

Výzkumný ústav potravinářský Praha, v.v.i.

QD 60079

Výzkum výroby biopaliva z odpadních živočišných tuků

**Periodická zpráva
2008**

Praha, leden 2009

1. Úvod

Biopalivem uvedeným v názvu projektu je míněn častěji používaný a ve světě rozšířený název biodiesel. Biodiesel můžeme definovat jako alkylestery mastných kyselin, získávané transesterifikací olejů nebo tuků rostlinného či živočišného původu s alkoholy s krátkými řetězci jako je metanol případně etanol. Jeho využití spočívá ve smíchání s palivem ropného původu určeného pro dieselové motory v různém poměru. V současné době se nejčastěji používá přídavek 5% biodieselu do klasického ropného paliva (Montgomery R., 2004). Také v ČR od 1. září 2007 vešla v platnost vyhláška, která má zaručovat, že v motorové naftě budou minimálně 2 objemová procenta tzv. MEŘO. V tomto případě se ale jedná o metylestery z řepkového oleje, v důsledku čehož stoupají osevní plochy řepky olejné. V celosvětovém měřítku se biodiesel vyrábí nejčastěji transesterifikací sojového (Stein K., 2007) nebo palmového oleje (Carter C. et al., 2007). Konkurence mezi potravinami a biopalivem vede ke snaze o využití některých nepotravinářských surovin, jako např. oleje z defektních kávových zrn (Oliveira L.S. et al., 2008) nebo odpadního oleje z restaurací (Canakci M., 2007). V subtropických oblastech se začínají přímo pěstovat rostliny pro získávání nepotravinářského oleje. Jedná se především o jatrofu, jejíž olej je nepoživatelný, protože je toxický, nebo o řízenou kultivaci určitých druhů řas. Na druhé straně je k dispozici odpadní kafilerní tuk v poměrně velkém množství, soustředěný v malém počtu kafilerií a dostupný jako surovina pro transesterifikaci bez omezení.

Transesterifikaci je možno provádět v kyselém nebo alkalickém prostředí případně enzymaticky. Kyselý a alkalický způsob byly diskutovány v minulých zprávách. Enzymatický způsob má tu výhodu, že je možno ho provádět za mírných teplot, ovšem cena používaných enzymů může být poměrně vysoká. K transesterifikaci je možno použít lipas různého původu, které nejsou inhibovány substrátem ani používaným alkoholem, k reakci mohou být tedy použity různé oleje a tuky. Enzymové transesterifikaci byly podrobeny čisté rostlinné oleje, a to slunečnicový (Al-Zuhair, 2005), sojový (Noureddini et al., 2004) i nepotravinářský olej z jatrophy (Shah et al., 2004) za použití různých enzymů s různými výtěžky. Alkoholýza čištěného oleje z bavlníkových semen byla testována (Köhe et al., 2002) s výtěžkem 72 až 94% metylesterů. Stejná surovina byla testována v r. 2007 (Royon et al., 2007) za použití metanolu s přídavkem butanolu z důvodu prodloužení životnosti (snížení inhibice enzymu) s výtěžkem přes 90%. Byla studována také enzymatická konverze kuchyňských odpadních jedlých tuků (Watanabe et al., 2001). Byly testovány i lipasy původem z různých mikroorganismů (např. z *Thermomyces lanuginosa*, *Candida antarctica*, *Pseudomonas cepacia*) imobilizované na různých nosičích použité pro transesterifikaci odpadních kuchyňských tuků (Hsu et al., 2002).

2. Stručné zhodnocení průběhu řešení za r. 2008

Tento projekt byl zahájen v únoru r. 2006. Účastní se ho jako koordinátor Výzkumný ústav potravinářský Praha v.v.i. a Česká zemědělská universita v Praze. Je plánován na čtyři roky, a to 2006 až 2009. Pro r. 2008 byly plánovány dva dílčí cíle projektu, a to:

V003 – Vypracování a optimalizace kyselé katalyzované transesterifikace živočišného tuku, který přichází v úvahu jako nejvýznamnější (1.1.2007 – 30.6. 2008)

V005 – Vypracování postupu enzymové transesterifikace živočišných tuků (1.1.2008 – 31.12.2008)

V rámci výstupu V003 byla v souladu s plánovanými aktivitami prováděna optimalizace kyselé katalyzované transesterifikace kafilerního tuku v souladu s výsledky předchozího roku. V rámci výstupu V005 byla dále testována možnost enzymové transesterifikace na materiálu, který přichází v úvahu jako odpadní tj. přímo na kafilerním tuku včetně následné optimalizace.

V rámci těchto výstupů bylo na tento rok plánováno 6 aktivit, a to:

A00/08 Vypracování optimalizovaného postupu kyselé katalyzované transesterifikace živočišného tuku, který přichází v úvahu jako nejvýznamnější

A01/08 Imobilizace enzymu na vhodný nosič

A02/08 Orientační ověření možnosti enzymové transesterifikace modelového živočišného tuku

A03/08 Optimalizace enzymové transesterifikace živočišného tuku, který je nejvíce zastoupen v zemědělských odpadech

A04/08 Výběr vhodného tuku a doporučení vhodného transesterifikačního postupu pro technologický postup transesterifikace

A05/08 Presentace na konferenci a vypracování článku do sborníku, vypracování článku do odborného recenzovaného periodika

2.1. Vypracování optimalizovaného postupu kyselé katalyzované transesterifikace živočišného tuku, který přichází v úvahu jako nejvýznamnější

V tomto roce řešení byl optimalizován postup kyselé katalyzované transesterifikace odpadního kafilerního tuku, který je vlastně směsí různých tuků a je produkován v dostatečném

množství. Tento tuk je jako jediný typicky odpadní, na rozdíl od jednodruhových, (hovězí, vepřový) které mohou být chápány jako vedlejší produkty s určitým dalším využitím.

Materiál a metody

Kafilerní tuk byl odebrán v kafilerii Agris s.r.o., Medlov. Tento tuk je získáván převážně z vepřového a hovězího odpadu s menším množstvím ostatních živočišných tuků. Zpracování zahrnuje expanzní sušení, separaci za vysokého tlaku a teploty a konečně ochlazení. Byl odebrán vzorek z úseku separace tuků; v okamžiku odběru byl tekutý, o teplotě cca 80°C. V této kafilerii je tuk získáván následujícím způsobem. Živočišný odpad se umístí do kontejneru a rozseká na kousky cca 5 cm. Hrubé zpracování tohoto materiálu se provádí při 135°C za tlaku 3 atm po dobu 20 min. Poté se postupně snižuje tlak, a tím se materiál vysuší (odpaří se voda). Takto vysušený materiál se zahřeje na 80 °C a za tlaku 300 atm se vylisuje tuk. Tento tuk je tekutý a později ztuhne (při 40 – 50 °C). Takto získaný tuk má poněkud jiné vlastnosti než jednodruhové tuky získané pouhým vytavením, a to vyšší číslo kyselosti, které jsme stanovili dle ČSN 58 01 30.

Vlastní esterifikace byly prováděny v kulatých baňkách, zahříváním pod zpětným chladičem na vodní lázni. Obsah mastných kyselin byl sledován metodou kapilární plynové chromatografie metodou dle Bannona (1985) na chromatografu Hewlett – Packard 6890 N. Methanol, diethylether, hexan a kyselina sírová byly od firmy Lach – Ner, s.r.o., Česká republika. Standardy methylesterů mastných kyselin byly od firmy Sigma.

Experimentální část

Studium optimalizace kyselé transesterifikace kafilerního tuku

Na základě výsledků z loňského roku byly dále optimalizovány hlavní proměnné, a to množství katalyzátoru, poměr metanolu k tuku, reakční teplota a i doba reakce, které mají zásadní vliv na produkci metylesterů (tj. biopaliva) z tuku.

Transesterifikační reakce byly prováděny v 500 ml kulatých baňkách se zábrusem na vodní lázni pod zpětným chladičem. K reakci byly používány 2 g tuku, ke kterému byl přidán metanol a jako katalyzátor koncentrovaná kyselina sírová. Obsah baňky byl dobře promíchán, a poté zahříván na vodní lázni po testovanou dobu. Reakce byla ukončena ochlazením v ledové vodě. V reakční baňce se vytvoří 2 vrstvy, které se dají od sebe dobře oddělit. Spodní vrstva obsahuje případně nezreagovaný tuk a surový glycerin, horní vrstva metylestery v metanolu. Spodní vrstva byla oddělena, horní převedena do destilační baňky a byl z ní oddestilován metanol. Ze získaného odparku byly metylestery vytřepány diethyletherem. Etherový roztok byl promyt několikrát malým množstvím vody v dělicí nálevce do dosažení neutrálního pH vodní vrstvy. Po neutralizaci a důkladném oddělení byl etherový roztok vysušen pomocí vyžíhaného

bezvodého síranu sodného filtrací přes filtrační papír s vrstvičkou tohoto síranu do destilační baňky s kulatým dnem. Etherový roztok byl dále odpařen na rotační vakuové odparce při teplotě lázně cca 30°C a zbytek šetrně vyfoukán jemným proudem dusíku k suchu. Tento zbylý produkt byl zvážen. Váha tohoto olejového odparku již představuje hrubé množství získaných metylesterů. Přesně byly metylestery stanoveny v tomto produktu metodou kapilární plynové chromatografie po zředění hexanem. Podmínky analýzy byly následující:

Plynový chromatograf: 6890N

Nástřík: SPLIT T=240°C

Detektor: FID T=280°C

Nosný plyn: dusík, průtok 0,8ml/min, 30°C.

Kolona: DB-23, 60m, 0,25mm, 0,25µm.

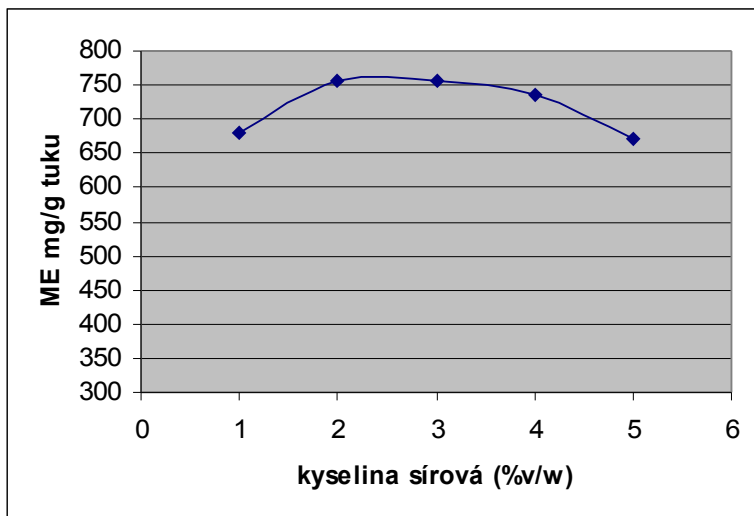
Teplotní program: T=160°C, 1 min, 2°C/min do 230°C, 20°C/min do 160°C

Celková doba analýzy: 36 minut.

Nástřík na GC : autosampler, 1µl

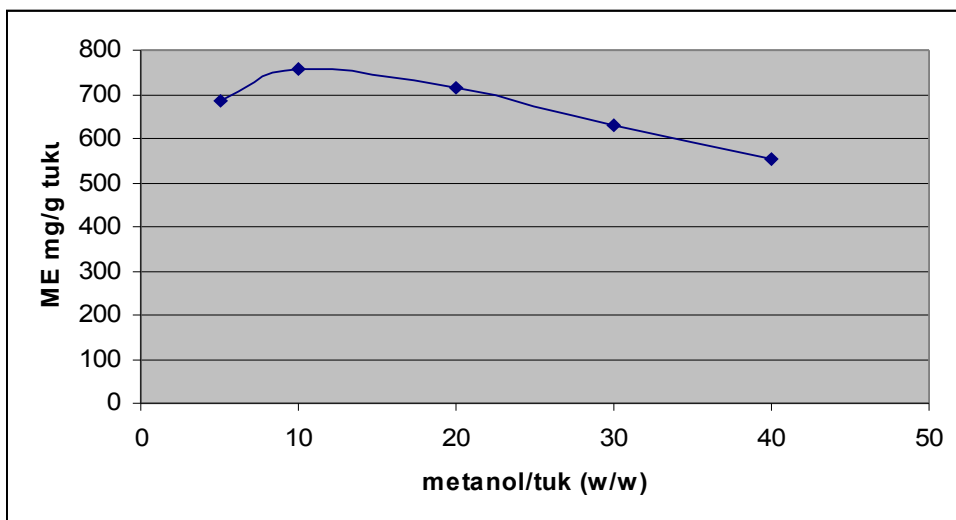
Na základě předběžných výsledků v loňském roce byly dále ověřovány a optimalizovány jednotlivé proměnné parametry. Vliv množství kyseliny sírové jako katalyzátoru byl tedy sledován při nižší koncentraci metanolu k tuku, a to v poměru 10:1 (w/w) od 1 do 5% (v/w) kyseliny sírové na tuto směs. Transesterifikace probíhala po dobu 7 hod při teplotě 95°C. Vliv množství metanolu, , byl sledován v poměru 10:1 až 40:1(w/w) vztaženo na testovaný tuk, při množství kyseliny sírové jednak 2,0% (v/w) počítáno na směs při nejběžněji používaném poměru k tuku v našich testech, a to 10:1, při teplotě 95°C po dobu 7 hod. Efekt vlivu teploty byl studován v rozsahu teplot 70 – 95 °C, po dobu 7 hod, při množství metanolu 10:1 (w/w) a koncentraci kyseliny sírové 2% (v/w) na tuto směs. Vliv času byl sledován po dobu 3 až 7 hod při množství metanolu 10:1 (w/w) opět při koncentraci kyseliny sírové 2% (v/w) na tuto směs a teplotě 95°C.

Optimalizace jednotlivých parametrů je dále znázorněna na obr. 1 až 4.



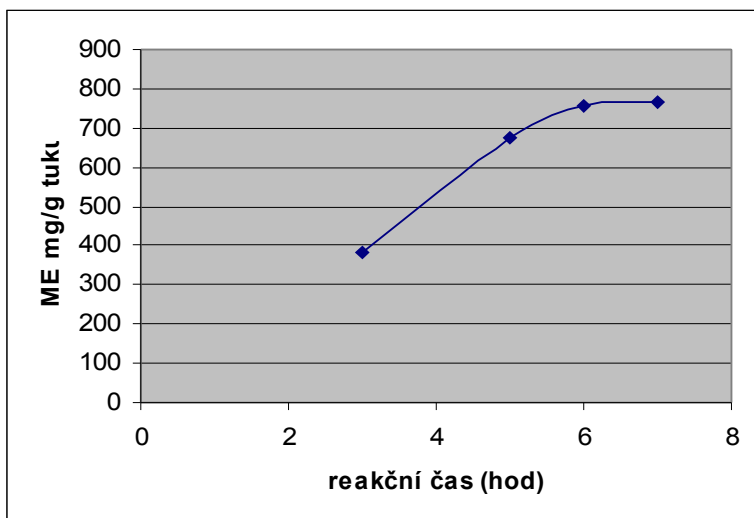
obr.1. Vliv množství kyseliny sírové na průběh esterifikace; metanol:tuk 10:1(w/w), 95°C, 7 hod

Na obr. č 1 je znázorněna závislost tvorby metylesterů na množství kyseliny sírové. V tomto případě má závislost zpočátku mírně stoupající tendenci, optima dosahuje při koncentraci 2 až 3% (v/w) ale při dalším zvýšení koncentrace již dochází k poklesu. Maximální dosažený výtěžek metylesterů, byl 762,0 mg/g v tomto případě, což činí při maximálním výtěžku 808,3 mg/g 94,3 % z celkových možných.



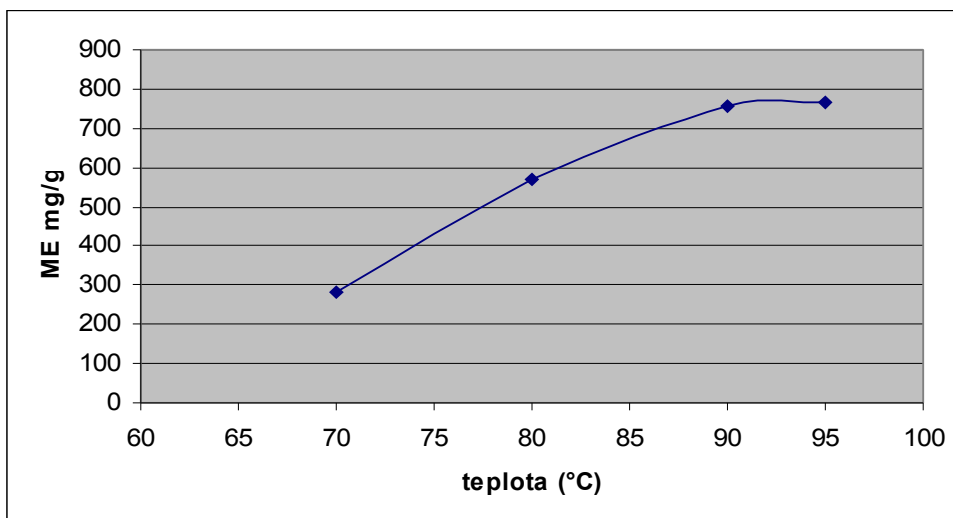
obr.2. Vliv množství metanolu na tvorbu metylesterů; 2% H₂SO₄, 7 hod, 95°C.

Na obr. č. 2 je znázorněna závislost přebytku metanolu vzhledem k množství tuku při již optimalizované koncentraci kyseliny sírové. Je zřejmé, že nejvyšších výsledků bylo dosaženo při nižších koncentracích metanolu. Při poměru metanolu vzhledem k testovanému kafilernímu tuku 10:1 (w/w) činilo množství metylesterů 755,6 mg/g, což representuje výtěžek 93,4 %,



obr.3. Rychlost tvorby methylesterů z kafilerního tuku v závislosti na čase; metanol:tuk 10:1, 2% H₂SO₄, 95 °C.

Ve sledované oblasti časů a za uvedených optimalizovaných podmínek (obr.3) je průběh závislosti rychlosti tvorby ME u kafilerního tuku zpočátku lineární, při zpomalení v páté hodině a téměř identický v 6 a 7 hodině. Maximální výtěžek je dosažen po 7 hod a činí 765,8 mg/g tj. 94,7 % možných ME.



obr.4. Vliv reakční teploty na tvorbu methylesterů ; metanol:tuk 10:1(w/w), 2% H₂SO₄, 7 hod.

Z obr. č 4 je zřejmé, že se vzrůstající teplotou roste i reakční rychlost. Při teplotě 95°C a za uvedených podmínek bylo získáno 760,6 mg ME z 1 g tuku, což činí za 7 hod 94,1% možného výtěžku. Rovněž již při teplotě 90°C byl výtěžek přes 90%, což by mohlo být výhodné především z hlediska ekonomického.

Na základě těchto výsledků u našeho kafilerního tuku byla navržena celková optimalizace transesterifikační reakce s následujícími podmínkami - množství metanolu k tuku 10:1(w/w), množství kyseliny sírové 2 - 3% v/w vztaženo na reakční směs, teplota reakce 90 - 95°C , doba reakce 6-7 hod . Za těchto podmínek bylo získáno vždy přes 90 % možných metylesterů.

2.2. Vypracování postupu enzymové transesterifikace živočišných tuků

Dle plánu byla testována možnost využití dalšího způsobu transesterifikace, a to za použití enzymů. Jak zhodnocení základního průběhu, tak následná optimalizace enzymaticky katalyzované transesterifikace byly prováděny přímo s použitím kafilerního tuku, jako tuku, který je nejvíce zastoupen v zemědělských odpadech. Z alkoholů vzhledem k vysoké reaktivitě byl použit opět metanol, z enzymů se jednalo o imobilizovanou lipasu.

Materiál a metody

Kafilerní tuk byl opět získán v kafilerii Agris s.r.o., Medlov. Použité lipasy (E.C.3.1.1.3) *Candida antarctica* rekombinantní z *Aspergillus niger* byly od firmy Novozymes, a to komerčně imobilizovaný Novozym 435 a volný Lipozyme CALB L, který byl imobilizován na našem pracovišti. Aktivity lipas byly stanoveny modifikovanou metodou dle Humberta et al. (1997) spektrofotometricky přes nitrofenol, bílkoviny dle Hartree, (1972). Fenylnetanesulfonyl fluorid, 4-nitrofenylbutyrát a 4-nitrofenol byly od firmy Sigma, N,N-dimetylformamid od firmy Merck.

Průběh transesterifikace byl opět sledován metodou kapilární plynové chromatografie na chromatografu Hewlett – Packard 6890 N. Methanol, diethylether, hexan a kyselina sírová byly od firmy Lach – Ner, s.r.o., Česká republika. Standardy methylesterů mastných kyselin byly od firmy Sigma.

Experimentální část

Imobilizace enzymu na vhodný nosič

K imobilizaci byl použita lipasa Lipozyme CALB L, jako nosič byl využit chitosan z mycelia *Aspergillus niger*.

Příprava pelet

Mycelium *Aspergillus niger* bylo získáno z výroby kyseliny citronové (Lachema Kaznějov, ČR).

Myceliální pelety byly promyty k odstranění zbytků kultivačního media (sacharosy, minerálních solí, kyseliny citronové a dalších organických kyselin).

Alkalická extrakce

Primární alkalická extrakce otevírá buňky a extrahuje většinu rozpustných látek z buněčného materiálu. Ke zvýšení účinnosti této extrakce jsme použili přídavek bakteriální alkalické proteasy (Alcalase NOVO). 100 g suchého mycelia bylo suspendováno v 1000 ml 1M Na₂CO₃ obsahující 1 g alkalické proteasy. Reakční směs jsme míchali 2 hod. při 50°C. Mycelium zbavené rozpustných látek bylo potom promyto do neutrality a resuspendováno v 0,2 M acetátu pH 6,5.

Sítění extrahovaného mycelia

100 g mycelia bylo suspendováno v 800 ml pufru (0,2 M acetát pH 6,2) a přidáno 16 ml 25% roztoku glutaraldehydu. Reakce probíhala 6 hodin při pokojové teplotě za míchání. Produkt byl potom odfiltrován a promyt nejprve stejným pufrům a potom 0,1 M HCl. Po promytí kyselinou byl konečný produkt získán opakovaným promytím dest. vodou.

Konverze myceliálního chitinu na chitosan

Chitin získaný v předešlé operaci byl hydrolyzován na chitosan v prostředí 2 M NaOH. Chitin byl suspendován v 2 M NaOH (100 ml na každých 20 g vlhkého chitinu a suspenze byla míchána 4 hodiny při 90°C. Chitosan byl pak dekantován a opakovaně promýván dest. vodou do neutrality. Produkt byl uchováván při teplotě do 10°C až do dalšího použití.

Vazba lipasy na pelety chitosanu

50 g mycelia bylo suspendováno ve 250 ml 0,2 M acetátu pH 6,2. K suspenzi bylo přidáno 25 ml 20% roztoku glutaraldehydu a suspenze byla míchána 4 hodiny při pokojové teplotě. Potom bylo aktivované mycelium odfiltrováno a resuspendováno v dalších 250 ml téhož pufru. K suspenzi bylo přidáno 10 ml lipasy (Liposyme Calb L) a byla míchána další 4 hodiny při pokojové teplotě. Potom byl konjugát odfiltrován, důkladně promyt vodou a uchováván při teplotě do 10°C až do dalšího použití. Konjugát byl pak suspendován v destilované vodě a stabilizován redukcí LiAlH₄ (2 g, 4 hodiny). Potom byl konjugát opět odfiltrován, promyt destilovanou vodou a uložen.

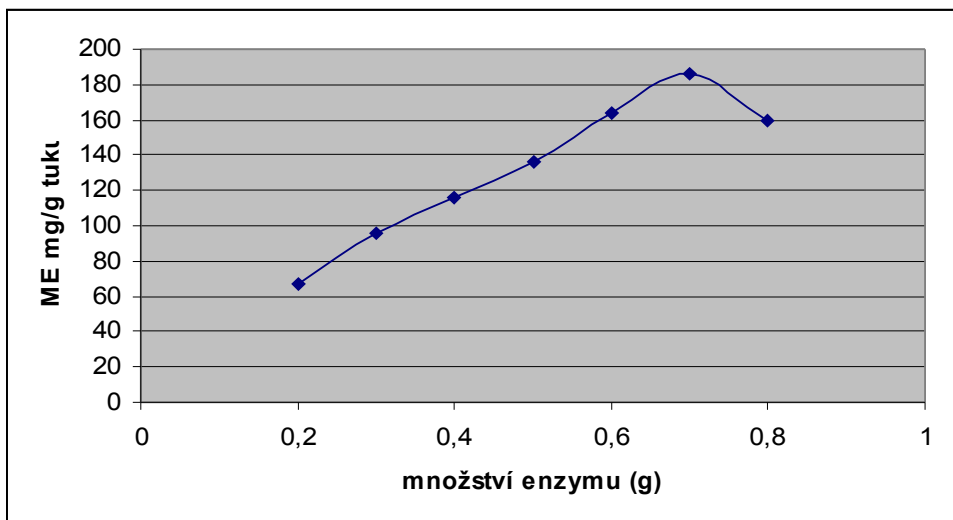
Orientační ověření možnosti enzymové transesterifikace modelového živočišného tuku

Pro orientační ověření enzymaticky katalyzované transesterifikace byla zvolena již komerčně imobilizovaná lipasa Novozym 435. V rámci experimentálních podmínek byly sledovány hlavní proměnné, a to poměr metanolu k tuku a množství enzymu, které mají zásadní vliv na produkci metylesterů z tuku.

Transesterifikační reakce byly prováděny ve 100 ml kulatých baňkách se zábrusem na třepače s vodní lázní. K reakci byl používán 1g tuku, ke kterému byl přidán metanol a testované množství imobilizované lipasy. Obsah baňky byl dobře promíchán, a poté temperován za třepání po testovanou dobu. Reakce byla ukončena ochlazením v ledové vodě a kvantitativním oddělením metanolové vrstvy od imobilizovaného enzymu. Další postup včetně analýzy byl stejný jako u kyselých esterifikací.

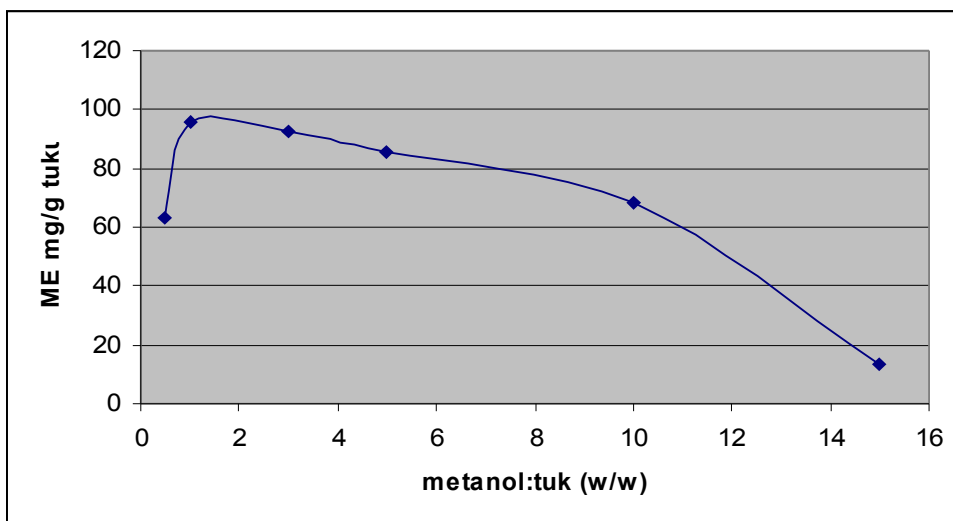
Vliv množství enzymu byl sledován při koncentraci metanolu k tuku v poměru 1:1 (w/w) a od 20 do 80% (w/w) lipasy vztaženo na tuk. Transesterifikace probíhala po dobu 7 hod při teplotě 40°C. Vliv množství metanolu, byl sledován v poměru 0,5:1 až 15:1(w/w) vztaženo na

testovaný tuk, při množství enzymu 30% (v/w) na tuk a teplotě 40°C po dobu 7 hod. Výsledky jsou znázorněny na obr. 5 a 6.



obr.5. Vliv množství Novozym 435 na průběh esterifikace; metanol:tuk 1:1(w/w), 40°C, 7 hod

Na obr. č 5 je znázorněna závislost tvorby metylesterů na množství enzymu. V tomto případě má závislost stoupající tendenci, ale při zvýšení koncentrace z 0,7g na 0,8g již dochází ke snížení tvorby pravděpodobně v důsledku již nedostatečného promíchávání reakční směsi. Maximální výtěžek metylesterů, byl v tomto případě získán při koncentraci enzymu 0,7g, který činil 185,9 mg/g tuku, což je při maximálním výtěžku 808,3 mg/g 23,5 % z celkových možných.



obr.6. Vliv množství metanolu na tvorbu metylesterů; 0,3g Novozyme 435, 7 hod, 40°C.

Na obr. č. 6 je znázorněna závislost množství metanolu na tvorbu metylesterů. Nutný minimální poměr metanolu k tuku je 1:1, dalším zvyšováním koncentrace metanolu již dochází

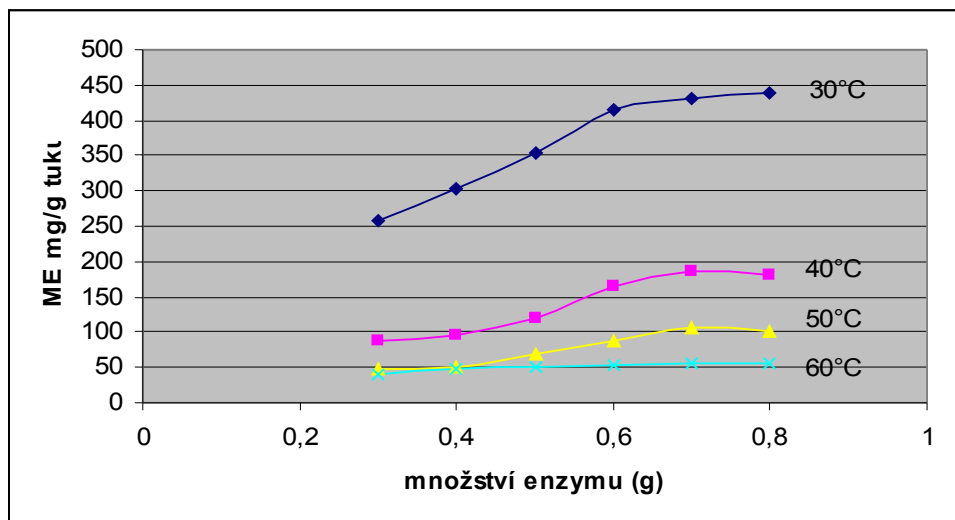
ke snížení tvorby metylesterů. Maximální výtěžek metylesterů, který činil 95,7 mg/g tuku byl v tomto případě tedy získán při poměru metanolu:tuk 1:1, a je 11,8 % z celkových možných.

Tímto orientačním ověřením bylo zjištěno, že enzymová transesterifikace kafilerního tuku tímto typem lipasy je možná a bylo v další práci přistoupeno k její optimalizaci.

Optimalizace enzymové transesterifikace živočišného tuku, který je nejvíce zastoupen v zemědělských odpadech

Optimalizace enzymaticky katalyzované transesterifikace byla prováděna ve stejném přístrojovém uspořádání jako předchozí orientační ověření. Pro tyto pokusy byla použita jednak již předem testovaná komerčně imobilizovaná lipasa Novozym 435 (aktivita 1042 U/g) a dále lipasa Lipozyme CALB L imobilizovaná v naší laboratoři na chitosan (aktivita 1020 U/g). V rámci experimentálních podmínek byly dále sledovány hlavní proměnné, a to poměr metanolu k tuku a množství enzymu vzhledem k reakčním teplotám, neboť aktivita enzymu je velmi závislá na použité teplotě a má tedy velký vliv na produkci metylesterů z tuku. Nakonec byl testován i časový průběh reakce. Nejprve byl tedy optimalizován vliv množství enzymu v rozsahu teplot 30 až 60°C při koncentraci metanolu k tuku v poměru 1:1 (w/w). Transesterifikace probíhala po dobu 7 hod. Vliv množství metanolu, byl na základě předchozích výsledků sledován v poměru 1:1 až 10:1(w/w) vztaheno na testovaný tuk, při množství enzymu 60% (v/w) na tuk a teplotách 30 a 40°C po dobu 7 hod. Nakonec za optimalizovaných podmínek byl sledován časový průběh transesterifikace. Výsledky jsou znázorněny na obr. 7 až 9.

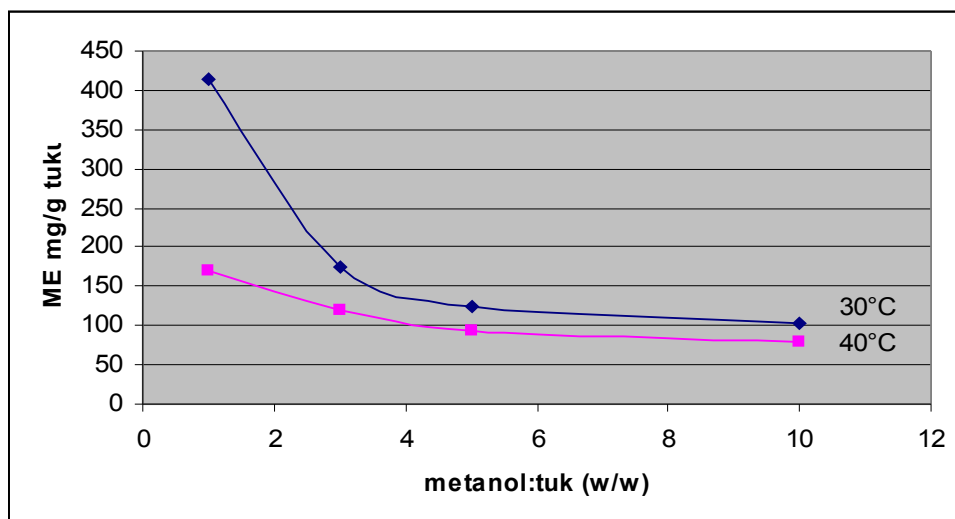
Novozym 435



obr.7. Vliv množství lipasy Novozym 435 při různých teplotách na průběh esterifikace; metanol:tuk 1:1(w/w), 7 hod

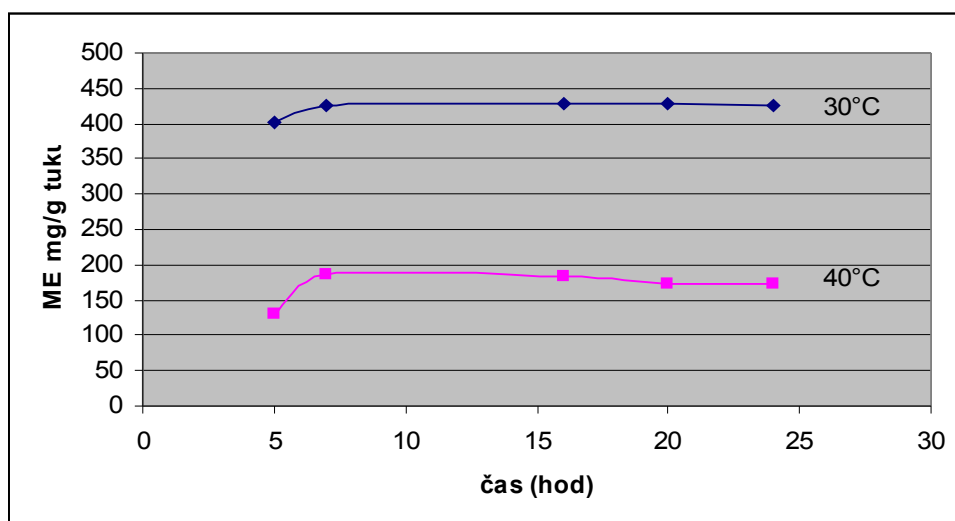
Z výsledků je patrné, že jak množství enzymu tj. přítomná aktivita, ale především použitá teplota mají výrazný vliv na tvorbu metylesterů. Průběh reakce je při všech teplotách podobný, ovšem se zvyšující se teplotou dochází k výrazné inaktivaci enzymu. Maximální výtěžek byl

dosažen při nejvyšším množství enzymu (0,8g) a nízké teplotě 30°C, a to 438,8 mg/g tj. 54,3% možných ME.



obr.8. Vliv množství metanolu na tvorbu metylesterů při různých teplotách; 0,6g Novozyme 435, 7 hod.

Při testování množství metanolu bylo již použité optimalizované množství enzymu a nižší teploty, při kterých nedochází k inaktivaci enzymu. Nejlepší výsledky byly opět dosaženy při nižší teplotě. Maximální výtěžek metylesterů, který činil 414,8 mg/g tuku byl v tomto případě tedy získán při poměru metanolu:tuk 1:1 a teplotě 30°C, a to 51,3 % z celkových možných.

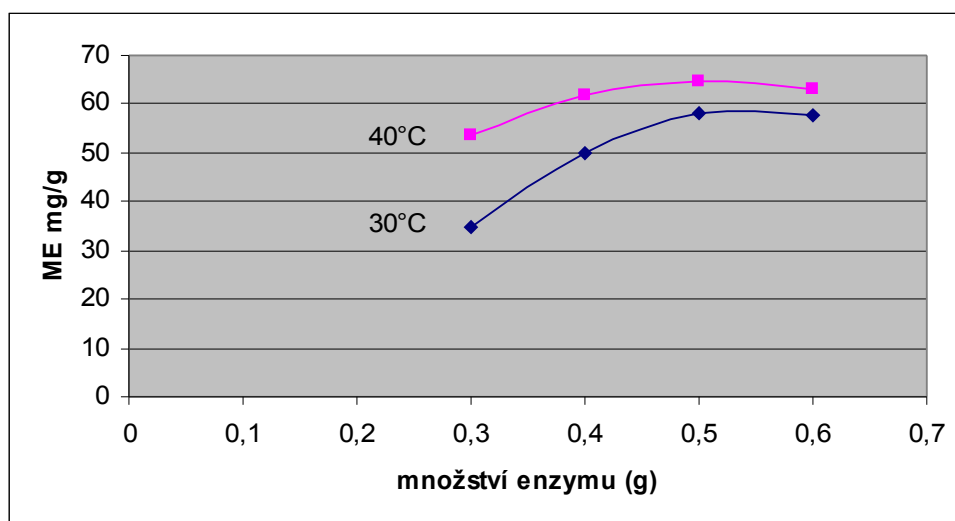


obr.9. Rychlost tvorby methylesterů z kafilerního tuku při různých teplotách; metanol:tuk 1:1, 0,7g Novozyme 435.

Z obr. č 9 je zřejmé, že prodloužení času ze 7 na 24 hod na další tvorbu metylesterů nemá vliv. Opět se potvrdilo, že se zvýšením teploty ze 30 na 40°C dochází ke snížení výtěžku. Maximálního výtěžku bylo dosaženo tedy při teplotě 30°C již po 7 hodinové reakci, a to přes 420 mg ME z 1 g tuku, což činí přes 52% možného výtěžku.

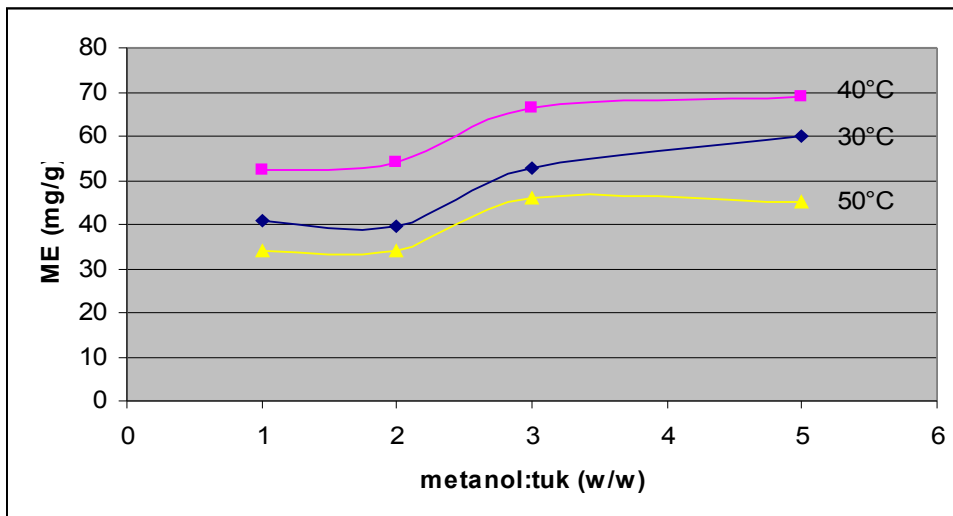
Liposyme CALB L – chitosan

Stejným způsobem byla testována i lipasa Liposyme CALB L imobilizovaná na chitosan. Výsledky jsou shrnuty v následujících tabulkách.



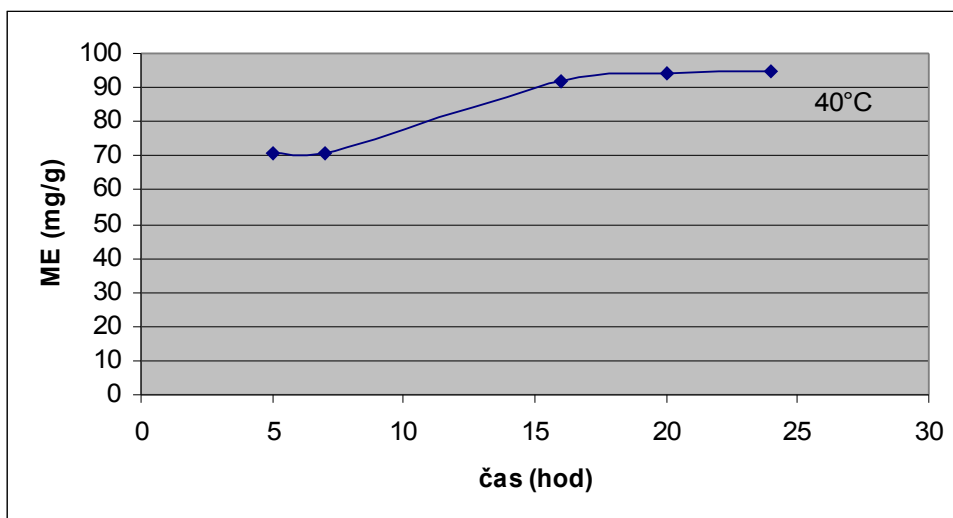
obr.10. Vliv množství lipasy Liposyme CALB L – chitosan při různých teplotách na průběh esterifikace; metanol:tuk 1:1(w/w), 7 hod

Na základě těchto výsledků je patrné, že množství enzymu tj. přítomná aktivita má určitý vliv, i když ne výrazný na tvorbu metylesterů z kafilerního tuku, neboť výtěžky mají podobné nízké výtěžky. Maximálního výtěžku bylo v tomto případě dosaženo při teplotě 40°C a množství navázaného enzymu 0,5g a to 64,8 mg/g, což činí pouhých 8%.



obr.11. Vliv množství metanolu na tvorbu metylesterů při různých teplotách; 0,6g Liposyme CALB L - chitosan, 7 hod.

Při testování množství metanolu bylo již použité optimalizované množství enzymu a teploty 30 až 50°C. Výsledky byly opět velmi nízké. Maximální výtěžek metylesterů, který činil 69,1mg/g tuku byl v tomto případě tedy získán při poměru metanolu:tuk 1:5 a teplotě 40°C, a to 8,5 % z celkových možných.



obr.12. Rychlost tvorby methylesterů z kafilenního tuku; metanol:tuk 1:5, , 0,6g Liposyme CALB L – chitosan, 40°C.

Z obr. č 12 je zřejmé, že prodloužením času ze 7 na 15 hod lze dosáhnout poněkud vyššího výtěžku metylesterů, což ale nemá prakticky význam, neboť celkový výtěžek v případě tohoto enzymu je opět nízký. Mezi 15 a 24 hodinou se pohyboval výtěžek od 91,7 až 94,8 mg metylesterů, což činí 11,3 až 11,7 % možného výtěžku.

Na základě výsledků enzymové transesterifikace kafilerního tuku je možno konstatovat, že u obou testovaných enzymů bylo dosaženo odlišných výsledků. U lipasy Novozym 435 se optimalizací podařilo dosáhnout konverze 51 až 54% možné a pro dosažení této konverze lze doporučit tyto podmínky: 30°C, poměr metanol:tuk 1:1 (w/w), 60 až 80% enzymu na tuk a 7 hodin reakce jako dostatečný čas. U druhého enzymu se optimalizací nepodařilo dosáhnout uspokojivé konverze, pouze hodnoty přes 11% po 15 hodinách reakce, což nemá praktický význam.

Diskuze

Dle plánu byl v roce 2008 optimalizován postup kyselé transesterifikace živočišného tuku, který přichází v úvahu jako nejvýznamější, což je tuk kafilerní, jak co do množství, tak do potřeby ho dále využívat, neboť se jedná o tuk odpadní. Mezi nejdůležitější parametry, které mají vliv na transesterifikaci tuků je molární poměr metanolu k triglyceridům, typ a množství katalyzátoru, reakční teplota a také reakční čas. Teoreticky stechiometricky kompletní transesterifikace dle reakce je možná při molárním poměru metanolu k triglyceridům 3:1 při výtěžku 3 moly metylesterů a 1 mol glycerolu. Nicméně již dříve citované práce ukázaly, že při tomto poměru je reakční rychlost velmi pomalá a k posunu rovnováhy reakce směrem k tvorbě esterů je potřeba použít výrazný přebytek metanolu. Na rozdíl od počátečních výsledků v minulých letech se optimalizací podařilo snížit množství metanolu z 30:1 na 10:1(w/w) vztaženo na tuk, kdy bylo také dosaženo výtěžku přes 90%. Tomuto snížení koncentrace metanolu odpovídá i nižší optimální koncentrace kyseliny sírové. Jedná se o snížení ze 4% na 2-3% při stejné výtěžnosti přes 90% možných metylesterů. Optimalizací koncentrace katalyzátoru a snížením množství metanolu se podařilo dále dosáhnout konverze přes 90% již v kratším čase tj. 6-7 proti 9 hodinám v loňském roce včetně možného snížení teploty maximálně na 90 °C. Při nižších teplotách by již bylo nutné pracovat s velmi dlouhými reakčními časy. Poměrně dobrá reaktivita dosažená za uvedených podmínek je způsobena pravděpodobně uvolněnými mastnými kyselinami po drastickém zpracování tohoto tuku v kafilerii. Číslo kyselosti kafilerního tuku bylo 23,63 mg KOH/g tuku, na rozdíl od vepřového tuku testovaného v předchozím roce, která činila 1,87 mg KOH/g tuku. Optimální podmínky pro kyselou transesterifikaci testovaného kafilerního tuku jsou tedy: metanol: tuk 10:1 (w/w), koncentrace kyseliny sírové 2-3% (v/w) vztaženo na reakční směs, teplota 90-95°C a nutná doba pro výtěžek přes 90% metylesterů 6-7 hodin.

Dále byl v tomto roce zhodnocen základní průběh a optimalizace enzymové transesterifikace kafilerního tuku. Byly testovány dva enzymy, a to komerčně imobilizovaná lipasa Novozym 435 a lipasa Lipozyme CALB L imobilizovaná v rámci tohoto projektu na chitosan. Co se týče enzymu Novozym 435 optimalizací doporučené podmínky jsou v nižší hladině metanolu, a to metanol:tuk 1:1, při vyšších koncentracích metanolu dochází k poklesu výtěžnosti reakce, což může být pravděpodobně způsobeno inaktivací enzymu. Dále bylo optimalizací zjištěno, že pro konverzi je potřeba poměrně vysoké množství enzymu, a to 60-70% z množství transesterifikovaného tuku, při nižších množstvích tohoto imobilizovaného enzymu účinnost konverze klesá. Bohužel cena tohoto enzymu je vysoká, a to 1213 EUR/kg což by v případě příznivých výsledků výrazně zvyšovalo cenu. Na druhé straně je nejvhodnější ekonomicky výhodná nízká teplota 30°C, neboť při vyšších teplotách dochází k inaktivaci enzymu. Nejvhodnější čas pro konverzi je 7 hodin, nižší čas je nedostatečný, naopak jeho dalším prodlužováním až na 24 hodin již k dalšímu nárůstu tvorby metylesterů nedochází. Optimální podmínky pro tento enzym jsou: metanol:tuk 1:1 (w/w), množství enzymu 60-70%, teplota 30°C

a čas 7 hodin. Tímto způsobem transesterifikace, za použití lipasy Novozym 435 bylo dosaženo maximálního výtěžku mírně přes 50%, což neumožňuje praktické využití této metody. Co se týče druhého enzymu Lipozyme CALB L imobilizovaný na chitosanu jsme také optimalizovali podmínky pro získání co nejvyššího stupně konverze. Optimální podmínky pro tento enzym byly odlišné, a to: metanol:tuk 1:5 (w/w), množství enzymu 50-60%, teplota 40°C a čas 15 hodin. I když tyto podmínky vyžadují větší množství metanolu, vyšší teplotu a čas, nebylo možné dosáhnout vyšších výtěžků než 11%, což zcela vylučuje využití enzymové transesterifikace s použitím tohoto enzymu.

Na základě získaných výsledků jak z loňského tak z letošního roku doporučujeme pro práce ve větších objemech optimalizovanou kyselou esterifikaci.

2.3. Výběr vhodného tuku a doporučení vhodného transesterifikačního postupu pro technologický postup transesterifikace

Pro výrobu biodieselu z živočišných tuků je k dispozici především směsný kafilerní tuk, který jako jediný je odpadem a v případě jeho využití je tedy vhodnou druhotnou surovinou pro výrobu biopaliva. Jednoduché živočišné tuky (hovězí, vepřový) nejsou odpadem, ale spíše surovinou v rámci různých průmyslových odvětví. V rámci transesterifikačních postupů zpracování kafilerního tuku na biopaliva byla v rámci projektu studována transesterifikace kyselá, alkalická a enzymová.

V případě kyselá transesterifikace bylo úpravou podmínek dosaženo výtěžnosti 90 až 100%, v případě alkalické transesterifikace maximálně 45% výtěžnosti a v případě enzymové transesterifikace mírně přes 50%. Tento výsledek je dán pravděpodobně skutečností, že kafilerní tuk obsahuje na rozdíl od jednoduchých tuků, jak živočišných tak rostlinných, největší množství volných mastných kyselin, čemuž je nutno přispůsobit i použitou technologii. Z těchto důvodů vzhledem k výtěžnosti přichází v úvahu pouze kyselá transesterifikace. Na základě současných výsledků projektu by byly možné z ekonomických důvodů i různé kombinace těchto metod, neboť mají např. různé energetické nároky. Pro tento tuk jako první stupeň reakce je ale nezbytné doporučit kyselou transesterifikaci.

Vhodný transesterifikační postup pro technologický postup transesterifikace kafilerního tuku je za těchto podmínek: metanol: tuk 10:1 (w/w), koncentrace kyseliny sírové 2-3% (v/w) vztaženo na reakční směs, teplota 90-95°C a nutná doba pro výtěžek přes 90% metylesterů 6-7 hodin. Tento postup bude využit pro další práci v roce 2009 za účelem získání většího množství produktu pro další práci v roce 2009.

Přibližný odhad nákladů na výrobu biopaliv z kafilerního tuku metodou kyselá transesterifikace:

Výchozí předpoklady:

Optimální podmínky zjištěné pro transesterifikaci kafilerního tuku byly:

1. poměr metanol:tuku = 10:1(w/w)

2. koncentrace kyseliny sírové (2-3% v/w) z reakční směsi pro výpočet 2%
3. teplota (90 – 95°C) pro výpočet použijeme 90°C
4. doba reakce (6 – 7 hodin) pro výpočet použijeme 7 hodin
5. předpokládaná průměrná spotřeba energie k zahřátí na 90°C a udržování této teploty při objemu 1l (závisí na způsobu ohřevu a tepelné vodivosti/isolace nádoby) je 50 W

Výpočet:

Pro 1 kg kafilerního tuku:

tuk: 8,- Kč/kg tj.

náklady	jednotková cena	množství	cena celkem
kafilerní tuk	8,- Kč/kg	1 kg	8,00 Kč
metanol čistý	38,- Kč/l	10 kg (regenerace 98%) (12,74 l)	9,68 Kč
kyselina sírová čistá	64,- Kč/l	0,22 l	14,08 Kč
energie	4,07 -Kč /kWh	50 W × 12,74 l x 7 = 4, 459 kW	18,15 Kč
pracovní čas	75,-/hod	7 hod., vytížení 20%	
celkem na 1 kg tuku			49,91 Kč

Ceny metanolu a kyseliny sírové jsou pro chemikálie čisté pro malooběratele tj. při odběru 10 l při jednorázovém nákupu, při odběru technických chemikálií a ve větších objemech dojde k výraznému snížení ceny.

Při regeneraci metanolu lze snížit náklady na tuto položku, je však nutno počítat se zvýšenými náklady na samotnou regeneraci. Podle účinnosti regenerace lze počítat s opětovným použitím až 98% metanolu s tím, že čím vyšší je stupeň regenerace, tím větší jsou náklady na destilaci (reflux).

Cena elektrické energie podle ceníku ČEZ. Mzdové náklady nejsou započteny, protože jsou závislé na objemu výroby. Podobně náklady na energii rozhodujícím způsobem ovlivňuje poměr objemu/povrch a tepelná vodivost nádoby. Při práci ve větších reaktorech je možno docílit snížení energie na jednotku. Z těchto důvodů může být odhad jen přibližný. Skutečné náklady je možné zjistit pouze na základě konkrétního projektu.

2.4. Prezentace na konferenci a vypracování článku do sborníku, vypracování článku do odborného recenzovaného periodika

V roce 2008 byly výsledky z tohoto projektu prezentovány na 2 konferencích s plným zněním ve sbornících a dále bylo vypracováno několik článků do odborných recenzovaných periodik.

- 1) Prošková A., Kučera J., Kopicová Z.: Využití odpadních živočišných tuků jako druhotných surovin pro výrobu biopaliv, XXXIX. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, 26.- 28.5.2008, Skalský Dvůr, ISSN 1802-1433, str. 301-305.
- 2) Kučera J., Prošková A., Kopicová Z., Škarková L.: Využití kafilerního tuku k výrobě biopaliva, III. Ročník mezinárodní konference: Odpady biodegradabilní – energetické a materiálové využití, 6.11.2008, MZLU v Brně, ISBN 978-80-7375-229-3, 6 stran.
- 3) Prošková A., Kučera J., Kopicová Z.: Využití odpadního kafilerního tuku k výrobě biopaliva, Odpadové fórum (Z vědy a výzkumu – recenzovaná rubrika časopisu Odpadové fórum), ISSN 1212-7779, 9, 12, 2008, str. 24 – 26.
- 4) Prošková A., Kopicová Z., Kučera J., Škarková L.: Acid catalyzed transesterification of animal fat, Research in Agricultural Engineering, ISSN 1212-9151, 55, 1, 2009.

3. Literatura

- Al-Zuhair S.: Biotechnology Progress, 21, 5,1442-1448, 2005.
- Bannon C.D., Craske J.D., Hilliker A.E.: JAOAC, 62, 1501 -1507, 1985.
- Canakci M.: Bioresource Technology , 98, 183-190, 2007.
- Carter C., Finley W., Fry W., Jackson D., Willis L.: European Journal of Lipid Science and Technology, 109, 307-314, 2007.
- Hartree E.F.: Analytical Biochemistry, 48, 2, 422, 1972.
- Hsu A.F., Jones K., Foglia T.A., Marmer W.N.: Biotechnology and Applied Biochemistry, 36, 181-186, 2002.;
- Humbert G., Guingamp M.F., Linde G.: Journal of Dairy Research, 64, 465-469, 1997.
- Köse Ö., Tüter M., Aksoy H.A.: Bioresource Technology, 93, 125-129, 2002.

- Montgomery R.: *Bioresource Technology*, 91, 1-29, 2004.
- Nouredini H., Gao X., Philkana R.S.: *Bioresource Technology*, 96, 769-777, 2005.
- Oliveira L.S., Franca A.S., Camargos R.R.S., Ferraz V.P.: *Bioresource Technology*, 99, 3244-3250, 2008.
- Royon D., Daz M., Ellenrieder G., Locatelli S.: *Bioresource Technology*, 98, 648-653, 2007.
- Shah S., Sharma S., Gupta M.N.: *Energy Fuels*, 18, 1, 154-159, 2004.
- Stein K.: *Journal of American Dietetic Association*, 107, 1870, 1872-1876, 1878, 2007.
- Watanabe Y., Shimada A., Sugihara A., Tominaga Y.: *JAOCS*, 78 ,7, 703-707, 2001.