	11,139	0,002123
X_3 (kvadratni član)	-1,536	0,325514
međudjelovanje X_1 - X_2	0,434	0,878860
međudjelovanje X_1-X_3	12,398	0,005967
međudjelovanje X_2 - X_3	2,019	0,489452

S obzirom na *p*-vrijednosti prikazane u Tablici 11. i primjenu kriterija $p < 0,05$, vidljivo je da udio vode (X_1) i omjer faza (X_3) kao i njihovo međudjelovanje (X_1 - X_3) imaju značajan utjecaj na iskorištenje biodizela. Taj je utjecaj pozitivan shodno predznacima pripadajućih koeficijenata polinoma pa se može zaključiti da povećanjem udjela vode i omjera faza iskorištenje biodizela znatno raste. Kao i u prethodnim slučajevima ponovno nema značajnog utjecaja sastava DES-a na iskorištenje biodizela.

Matematički model koji opisuje ovisnost iskorištenja biodizela o analiziranim procesnim varijable u pokusima provedenim s ChCl:EG prikazan je sljedećom jednadžbom (Jednadžba (10)):

$$I = 8,389 + 12,368 \cdot X_1 + 1,249 \cdot X_2 + 11,139 \cdot X_3 - 1,390 \cdot X_1^2 + 0,745 \cdot X_2^2 - 1,536 \cdot X_3^2 + 0,4345 \cdot X_1X_2 + 12,379 \cdot X_1X_3 + 2,019 \cdot X_2X_3 \quad (10)$$

Na Slici 12. prikazana je usporedba rezultata simulacije modela i eksperimentalnih podataka, a može se zaključiti da je njihovo slaganje dobro na što ukazuje i vrijednost $R^2 = 0,9562$. Uz primjenu kriterija $R^2 > 0,75$, ovaj se model može smatrati prikladnim za korištenje pri opisu ovisnosti iskorištenja biodizela o promatranim parametrima.



Slika 12. Odnos vrijednosti dobivenih simulacijom modela i eksperimentalnih rezultata za točke eksperimentalnog plana prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu na primjeru iskorištenja biodizela u pokusima provedenima s ChCl:EG

U Tablici 12. prikazani su parametri modela odzivnih površina za optimiranje procesa ekstrakcije glicerola uz korištenje ChCl:EG.

Tablica 12. Parametri modela odzivnih površina za optimiranje procesa ekstrakcije glicerola uz korištenje ChCl:EG

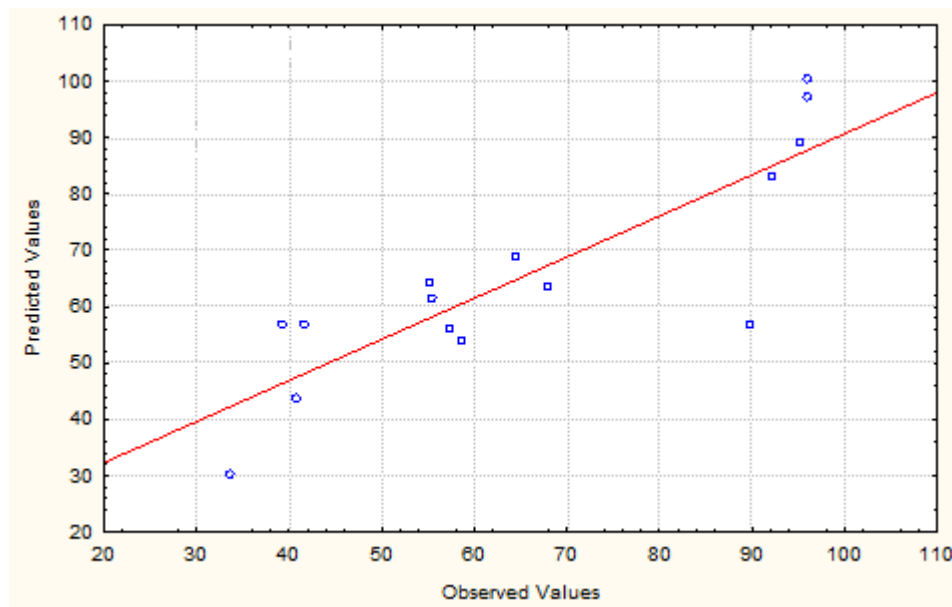
Parametar	Utjecaj	<i>p</i>-vrijednost
Odsječak	66,332	0,001219
X_1 (linearni član)	20,669	0,444635
X_1 (kvadratni član)	4,099	0,850223
X_2 (linearni član)	30,010	0,084996
X_2 (kvadratni član)	-2,421	0,823573
X_3 (linearni član)	11,215	0,459572
X_3 (kvadratni član)	-15,946	0,182499
međudjelovanje X_1 - X_2	40,199	0,098137
međudjelovanje X_1 - X_3	8,995	0,668742
međudjelovanje X_2 - X_3	3,032	0,884322

Matematički model koji opisuje ovisnost učinkovitosti ekstrakcije glicerola o analiziranim procesnim varijablama u pokusima provedenim s ChCl:EG prikazan je sljedećom jednačinom (Jednačina (11)):

$$\eta = 66,332 + 20,669 \cdot X_1 + 30,010 \cdot X_2 + 11,215 \cdot X_3 + 4,099 \cdot X_1^2 - 2,421 \cdot X_2^2 - 15,946 \cdot X_3^2 + 40,199 \cdot X_1X_2 + 8,995 \cdot X_1X_3 + 3,032 \cdot X_2X_3 \quad (11)$$

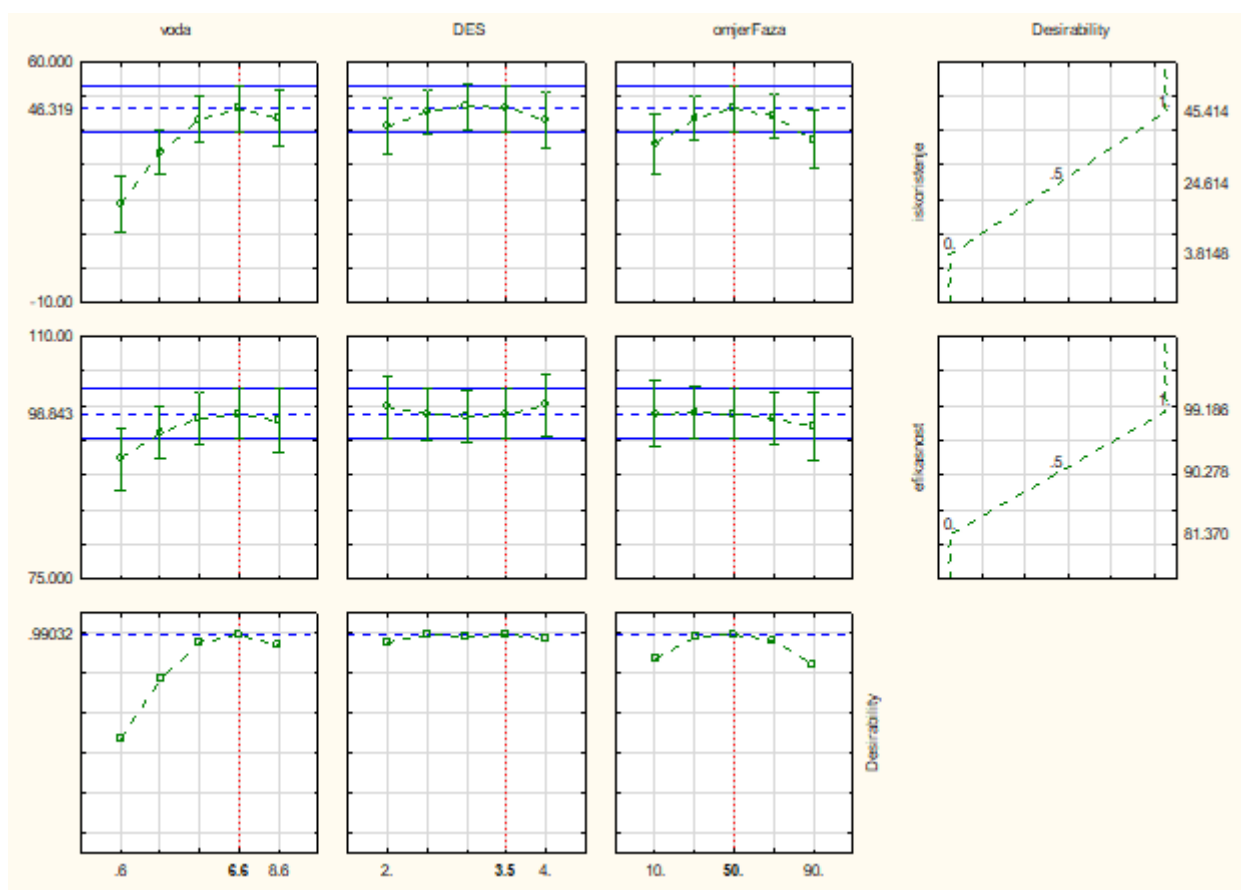
te se na temelju p -vrijednosti u Tablici 13. i kriterija $p < 0,05$ može zaključiti da niti jedan parametar nema ni pozitivnog ni negativnog utjecaja na učinkovitost ekstrakcije glicerola. Isto vrijedi i za međudjelovanja pojedinih parametara. Prema tome se može zaključiti da se u ovom slučaju promjenama promatranih parametara ne može značajno utjecati na učinkovitost ekstrakcije glicerola uz korištenje ChCl:EG.

Na Slici 13. prikazana je usporedba rezultata simulacije modela i eksperimentalnih podataka za učinkovitost ekstrakcije. Značajno rasipanje rezultata simulacije modela i eksperimentalnih podataka potvrđeno je i najmanjom vrijednošću korelacijskog koeficijenta koji je u ovoj analizi bio $R^2 = 0,7297$. Shodno kriteriju $R^2 > 0,75$ može se zaključiti da ovaj model nije prikladan za opis procesa ekstrakcije glicerola u slučaju korištenja ChCl:EG te da zahtjeva poboljšanje.

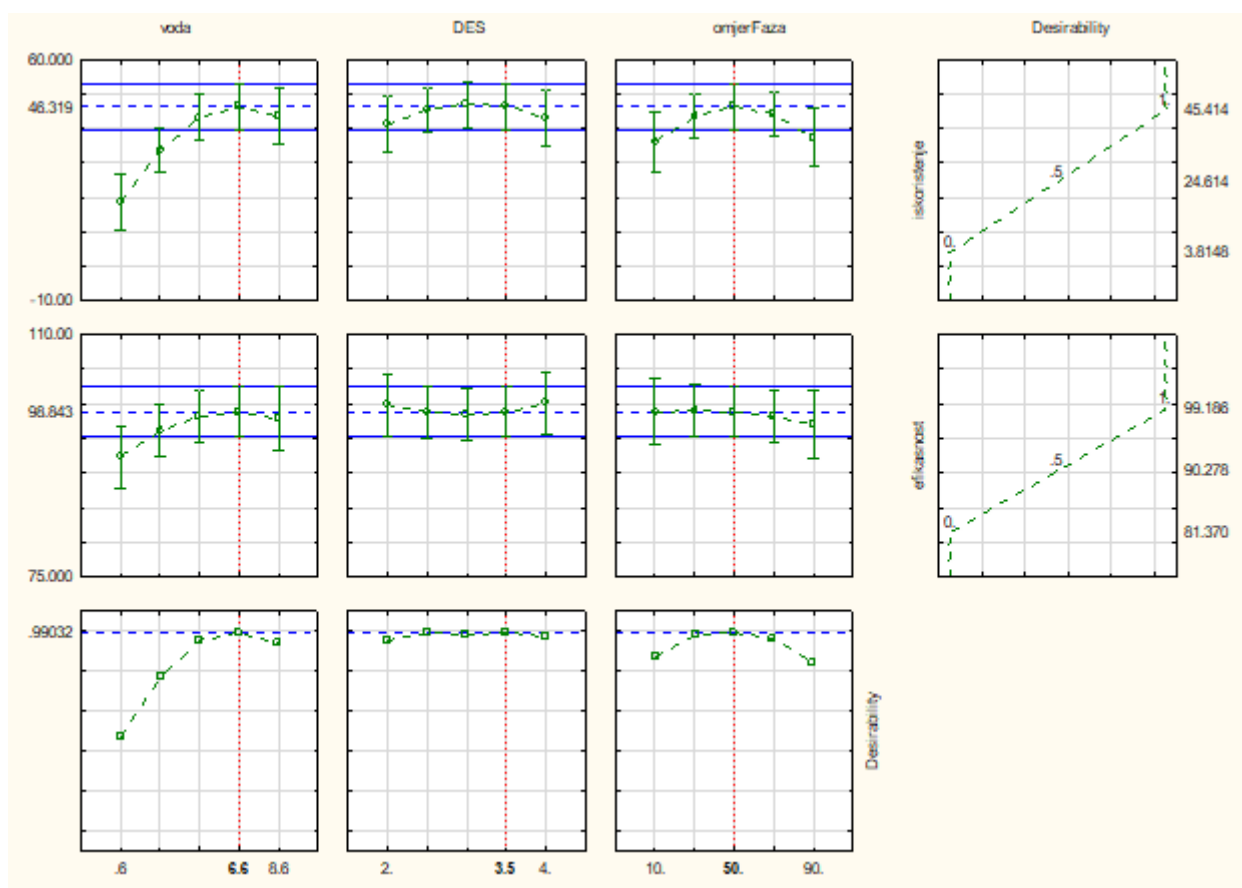


Slika 13. Odnos vrijednosti dobivenih simulacijom modela i eksperimentalnih rezultata za točke eksperimentalnog plana prema Box-Behnken eksperimentalnom dizajnu na primjeru učinkovitosti ekstrakcije glicerola u pokusima provedenima s ChCl:EG

Optimalne vrijednosti procesnih varijabli (udio vode, sastav DES-a i omjer faza) dobivene su simulacijama razvijenih matematičkih modela, odnosno numeričkim optimiranjem u programskom paketu Design-Expert. Rezultati optimiranja prikazani su na Slici 14. za ChCl:Gly DES i Slici 15. za ChCl:EG DES. S obzirom da se provodi optimizacija dvaju procesa, pojavljuju se slučajevi u kojima nije moguće postići maksimalni odziv oba procesa pri istim uvjetima, odnosno procesnim veličinama, kao primjerice pri optimiranju sastava DES-a. Pritom su kao optimalni uvjeti odabrani oni koji odgovaraju maksimalnom iskorištenju biodizela budući da su vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije glicerola općenito visoke te njihove promjene s promjenama procesnih veličina nisu toliko izražene kao što je to slučaj kod iskorištenja biodizela.



Slika 14. Određivanje optimalnih uvjeta sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola za ChCl:Gly DES



Slika 15. Određivanje optimalnih uvjeta sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola za ChCl:EG
DES

Optimalni uvjeti određeni numeričkim optimiranjem za provedbu integriranog procesa sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola prikazani su u Tablici 13. te su za oba ispitana DES-a jednaki (Slike 14. i 15.). Kao što je vidljivo, za postizanje većeg iskorištenja te veće učinkovitosti procesa potrebno je povećati udio vode te promijeniti sastav DES-a. Na ovaj je način primjenom metode odzivnih površina dobiven uvid u utjecaj analiziranih procesnih veličina na iskorištenje biodizela i učinkovitost ekstrakcije glicerola u integriranom procesu.

Tablica 13. Početni i optimalni uvjeti integriranog procesa sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola određeni metodom odzivnih površina za ChCl:Gly i ChCl:EG DES-ove

	Početni uvjeti	Optimalni uvjeti
Parametar	Vrijednost	
Udio vode, % mas.	4,6	6,6
Molarni omjer ChCl:Gly	1:3	1:3,5
Omjer reakcijske i ekstrakcijske faze	50:50	50:50

4.2. Proizvodnja i pročišćavanje biodizela u šaržnom reaktoru

Kako bi se usporedili dobiveni rezultati, provedena su tri dodatna eksperimenta na laboratorijskoj tresilici ($t = 2$ h, 400 okr min^{-1} i $T = 40$ °C). Svi eksperimenti provedeni su pri istom molarnom omjeru ulja i metanola (1:3,4) te pri istoj koncentraciji enzima ($\gamma_{E,0} = 0,1$ mg mL^{-1}). U eksperimentu I provedena je samo sinteza biodizela bez pročišćavanja (bez DES-a) pri masenom udjelu vode od 4,6%. Eksperiment II proveden je pri početnim uvjetima koji su definirani u Tablici 13, dok je eksperiment III proveden pri optimalnim uvjetima (Tablica 13). Eksperimenti su provedeni samo s ChCl:Gly DES-om kao medijem budući da su veća iskorištenja biodizela pri optimizaciji postignuta upravo u tom mediju, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 14.

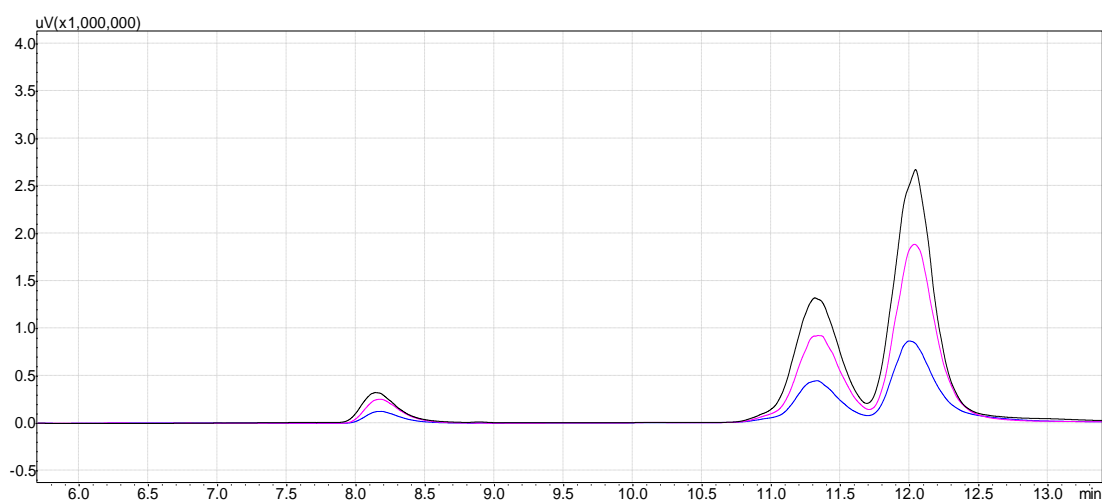
Tablica 14. Usporedba iskorištenja, učinkovitosti ekstrakcije i udjela glicerola pri različitim početnim uvjetima sinteze i pročišćavanja biodizela

	Eksperiment 1	Eksperiment 2 (početni uvjeti)	Eksperiment 3 (optimalni uvjeti)
$I, \%$	61,61	43,01	43,54
$\eta, \%$	-	97,52	99,54
$w_G, \%$	0,35	0,15	0,027

Kao što je vidljivo, iskorištenje biodizela nešto je veće u eksperimentu I, nego u eksperimentima II i III. S druge strane u eksperimentu I znatno je veći maseni udio glicerola te se tako dobiven biodizel mora podvrgnuti dodatnom pročišćavanju koje je dugotrajno i skupo. Usporedbom rezultata eksperimenata II i III, odnosno eksperimenata provedenih pri početnim i optimalnim uvjetima, jasno je da je cilj optimizacije postignut budući da su i iskorištenje i

učinkovitost ekstrakcije veći u eksperimentu III provedenom pri optimalnim uvjetima. Također, maseni udio glicerola ostvaren u tom eksperimentu ima vrijednost blisku onoj propisanoj normom. Vjerojatno bi ova vrijednost bila manja od normom propisanih 0,02 % kada bi se eksperimenti provodili duže od dvosatnog intervala korištenog u ovom radu.

Poznato je da povećanje temperature pozitivno djeluje na učinkovitost procesa ekstrakcije.²⁷ Kako bi se ispitalo utjecaj povećanja temperature na učinkovitost ekstrakcije, integrirani proces proizvodnje i pročišćavanja biodizela u šaržnom reaktoru proveden je u ukupnom trajanju od 48 sati na tri različite temperature (40, 50 i 60 °C) pri optimalnim uvjetima određenim u pokusima provedenim s ChCl:Gly. Najveće iskorištenje biodizela postignuto je pri temperaturi 40 °C (temperaturni optimum enzima lipaza). Porastom temperature iskorištenje biodizela znatno pada pa je tako pri temperaturi od 50 °C iskorištenje 1,42 puta manje dok je pri 60 °C čak 3,07 puta manje u odnosu na vrijednost dobivenu pri 40 °C. Opisani odnosi iskorištenja biodizela za pokuse provedene pri različitim temperaturama mogu se lako uočiti na kromatogramu prikazanom na Slici 16. S druge strane, učinkovitost ekstrakcije nije se značajno mijenjala što ukazuje da temperatura nije ključna veličina u daljnjem razvoju procesa. Kao jedno od rješenja za dodatnu intenzifikaciju procesa moguće je korištenje neke druge vrste reaktora, primjerice cijevnih mikroreaktora čijom primjenom bi se, zbog njihove specifične izvedbe i povezanih prednosti s obzirom na prijenos tvari i energije, moglo očekivati povećanje iskorištenja biodizela i učinkovitosti ekstrakcije glicerola tijekom provedbe integriranog procesa.



Slika 16. Kromatogram uzoraka nakon provedbe integriranog procesa sinteze i pročišćavanja biodizela u šaržnom sustavu pri temperaturama 40 (—), 50 (—) i 60 (—) °C

5. Zaključak

Provedena je optimizacija integriranog procesa sinteze biodizela iz jestivog suncokretovog ulja i metanola katalizirane enzimom lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* te ekstrakcije nusprodukta glicerola, odnosno pročišćavanja biodizela pomoću dvaju eutektičkih otapala u svrhu dobivanja biodizela prikladnog za direktnu upotrebu. Za optimizaciju je korištena metoda odzivnih površina (RSM).

Veća iskorištenja biodizela i učinkovitosti ekstrakcije uz zadržavanje visoke vrijednosti aktivnosti enzima dobiveni su kod pokusa provedenih s ChCl:Gly DES-om koji je stoga prikladniji reakcijski medij za provedbu ovog procesa.

Optimalni uvjeti za procese sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola određeni numeričkim optimiranjem i potvrđeni neovisnim pokusom postižu se pri omjeru faza 1:1, masenom udjelu vode od 6,6% te molarnom omjeru ChCl:Gly, odnosno ChCl:EG od 1:3,5.

Utjecaj temperature na učinkovitost ekstrakcije glicerola je zanemariv. Kako se s povećanjem temperature znatno smanjuje iskorištenje biodizela kao optimalna temperatura određena je temperatura 40 °C pri kojoj je aktivnost enzima lipaze najveća.

6. Zahvale

Ovaj rad financirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-2016-06-7993.



Na početku, zahvaljujemo našem mentoru, prof. dr. sc. Bruni Zeliću, ponajprije na pruženoj prilici za rad u ovom zanimljivom području, pri čemu smo iz istog stekle mnoga nova znanja, a isto tako i na svim danim savjetima te beskonačnom strpljenju pri izradi ovog rada. Hvala Vam na motivaciji i prenesenom znanju!

Također, veliko hvala dr. sc. Aniti Šalić i Martinu Gojunu, mag. ing. oecoing. na neposrednom vodstvu, nesebičnoj pomoći te brojnim savjetima i objašnjenjima, kako pri pisanju rada, tako i pri izvedbi eksperimentalnog dijela. Hvala što ste uvijek bili strpljivi i na raspolaganju za sva pitanja, bilo nam je neizmjereno drago raditi s vama!

U konačnici, želimo zahvaliti i našim obiteljima te prijateljima na podršci, motivaciji i razumijevanju koje su nam uvijek nesebično pružali.

7. Literatura

1. Franjo, M., Šalić, A., Zelić, B., Microstructured devices for biodiesel production by transesterification, *Biomass Conv. Bioref.*, 8 (2018) 1005-1020.
2. Chattopadhyay, S., Sen, R., Fuel properties, engine performance and environmental benefits of biodiesel produced by a green process, *Appl. Energy*, 105 (2013) 319-326.
3. Gojun, M., Bačić, M., Ljubić, A., Šalić, A., Zelić, B., Transesterification in microreactors - overstepping obstacles and shifting towards biodiesel production on a microscale, *Micromachines*, 11 (2020) 457.
4. Budžaki, S., Miljić, G., Tišma, M., Sundaram, S., Hessel, V., Is there a future for enzymatic biodiesel industrial production in microreactors?, *Appl. Energy*, 201 (2017) 124-134.
5. Sinčić, D., Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela I, *Kem. Ind.*, 63 (2014) 19-31.
6. Šalić, A., Jurinjak Tušek, A., Sander, A., Zelić, B., Lipase catalysed biodiesel synthesis with integrated glycerol separation in continuously operated microchips connected in series, *New Biotechnol.*, 47 (2018) 80-88.
7. Dwivedi, G., Sharma, M. P., Application of Box–Behnken design in optimization of biodiesel yield from Pongamia oil and its stability analysis, *Fuel*, 145, (2015) 256–262.
8. Chhabra, M., Dwivedi, G., Baredar, P., Kumar Shukla, A., Garg, A., Jain, S., Production & optimization of biodiesel from rubber oil using BBD technique, *Mater. Today: Proc.* (2020), in press.
9. Bart, J. C. J., Palmeri, N., Cavallaro, S., *Biodiesel Science and Technology*, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 2010, str. 1-49.
10. Ranganathan, S. V., Narasimhan, S. L., Muthukumar, K., An overview of enzymatic production of biodiesel, *Bioresour. Technol.* 99 (2008) 3975-3981.
11. Barreiros, T., Young, A., Cavalcante, R., Queiroz, E., Impact of biodiesel production on a soybean biorefinery, *Renew. Energy*, 159 (2020) 1066-1083.
12. Mathiyazhagan, M., Ganapathi, A., Factors affecting biodiesel production, *Res. Plant Biol.*, 1 (2011) 1-5.

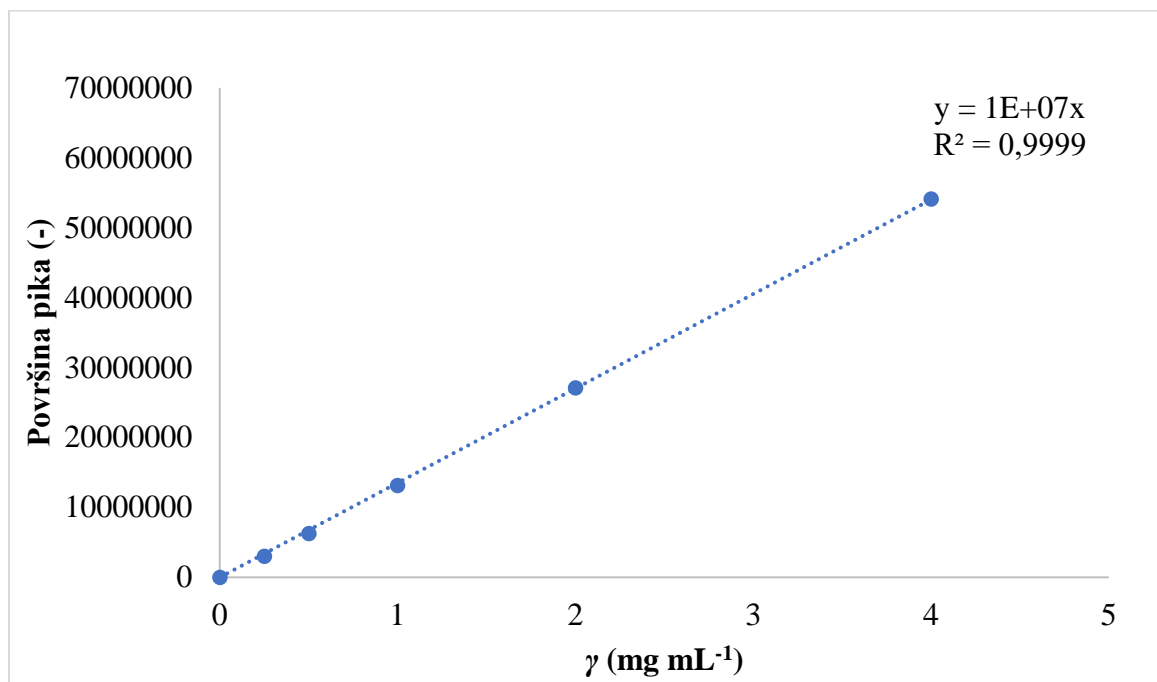
13. Singh, D., Sharma, D., Soni, S. L., Sharma, S., Kumar Sharma, P., Jhalani, A., A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel, *Fuel*, 262 (2019) 116553.
14. Chozhavendhan, S., Vijay Pradhap Singh, M., Fransila, B., Praveen Kumar, R., Karthiga Devi, G., A review on influencing parameters of biodiesel production and purification processes, *Curr. Res. Green Sustain. Chem.*, 1-2 (2020) 1-6.
15. 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, *Biotechnol. Adv.*, 28 (2010) 500-518.
16. Wu, S., Song, L., Sommerfeld, M., Hu, Q., Chen, W., Optimization of an effective method for the conversion of crude algal lipids into biodiesel, *Fuel*, 197 (2017) 467-473.
17. Moazeni, F., Chen, Y.-C., Zhang, G., Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review, *J. Clean. Prod.*, 216 (2019) 117-128.
18. Hasan F., Shah A.A., Javed S., Hameed A., Enzymes used in detergents: Lipases, *African J. Biotechnol.* 9 (2010) 4836-4844.
19. Lokha, Y., Arana-Peña, S., Rios, N. S., Mendez-Sanchez, C., Gonçaves, L. R. B., Lopez-Gallego, F., Fernandez-Lafuente, R., Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions, *Enzyme Microb. Technol.*, 133 (2019) 109461.
20. Fernandez-Lafuente, R., Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 62 (2010) 197-212.
21. Šalić, A., Jurinjak Tušek, A., Gojun, M., Zelić, B., Biodiesel purification in microextractors: Choline chloride based deep eutectic solvents vs water, *Sep. Purif. Technol.*, 242 (2020) 116783
22. Hayyan, M., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., AlNashef, I. M., A novel technique for separating glycerine from palm oil-based biodiesel using ionic liquids, *Fuel Process. Technol.*, 91 (2101) 116-120.
23. Ho, K. C., Shahbaz, K., Rashmi, W., Mjalli, F. S., Hashim, M. A., Alnashef, I. M., Removal of glycerol from palm oil-based biodiesel using new ionic liquids analogues, *J. Eng. Sci. Technol.*, 10 (2015) 98.

24. Gotor-Fernandez, V., Paul, C. E., Deep eutectic solvents for redox biocatalysis, *J. Biotechnol.*, 293 (2019) 24-35.
25. Cvjetko Bubalo, M., Jurinjak Tušek, A., Vinković, M., Radošević, K., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I., Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 122 (2015) 188-198.
26. Petračić, A., Sander, A., Ćurić, M., Furač, D., Šimićević, A., Parlov-Vuković, J., Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u predobradi otpadnih životinjskih masti i pročišćavanju sintetiziranog biodizela, *Kem. Ind.*, 68 (2019) 397-405.
27. Petračić, A., Sander, A., Magić, L., Separation of free glycerol and glycerides from biodiesel by means of liquid-liquid extraction, *Sci. J. Energy Eng.*, 5 (2017) 87-94.
28. Homan, T., Shahbaz, K., Farid, M. M., Improving the production of propyl and butyl esters-based biodiesel by purification using deep eutectic solvents, *Sep. Purif. Technol.*, 174 (2017) 570-576.
29. Bas, D., Boyac, I. H., Modeling and optimization I: usability of response surface methodology, *J. Food Eng.*, 78 (2007) 836-845.
30. Bezzera, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escalera, L. A., Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta*, 76 (2008) 965-977.
31. Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nyström, A., Pettersen, J., Bergman, R., Experimental design and optimization, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 42 (1998) 3-40.
32. Merza, F., Fawzy, A., AlNashef, I., Al-Zuhair, S., Taher, H., Effectiveness of using deep eutectic solvents in enzymatic biodiesel production from waste oils, *Energy Rep.*, 4 (2018) 77-83.
33. Budžaki, S., Šalić, A., Zelić, B., Tišma, M., Enzyme-catalysed biodiesel production from edible and waste cooking oils, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 29 (2015) 329-333.
34. Bondioli, P., Della Bella, L., An alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 107 (2005) 153-157.

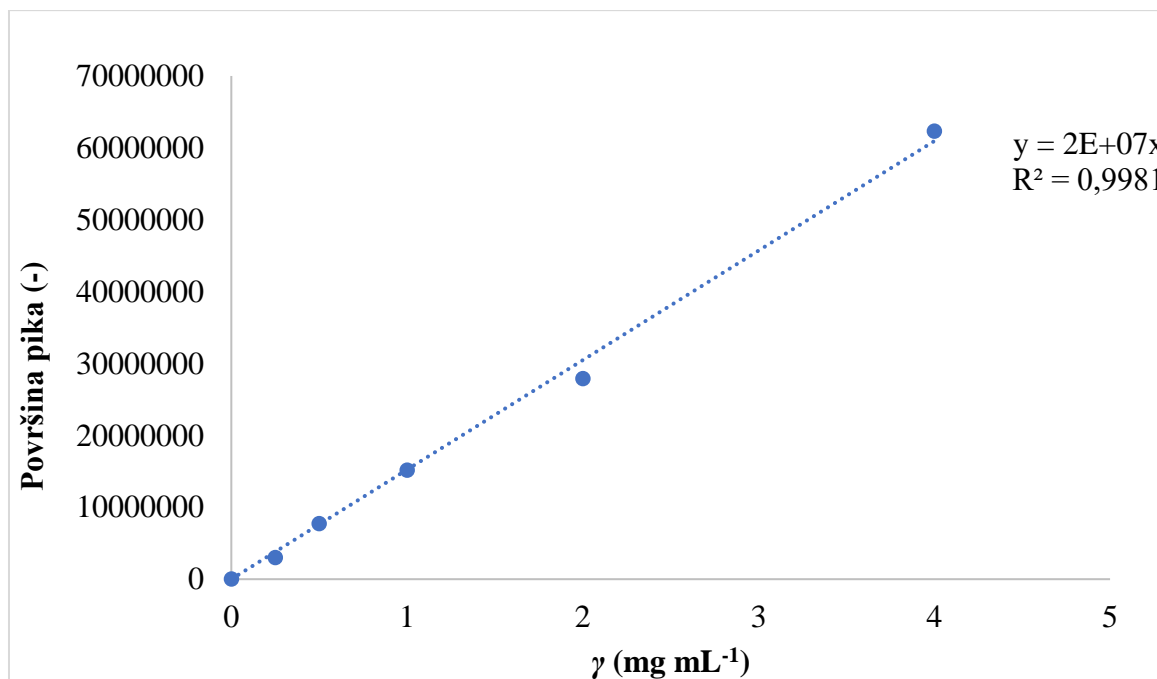
35. Teng, D., Fang, Y., Song, X., Gao, Y., Optimization of enzymatic hydrolysis parameters for antioxidant capacity of peptide from goat placenta, *Food Bioprod. Process.*, 89 (2011) 202-208.
36. Le Man, H., Behera, S. K., Park, H. S., Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate, *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 7 (2010) 157-164.

8. Prilozi

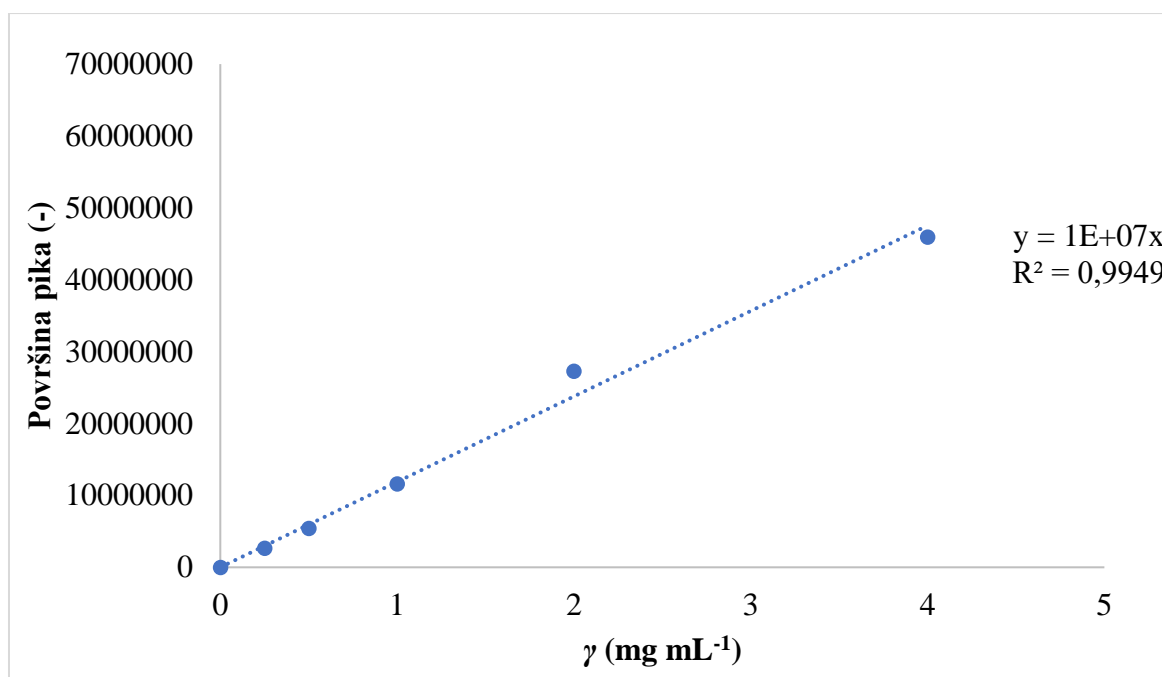
Prilog 1. Baždarni dijagram estera palmitinske kiseline



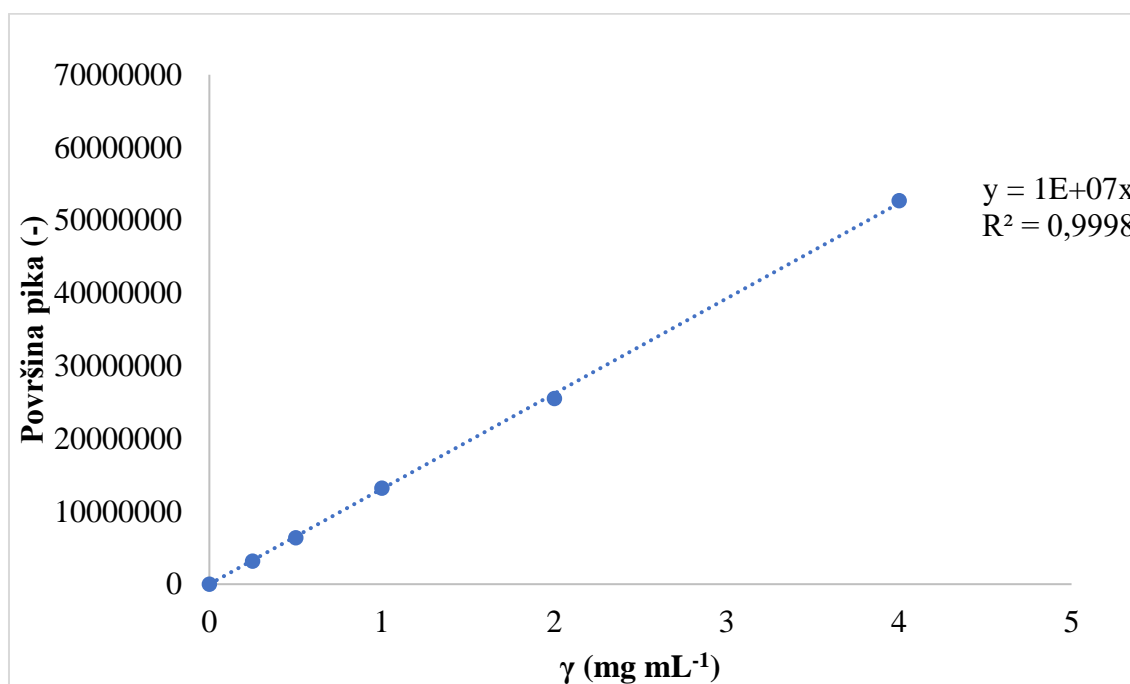
Prilog 2. Baždarni dijagram estera stearinske kiseline



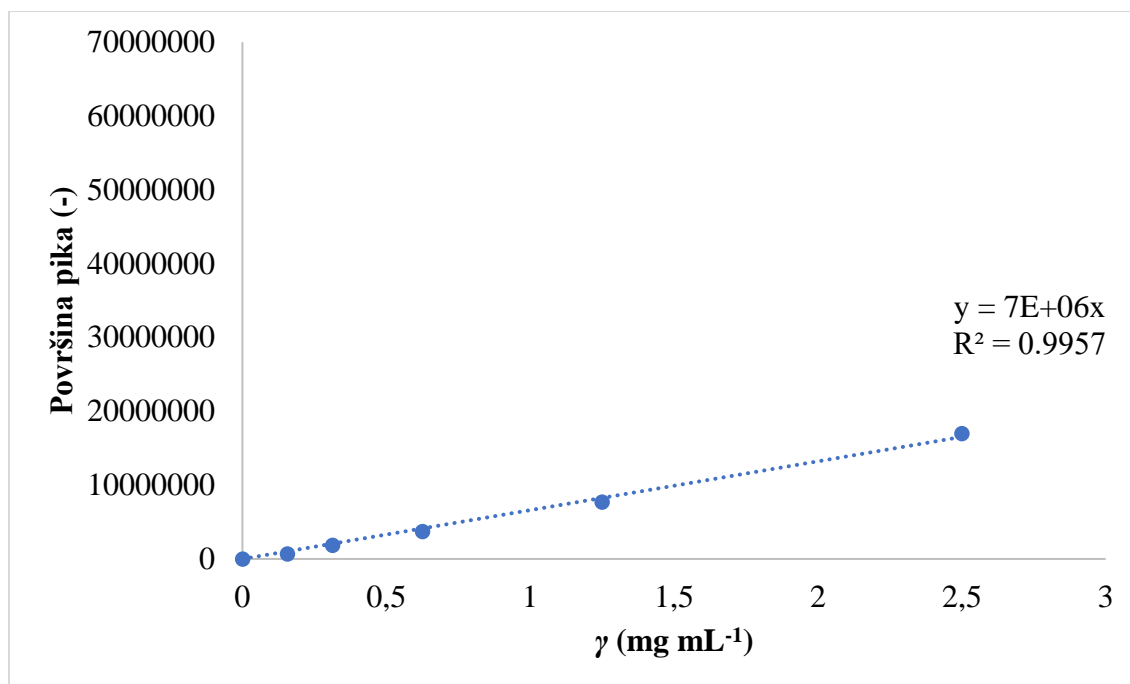
Prilog 3. Baždarni dijagram estera oleinske kiseline



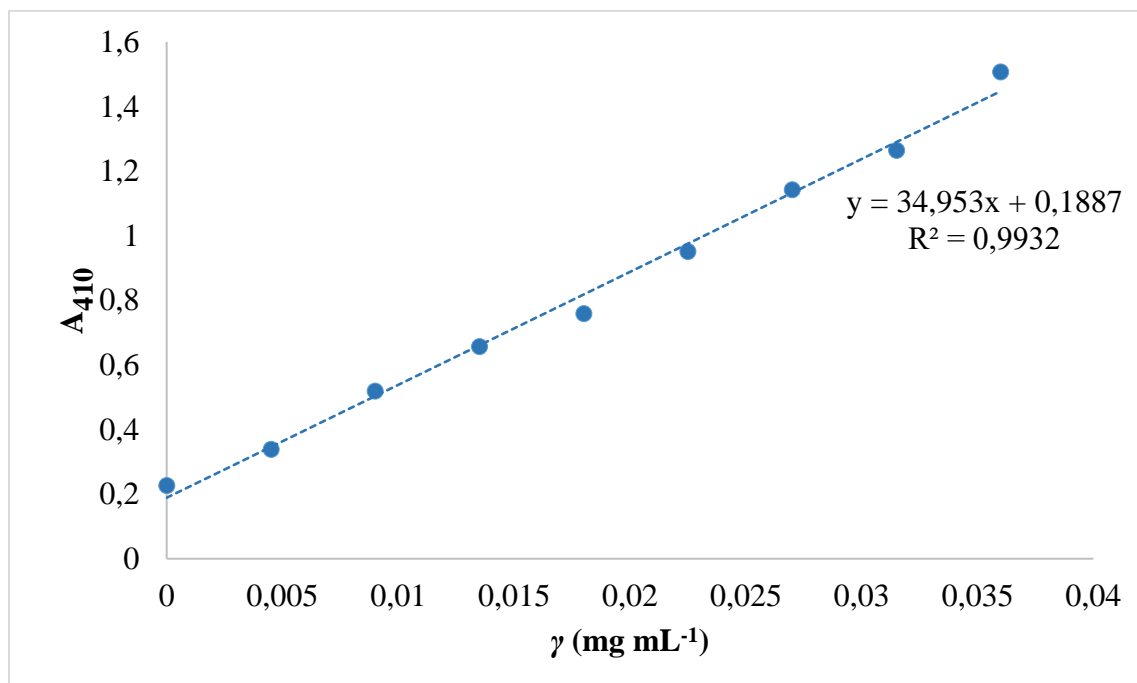
Prilog 4. Baždarni dijagram estera linolne kiseline



Prilog 5. Baždarni dijagram glicerola – plinska kromatografija



Prilog 6. Baždarni dijagram glicerola – spektrofotometrijski



Sažetak

OPTIMIZACIJA INTEGRIRANOG PROCESA SINTEZE BIODIZELA I EKSTRAKCIJE GLICEROLA EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Matea Bačić, Anabela Ljubić

Ubrzana urbanizacija i industrijalizacija pospješuju veću potrošnju rezervi fosilnih goriva, što je dovelo do naglog pada količine rezervi nafte. Posljedično, povećava se svijest o brizi za okoliš te time raste interes za proizvodnju goriva iz biljaka ili organskog otpada (biogoriva), među kojima dominiraju biodizel i bioetanol. Biodizel, smjesa alkilnih estera masnih kiselina, smatra se alternativnim gorivom koje je netoksično te ga pri izgaranju odlikuje niska emisija CO₂ u atmosferu u usporedbi s konvencionalnim dizelom. Glavna prepreka komercijalizaciji biodizela je tehnologija proizvodnje biodizela što uključuje proizvodnju, najčešće transesterifikacijom, te procese pročišćavanja biodizela, odnosno uklanjanja glicerola koji se provode kako bi biodizel bio pogodan za upotrebu i usklađen s odgovarajućim normama. Velike se uštede pri proizvodnji i pročišćavanju biodizela mogu postići primjenom enzimske transesterifikacije te korištenjem eutektičkih otapala kao sredstva za pročišćavanje dobivenog biodizela. S obzirom na visoku cijenu enzima kao katalizatora potrebno je pronaći optimalne reakcijske uvjete kako bi proces bio isplativ i pogodan za realni sektor.

U ovom radu provedena je optimizacija integriranog procesa transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja kataliziranog komercijalnim enzimom lipaza i ekstrakcije glicerola iz proizvedenog biodizela korištenjem različitih eutektičkih otapala. Za optimiranje procesnih uvjeta primijenjena je metoda odzivnih površina (RSM). Za dva sustava koji su se međusobno razlikovali u upotrijebljenom eutektičkom otapalu (ChCl:Gly ili ChCl:EG) određene su optimalne vrijednosti udjela vode i omjera faza (biodizel: eutektičko otapalo) u sustavu te molarni omjer komponenti eutektičkog otapala. Optimalni uvjeti za procese sinteze biodizela i ekstrakcije glicerola određeni su numeričkim optimiranjem te se postižu pri omjeru faza 50:50, masenom udjelu vode od 6,6% te molarnom omjeru ChCl:Gly, odnosno ChCl:EG od 1:3,5. Pokusi provedeni s ChCl:Gly rezultirali su većim iskorištenjem biodizela i većom učinkovitošću ekstrakcije glicerola. Pri optimalnim uvjetima proveden je integrirani proces proizvodnje i pročišćavanja biodizela u šaržnom reaktoru pri tri različite temperature te je kao optimalna za provedbu integriranog procesa određena temperatura od 40 °C.

Ključne riječi: biodizel, enzim lipaza, eutektičko otapalo, pročišćavanje, optimizacija procesa

Summary

OPTIMIZATION OF THE INTEGRATED PROCESS OF BIODIESEL SYNTHESIS AND GLYCEROL EXTRACTION USING DEEP EUTECTIC SOLVENTS

Matea Bačić, Anabela Ljubić

Rapid urbanization and industrialization promote higher consumption of fossil fuel reserves, which has led to a sharp decline in oil reserves. Consequently, awareness of caring for the environment is increasing, and thus the interest in the production of plant fuels or organic waste (biofuels), among which biodiesel and bioethanol dominate, is growing as well. Biodiesel, a mixture of alkyl esters of fatty acids, is considered an alternative fuel that is non-toxic and has lower CO₂ emissions into the atmosphere compared to conventional diesel. The main obstacle to the commercialization of biodiesel is the technology of its production, which includes the production, most often by transesterification, and the processes of biodiesel purification, i.e. removal of glycerol, which is carried out to make it suitable for use. Significant savings in the production and purification of biodiesel can be achieved by the application of enzymatic transesterification and the use of deep eutectic solvents as a means of purifying the resulting biodiesel. Given the high cost of enzymes as catalysts, it is necessary to find optimal reaction conditions to make this process cost-effective and suitable for the real sector.

For the purposes of this research, the optimization of the integrated processes of transesterification of edible sunflower oil, catalyzed by the commercial enzyme lipase, and the extraction of glycerol from the produced biodiesel using different deep eutectic solvents, was performed. The response surface method (RSM) was applied to optimize the process conditions. For two systems that differed in the eutectic solvent used (ChCl:Gly or ChCl:EG), the optimal values of water content and phase ratio (biodiesel: deep eutectic solvent) in the system, and the molar ratio of deep eutectic solvents components were determined. Optimal conditions for the processes of biodiesel synthesis and glycerol extraction are determined by numerical optimization and are achieved at a phase ratio 50:50, a mass fraction of water of 6,6% and a molar ratio of ChCl: Gly and ChCl:EG of 1: 3,5. Experiments performed with ChCl: Gly resulted in higher biodiesel yields and higher glycerol extraction efficiencies. The integrated process of production and purification of biodiesel was carried out under optimal conditions in a batch reactor at three different temperatures and a temperature of 40 °C was determined as optimal for the implementation of the integrated process.

Keywords: biodiesel, lipase, eutectic solvent, purification, process optimization

Životopis

Matea Bačić rođena je 17. studenog 1997. godine u Rijeci. Završila je Osnovnu školu Gornja Vežica u Rijeci te je sudjelovala na regionalnim natjecanjima iz matematike i državnim natjecanjima iz geografije, na kojem je osvojila 1. mjesto. Potom je upisala Salezijansku klasičnu gimnaziju s pravom javnosti u Rijeci, opći smjer za sportaše. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjelovala je na državnom natjecanju iz geografije te je proglašena za najboljeg učenika generacije. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo upisala je u Zagrebu 2016. godine. Kao član Organizacijskog odbora *1. Studentskog kongresa o inženjerstvu materijala e-SKIM 2019.* dobitnica je Dekanove nagrade za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici za studentski projekt *1. Studentski kongres o inženjerstvu materijala e-SKIM 2019.* Završni rad pod temom „Transesterifikacija otpadnog jestivog suncokretovog ulja u mikroreaktoru katalizirana komercijalnim enzimom lipaza“ pod vodstvom prof. dr. sc. Bruna Zelića obranila je 2019. godine. Iste je godine upisala diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijske tehnologije i proizvodi te je izabrana za tajnicu Studentskog zbora Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. S posterskim priopćenjima sudjelovala je na *2. kongresu studenata biotehnologije i XII. susretu mladih kemijskih inženjera* te je koautor znanstvenog rada objavljenog u časopisu *Micromachines.*

Anabela Ljubić rođena je 24. travnja 1997. godine u Varaždinu. U Ivancu je završila Osnovnu školu Ivana Kukuljevića Sakcinskog i Osnovnu glazbenu školu Ladislav Šaban te je sudjelovala na državnim natjecanjima iz fizike, matematike i hrvatskog jezika, dok je na državnom natjecanju iz kemije osvojila 2. mjesto. Potom je upisala Prvu gimnaziju Varaždin, smjer prirodoslovno-matematička gimnazija i tijekom tog razdoblja sudjelovala na državnim natjecanjima iz kemije i fizike, a proglašena je i najboljom maturanticom škole. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo upisala je u Zagrebu 2016. godine te je tijekom studija primila nagrade Fakulteta za najbolju studenticu 1., 2. i 3. godine preddiplomskih studija. Završni rad obranila je 2019. godine uz pohvalu *Summa Cum Laude.* Iste godine upisala je diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijsko procesno inženjerstvo i postala članica Studentskog zbora Fakulteta. Sudjelovala je s posterskim priopćenjima na *2. kongresu studenata biotehnologije i XII. susretu mladih kemijskih inženjera* te je koautor znanstvenog rada objavljenog u časopisu *Micromachines.*