

Priprema biomaziva u ionskoj kapljevini

Kovač, Mirna

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:664448>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mirna Kovač

PRIPREMA BIOMAZIVA U IONSKOJ KAPLJEVINI

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitne komisije:

izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.

dr. sc. Zvonimir Katančić, zn. sur.

Zagreb, rujan 2016.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na strpljenju, uloženom vremenu i savjetima koje mi je pružila prilikom pisanja ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Laszlu Gubiczi na ukazanom povjerenju i pruženoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Najveća zahvala ide mojim roditeljima koji su mi omogućili ovaj studij i bili najveća podrška tokom školovanja.

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je istražiti najbolje uvjete za sintezu biomaziva izoamil oleata enzimatskom esterifikacijom izoamil alkohola i oleinske kiseline. Reakcija je provedena uz prisustvo *Candida antarctica* lipaze B. Reakcija je također testirana u inkubator miješalici u *n*-heksanu i dvije ionske kapljevine; 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) i 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroboratu ([BMIM] BF₄) pri različitim temperaturama (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C). Koristeći *n*-heksan kao otapalo nakon 24 sata dobivena je konverzija oleinske kiseline od 95 %, dok je korištenjem ionskih kapljevina jednaka konverzija oleinske kiseline postignuta već nakon 60 minuta. Također, ustanovljeno je da u ovim slučajevima temperatura nema značajan utjecaj na konverziju. Daljnji eksperimenti provedeni su u ionskoj kapljevine 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) pri različitim temperaturama (30 °C, 40 °C, 50 °C) koristeći kotlasti reaktor s mikrovalovima. Ustanovljeno je da porastom temperature raste i konverzija oleinske kiseline. U svim slučajevima, količina proizvedenog izoamil oleata analizirana je plinskom kromatografijom. Rezultati su pokazali da se provođenjem reakcije u kotlastom reaktoru s mikrovalovima uz 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆) kao otapalo postiže najveća konverzija od 68 % u vremenu od 20 min pri 50 °C.

Količina vode proizvedene tijekom reakcija esterifikacija određena je Karl Fischer titracijom te se u svim slučajevima konstantno povećavala što je i karakteristično za reakciju esterifikacije.

U posljednjem dijelu eksperimenta testirana je aktivnost enzima u kotlastom reaktoru s mikrovalovima pri dvije različite temperature (40 °C, 50 °C). Rezultati su pokazali da aktivnost enzima pada s brojem ciklusa upotrebe te se također pri većoj temperaturi dobiva veća konverzija supstrata.

Ključne riječi: sinteza biomaziva, *Candida antarctica* lipaza B, ionska kapljevine

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the best conditions for the synthesis of biolubricant, isoamyl oleate by enzymatic esterification of isoamyl alcohol and oleic acid. The reaction was catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. The reaction was also tested on a laboratory shaker in *n*-hexane and two ionic liquids; 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM] PF₆) and 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ([BMIM] BF₄) at different temperatures (30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C). Using *n*-hexane as a solvent after 24 hours a conversion of oleic acid of 95 % was achieved while using ionic liquids the same conversion was achieved already after 60 min. Also, it was found that in these cases the temperature has no significant impact on oleic acid conversion. Further experiments were carried out in ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM] PF₆) where the heating was carried out using microwaves. It was found that at higher temperature conversion is higher too. In all cases, the amount of produced isoamyl oleate was analyzed by gas chromatography. Results showed that using microwave heating in combination with ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([BMIM] PF₆) as solvent it is possible to get the highest conversion of 68 % after 20 min at 50 °C.

The amount of water produced during esterification reactions was detected using Karl Fischer titrator and in all cases it was increasing which is characteristic for reaction of esterification.

The reuse of enzyme was tested in the final step of experiment using microwave heating at two different temperatures (40 °C, 50 °C). This experiment showed that the activity of enzyme decreases with numbers of use and also at higher temperature conversion is higher.

Keywords: synthesis of biolubricant, *Candida antarctica* lipase B, ionic liquids

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Biomaziva.....	2
2.1.1. Općenito o biomazivima	2
2.1.2. Načini dobivanja biomaziva	2
2.2. Lipaze	5
2.3. Nekonvenconalna otapala.....	8
2.3.1. Organska otapala	8
2.3.2. Ionske kapljevine	10
2.3.3. Superkritični fluidi.....	12
3. EKSPERIMENTALNI DIO:	14
3.1. Aparatura.....	14
3.1.1. Inkubator miješalica.....	14
3.1.2. Kotlasti reaktor s mikrovalovima.....	14
3.1.3. Plinski kromatograf.....	15
3.1.4. Injekcijska igla.....	15
3.1.5. Karl Fischer titrator.....	15
3.2. Kemikalije	16
3.3. Analičke metode.....	16
3.3.1. Određivanje koncentracije nastalog izoamil oleata	17
3.3.2. Određivanje vode u uzorku.....	17
3.3.3. Određivanje aktivnosti <i>Candida antarctica</i> lipaze B	18
3.4. Opis provedbe sinteze izoamil oleata	19
3.4.1. Reakcije provedene u inkubatoru miješalici	19
3.4.2. Reakcije provedene u kotlastom reaktoru s mikrovalovima	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu <i>n</i> -heksan uz konvencionalno grijanje.....	25
4.2. Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF ₆) uz konvencionalno grijanje	26
4.3. Sinteza izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat ([BMIM] BF ₄) uz konvencionalno grijanje	27
4.4. Utjecaj vrste otapala na sintezu izoamil oleata uz konvencionalno grijanje pri 50 °C.....	28
4.5. Utjecaj molarnog omjera izoamil alkohola i oleinske kiseline na sintezu izoamil oleata u ionskoj kapljevine 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF ₆) u kotlastom reaktoru s mikrovalovima pri temperaturi 30 °C	29
4.6. Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF ₆) u kotlastom reaktoru s mikrovalovima	30
4.7. Količina vode u uzorku.....	31
4.8. Utjecaj broja ciklusa korištenja i temperature na aktivnost <i>Candida antarctica</i> lipaze B.....	33
5. ZAKLJUČAK:	34
6. LITERATURA	36
7. PRILOZI	39
8. POPIS SIMBOLA	40
9. ŽIVOTOPIS	41

1. UVOD

Maziva imaju široko tržište diljem svijeta te se potražnja za njima konstantno povećava. Primjenjuju se u različitim industrijama, kao što su automobilska i zrakoplovna industrija, i to kao sredstva za smanjenje trenja, povećanje učinkovitosti, smanjenje gubitka energije, ravnomjernu raspodjelu topline itd. S druge strane, Internacionalna energetska agencija (IEA) pretpostavlja da bi se fosilna goriva iz kojih se dobivaju maziva mogla iscrpiti u naredne 53 godine ukoliko se nastavi stopa trenutne potrošnje. Također, glavni problemi konvencionalnih maziva dobivenih iz fosilnih goriva, tj. mineralnih ulja su toksičnost i slaba biorazgradivost. Prema procjeni, 50% sredstva za podmazivanje koja se prodaju širom svijeta završi u ekosustavu zbog izlivanja, isparavanja ili različitih nesreća, što izaziva toksične efekte u okolišu. Kako bi se riješili navedeni problemi sve više se razvijaju obnovljiva, biorazgradiva i ekološki prihvatljiva industrijska maziva, tzv. biomaziva. Budući da su se biljna ulja pokazala kao vrlo dobra alternativa mineralnim uljima u proizvodnji maziva, njihova je potražnja sve veća te se sve više istražuju (Trivedi et al. 2015). Upotreba biomaziva nudi niz prednosti kao što su mogućnost obnovljivosti, niska toksičnost, dobra biorazgradivost, visok indeks viskoznosti, dobra mazivost te visoko plamište stoga se njihova sinteza sve više istražuje.

2. OPĆI DIO

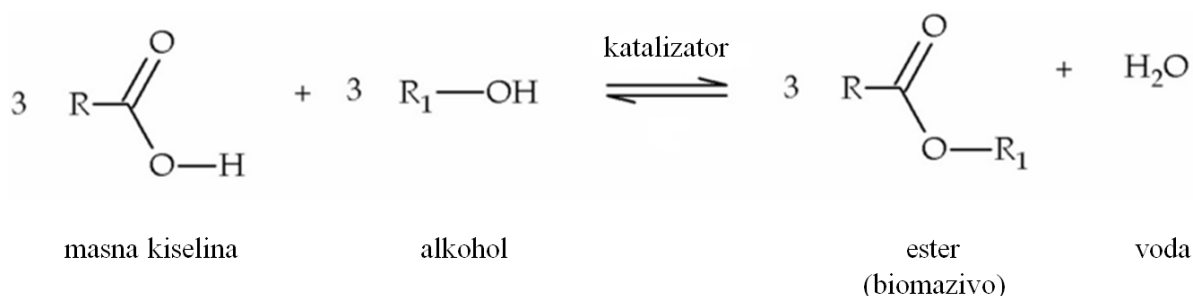
2.1. Biomaziva

2.1.1. Općenito o biomazivima

Biomaziva su esteri masnih kiselina za čiju se proizvodnju kao glavna sirovina koriste biljna ulja. Ključna značajka koja ih razlikuje od konvencionalnih maziva jest mogućnost biorazgradnje. Korištenje biljnih umjesto mineralnih ulja u sintezi biomaziva sve se više preferira zbog njihovih specifičnih svojstava kao što su visok indeks viskoznosti, dobra mazivost, visoko plamište te biorazgradivost. Unatoč povoljnim karakteristikama biorazgradivosti i netoksičnosti, biomaziva dobivena iz biljnih ulja moraju prevladati i određene nedostatke kako bi mogla konkurirati konvencionalnim mazivima. Glavni nedostatak biomaziva je visoka cijena koja je 2-3 puta veća od cijene maziva dobivenih iz fosilnih goriva. Također, nastoji se poboljšati njihova termička stabilnost i osigurati bolja zaštita od korozije, te povećati raznolikost budući da su potrebe tržišta puno veće od trenutne ponude (Chowdhury et al., 2013).

2.1.2. Načini dobivanja biomaziva

Biomaziva se dobivaju reakcijama esterifikacije između različitih masnih kiselina (palmitinska, oleinska, stearinska) te nižih ili viših alkohola (metanol, etanol, *n*-propanol, *n*-oktanol) (slika 2.1.). Uz reakciju esterifikacije također je moguća i sinteza biomaziva provođenjem transesterifikacije. Masne kiseline mogu se ekstrahirati procesom hidrolize iz različitih biljnih ulja kao što su suncokretovo, ricinusovo, sojino, palmino, jatrofino, ulje uljane repice itd. (Chowdhury et al., 2013).

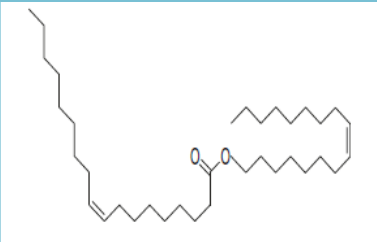
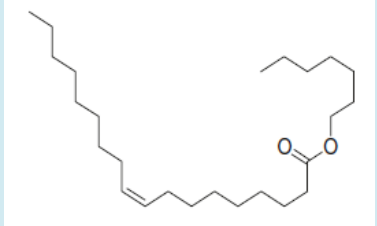
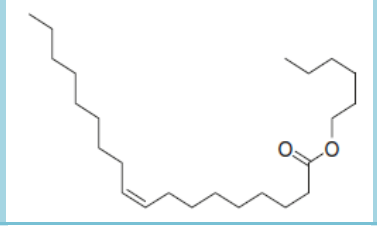
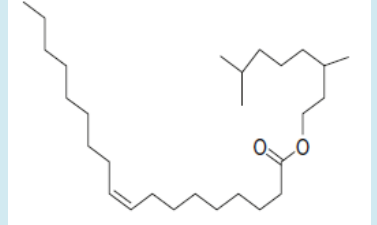
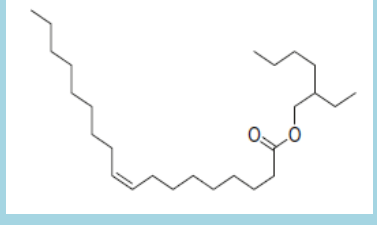


Slika 2.1. Prikaz dobivanja biomaziva reakcijom esterifikacije

Sinteza biomaziva predmet je sve većeg interesa stoga se provode mnoga istraživanja. Trivedi i kosuradnici uspješno su proveli sintezu nekoliko biomaziva esterifikacijom između

različitih alkohola i oleinske kiseline prikazanih u tablici 2.1. Reakcije su provedene uz prisustvo lipaze *Callera Trans L* bez dodatka organskog otapala. Ovim istraživanjem ustanovljeno je da lipaze imaju veću aktivnost, tj. postiže se brža konverzija supstrata u produkte što je veći broj ugljikovih atoma u lancu alkohola (Trivedi et al., 2015).

Tablica 2.1. Prikaz korištenih supstrata u sintezi biomaziva te pripadajuće vrijednosti iskorištenja

Supstrati	Struktura dobivenog biomaziva	Iskorištenje / %	Referenca
oleil alkohol + oleinska kiselina		99	Trivedi et al., 2015.
heptanol + oleinska kiselina		86	
heksanol + oleinska kiselina		82	
3,7-dimetil-1- oktanol + oleinska kiselina		64	
2-etilheksanol + oleinska kiselina		53	

Happe i suradnici proučavali su enzimsku esterifikaciju trimetanolpropana i oleinske kiseline u dvofaznom sustavu bez prisustva otapala. Reakcija je katalizirana lipazom B iz *Candida antarctica* te je dobiveno je iskorištenje od 95 % (Happe et al., 2012).

Kao supstrati za sintezu biomaziva također se mogu koristiti 2,2-dietil-1,3-propandiol, trimetilol propan i pentaeritritol što su proveli Jinho i suradnici u kombinaciji s oleinskom kiselinom dobivenom iz sojinog ulja (Jinho et al., 2013).

Nedavno je uspješno provedena i sinteza izoamil oleata enzimskom esterifikacijom izoamil alkohola i oleinske kiseline uz konverziju supstrata od 98 % (Madarasz et al., 2015).

U tablici 2.2. sumirani su svi prethodno navedeni supstrati do sada korišteni za sintezu biomaziva.

Tablica 2.2. Supstrati koji se mogu koristiti za sintezu biomaziva

Supstrati za sintezu biomaziva		Reference
Masne kiseline	Alkoholi	Trivedi et al., 2015.
oleinska kiselina	oleil alkohol	
	heptanol	
	heksanol	
	3,7-dimetil-1-oktanol	
	2-etilheksanol	
oleinska kiselina	trimetanolpropan	Happe et al., 2012.
oleinska kiselina	2,2-dietil-1,3-propandiol	Jinho et al., 2013.
	trimetilol propan	
	pentaeritritol	
oleinska kiselina	izoamil alkohol	Madarasz et al., 2015.

2.2. Lipaze

Lipaze su enzimi koji spadaju u hidrolaze čija je prirodna funkcija hidroliza netopljivih triglicerida pri čemu nastaju slobodne masne kiseline i glicerol. Uz svoju primarnu funkciju hidrolize triglicerida, lipaze također kataliziraju i mnoštvo drugih reakcija kao što su esterifikacija, transesterifikacija, aminoliza, ozonoliza itd. Lipaze su vrlo svestrani enzimi koji prihvaćaju širok spektar supstrata (alifatski, aliciklički, biciklički i aromatski esteri, tioesteri, aktivirani imini) pri čemu održavaju visoku regioselektivnost i stereoselektivnost.. Ovakva svojstva čine ih jednim od najvažnijih grupa biokatalizatora koji se primjenjuju u biotehnološkim procesima (Gandhi et al., 2000).

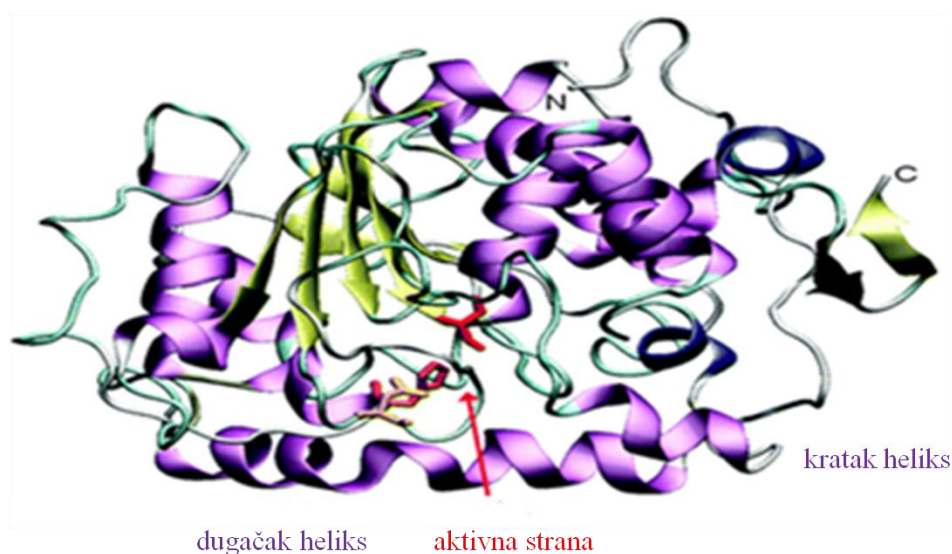
Ovi enzimi prisutni su u svim živim organizmima stoga se mogu izolirati iz različitih vrsta biljaka, životinja, bakterija, gljiva i kvasaca. Lipaze prisutne u bakterijama i gljivama imaju najveći potencijal korištenja kao industrijskih biokatalizatora budući da ih karakterizira robusnost, jednostavna proizvodnja fermentacijom te laka ponovna upotreba. Većina lipaza izoliranih iz bakterija pripada porodicama *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Bacillus* i *Chromobacterium*, dok lipaze izolirane iz gljiva većinom pripadaju porodicama *Candida*, *Humicola*, *Penicillium*, *Yarrowia*, *Mucor*, *Rhizopus* i *Aspergillus* (Müller et al., 2004). U tablici 2.3. prikazane su porodice lipaza izoliranih iz bakterija i gljiva koje se najviše koriste u biokatalitičkim procesima.

Tablica 2.3. Porodice lipaza izoliranih iz bakterija i gljiva

	Lipaze izolirane iz bakterija	Lipaze izolirane iz gljiva	
Porodica	<i>Pseudomonas</i>	<i>Candida</i>	
	<i>Burkholderia</i>	<i>Humicola</i>	
	<i>Alcaligenes</i>	<i>Penicillium</i>	
	<i>Acinetobacter</i>	<i>Yarrowia</i>	
	<i>Bacillus</i>	<i>Mucor</i>	
	<i>Chromobacterium</i>		<i>Rhizopus</i>
			<i>Aspergillus</i>

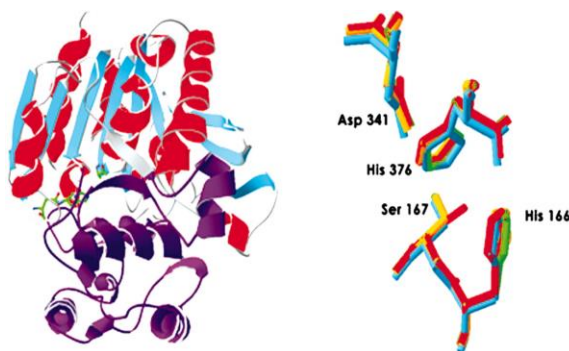
Optimalna temperatura pri kojoj su lipaze aktivne kreće se između 30 i 60 °C, međutim to se odnosi na lipaze dobivene iz konvencionalnih izvora. U zadnje vrijeme sve se više istražuje dobivanje enzima ekstremofila koji pokazuju aktivnost i stabilnost u ekstremnim uvjetima temperature, tlaka, pH itd. Kao posljedica toga dobivena je lipaza iz *Bacillus thermocatenuatus* koja pokazuje visoku aktivnost i do 70 °C. Također se istražuje i dobivanje lipaze koje bi bile aktivne pri vrlo niskim temperaturama kao što je slučaj enzima izoliranih iz bakterija na Antarktiku (porodice *Pseudomonas* i *Moraxella*). Takve ekstremne i neobične značajke nude mogućnost primjene lipaza u njihovom izvornom obliku u ekstremnim reakcijskim uvjetima bez potrebe za prethodnom obradom (Demirhian *et al.*, 2001).

Sve lipaze karakterizira identična struktura, tzv. α/β hidrolaza nabor. Glavni dio nabora čini sedam paralelnih niti i jedna antiparalelna nit (β_2) centralne β ploče, a niti β_3 – β_8 povezane su α heliksom koji ujedno i zaklanja β ploču (slika 2.2.) (Polaina *et al.*, 2007).



Slika 2.2. Struktura lipaze B iz *Candida antarctica* (Klähn *et al.*, 2011).

Aktivni centar lipaza nalazi u unutrašnjosti molekula te je zaklonjen peptidnim lancem. Iz do sada poznatih struktura proizlazi da aktivni centar većine lipaza čine ostaci tri aminokiseline: serina, asparagina ili glutamina, i histidina (slika 2.3.). Za ostatke histidina vodikovim vezama

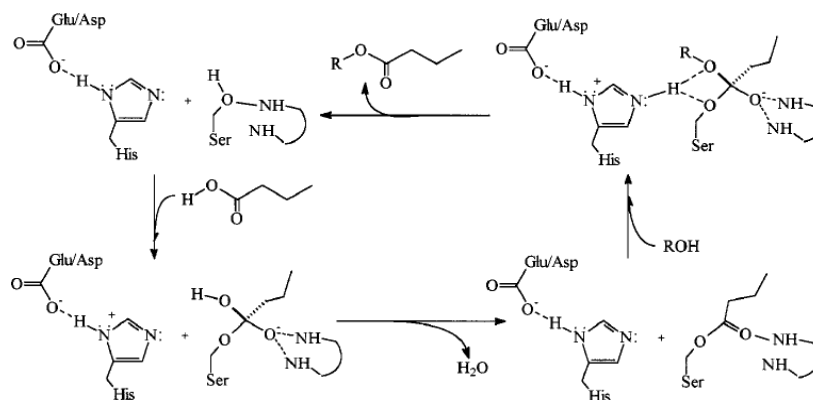


Slika 2.3. Prikaz aminokiselina koje čine aktivni centar lipaza (Mueller et al., 2004).

vezani su ostaci serina i ostaci karboksilne grupe neke od kiselina glutamina ili asparagina. Položaj u primarnoj strukturi ova tri aminokiselinska ostatka u lipazama različitog porijekla drastično se razlikuje, ali zahvaljujući različitim konformacijama oni se nalaze na povoljnom mjestu za formiranje aktivnog centra (Pleiss et al., 1998).

Lipaze djeluju u dvofaznom reakcijskom sustavu koji se sastoji od vode i supstrata netopljivog u vodi. Imaju karakterističan mehanizam djelovanja jer su aktivne na granici faza vodene i organske faze. Ovaj fenomen poznat je pod nazivom aktivacija na granici faza i objašnjava se konformacijskim promjenama kojima je izloženo aktivno mjesto lipaze. Budući da je aktivni centar lipaze zaklonjen peptidnim vezama takav položaj onemogućava molekuli supstrata da se veže za enzim i zbog toga lipaze mogu biti neaktivne u vodenim otopinama. Međutim, kada se lipaza adsorbira na graničnoj površini između vodene i nepolarne faze, dolazi do promjene prostornog rasporeda molekula zbog pomicanja hidrofobnih dijelova peptidnog lanca prema nepolarnoj fazi. Molekula lipaze zauzima tzv. „otvorenu konformaciju“ pri kojoj je aktivni centar dostupan molekulama supstrata i omogućava se stvaranje kompleksa enzim–supstrat (Ognjanović, 2010).

Mehanizam reakcije esterifikacije katalizirane lipazom uključuje dva tetrahedralna intermedijera (slika 2.4.). Prvi tetrahedralni intermedijer nastaje nukleofilnim napadom serinskog ostatka na kiselinu. Intermedijer gubi vodu pri čemu se stvara acil-enzimski kompleks. Molekula alkohola zatim nukleofilno napada nastali kompleks te nastaje drugi tetrahedralni intermedijer. Iz drugog intermedijera potom se izdvaja ester, a enzim se vraća u svoju primarnu formu.



Slika 2.4. Mehanizam reakcije esterifikacije katalizirane lipazom

Potencijal lipaza kao biokatalizatora leži u njihovoj selektivnosti (regioselektivnost, kemoselektivnost te stereoselektivnost) i specifičnosti stoga je pravilnim izborom lipaza moguće usmjereno odvijanje reakcije i dobivanje čistog proizvoda u velikom prinosu. Ovi enzimi do sada su pokazali veliki utjecaj na reakcije esterifikacije kojima se dobivaju različiti proizvodi kao što su biomaziva, mirisi, tenzidi, enantiomeri korišteni u lijekovima, ljepila, insekticidi, plastične mase, odstranjivači lakova itd. Unatoč tome većina navedenih reakcija još uvijek nije komercijalizirana te su potrebna daljnja istraživanja (Gandhi et al., 2000).

2.3. Nekonvencionalna otapala

Smanjenje i uklanjanje štetnih tvari u dizajnu, proizvodnji i primjeni kemijskih proizvoda glavni je cilj zelene kemije. Budući da otapala imaju ključnu ulogu u ovim procesima, pridaje im se sve više važnosti i sve se više istražuju. Naime, mnoga konvencionalna otapala su toksična, zapaljiva, lako isparavaju te se teško ponovno upotrebljavaju stoga se razvijaju ekološki prihvatljivija nekonvencionalna otapala. Nadalje, ključnu ulogu u uspješnoj provedbi biokatalitičkih procesa ima stabilnost enzima koja se također može postići korištenjem nekonvencionalnih otapala (Lozano et al., 2012). Organska otapala, ionske kapljavine i superkritični fluidi nekonvencionalna su otapala kojima se do sada pridalo najviše pažnje stoga će u nastavku biti detaljnije opisani (Kishor et al., 2013).

2.3.1. Organska otapala

Iako je voda tradicionalno otapalo u biokatalizi, koriste se puno i organska otapala. Ova otapala često se smatraju denurantima enzima, što nije točno, te im je zbog toga trebalo dugo vremena da nađu svoju primjenu u biokatalizi. Postoje tri glavna tipa sustava unutar kojih se primjenjuju organska otapala, a to su vodeno/organski, dvofazni i monofazni. Ova

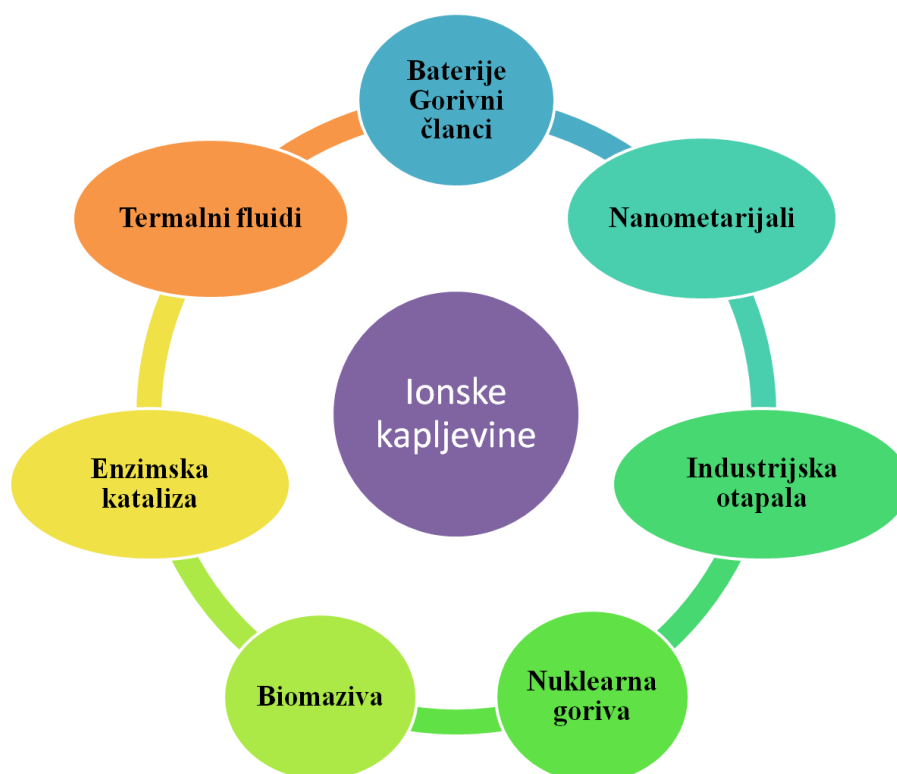
otapala nude niz prednosti. Njihovim korištenjem može se postići veća topljivost hidrofobnih molekula, mijenja se specifičnost enzima prema supstratu te je potrebna manja količina vode za aktivnost. Također, nepolarna otapala ne mogu desorbirati vezanu vodu za enzim ili imobilizirani enzim. Korištenjem organskih otapala postižu se veća iskorištenja reakcija, reducirana su mikrobiološka onečišćenja, osigurana je visoka termička stabilnost enzima i moguće je *in situ* izdvajanje produkata. Nedostatak ovih otapala jest moguće smanjenje aktivnosti enzima zbog čega su potrebne veće količine biokatalizatora, mogu djelovati kao denaturanti te može doći do inaktivacije enzima na međufaznoj površini (Sellek et al., 1999). U tablici 2.4. sumirane su prednosti i nedostaci upotrebe ovih nekonvencionalnih otapala.

Tablica 2.4. Prednosti i nedostaci upotrebe organskih otapala

Prednosti	Nedostaci
Veća topljivost hidrofobnih molekula	Moguće smanjenje aktivnosti enzima zbog čega su potrebne veće količine biokatalizatora
Promijenjena specifičnost enzima prema supstratu, regiospecifičnost, stereospecifičnost	Polarna otapala mogu djelovati kao denaturanti
Manja količina vode potrebna za aktivnost	Mogućnost inaktivacije enzima na međufaznoj površini
Reduciran broj sporednih reakcija koje se javljaju u vodenim otapalima	
Nepolarna otapala ne mogu desorbirati vezanu vodu za enzim ili imobilizirani enzim	
Veća iskorištenja reakcija	
Reducirana mikrobiološka onečišćenja	
Visoka termička stabilnost enzima	
Mogućnost <i>in situ</i> izdvajanja produkta	

2.3.2. Ionske kapljevine

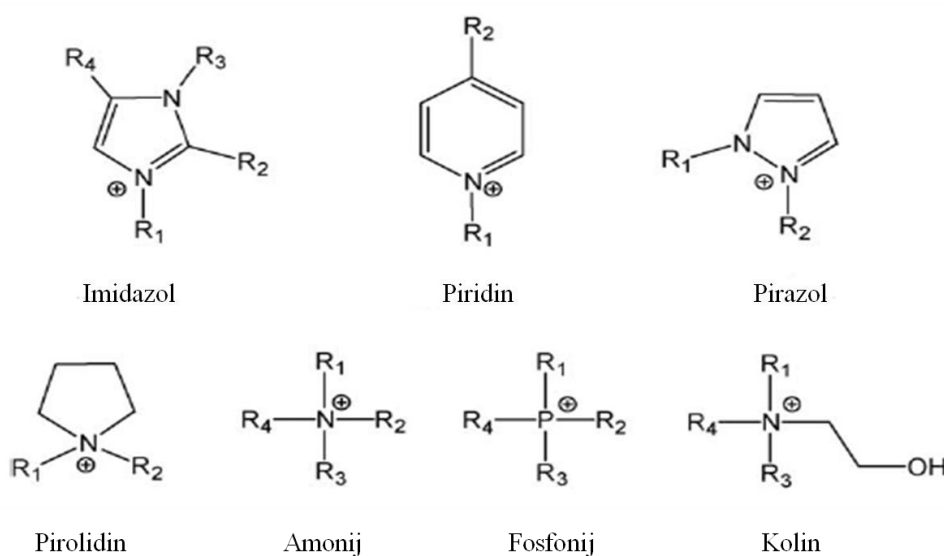
Ionske kapljevine su organske soli, koje su kapljevine ispod 100°C, ili obično blizu sobne temperature, a ključna karakteristika im je raznolikost. Temelje se na organskim kationima (npr. 1,3-dialkilimidazol) u paru s različitim anionima koji imaju snažno delokalizirani negativni naboj (npr. BF₄, PF₆) što rezultira dobivanjem vrlo različitih bezbojnih materijala, male viskoznosti (Lozano et al., 2012). Zahvaljujući mogućnosti kombiniranja kationa i aniona te različitih načina pripreme i pročišćavanja, ionske kapljevine imaju sve širu primjenu u enzimskoj katalizi, dobivanju biomaziva, nanotehnologiji, baterijama i gorivnim člancima, koriste se kao industrijska otapala, termalni fluidi, nuklearna goriva itd. (slika 2.5.) (Bourbigou et al., 2010).



Slika 2.5. Neke od primjena ionskih kapljevina (Bourbigou et al., 2010).

Ionske kapljevine su potencijalne "zelene kemikalije" i to zbog visoke toplinske stabilnosti te niskog tlaka pare čijim se korištenjem može ublažiti problem emisije hlapljivih organskih otapala u atmosferu. Štoviše, fizikalna svojstva ionskih kapljevina (npr. gustoća, viskoznost, talište, polarnost) mogu se podešavati kombinacijom/odabirom različitih aniona

i/ili kationa (slika 2.6.). Polarnost je jedno od najvažnijih svojstava za karakterizaciju učinka



Slika 2.6. Najčešći kationi i anioni od kojih se sastoje ionske kapljevine (Bourbigou et al., 2010).

ionskih kapljevina kao otapala u kemijskim reakcijama. Polarnost ionskih kapljevina određivana je različitim tehnikama većinom baziranim na Reichardtovoj metodi bojila. Rezultati ispitivanja ukazali su da ova otapala imaju polarnost usporedivu s nižim alkoholima (metanol, etanol), no unatoč tome fizička interpretacija rezultata vrlo je komplicirana. Polarnost ionskih kapljevina zapravo je svojstvo koje se najviše pokušava objasniti budući da ne postoji niti jedan parametar i izravna mjera koja bi okarakterizirala polarnost ovih kapljevina (Reichardt, 2005). U svakom slučaju, jasno je da ionske kapljevine mogu biti dizajnirane s različitom polarnošću te pritom biti mješljive ili nemješljive s većinom hidrofobnih organskih otapala (npr. heksanom, toluenom, eterom). Zahvaljujući navedenom svojstvu ionske kapljevine mogu biti bezvodna polarna alternativa u dizajniranju dvofaznih sustava koji se široko primjenjuju pri odvajanju produkata iz reakcijske smjese (Wasserscheid et al., 2008; Plechkova et al., 2008; Bourbigou et al., 2010). Nadalje, higroskopian karakter ionskih kapljevina može se smatrati dodatnom prednošću ovih modernih otapala budući da enzimi zahtijevaju određeni stupanj hidratacije kako bi bili aktivni (Poole, 2004; Zhao et al., 2005; Greaves et al., 2008). Lipaze su daleko najčešće korišteni biokatalizatori u ionskim kapljevina koje nisu mješljive s vodom te se koriste pri sintezi različitih estera (Lozano, 2012). Ionske kapljevine se mogu reciklirati što ih također čini potencijalnim idealnim otapalima "zelene kemije" (Wasserscheid et al., 2008; Plechkova et al., 2008; Bourbigou et al., 2010).

Sinteza biomaziva sve se više provodi u ionskim kapljevina budući da one osiguravaju stabilnost enzima te nude niz prethodno navedenih prednosti. U tablici 2.5. dan je popis ionskih kapljevine koje bi se mogle upotrijebiti u sintezi biomaziva. Naime, za navedene kapljevine utvrđeno je da dobro otapaju određene masne kiseline koje su uz alkohole ujedno i supstrati za dobivanje biomaziva.

Tablica 2.5. Potencijalne ionske kapljevine za sintezu biomaziva

Potencijalne ionske kapljevine za sintezu biomaziva	Reference
1-heksadecil-3-metilimidazol triflimid [C ₁₆ MIM][NTf ₂]	Diego et al., 2011.
1-oktadecil-3-metilimidazoli triflimid [C ₁₈ MIM][NTf ₂]	Diego et al., 2011.
1-butil-3-metilimidazol klorid [C ₄ MIM]Cl	Zarski et al., 2016.
1-butil-3-metilimida- zolij klorid [C ₄ MIM]Cl	Singh et al., 2014.
1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat [BMIM] PF ₆	Shangde et al., 2014.
1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat [BMIM] BF ₄	Shangde et al., 2014.

2.3.3. Superkritični fluidi

Superkritični fluid definira se kao tvar iznad svoje kritične temperature (T_k) i kritičnog tlaka (p_k). (Lozano et al., 2012). Glavna prednost provođenja biokatalize u superkritičnim fluidima jest mogućnost podešavanja njihovih svojstava promjenom temperature i tlaka (Knez et al., 2009). Vrijednosti kritičnog tlaka i temperature superkritičnih fluida pri kojima se

provodi biokataliza povoljne su za osjetljive supstrate. Nadalje, sposobnost superkritičnih fluida da otope određene supstrate uvelike ovisi o njihovoj gustoći. Kontrolom temperature i tlaka moguće je kontrolirati gustoću fluida što omogućava selektivno otapanje i ekstrakciju supstrata (Lozano et al., 2012).

Na stabilnost i aktivnost enzima u superkritičnim fluidima utječu količina vode, radni tlak i temperatura. U ekstremnim uvjetima superkritični fluidi mogu uzrokovati denaturaciju ili smanjenu aktivnost enzima. Međutim, podešavanjem odgovarajuće temperature i tlaka moguće je postići uvjete pri kojima enzimi postižu najvišu aktivnost i stabilnost. Superkritične fluide također karakterizira visok koeficijent difuzije i niska viskoznost zahvaljujući kojima se može povećati brzina prijenosa supstrata do aktivnog mjesta enzima (Knez et al., 2009). Biokataliza u superkritičnim uvjetima provedena je samo s fluidima s niskom kritičnom temperaturom budući da pri visokim temperaturama može doći do denaturacije proteina. U tu svrhu korišteni su CO₂, etan, propan, butan, SF₆, CF₃ itd. Najpopularniji superkritični fluid je CO₂ zbog toga što je kemijski inertan, netoksičan, nezapaljiv, jeftin i lako dostupan. CO₂ također ima niske kritične parametre ($T_k = 31\text{ °C}$, $p_k = 73,8\text{ bar}$) koji su povoljni za biokatalizu te se smatra „zelenim otapalom“. Lipaze su enzimi čije je djelovanje u superkritičnim fluidima najviše proučavano. Sukladno tome reakcije esterifikacije i transesterifikacije najpopularnije su enzimatske reakcije u ovim otapalima.

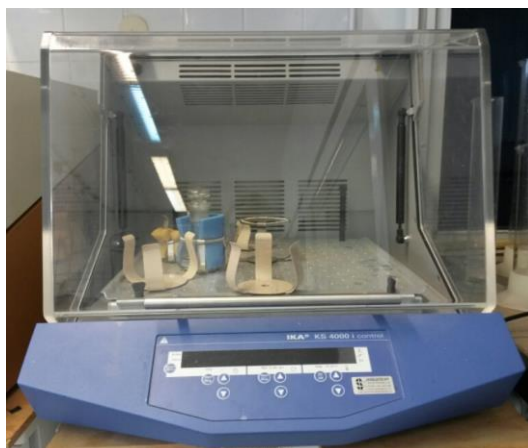
Dakle, primjenom superkritičnih fluida kao otapala moguće je jednostavno optimiranje i kontrola procesa podešavanjem temperature, tlaka i gustoće fluida. Isto tako, na lak način kontrolira se brzina procesa, moguće je dizajnirati integrirani sustav sinteze i separacije produkata te se pruža mogućnost jednostavnog recikliranja i ponovne upotrebe enzima (Lozano et al., 2012).

3. EKSPERIMENTALNI DIO:

3.1. Aparatura

3.1.1. Inkubator miješalica

Dio reakcija provoden je u IKA KS 4000 inkubatoru miješalici prikazanoj na slici 3.1.



Slika 3.1. IKA KS 4000 inkubator miješalica

3.1.2. Kotlasti reaktor s mikrovalovima

Drugi dio reakcija provoden je u kotlastom reaktoru s mikrovalovima (Discover series, BenchMate model, CEM Corporation, USA) prikazanom na slici 3.2.



Slika 3.2. Kotlasti reaktor s mikrovalovima

3.1.3. Plinski kromatograf

Koncentracije supstrata i produkata određivane su GC analizom pomoću plinskog kromatografa s FID detektorom prikazanog na slici 3.3.



Slika 3.3. Plinski kromatograf (Hewlett 5890)

3.1.4. Injekcijska igla

Injekcijska igla korištena za unos tekućeg uzorka na vrh kolone pri GC analizi prikazana je na slici 3.4.



Slika 3.4. Injekcijska igla

3.1.5. Karl Fischer titrator

Količina nastale vode određivana je Karl Fischer titracijom pomoću aparature prikazane na slici 3.5.



Slika 3.5. Karl Fischer titrator (Mettler DL35)

3.2. Kemikalije

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije: 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆) (IoLiTec, Germany), 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat ([BMIM] BF₄) (IoLiTec, Germany), amonijev heksafluorofosfat (NH₄PF₆) (IoLiTec, Germany), 98 %-tni izoamil alkohol (Scharlau GmbH), 65 – 88 %-tna oleinska kiselina (Merck, Germany), *n*-heksan (Merck, Germany), Složeni titrant 5 (jednokomponentni reagens za volumetrijsku Karl-Fischer titraciju 1ml \cong ca. 5 mg H₂O), (Merck KGaA, Germany), Novozym 435 (*Candida antarctica* lipaza B) (Novozyme, Denmark).

3.3. Analitičke metode

Analitičke metode korištene u ovom radu mogu se podijeliti na kromatografske i volumetrijske. Kromatografski je određivana koncentracija oleinske kiseline i nastalog

izoamil oleata te utjecaj temperature na sintezu navedenog biomaziva, aktivnost *Candida antarctica* lipaze B i utjecaj temperature na aktivnost *Candida antarctica* lipaze B. Volumetrijski, tj. Karl-Fischer titracijom određivana je količina nastale vode tijekom reakcije esterifikacije oleinske kiseline i izoamil alkohola.

3.3.1. Određivanje koncentracije nastalog izoamil oleata

Koncentracije oleinske kiseline i nastalog izoamil oleata određivane su kromatografski, GC analizom pomoću plinskog kromatografa (Hewlett Packard 5890) s FID detektorom. Korištena je kolona DB-FFAP 10 m koja radi u temperaturnom rasponu od 40-250 °C pri tlaku od 50 kPa. Kao mobilna faza korišten je dušik pri tlaku od 100 kPa. Početna temperatura u koloni bila je 130 °C, dok je konačna dosegla 240 °C. Pri svakoj analizi 1 µL tekućeg uzorka unesen je injekcijskom iglom izravno na vrh kolone. U plameno ionizacijskom detektoru (FID, flame ionisation detector) razdvojeni sastojci izgaraju u plamenu (smjesa sintetskog zraka i vodika) i formiraju električni signal koji se bilježi na papiru u obliku kromatograma s nizom karakterističnih pikova. Svaki pik ima svoje karakteristično vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme, RT) koje bilježi kompjuterizirani integrator kao površinu i visinu pikova. Retencijsko vrijeme izoamil-oleata iznosi 8 min, a oleinske kiseline 11 min.

Za izradu kalibracijskog pravca korištena je metoda vanjskog standarda. Pripremljene su 3 standardne otopine izoamil oleata različitih koncentracija. Prvo je pripremljena standardna otopina izoamil oleata masene koncentracije 0,4496 g / 10 ml koja je zatim razrijeđena 5 i 10 puta. U tablici 3.1. prikazane su koncentracije pripremljenih standardnih otopina. Kalibracijski pravac za određivanje koncentracije izoamil oleata nalazi se u prilogu 1.

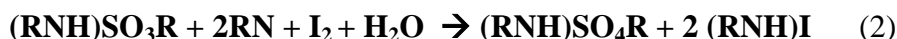
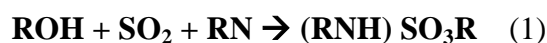
Tablica 3.1. Masene koncentracije standardnih otopina za izradu kalibracijskog pravca za određivanje koncentracije izoamil oleata

izoamil oleat	γ (izoamil oleat) / (g/10 mL)
Početna otopina	0,4496
Razrjeđenje 5 puta	0,0899
Razrjeđenje 10 puta	0,0450

3.3.2. Određivanje vode u uzorku

Određivanje vode u uzorcima provedeno je volumetrijskom Karl Fisher titracijom. Mjerenja su provedena Karl Fischer titratorom (Mettler DL35 titrator). Korišten je složeni titrant 5 (jednokomponentni reagens za volumetrijsku Karl Fischer titraciju 1ml \cong ca. 5 mg H₂O) koji sadrži sve reaktante potrebne za reakciju (jod (I₂), sumporov dioksid (SO₂) te imidazol koji je korišten kao baza). Vrijednost pH kretala se u rasponu 5-8 budući da brzina reakcije ovisi o pH otapala. Niska vrijednost pH (<5) titraciju čini sporom dok je visoka vrijednost (>5) čini brzom. U titracijsku posudu s miješalicom dodano je 25 mL metanola (otapalo) u koji su uronjene platinaste elektrode. Metanol je zatim predtitriran složenim titrantom 5 do završne točke kako bi se uklonila neželjena voda u sustavu. U takvu otopinu injekcijskom iglom dodan je 1 μ L prethodno izvaganog uzorka. Masa uzorka potom je zapisana u uređaj te je provedena titracija složenim titrantom 5. Završna točka titracije određena je potenciometrijski. Prilikom titracije određena količina struje prolazi kroz elektrode, a svaki dodatak vode bilježi se promjenom potencijala između elektroda. Kada se dođe do završne točke titracije, dodavanjem titranta na elektrodama više ne dolazi do promjene potencijala. Vrijednost količine vode u uzorku dobivena je kao postotak ($\frac{m_{voda}}{m_{ukupno}} * 100\%$).

Karl Fischer titracija odvija se u dva koraka. U prvoj reakciji alkohol (metanol ili etanol), sumporov dioksid (SO₂) i baza (RN) reagiraju formirajući alkilsulfit (jednadžba 1). U drugoj reakciji alkilsulfit reagira s jodom (I₂) i vodom iz uzorka. To je oksido-redukcijska reakcija gdje dolazi do oksidacije alkilsulfita u alkilsulfata te jod djeluje kao redukcijsko sredstvo prema jednadžbi 2. Tijekom ove reakcije voda i jod troše se u istom molarnom omjeru (1:1), te je na poznavajući količinu utrošenog joda moguće kvantitativno određivanje količine vode u uzorku.



3.3.3. Određivanje aktivnosti *Candida antarctica* lipaze B

Aktivnost *Candida antarctica* lipaze B određivana je pri dvije različite temperature; 40 °C i 50 °C. Pri svakoj temperaturi ista *Candida antarctica* lipaza B korištena je 4 puta. Za svako mjerenje pripravljena je otopina čiji je sastav dan u tablici 3.2. U Eppendorf epruveti pomiješano je 148 μ L izoamil alkohola (1,41 mmol), 200 μ L oleinske kiseline (0,64 mmol), 800 μ L 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfata ([BMIM] PF₆) (3,88 mmol) te dodano 10 mg *Candida antarctica* lipaze B. Svaka reakcija provedena je 10 min u kotlastom reaktoru s

mikrovalovima nakon čega je provedena ekstrakcija s 2,5 mL *n*-heksana. Nakon ekstrakcije GC analizom praćena je promjena koncentracije nastalog estera, izoamil oleata nakon više upotreba *Candida antarctica* lipaze B. Aktivnost je izražena definiranjem konverzije oleinske kiseline.

Tablica 3.2. Sastav otopine pripremljene za određivanje aktivnosti *Candida antarctica* lipaze B

	V / μL	n / mmol
izoamil alkohol	148	1,41
oleinska kiselina	200	0,64
[BMIM] PF₆	800	3,88
	m / mg	
<i>Candida antarctica</i> lipaza B	10	

3.4. Opis provedbe sinteze izoamil oleata

3.4.1. Reakcije provedene u inkubatoru miješalici

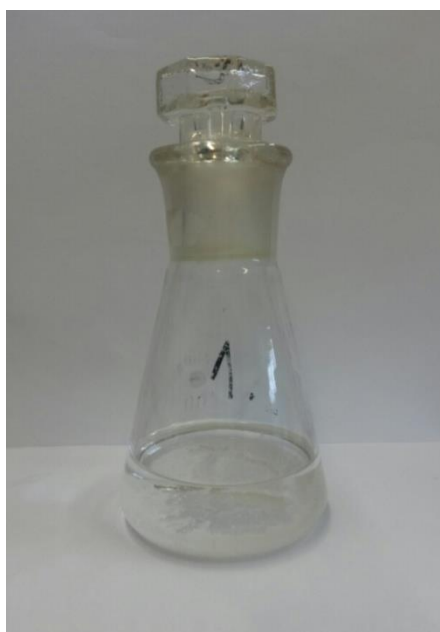
Reakcije esterifikacije izoamil alkohola i oleinske kiseline provedene su uz konvencionalno grijanje u IKA KS 4000 inkubatoru miješalici pri intenzitetu miješanja, tj. frekvenciji rotacije 60 okr/min te pri različitim temperaturama.

Reakcije su provedene u nekoliko otapala, *n*-heksanu te ionskim kapljevinama 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆), 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroboratu ([BMIM] BF₄) i amonijevom heksafluorofosfatu ([NH₄] PF₆).

Za reakcije provedene u *n*-heksanu pripremljene su tri otopine jednakog sastava prikazanog u tablici 3.3. Za svaku reakciju u Erlenmeyerovoj tikvici prikazanoj na slici 3.5. pomiješano je 4 ml izoamil alkohola (36,95 mmol) i 2 ml oleinske kiseline (6,36 mmol) te im je dodano 20 ml *n*-heksana (304,35 mmol). U tikvicu je također dodano 50 mg enzima, *Candida antarctica* lipaza B. U ovom slučaju reakcije esterifikacije provedene su pri tri različite temperature, 30 °C, 40 °C i 50 °C unutar 24 sata.

Tablica 3.3. Sastav otopine pripremljene za sintezu izoamil oleata u *n*-heksanu u inkubatoru miješalici

	V / mL	n / mmol
izoamil alkohol	4	36,95
oleinska kiselina	2	6,36
<i>n</i>-heksan	20	304,35
	m / mg	
<i>Candida antarctica</i> lipaza B	50	



Slika 3.5. Prikaz reakcijske otopine (izoamil alkohol, oleinska kiselina, *n*-heksan) u Erlenmeyerovoj tikvici

Za reakcije provedene u ionskoj kapljevini 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) pripremljena je 21 otopina jednakog sastava prikazanog u tablici 3.4. 21 otopina korištena je budući da je uzorkovanje teško provedivo pri većim volumenima ($V(\text{reakcijske smjese}) \geq 10 \text{ mL}$), tj. reakcijska smjesa nije homogena te je stoga bilo potrebno pripremiti sedam otopina manjih volumena za svaku temperaturu. Reakcije su provedene pri tri različite temperature 40 °C, 50 °C i 60 °C. Za svaki niz mjerenja pri određenoj temperaturi korišteno je sedam otopina budući da su GC analiza provodila u nultoj minuti te nakon 5, 30, 60, 180, 300 i 1440 min, tj. 24 sata. Za svaku reakciju u Eppendorf epruveti (slika 3.6.)

pomiješano je 74 μL izoamil alkohola (0,68 mmol), 25 μL oleinske kiseline (0,08 mmol) te 400 μL ionske kapljevine (1,94 mmol). Svakoj otopini dodano je 17 mg enzima, *Candida antarctica* lipaze B (tablica 3.4.). Nakon svake reakcije provedene u inkubator miješalici, tj. prije GC analize provedena je ekstrakcija s 2,5 ml *n*-heksana čime je dobivena jedna točka mjerenja. Jednak postupak ponovljen je i za sintezu izoamil oleata u ionskoj kapljevini 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat ([BMIM] BF₄) no samo pri temperaturi od 50 °C u nultoj minuti te nakon 30, 60, 300 i 1440 min, tj. 24 sata. Ova ionska kapljevina nije ispitivana pri drugim temperaturama budući da se ionska kapljevina 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆) pokazala kao bolje otapalo. Sinteza u amonijevom heksafluorofosfatu ([NH₄] PF₆) nije bila moguća zbog toga što ova ionska kapljevina ima temperaturu taljenja iznad sobne temperature.

Tablica 3.4. Sastav otopine pripremljene za sintezu izoamil oleata u ionskoj kapljevini 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆) u inkubator miješalici

	V / μL	n / mmol
izoamil alkohol	74	0,68
oleinska kiselina	25	0,07
[BMIM] PF₆	400	1,94
	m / mg	
<i>Candida antarctica</i> lipaza B	17	



Slika 3.6. Prikaz Eppendorf epruvete u kojoj je provedena sinteza izoamil oleata

U svim navedenim mjerenjima konverzija supstrata izračunata je na temelju dobivene površine oleinske kiseline prema jednadžbi 3.

$$X_A = \frac{\text{površina oleinske kiseline (0 min)} - \text{površina oleinske kiseline (x min)}}{\text{površina oleinske kiseline (0 min)}} \quad (3)$$

3.4.2. Reakcije provedene u kotlastom reaktoru s mikrovalovima

Reakcije esterifikacije izoamil alkohola i oleinske kiseline provedene su također i u kotlastom reaktoru s mikrovalovima pri snazi od 10 W te pri različitim temperaturama. Za svaki niz mjerenja pri određenoj temperaturi pripremljeno je 5 otopina te su se GC analiza provodila u nultoj minuti te nakon 5, 10, 15 i 20 min. U ovom djelu eksperimenta također je mijenjan molarni omjer alkohola i kiseline (1,41:0,32 te 1,41:0,64) kako bi se dobilo željeno iskorištenje u određenom vremenu. U tablici 3.5. prikazan je sastav otopine korišten u prvom nizu mjerenja provedenih pri temperaturi od 30 °C. U svaku epruvetu dodano je 148 µL izoamil alkohola (1,41 mmol), 100 µL oleinske kiseline (0,32 mmol), 800 µL ionske kapljevine 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfata ([BMIM] PF₆) (3,88 mmol) te 10 mg *Candida antarctica* lipaze B. U ovom slučaju mjerenje nakon 20 min otopine sastava prikazanog u tablici 3.4. također je provedeno i uz prisustvo zeolita.

Tablica 3.5. Sastav otopine (molarnog omjera alkohol : kiselina = 1,41 : 0,32) pripremljene za sintezu izoamil oleata u ionskoj kapljevinu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) u kotlastom reaktoru s mikrovalovima

	V / µL	n / mmol
izoamil alkohol	148	1,41
oleinska kiselina	100	0,32
[BMIM] PF₆	800	3,88
	m / mg	
<i>Candida antarctica</i> lipaza B	10	

U drugom nizu mjerenja korištena je otopina sastava prikazanog u tablici 3.5. U svaku epruvetu dodano je 148 µl izoamil alkohola (1,41 mmol), 200 µl oleinske kiseline (0,64

mmol), 800 μl ionske kapljevine 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfata ([BMIM] PF₆) (3,88 mmol) te 10 mg enzima, *Candida antarctica* lipaza B.

Tablica 3.5. Sastav otopine (molarnog omjera alkohol : kiselina = 1,41 : 0,64) pripremljene za sintezu izoamil oleata u ionskoj kapljevinu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) u kotlastom reaktoru s mikrovalovima

	<i>V</i> / μL	<i>n</i> / mmol
izoamil alkohol	148	1,41
oleinska kiselina	200	0,64
[BMIM] PF₆	800	3,88
	<i>m</i> / mg	
<i>Candida antarctica</i> lipaza B	10	

Nakon svake reakcije u kotlastom reaktoru s mikrovalovima, tj. prije GC analize provedena je ekstrakcija s 5 ml *n*-heksana kako bi se izoamil oleat i oleinska kiselina razdvojili od ionske kapljevine i enzima (slika 3.7.).



Slika 3.7. Prikaz reakcijske otopine nakon provedbe sinteze u koltastom reaktoru i ekstrakcije *n*-heksanom

U svim navedenim mjerenjima konverzija supstrata također je izračunata je na temelju dobivene površine oleinske kiseline prema ranije navedenoj jednadžbi 3.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je sinteza biomaziva, izoamil oleata reakcijom esterifikacije izoamil alkohola i oleinske kiseline uz prisustvo *Candida antarctica* lipaze B (jednadžba 4).

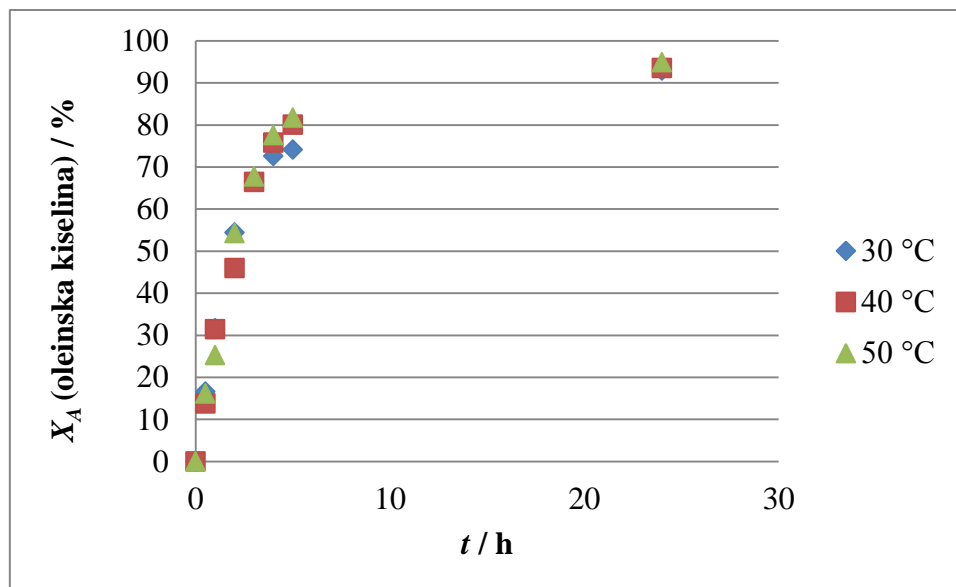


Reakcija je provedena u *n*-heksanu te dvije ionske kapljevine, 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) i 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroboratu ([BMIM] BF₄) uz konvencionalno grijanje pri različitim temperaturama. Rezultati su prikazani na slikama 4.1., 4.2., i 4.3. Također je dana usporedba provođenja reakcije u navedene dvije ionske kapljevine kako bi se vidjelo koja je povoljnije otapalo što je vidljivo na slici 4.4. Sinteza izoamil oleata provedena je i u ionskoj kapljevinu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) u kotlastom reaktoru s mikrovalovima. Reakcija je najprije testirana pri različitim molarnim udjelima (slika 4.5.), a zatim pri različitim temperaturama (slika 4.6.)

Tijekom sinteze izoamil oleata u *n*-heksanu i ionskoj kapljevinu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) praćena je i količina nastale vode unutar 24 sata, tj. 20 min, a rezultati eksperimenta prikazani su na slikama 4.7. i 4.8. U radu je također određena aktivnost enzima, *Candida antarctica* lipaze B pri različitim temperaturama, a rezultati su prikazani na slici 4.9.

4.1. Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu *n*-heksan uz konvencionalno grijanje

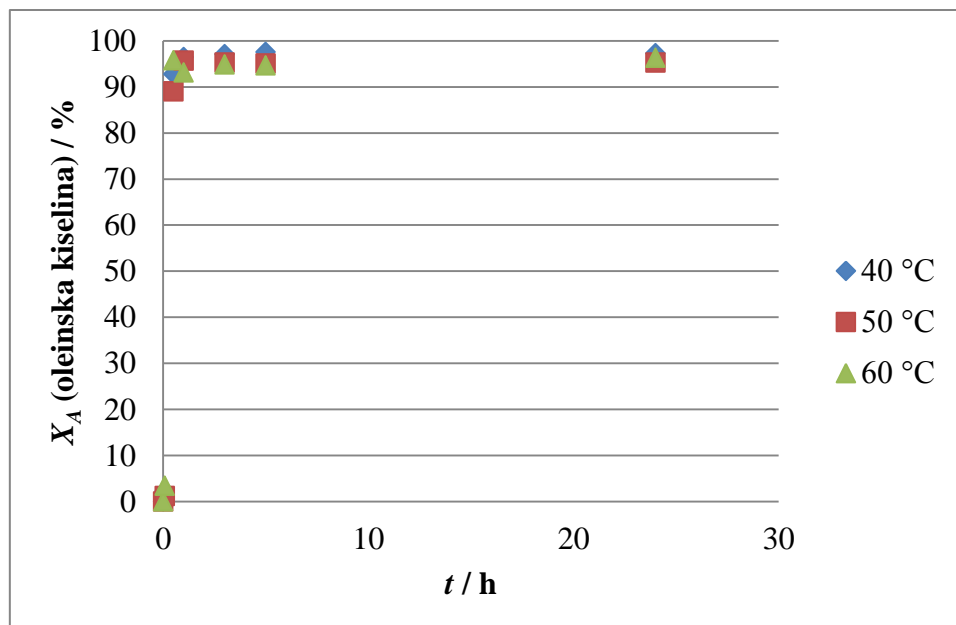
Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu *n*-heksanu uz konvencionalno grijanje prikazan je na slici 4.1. Rezultati pokazuju da promjena temperature u ovom slučaju nema značajan utjecaj na konverziju, budući da su sve vrijednosti konverzije oleinske kiseline približno iste. Također se vidi da je u *n*-heksanu reakcija vrlo spora te se konverzija oleinske kiseline od 94 % postiže tek nakon 24 sata.



Slika 4.1. Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu *n*-heksan uz konvencionalno grijanje ($n_{\text{izoamil alkohol}} = 36,95$ mmol, $n_{\text{oleinska kiselina}} = 6,36$ mmol, $V_{n\text{-heksan}} = 20$ mL, $m_{\text{Candida antarctica lipaza B}} = 50$ mg)

4.2. Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆) uz konvencionalno grijanje

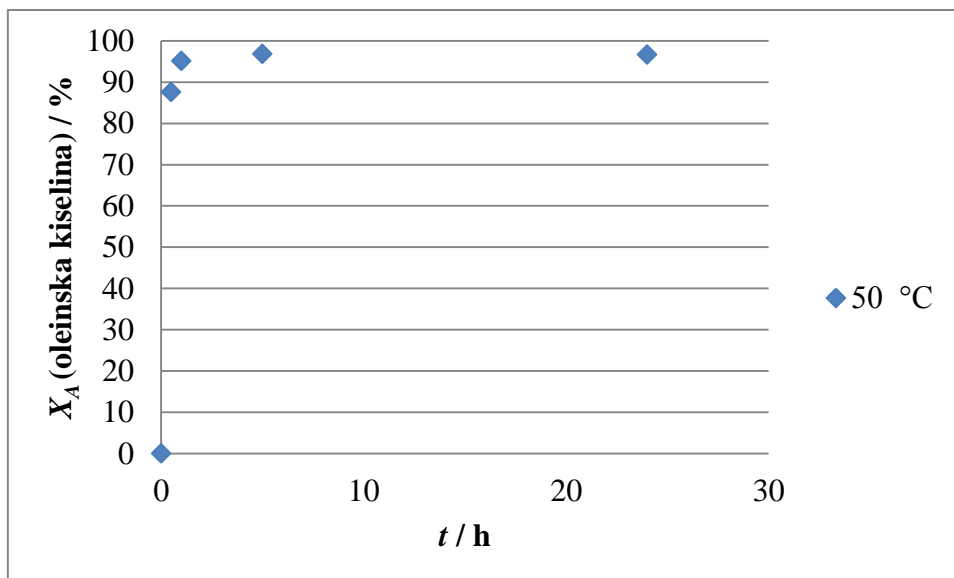
Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) uz konvencionalno grijanje prikazan je na slici 4.2. Rezultati pokazuju da promjena temperature u ovom slučaju također nema značajan utjecaj na konverziju, budući da su sve vrijednosti konverzije oleinske kiseline približno iste. 1-Butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆) potencijalno je otapalo za sintezu izoamil-oleata, budući da se već nakon 60 min postiže konverzija oleinske kiseline od 96 %.



Slika 4.2. Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) uz konvencionalno grijanje ($n_{\text{izoamil alkohol}} = 0,68$ mmol, $n_{\text{oleinska kiselina}} = 0,07$ mmol, $V_{[\text{BMIM}] \text{PF}_6} = 400$ μL , $m_{\text{Candida antarctica lipaza B}} = 17$ mg)

4.3. Sinteza izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat ([BMIM] BF₄) uz konvencionalno grijanje

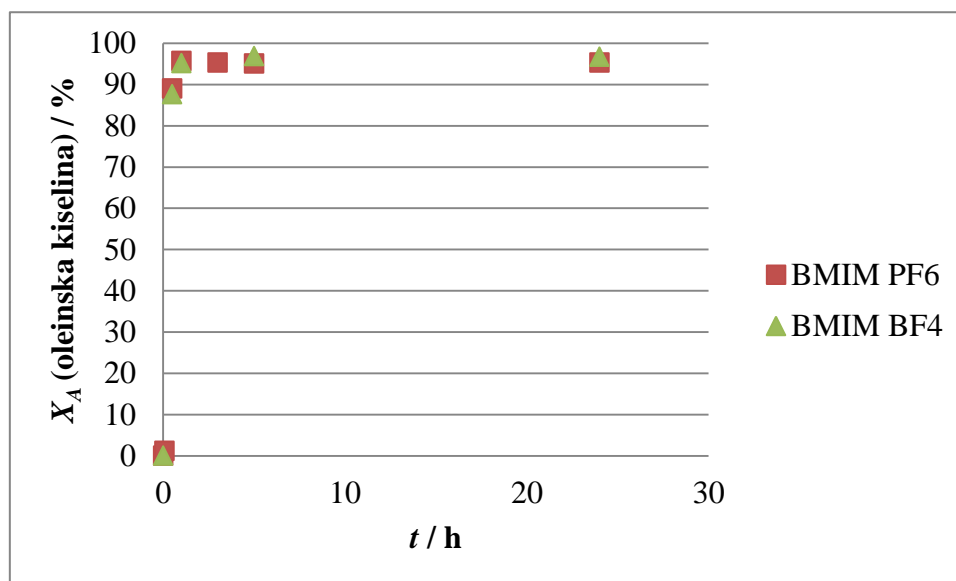
Na slici 4.3. prikazani su rezultati sinteze izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat ([BMIM] BF₄) uz konvencionalno grijanje. Rezultati prikazuju da je ionska kapljevina 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat ([BMIM] BF₄) također potencijalno otapalo za sintezu izoamil oleata budući da se već nakon 60 minuta postiže konverzija oleinske kiseline od 95 %.



Slika 4.3. Sinteza izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat ([BMIM] BF₄) uz konvencionalno grijanje ($n_{\text{izoamil alkohol}} = 0,68$ mmol, $n_{\text{oleinska kiselina}} = 0,07$ mmol, $V_{[\text{BMIM}]\text{BF}_4} = 400$ μL , $m_{\text{Candida antarctica lipaza B}} = 17$ mg)

4.4. Utjecaj vrste otapala na sintezu izoamil oleata uz konvencionalno grijanje pri 50 °C

Na slici 4.4. vidljivo je da se u ionskim kapljevinama konverzija veća od 90 % postiže već nakon 60 min. Dakle, ionske kapljevine 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆) i 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat ([BMIM] BF₄) pogodna su otapala za sintezu izoamil oleata. Daljnji eksperimenti provedeni su u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆), budući da je 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat ([BMIM] BF₄) hidrofilnog karaktera. Zbog navedene hidrofilnosti ova ionska kapljevina može utjecati na sloj adsorbirane vode na površini enzima koji je neophodan za zauzimanje aktivne konformacije enzima tj. njegovo djelovanje.

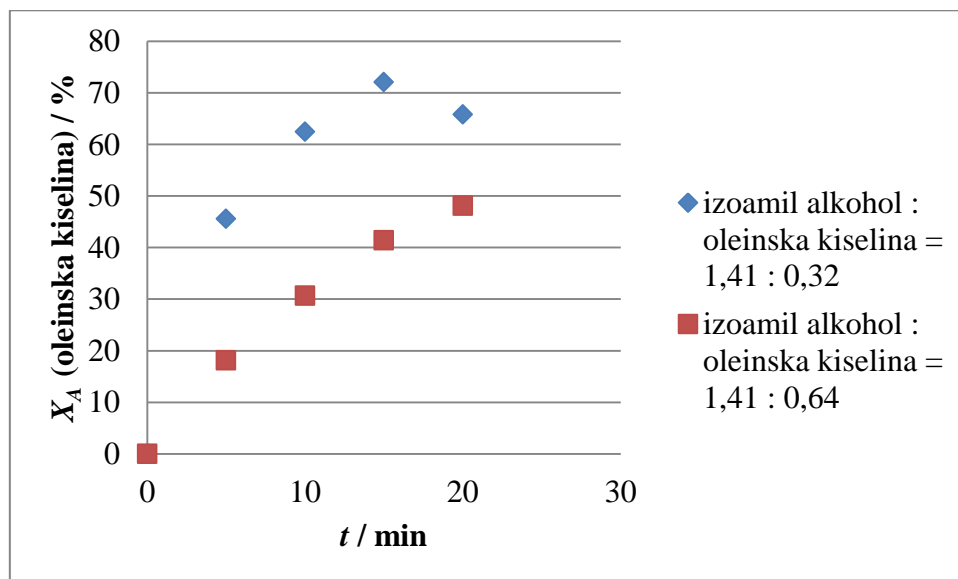


Slika 4.4. Sinteza izoamil oleata u različitim otapalima pri 50 ° C uz konvencionalno grijanje ($V_{[\text{BMIM}] \text{PF}_6} = 400 \mu\text{L}$, $V_{[\text{BMIM}] \text{BF}_4} = 400 \mu\text{L}$, $n_{\text{izoamil alkohol}} = 0,68 \text{ mmol}$, $n_{\text{oleinska kiselina}} = 0,07 \text{ mmol}$, $m_{\text{Candida antarctica lipaza B}} = 17 \text{ mg}$).

4.5. Utjecaj molarnog omjera izoamil alkohola i oleinske kiseline na sintezu izoamil oleata u ionskoj kapljevini 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) u kotlastom reaktoru s mikrovalovima pri temperaturi 30 °C

Sinteza izoamil oleata je provedena u kotlastom reaktoru s mikrovalovima. Na slici 4.5. vidljiv je utjecaj molarnog omjera izoamil alkohola i oleinske kiseline na sintezu izoamil alkohola u ovom reaktoru. Rezultati prikazuju da je pri molarnom omjeru izoamil alkohola i oleinske kiseline 1,41 : 0,32 reakcija znatno brža te se već nakon 15 min postiže konverzija oleinske kiseline iznad 70 %, no nakon 20 min konverzija oleinske kiseline opada. Razlog tome moguće je nastajanje vode koja reakciju pomiče u lijevo. Korištenjem zeolita kako bi se suzbio utjecaj vode dobivena je još manja konverzija oleinske kiseline zbog toga što je zeolit adsorbirao i oleinsku kiselinu. Molarni omjer izoamil alkohola i oleinske kiseline 1,41 : 0,64 mnogo je povoljniji budući da se konverzija oleinske kiseline cijelo vrijeme povećava stoga je ovaj omjer izoamil alkohola i oleinske kiseline korišten u daljnjim eksperimentima. Molarni omjer alkohola i oleinske kiseline jedan je od najvažnijih parametara kod enzimski kataliziranih reakcija esterifikacije. Budući da se radi o reverzibilnoj reakciji povećanje koncentracije jednog od supstrata može rezultirati većim iskorištenjem, tj. može se ostvariti pomak ravnoteže u smjeru esterifikacije, te ostvariti veća reakcijska brzina. Jedan od načina pomaka ravnoteže u smjeru esterifikacije jest povećanje koncentracije alkohola. U ovom

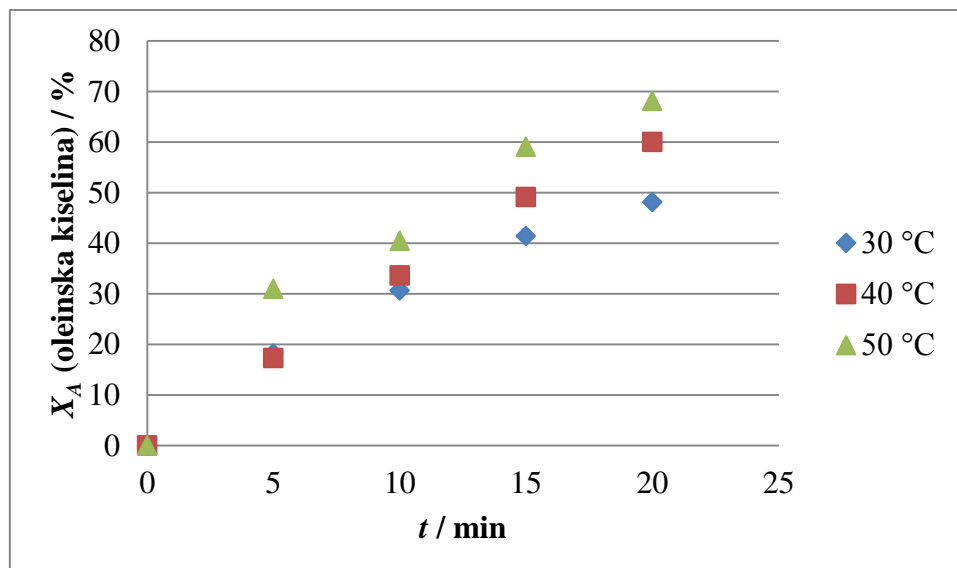
slučaju također može doći i do usporavanja brzine reakcije. Stoga je potrebno pronaći najpovoljnije uvjete za reakciju.



Slika 4.5. Utjecaj molarnog omjera izoamil alkohola i oleinske kiseline na sintezu izoamil oleata u kotlastom reaktoru s mikrovalovima pri temperaturi 30 °C ($n_{\text{izoamil alkohol}} = 1,41$ mmol, $n_{\text{oleinska kiselina}} = 0,32$ mmol, $n_{\text{2oleinska kiselina}} = 0,64$ mmol, $V_{[\text{BMIM}] \text{PF}_6} = 800 \mu\text{L}$, $m_{\text{Candida antarctica lipaza B}} = 10$ mg)

4.6. Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆) u kotlastom reaktoru s mikrovalovima

Na slici 4.6. vidljiv je utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) u kotlastom reaktoru s mikrovalovima. Rezultati prikazuju da je s povećanjem temperature reakcija brža te se postiže veća konverzija oleinske kiseline. Pri 30 °C nakon 20 min postiže se konverzija oleinske kiseline jednaka 48 %, pri 40 °C konverzija oleinske kiseline iznosi 60 % dok je pri temperaturi 50 °C postignuta konverzija oleinske kiseline 68 %. Dakle, u ovom slučaju temperatura ima pozitivan utjecaj na reakciju sinteze izoamil oleata.



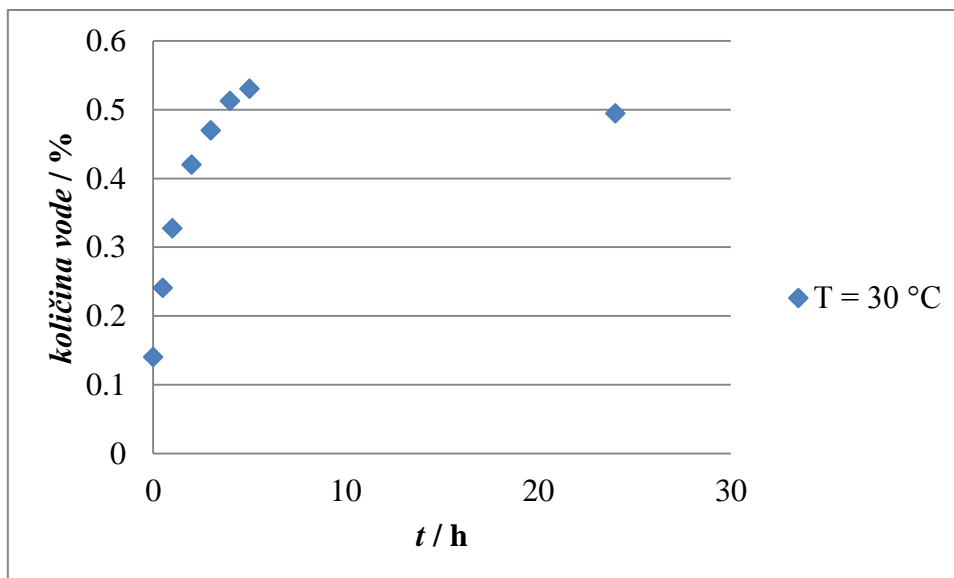
Slika 4.6. Utjecaj temperature na sintezu izoamil oleata u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) u kotlastom reaktoru s mikrovalovima ($n_{\text{izoamil alkohol}} = 1,41$ mmol, $n_{\text{oleinska kiselina}} = 0,64$ mmol, $V_{[\text{BMIM}] \text{PF}_6} = 800 \mu\text{L}$, $m_{\text{Candida antarctica lipaza B}} = 10$ mg).

4.7. Količina vode u uzorku

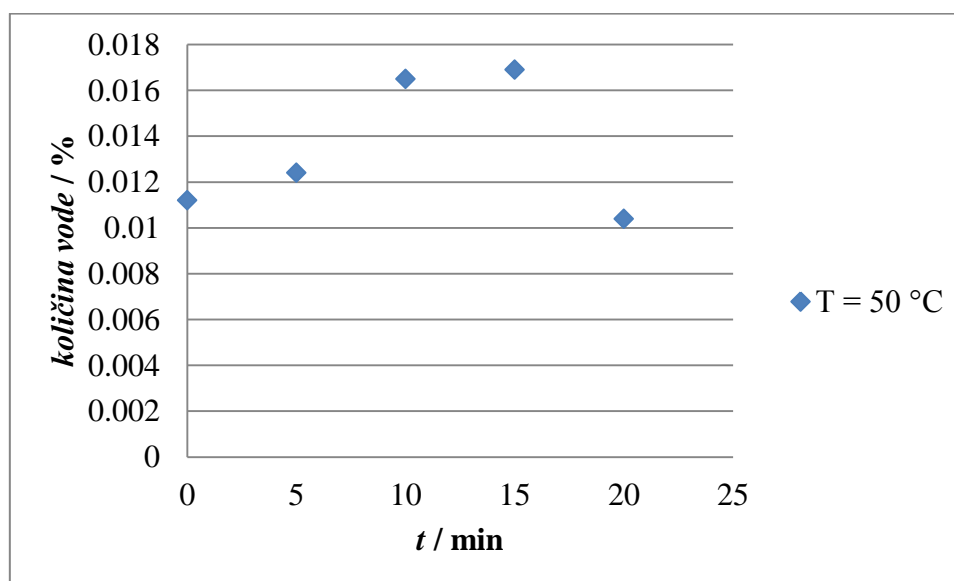
Reakcija sinteze izoamil oleata spada u reakcije esterifikacije kod kojih kao jedan od produkata nastaje voda koja negativno utječe ne samo na konverziju supstrata, već i na aktivnost enzima. Zbog toga je vrlo važno pratiti količinu nastale vode tijekom ove ravnotežne reakcije.

Na slici 4.7. prikazana je promjena količine vode nastale unutar 24 sata pri sintezi izoamil oleata pri 30 °C u otapalu *n*-heksan uz konvencionalno grijanje, dok je na slici 4.8. prikazana promjena količine vode nastale unutar 20 min pri sintezi izoamil oleata pri 50 °C u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆) uz grijanje mikrovalovima.

Rezultati prikazuju da količina vode u oba slučaja raste tijekom reakcije. U prvom slučaju količina vode počinje padati nakon 24 sata, a u drugom nakon 20 min, a razlog tome je isparavanje vode iz Erlenmeyerove tikvice, tj. Eppendorf epruvete.



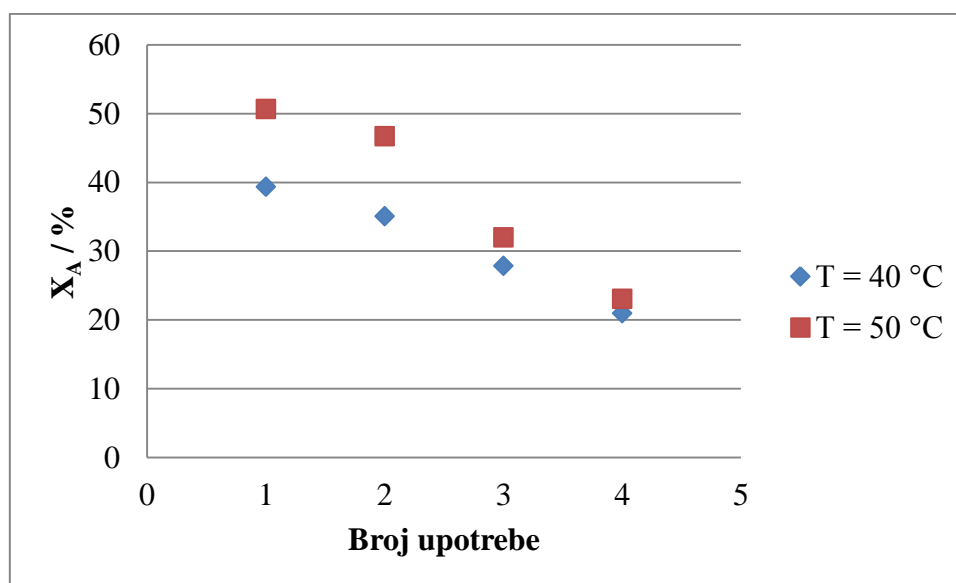
Slika 4.7. Promjena količine vode nastale unutar 24 sata pri sintezi izoamil oleata pri 30 °C u otapalu *n*-heksan uz konvencionalno grijanje ($n_{\text{izoamil alkohol}} = 36,95$ mmol, $n_{\text{oleinska kiselina}} = 6,36$ mmol, $V_{n\text{-heksan}} = 20$ mL, $m_{\text{Candida antarctica lipaza B}} = 50$ mg)



Slika 4.8. Promjena količine vode nastale unutar 20 min pri sintezi izoamil oleata pri 50 °C u otapalu 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) uz grijanje mikrovalovima ($n_{\text{izoamil alkohol}} = 1,41$ mmol, $n_{\text{oleinska kiselina}} = 0,64$ mmol, $V_{[\text{BMIM}] \text{PF}_6} = 800$ μL, $m_{\text{Candida antarctica lipaza B}} = 10$ mg).

4.8. Utjecaj broja ciklusa korištenja i temperature na aktivnost *Candida antarctica* lipaze B

Na slici 4.9. prikazan je utjecaj broja upotrebe i temperature na aktivnost *Candida antarctica* lipaze B. Vidljivo je da s povećanjem broja ciklusa korištenja enzima njegova aktivnost opada. Rezultati također prikazuju da s povišenjem temperature aktivnost enzima raste. Pri temperaturi od 50 °C i prvom korištenju enzima nakon 10 min postignuta je konverzija oleinske kiseline 50 %, dok je pri istim uvjetima no nižoj temperaturi od 40 °C postignuta konverzija oleinske kiseline od 40 %.



Slika 4.9. Utjecaj broja upotrebe i temperature na aktivnost *Candida antarctica* lipaze B ($n_{\text{izoamil alkohol}} = 1,41 \text{ mmol}$, $n_{\text{oleinska kiselina}} = 0,64 \text{ mmol}$, $V_{[\text{BMIM}]\text{PF}_6} = 800 \text{ }\mu\text{L}$, $m_{\text{Candida antarctica lipaza B}} = 10 \text{ mg}$).

5. ZAKLJUČAK

Sinteza izoamil oleata uspješno je provedena reakcijom esterifikacije između izoamil alkohola i oleinske kiseline. Reakcija je provedena u *n*-heksanu te dvije ionske kapljevine, 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfatu ([BMIM] PF₆) i 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroboratu ([BMIM] BF₄) uz prisustvo *Candida antarctica* lipaze B. Mjerenja su pokazala da je reakcija u *n*-heksanu uz konvencionalno grijanje te 50 mg enzima vrlo spora budući da se konverzija oleinske kiseline od 95 % postiže tek nakon 24 sata. Korištenjem ionskih kapljevina 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfata ([BMIM] PF₆) i 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborata ([BMIM] BF₄) te 17 mg enzima uz konvencionalno grijanje postignuta je također konverzija oleinske kiseline od 95 % no nakon 60 min. U ovim slučajevima temperatura nema značajan utjecaj na reakciju. Daljnji eksperimenti provedeni su u kotlastom reaktoru s mikrovalovima te je kao otapalo korišten 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat ([BMIM] PF₆). Mijenjanjem molarnih omjera alkohola i kiseline te promjenom temperature pokušalo se naći najbolje uvjete za reakciju. Nakon 20 min pri temperaturi od 30 °C postignuta je konverzija oleinske kiseline od 48 %, pri temperaturi od 40 °C postignuta je konverzija oleinske kiseline od 60 %, a pri temperaturi od 50 °C postignuta je konverzija oleinske kiseline od 68 %. Dakle, rezultati su pokazali da grijanje mikrovalovima ima značajan utjecaj na reakciju te porastom temperature raste i konverzija oleinske kiseline.

Promjena količine vode u reakcijskoj smjesi praćena je Karl Fischer titracijom budući da voda negativno utječe ne samo na konverziju supstrata već i na aktivnost enzima. Rezultati su pokazali da tijekom reakcija količina vode raste.

Aktivnost enzima testirana je pri dvije različite temperature (40 °C i 50 °C). Rezultati su pokazali da aktivnost enzima opada s brojem ciklusa korištenja, a raste povišenjem temperature. Pri temperaturi od 50 °C i prvom korištenju enzima nakon 10 min u kotlastom reaktoru s mikrovalovima postignuta je konverzija oleinske kiseline 50 %, dok je pri istim uvjetima no nižoj temperaturi, 40 °C postignuta konverzija oleinske kiseline od 40 %.

U ovom je radu prikazano da je koristeći grijanje mikrovalovima u kombinaciji s ionskom kapljevnom kao otapalom moguće ostvariti povoljne uvjete za sintezu izoamil oleata. Ipak, potrebno je voditi brigu i o aktivnosti enzima čija bi stabilnost pri većim temperaturama mogla biti narušena. Sinteza izoamil oleata ravnotežna je reakcija u kojoj

molarni udio supstrata, temperatura, količina enzima i otapala znatno utječu na konverziju supstrata. Stoga je potrebno provesti daljnja istraživanja usmjerena na optimiranje ovih varijabli. Mjerenja bi bilo korisno provesti pri istim količinama enzima i volumenima supstrata i otapala kako bi se rezultati mogli dodatno usporediti te pronaći najbolji uvjeti za reakciju.

6. LITERATURA

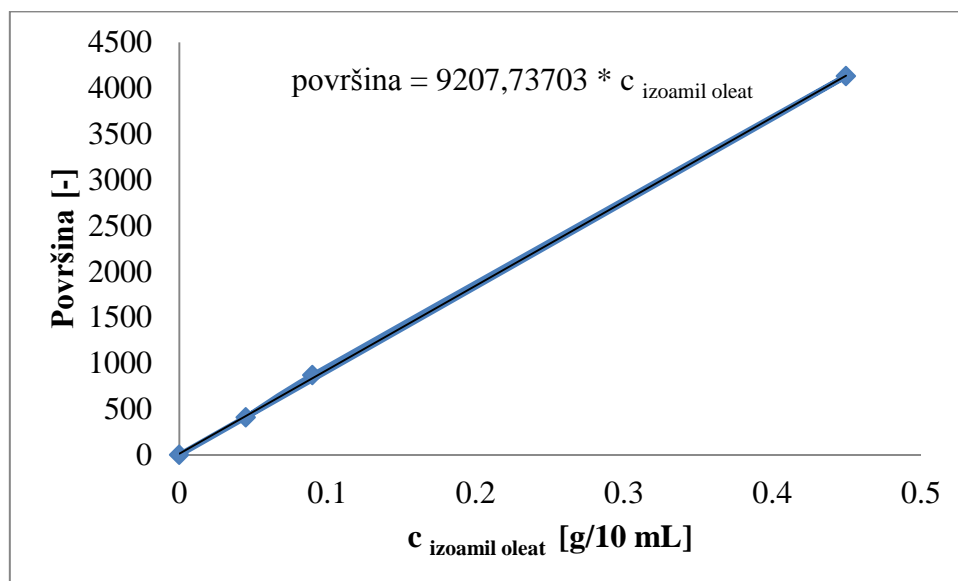
1. Bourbigou O. H., Magna L., Morvan D., Ionic liquids and catalysis: Recent progress from knowledge to applications, *Appl. Catal. A*. 373, 2010, 1-56.
2. Chowdhury A., Mitra D., Biswas D., Biolubricant synthesis from waste cooking oil via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 2013, 139-144.
3. Demirhian D. C., Moris-Varas F., Cassidy, C.S., Enzymes from extremophiles, *Curr. Opinion, Chem. Biol.* 5, 2001, 144–151.
4. Diego T., Manjón A., Lozano P., Iborra J. L., A recyclable enzymatic biodiesel production process in ionic liquids, *Bioresource Technol.* 102, 2011, 6336–6339.
5. Gandhi N. N., Patil S. N., Sawant S. B., Joshi B. J., Wangikar P. P., Mukesh D., Lipase-Catalyzed Esterification, *Catal. Rev.* 42, 2000, 439-480.
6. Greaves T. L., Drummond C. J., Protic ionic liquids: properties and applications, *Chem. Rev.* 108, 2008, 206-237.
7. Happe M., Grand P., Farquet S., Aeby S., Hérítier J. C., Corthay F., Mabillard E., Marti R., Vanoli E., Grogg A. F., Nussbaum S., Roduit A., Tièche F., Salem S., Constantin C., Schmitt E., Zahno S., Ellert C., Habib A., Wyssb J., Fischer F., Microwave barrel reactor use in trimethylolpropane oleate synthesis by *Candida antarctica* lipase in a biphasic non-solvent process, *Green Chem.* 14, 2012, 2337-2345.
8. Lai J. Q., Hu L. Z., Wang P. W., Yang Z., Enzymatic production of microalgal biodiesel in ionic liquid [BMIM][PF₆], *Fuel* 95, 2012, 329–333.
9. Jinho O., Sungeun Y., Chanyeon K., Inchang C., Jae Hyun K., Hyunjoo L., Synthesis of biolubricants using sulfated zirconia catalysts, *Appl. Catal. A-Gen.* 455, 2013, 164– 171.
10. Klähn M., Lim G. S., Seduraman A., Wu P., On the different roles of anions and cations in the solvation of enzymes in ionic liquids, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 2011, 1649-1662.
11. Kishor P. D., Dinesh D. T., Bhalchandra M. B., Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds, *Flavour Fragr. J.* 28, 2013, 71–83.
12. Knez Ž., Enzymatic reactions in dense gases, *J. Supercrit. Fluid.* 47, 2009, 357–372.
13. Lozano P., Verdugo G. E., Ionic liquids and other nonconventional solvents in biotransformations: medium engineering and process development, *Ionic Liquids in biotransformations and Organocatalysis: Solvents and Beyond*, P. Dominguez de Maria, Wiley VCH, 2012, 103-149.

14. Madarasz J., Nemeth D., Bakos J., L. Gubicza L., Bakonyi P., Solvent-free enzymatic process for biolubricant production in continuous microfluidic reactor, *J. Clean. Prod.* 93, 2015, 140-144.
15. Müller G., Petry, S., *Lipases and phospholipases in drug development: from biochemistry to molecular pharmacology*, Wiley VCH, 2004.
16. Mueller J. L., Ripoll R. D., Aquadro C. F., Wolfner M. F., Comparative structural modeling and inference of conserved protein classes in *Drosophila* seminal fluid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 2004, 13542-13547.
17. Ognjanović N. D., Petrović S. D., Bezbradica D. I., Knežević-Jugović Z. D., Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela, *Hem. Ind.* 64, 1, 2010, 1–8.
18. Plechkova N. V., Seddon K. R., Applications of ionic liquids in the chemical industry, *Chem. Soc. Rev.* 37, 2008, 123-150 .
19. Pleiss J., Fischer M., Schmid R. D., Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site, *Chem. Phys. Lipids* 93, 1998, 67–80.
20. Polaina J., MacCabe A. P., *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications, Lipases: Molecular structure and function*, 2007.
21. Poole C. F., Chromatographic and Spectroscopic Methods for the Determination of Solvent Properties of Room Temperature Ionic Liquids, *J. Chromatogr. A.* 1037, 2004, 49-82.
22. Reichardt C., Polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes, *Green Chem.* 7, 2005, 339-351.
23. Sellek A. G., Chaudhuri J. B., Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles, *Enzyme Microb. Technol.* 25, 1999, 471–482.
24. Shandges., Ping L., Yanlan B., Fugang X., Enzymatic Epoxidation of Soybean Oil Using Ionic Liquid as reaction Media, *J. Oleo Sci.* 63, 2014, 383-390.
25. Singh R. K., Gupta P., b, Sharma P. O., Ray S. S., Homogeneous synthesis of cellulose fatty esters in ionic liquid (1-butyl-3-methylimidazolium chloride) and study of their comparative antifriction property, *J. Ind. Eng. Chem.* 24, 2014, 14-19.
26. Trivedi J., Aila M., Sharmaz D. C., Gupta P., Kaul S., Clean synthesis of biolubricant range esters using novel liquid lipase enzyme in solvent free medium, *SpringerPlus* 4, 2015, 1-9.
27. Wasserscheid P., Welton T., *Ionic Liquids in Synthesis*, Wiley - VCH, Weinheim, 2008.
28. Zhao H., Xia S. Q., Ma P. S., Use of ionic liquids as „green“ solvents for extractions, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80, 2005, 1089-1096.

29. Zarski A., Ptaka S., Siemiona P., Kapusniaka J., Esterification of potato starch by a biocatalysed reaction in an ionic liquid, *Carbohydr. Polym.* 137, 2016, 657–663.

7. PRILOZI

PRILOG 1.



Slika 7.1. Kalibracijski pravac za određivanje koncentracije izoamil oleata

8. POPIS SIMBOLA

[C₁₆MIM][NTf₂] - 1-heksadecil-3-metilimidazol triflimid

[C₁₈MIM][NTf₂] - 1-oktadecil-3-metilimidazoli triflimid

[C₄MIM]Cl - 1-butil-3-metilimidazol klorid

[BMIM] PF₆ - 1-butil-3-metilimidazol heksafluorofosfat

[BMIM] BF₄ - 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborat

[NH₄] PF₆ - amonijev heksafluorofosfat

ROH – alkohol

SO₂ – sumporov dioksid

RN – baza

(RNH) SO₃R – alkilsulfit

I₂ – jod

H₂O – voda

(RNH)SO₄R - alkilsulfat

m – masa [mg]

γ – masena koncentracija [g dm⁻³]

V – volumen [mL]

X_A – konverzija supstrata oleinske kiseline [%]

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28. travnja 1991. godine u Koprivnici. Pohađala sam osnovnu školu „Đuro Ester“, nakon čega sam upisala opću gimnaziju „Fran Galović“ u Koprivnici. Maturirala sam 2010. godine te sam iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, smjer Primijenjena kemija. Stručnu praksu odradila sam u tvornici Pliva, u laboratoriju za razvoj i istraživanje lijekova, u razdoblju od 2. travnja do 30. travnja 2014. godine. Sudjelovala sam u Ceepus razmjeni putem mreže Chemistry and Chemical Engineering (koordinator u RH izv. prof. Zvezdana Findrik Blažević) te sam provela dva mjeseca (1.3 – 30.4. 2016.) na University of Pannonia, Research Institute on Bioengineering, Membrane Technology and Energetics kod prof. Laszla Gubicze (Veszprem, Mađarska) radeći eksperimentalni dio diplomskog rada.