

# Transesterifikacija otpadnog jestivog ulja u mikroreaktoru katalizirana komercijalnim enzimom lipaza

---

Bačić, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:149:234193>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



zir.nsk.hr



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Bačić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja                     **Matea Bačić**                    

Predala je izrađen završni rad dana:           10. rujna 2019.          

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Bruno Zelić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Dr. sc. Anita Šalić, znanstveni suradnik, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana:           13. rujna 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDIPLOMSKI STUDIJ

Matea Bačić

TRANSESTERIFIKACIJA OTPADNOG JESTIVOG ULJA U MIKROREAKTORU  
KATALIZIRANA KOMERCIJALNIM ENZIMOM LIPAZA

*TRANSESTERIFICATION OF WASTE COOKING OIL IN A MICROREACTOR CATALYSED  
BY COMMERCIAL LIPASE*

**ZAVRŠNI RAD**

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

Neposredni voditelji: dr. sc. Anita Šalić, Martin Gojun, mag. ing. oecoiing.

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Bruno Zelić
2. dr. sc. Anita Šalić, znanstveni suradnik
3. prof. dr. sc. Irena Škorić

Zagreb, rujan 2019.

*Iskreno se zahvaljujem se mentorima, prof.dr.sc Bruni Zeliću, dr.sc. Aniti Šalić, znanstvenoj suradnici te asistentu mag. ing. oecoing. Martinu Gojunu na odabiru teme, vođenju, savjetima, sugestijama te na ukazanoj pomoći, trudu i vremenu tijekom izrade ovog rada. Bilo je veliko zadovoljstvo raditi s Vama.*

*Zahvaljujem se obitelji, posebice majci Aniti, i prijateljima na strpljenju i podršci u dosadašnjem dijelu školovanja.*

## SAŽETAK

U novije vrijeme sve se više zaliha fosilnih goriva nekontrolirano iscrpljuje, a različiti ekonomski, gospodarski i politički interesi suverenih država, samo su dodatni faktori koji su utjecali na sve veća ulaganja u istraživanja alternativnih goriva u svrhu povećanja ekološke svijesti. Biogoriva, osobito biodizel, ističu se kao prikladno rješenje koje odgovara zahtjevima globalnog tržišta, održivog razvoja i postizanja zadanih ušteda. Biodizel se definira kao metilni ili etilni ester viših masnih kiselina proizveden raznim procesima među kojima se ističu mikroemulzifikacija, piroliza i transesterifikacija. Potonji proces je ujedno i najrašireniji zbog visoke učinkovitosti, manjih proizvodnih troškova i velike brzine reakcije. Kao sirovine za proizvodnju biodizela transesterifikacijom koristi se široki spektar proizvoda poput jestivih i/ili otpadnih ulja i masti te alge i jantrofa koji poboljšavaju svojstva biorazgradivosti i netoksičnosti, a biodizel proizveden iz ovih sirovina odlikuju niže emisije stakleničkih plinova. Stoga se biodizel proizveden transesterifikacijom iz ovih izvora smatra i ekološki prihvatljivim.

Kako bi se odvila reakcija transesterifikacije između ulja/masti i alkohola, najčešće metanola, potreban je katalizator. Uporaba enzima tj biokatalizatora, posebice enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*, pokazala se obećavajućom jer su enzimi specifični, kataliziraju reakcije u kojim sudjeluju brojni supstrati, selektivni su, posjeduju visoku aktivnost u blagim eksperimentalnim uvjetima čime njihova primjena rezultira manjom potrošnjom energije u odnosu na kiselo ili bazno katalizirane reakcije transesterifikacije.

Učinkovitosti procesa transesterifikacije može pridonijeti i upotreba mikroreaktorskih sustava, odnosno reaktora u mikroskopskom mjerilu. U usporedbi s makroskopskim reaktorskim sustavima, primjena mikroreaktora omogućuje bolji prijenos tvari i topline, što je posljedica velikog omjera površine i volumena samog mikroreaktora, za provedbu reakcije potrebne su manje količine reaktanata i katalizatora što rezultira i manjom količinom otpadnih struja, a samim time i manjim utroškom energije. Povoljnija hidrodinamika sustava, laminaran tok i učinkovito miješanje procesnih struja vode k povećanju brzine kemijske reakcije.

U ovom radu provedena je transesterifikacija otpadnog jestivog ulja uz enzim lipazu u mikroreaktoru širine kanala 500  $\mu\text{m}$  s dva ulaza i dva izlaza, a praćene su veličine značajne za uspješnu provedbu procesa (konverzija, vrijeme zadržavanja i aktivnost enzima). Maksimalna konverzija  $X = 32,28\%$  postignuta je pri najdužem retencijskom vremenu ( $\tau = 30,63\text{ min}$ ) za sustav u kojemu je transesterifikacija otpadnog ulja provedena uz komercijalni enzim suspendiran u puferu.

Ključne riječi: biodizel, transesterifikacija, lipaza, mikroreaktor

## SUMMARY

In recent years, more and more fossil fuel stocks have been uncontrollably depleted and the differing economic and political interests of sovereign countries are merely additional factors that have led to increasing investment in alternative fuel research with the purpose of increasing environmental awareness. Biofuels, especially biodiesel, stand out as a suitable solution that meets the demands of the global market, sustainable development as well as achieving the set savings. Biodiesel is defined as the methyl or ethyl ester of higher fatty acids produced through various processes such as microemulsification, pyrolysis and transesterification. Transesterification is the most widespread due to its high efficiency, lower production costs and high reaction speed. As a raw material, it offers a wide range of products such as edible and / or waste oils and fats as well as algae and amber, which improve biodegradability, non-toxicity and lower greenhouse gas emissions. Therefore, biodiesel is produced by transesterification from these sources and is environmentally friendly.

In order to carry out the transesterification reaction between oil / fat and alcohol, most commonly methanol, a catalyst is required. The use of enzymes, i.e. biocatalysts, especially lipases from *Thermomyces lanuginosus*, has proven to be very promising as they are very specific with the recognition of numerous substrates, selective and they show high activity in mild experimental conditions, which reduces energy consumption relative to acidic or base catalyzed reactions.

The efficiency of the process is also contributed by the microreactor system, i.e. the microscopic scale reactors. Comparing micro- and macroscopic systems, microreactors enable better mass and heat transfer, which is due to the large surface-to-volume ratio of the microreactor itself, requires less reactants and catalysts to effect the reaction, resulting in less waste streams and, over time, lower energy consumption. It is also noticed that more favorable hydrodynamics of the system, laminar flow and effective mixing of currents are increasing the rate of chemical reaction.

In this work the transesterification of waste edible oil with lipase enzyme in a 500  $\mu\text{m}$  channel microreactor with two inputs and two outputs was carried. The sizes important for successful process implementation (conversion, retention time, enzyme activity) were monitored as well. A maximum conversion of  $X = 32.28\%$  was achieved at the longest retention time ( $\tau = 30.63$  min) for a system in which transesterification of waste oils was carried out with a commercial enzyme suspended in buffer.

**Key words:** biodiesel, transesterification, lipase, microreactor

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	1
<b>2. TEORIJSKI DIO</b>	3
2.1 Biodizel	3
2.1.1 Otpadno jestivo ulje kao potencijalna sirovina za proizvodnju biodizela	4
2.2 Transesterifikacija	7
2.2.1 Enzimska transesterifikacija	8
2.3 Biokatalizatori	10
2.3.1 Enzim lipaza	11
2.4 Mikroreaktori	12
2.4.1 Struktura, izvedba, svojstva i primjena mikroreaktora	13
2.5 Ionske kapljevine i eutektičke smjese	16
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b>	19
3.1 Materijali	19
3.1.1 Otpadno jestivo ulje	19
3.1.2 Katalizator	19
3.1.3 Kemikalije	19
3.1.4 Priprema otopina	20
3.1.5 Aparatura	21
3.2 Metode	21
3.2.1 Određivanje aktivnosti enzima lipaza	21
3.2.2 Pročišćavanje nekomercijalnog enzima	22
3.2.3 Određivanje koncentracije proteina – Bradfordičina metoda	23
3.2.4 Utjecaj temperature na aktivnost enzima	23
3.2.5 Priprava bezvodnog eutektičkog otapala (DES)	24
3.2.6 Sinteza biodizela u mikroreaktoru	24
3.2.7 Kemijska sinteza biodizela	26
3.2.8 Analiza produkata plinskom kromatografijom	26
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b>	27
4.1 Kemijska sinteza biodizela	27
4.2 Aktivnost komercijalnog enzima lipaze	28
4.3 Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima lipaze	30
4.4 Sinteza biodizela u mikroreaktoru	31
<b>5. ZAKLJUČAK</b>	36
<b>6. LITERATURA</b>	37





# 1. UVOD

Od davnine čovjek nastoji olakšati svakodnevni život koristeći prirodu i njene resurse, a upravo priroda i resursi koji se iz nje pridobivaju omogućuju razvoj cjelokupnog ljudskog društva. Napredak čovječanstva veže se uz korištenje energije, a kao prvi oblik energije pojavljuje se vatra. Nakon što je ovladao vatrom, čovjek je krenuo u potragu za energentom koji će održavati vatru. Pri tome se okrenuo onome što mu je bilo najdostupnije – drvnoj masi, a izgaranje drva se bilježi kao prva poznata upotreba nekog oblika goriva. Uz evoluciju čovjeka povezuje se razvitak i upotreba novih vrsta goriva, koje se zasnivaju na biljnim i životinjskim masnoćama. Oko 6.000 g. pr. Kr. otkriven je ugljen kojem je primjena bila prvenstveno u taljenju metala. Sredinom 18. stoljeća, za vrijeme prve industrijske revolucije, bilježi se početak korištenja fosilnih goriva pri čemu se ugljen koristi za pokretanje parnih strojeva. Korištenje fosilnih goriva imalo je značajne i mnogostruke posljedice na razvoj čovječanstva. Nove spoznaje, tehnička otkrića, a napose sve veća primjena fosilnih goriva i električne energije, u drugoj su polovici 19. stoljeća izazvali su drugu industrijsku revoluciju, koja je još više i značajnije izmijenila tijek povijesti. Nafta i njezini derivati te unapređenje naftne industrije pokazali su se kao najbolji izvor energije.<sup>1</sup>

Posljednjih desetljeća se količina dostupnih fosilnih goriva smanjuje, a potrošnja energije, ponajviše u industriji i transportu, značajno raste. Konvencionalni oblici energije se iscrpljuju pa primjena nekonvencionalnih oblika energije pronalazi sve veću upotrebu. Ograničene količine fosilnih goriva, različiti ekonomski, gospodarski i politički interesi suverenih država, samo su neki od čimbenika koji su utjecali na sve veća ulaganja u istraživanja alternativnih goriva i s tim povezano povećanje ekološke svijesti društva.<sup>2</sup> Smanjenje potrošnje energije, povećanje energetske učinkovitosti i povećanje udjela energije iz obnovljivih izvora ključne su mjere za smanjenje emisije stakleničkih plinova. Prema direktivi Europske unije (2009/28/EC) o promicanju uporabe energije iz obnovljivih izvora, zahtjeva se od zemalja članica EU da do 2020. godine ispune najmanje 20% svojih ukupnih energetske potreba s obnovljivim izvorima energije što je dostižno ukoliko zemlje članice postignu pripadajuće nacionalne ciljeve. Tom direktivom postavljeni su visoki ciljevi za 2020. godinu (20 % smanjenje emisije stakleničkih plinova, povećanje udjela energije iz obnovljivih izvora u ukupnoj potrošnji na 20 % i povećanje energetske učinkovitosti za 20 %) koja je prema tome poznata pod terminom 20-20-20. Također članice moraju osigurati da do 2020. godine najmanje 10% goriva potrošenog u transportu dolazi iz obnovljivih izvora.<sup>3,4</sup> Obzirom na zahtjeve globalnog tržišta, održivost, postizanje zadanih ušteda i pozitivni utjecaj na okoliš, biogoriva se nameću kao najprikladnije alternativno gorivo.

Biogorivom se smatra svako kapljevitom ili plinovito gorivo za potrebe prijevoza proizvedeno isključivo iz biomase. Biogoriva se danas proizvode iz različitih vrsta biomase te se prema tome i svrstavaju u tri generacije. Na tržištu su dostupna biogoriva takozvane prve i druge generacije, dok je tehnologija treće generacije u razvoju. Konvencionalna biogoriva, tzv. goriva prve generacije, proizvode se iz sirovina koje se mogu koristiti i za prehranu ljudi i životinja, a to su najčešće žitarice s visokim sadržajem škroba ili šećera (biometanol, biobutanol) te uljarice (biodizel). Druga i treća generacija zajedničkim imenom se nazivaju još i naprednim biogorivima. Biogoriva druge generacije proizvode se iz neprehrambenih sirovina, otpadnog ulja iz domaćinstva te iz lignoceluloze (dio biomase koja potječe od ostatka proizvodnje žitarica te iz biorazgradljivog dijela otpada ili biljaka i stabala ciljano uzgojenih radi proizvodnje energije). U treću generaciju biogoriva, za koju je tehnologija još uvijek u razvoju te nije komercijalno dostupna, ubrajaju se biogoriva dobivena iz nejestivih triglicerida kao što su alge i jatrofa.<sup>5,6</sup>

Biodizel je neotrovno, biorazgradivo alternativno gorivo za dizelske motore s fizikalnim svojstvima vrlo sličnim mineralnim gorivima te ih prema tome u potpunosti može istisnuti iz uporabe.<sup>5</sup> Industrijska proizvodnja biodizela prisutna je već dugi niz godina, no problem potpune integracije na tržištu predstavlja njegova prodajna cijena koja je znatno viša od običnog dizelskog goriva. Uzrok tome je visoka cijena sirovine (najzastupljenija je proizvodnja iz prehrambenih sirovina), neadekvatna oprema i ograničenja trenutne tehnologije proizvodnje povezana s nedostatnom energetsom učinkovitošću procesa.<sup>7,8</sup> Svi ovi razlozi usmjeravaju aktualna istraživanja k pronalasku jeftinijih sirovina te novim, učinkovitijim katalizatorima – biokatalizatorima. Do sada su se kao najbolje alternativne sirovine za proizvodnju biodizela pokazali otpadno jestivo ulje i nejestivo ulje dok su se kao ekološki prihvatljivi biokatalizatori za proizvodnju biodizela istaknuli enzimi porijeklom iz mikroorganizama, najviše lipaze. Uz alternativne sirovine i učinkovite biokatalizatore razvijaju se i nove tehnologije za proizvodnju biodizela, a ovdje se kao učinkovito rješenje ističu mikroreaktorski sustavi.<sup>9</sup>

U ovom radu provedene su sinteze biodizela iz otpadnog jestivog ulja u mikroreaktoru, a katalizirane su komercijalnim i pročišćenim enzimom lipaza podrijetlom iz *Thermomyces lanuginosus*. Kao cilj istraživanja postavljen je ispitivanje utjecaja različitih vremena zadržavanja na konverziju pri čemu je analiziran i utjecaj alternativnog reakcijskog medija, eutektičkog otapala na učinkovitost provedbe procesa.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Biodizel

Biodizel se prema američkoj normi ASTM D 6751 definira kao monoalkilni ester nižih alkohola i dugolančanih masnih kiselina podrijetlom iz ulja ili masti biljnog ili životinjskog podrijetla. Europska norma EN 14214 te hrvatska norma i Uredba o kakvoći biogoriva<sup>10</sup> definiraju biodizel kao metilni ester masnih kiselina (engl. *FAME – Fatty Acid Methyl Ester*). U biodizelu mogu biti prisutni i zasićeni i nezasićeni alkilni esteri masnih kiselina, a upravo njihova svojstva utječu na sveukupna svojstva biodizelskog goriva. Duljina i razgranatost lanaca masnih estera te stupanj nezasićenosti ključne su strukturne značajke biodizela jer one određuju fizikalna i kemijska svojstva goriva. Udio pojedine masne kiseline je ključni parametar o kojem ovise svojstva biljnih i životinjskih ulja, a samim time i kvaliteta proizvedenog biodizela.<sup>4</sup>

Sagorijevanjem biodizela, za razliku od izgaranja fosilnih goriva, u atmosferu se ne ispuštaju nove količine ugljikovog dioksida već se u kružni tok ugljikovog dioksida vraća ranije potrošeni ugljikov dioksid tj. onaj koji je biljka iz atmosfere potrošila za potrebe procesa fotosinteze. U usporedbi s konvencionalnim, fosilnim dizelom, ispušni plinovi nastali pri izgaranju biodizela sadrže manje ugljikova monoksida, neizgorenih ugljikovodika i čvrstih čestica, a posebice policikličkih aromata i tvari koje imaju kancerogeno djelovanje. Recikliranje ugljikovog dioksida pomaže pri smanjenju učinka staklenika koji je danas posljedica, prije svega, velike količine oslobođenog ugljikova dioksida nastalog iz fosilnih goriva. Zbog toga se biodizel pokazao kao ekološki prihvatljivo gorivo čiju proizvodnju i primjenu potiču mnoge djelatnosti kao što su poljoprivreda, industrija nafte te energetika.<sup>11</sup>

Nekoliko je prednosti koje se ističu kod biodizela u odnosu na konvencionalni dizel. Dodatak 1 – 2 % biodizela fosilnom dizelu poboljšava njegovu mazivost, što je veliki nedostatak današnjih goriva s malim udjelom sumpora. Moguća je primjena čistog biodizela (B100) ili mješavina s konvencionalnim dizelom u različitim udjelima poput B0 (dizelsko gorivo bez dodatka biodizela), B2, B5 (eurodizel), B10, B20 i sl. Općenito se dizelska goriva označavaju s BX, gdje je X udio biodizela u dizelu. Biodizel ima bolju biorazgradivost nego ulje od kojih je načinjen te bolju razgradivost metilnih u odnosu na etilne estere, a sve te supstance imaju mnogo jaču biorazgradivost od petrodizela. Visoka točka vrelišta (iznad 120 °C, dok petrodizel ima vrelište na 55 °C) je od velikog značaja pri skladištenju biodizela, a posljedično omogućuje i sigurnost pri radu. S ekonomsko-političkog aspekta, biodizel može smanjiti ovisnost o uvozu nafte, što je

zanimljivo zemljama uvoznicama nafte i onima s vrlo malim zalihama. Sa svakom prednošću dolazi i neki nedostatak, stoga i biodizel ima svoje mane. Među njima treba izdvojiti manju radnu snagu motora (5 – 9%) i veću potrošnju kisika (7 – 10%), a zbog relativno visoke viskoznosti biodizel u odnosu na fosilni dizel ima lošija fizikalno-kemijska svojstva na niskim temperaturama. Također, biodizel odlikuju i lošija termička i oksidacijska stabilnost zbog prisustva nezasićenih veza, a uz to je biodizel kemijski reaktivan u kontaktu s gumenim i plastičnim materijalima elemenata sustava za napajanje motora gorivom. Najveće probleme biodizel može uzrokovati na rezervoarima i cijevima jer otapa naslage i stvara velike troškove povezane s češćom zamjenom filtera i ulja.<sup>4</sup>

U procesu proizvodnje biodizela najveći je izazov ekonomska izvodljivost i isplativost. Ukupni trošak proizvodnje biodizela uključuje sirovine (proizvodnja i prerada), katalizatore, obradu biodizela (energija, potrošni materijal i rad), prijevoz (sirovine i završni proizvodi) te lokalne i državne porezi. Danas većina proizvođača biodizela koristi rafinirana biljna ulja kao osnovnu sirovinu koja su najveći izdatak cijele proizvodnje. Prema tome, neosporno je da će sirovina biti najvažnija varijabla koja utječe na cijenu biodizela na globalnom tržištu. Uz to, istraživanja pokazuju da se upotrebom otpadnog jestivog ulja troškovi proizvodnje mogu prepoloviti za više od polovice u usporedbi s procesom koji kao sirovinu koristi jestiva djevičanska ulja. Kako su troškovi proizvodnje biodizela čak i niži od troškova proizvodnje konvencionalnog dizela visoka cijena biodizela se može smanjiti ukoliko se kao sirovine koriste neprehrambena ulja, s posebnim naglaskom na otpadna jestiva ulja.<sup>9</sup>

### 2.1.1 Otpadno jestivo ulje kao potencijalna sirovina za proizvodnju biodizela

Biodizel je smjesa monoalkilnih estera dobivenih iz ulja i masti. Veći udio ulja u sirovinama znači veću mogućnost proizvodnje biodizela po nižoj cijeni i uz manje troškove, što odgovara ekonomskim zakonima ponude i potražnje. Najčešće sirovine koje se koriste za proizvodnju biodizela su jatrofa, sjeme gume, ricinus, palma i soja. Najznačajnija biljka za proizvodnju biodizela je palma koja omogućuje proizvodnju 5.000 kg ulja po hektaru što je ekvivalentno 5,3% (w) masnih kiselina. S druge strane, palmino ulje je jestivo što bi iz palme proizvedeni biodizel iz perspektive društva stavlja u nepovoljan položaj i u izravnu konkurenciju s potrebama poljoprivrede i prehrambene industrije. S druge strane palmino ulje je nakon upotrebe nužno zbrinjavati jer otpadno palmino ulje nakon kuhanja sadrži više od 20% (w) masnih kiselina.

U Tablici 1. prikazana je usporedba sadržaja masnih kiselina najčešćih djevičanskih ulja i uzorka korištenog ulja za kuhanje dobivenog iz restorana gdje se većina pripreme hrane provodi prženjem. Ova usporedba sastava najzastupljenijih masnih kiselina u djevičanskim uljima i otpadnog jestivog ulja (Tablica 1) definira otpadno jestivo ulje kao obećavajuću sirovinu za proizvodnju biodizela.<sup>8</sup>

Tablica 1. Udio masnih kiselina u različitim uljima izraženo u masenim postocima (w/%)

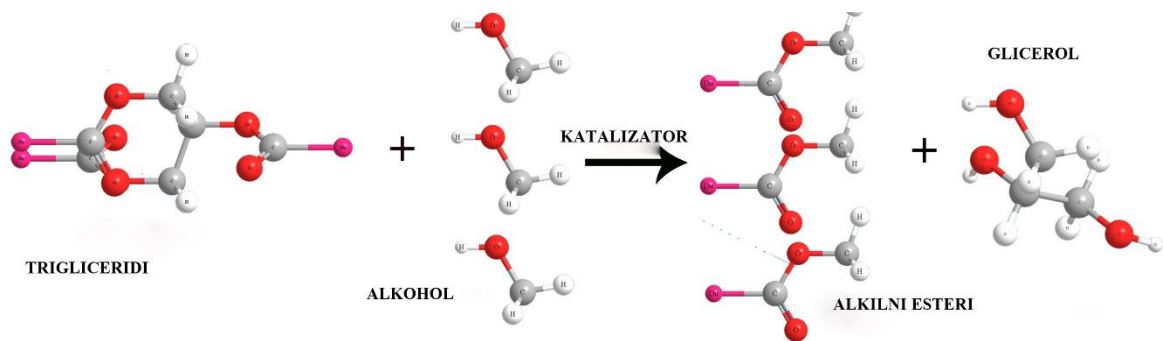
<b>ULJE</b>	<b>SOJINO</b>	<b>PAMUKOVO</b>	<b>PALMINO</b>	<b>KOKOSOVO</b>	<b>KANOLINO</b>	<b>OTPADNO JESTIVO</b>
<b>Masna kiselina</b>						
<b>Miristinska</b>	0,1	0,7	1,0	19,2	1,0	0,9
<b>Palmitinska</b>	0,2	20,1	42,8	9,8	5,5	20,4
<b>Stearinska</b>	3,7	2,6	4,5	3,0	2,2	4,8
<b>Oleinska</b>	22,8	19,2	40,5	6,9	55	52,9
<b>Linolna</b>	53,7	55,2	10,1	2,2	24	13,5
<b>Linoleinska</b>	8,6	0,6	0,2	0,0	8,8	0,8

Tablica 2. Fizikalno-kemijske karakteristike otpadnog jestivog ulja

SVOJSTVA	VRIJEDNOST
<b>Palmitinska kiselina (w/%)</b>	8,5
<b>Stearinska kiselina (w/%)</b>	3,1
<b>Oleinska kiselina (w/%)</b>	21,2
<b>Linolna kiselina (w/%)</b>	55,2
<b>Linoleinska kiselina (w/%)</b>	5,9
<b>Ostale kiseline (w/%)</b>	4,2
<b>Gustoća (g/cm<sup>3</sup>)</b>	0,910-0,924
<b>Kinematička viskoznost (mm<sup>2</sup>/s) na 40 °C</b>	36,4-42,0
<b>Saponifikacijski broj (mg KOH/g)</b>	188,2-207,0
<b>Kiselinski broj (mg KOH/g)</b>	1,32-3,60
<b>Jodni broj (g I<sub>2</sub>/100g)</b>	83,0-141,5
<b>Udio vode (w/%)</b>	0,8-1,9
<b>Udio natrija (mg/kg)</b>	6,9
<b>Peroksidni broj (mg/kg)</b>	23,1

## 2.2 Transesterifikacija

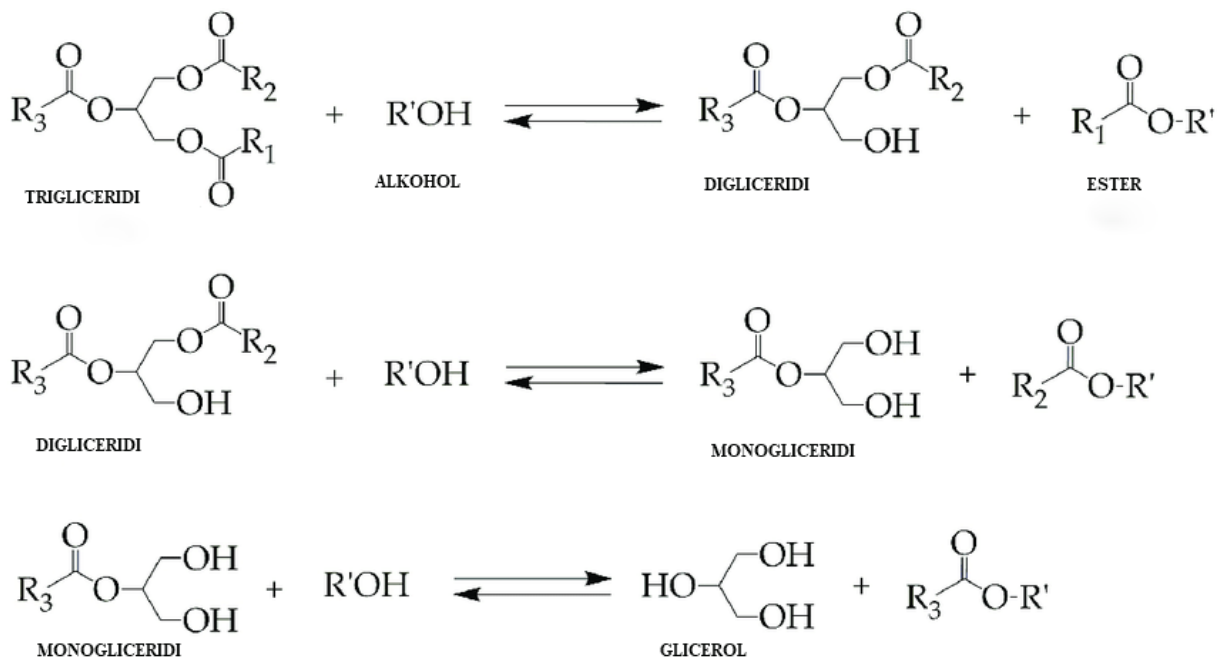
Najčešće korištena metoda proizvodnje biodizela je procesom transesterifikacije, odnosno kemijska reakcija pretvorbe ulja i masnih kiselina u alkilne estere, poznatije kao biodizel (Slika 1). Reakcija transesterifikacije se temelji na supstituciji alkilne skupine R'' bilo kojeg estera s alkilnom skupinom R' alkohola. U procesu transesterifikacije trigliceridi biljnih ulja, životinjskih masti, otpadnih ulja ili ulja algi reagiraju s alkoholom (metanol ili etanol) kako bi se kao produkti dobili metilni ili etilni esteri masnih kiselina i glicerol. Reakcija je reverzibilna te se odvija uz katalizator, koji ubrzava reakciju i vodi k povećanju količine željenog produkta. Primarni i sekundarni alifatski alkoholi koji imaju 1-8 ugljikovih atoma, posebice metanol i etanol, su najupotrebljavaniji u proizvodnji biodizela transesterifikacijom. Metanol je češće u upotrebi, zbog svojih boljih fizikalnih i kemijskih karakteristika te je ekonomski povoljniji i dostupniji na tržištu.



Slika 1. Reakcija transesterifikacije triglicerida

Reakcija transesterifikacije se sastoji od 3 slijedna stupnja koji su međusobno reverzibilni u kojima se stvaraju intermedijarne molekule di- i monoglicerida i kao konačni produkt glicerol. Kao što je i prikazano na Slici 2, u svakom stupnju nastaje i molekula alkil estera masne kiseline prisutne u reakciji. Omjer ulja i alkohola trebao bi biti, po stehiometriji kemijske reakcije, 1:3. Kako je transesterifikacija povratna reakcija u kojoj je željeni produkt biodizel za čije nastajanje je potrebno osigurati pomak ravnoteže u smjeru nastajanja produkta, ova reakcija se uvijek provodi uz suvišak alkohola.<sup>9</sup>





Slika 1. Shema mehanizma transesterifikacije kao slijedne reakcije

Temperatura pri kojoj se odvija reakcija te podrijetlo i vrsta katalizatora ključni su parametri za produktivnost procesa proizvodnje biodizela. Katalizatori mogu biti kemijski spojevi, poput kiselina ili baza, i enzimi, ovisno o korištenoj metodi proizvodnje. Jake kiseline su proton donori karbonylnoj skupini stvarajući jači elektrofil, a bazični katalizatori alkoholu oduzimaju proton i tvore jači nukleofil.

## 2.2.1 Enzimski transesterifikacija

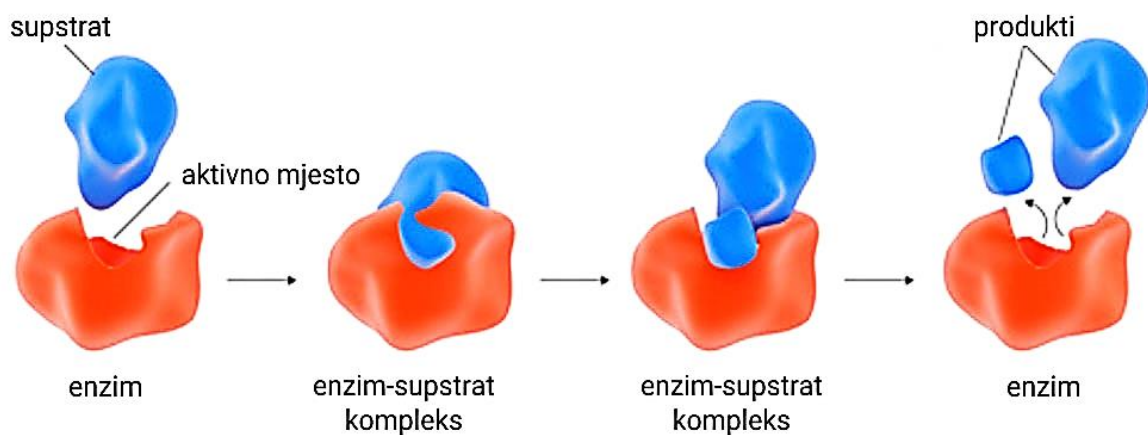
Enzimski katalizirana reakcija je nova metoda proizvodnje biodizela u kojoj enzim, najčešće lipaza, služi kao bio-katalizator za provedbu reakcije transesterifikacije. Slično kao i kod nekataliziranih reakcija, enzimski katalizirane reakcije rezultiraju većom kvalitetom proizvedenog biodizela s manje sporednih produkata što smanjuje troškove pročišćavanja. Uz to značajno je smanjena potreba za energijom jer se enzimski katalizirane reakcije, pa tako i enzimski katalizirana proizvodnja biodizela, provode pri blagim reakcijskim uvjetima. Mnoge su prednosti enzimski transesterifikacije u odnosu na druge metode proizvodnje biodizela, a ponajviše se ističu sljedeće: blagi reakcijski uvjeti, visoka selektivnost transesterifikacije s obzirom na sirovinu, široka paleta supstrata koji se mogu koristiti zbog mogućnosti esterifikacije masnih kiselina povezanih gliceridima i ne-esterificiranih kiselina u jednom koraku; nema sporednih reakcija kao što je

saponifikacija, kao nusprodukt se dobiva visokokvalitetni glicerol i prihvatljivost za okoliš. Međutim, ekonomski aspekti kao što su cijena, isplativost i stabilnost enzima glavni su izazovi na kojima još treba raditi.<sup>8</sup>

Enzimski transesterifikacija, posebno ona u kojoj se koristi enzim lipaza, je u posljednjih deset godina privukla pozornost istraživača zbog sve većih problema povezanih s obradom biodizela proizvedenog kemijskom transesterifikacijom. Velika količina otpadnih voda i poteškoće u obnavljanju glicerola spadaju u probleme koji na kraju povećavaju ukupne proizvodne troškove biodizela te predstavljaju značajan utjecaj na okoliš. Nasuprot tome, enzimski transesterifikacija svojim prednostima pokazuje velik potencijal biti ekološki prihvatljiv i perspektivan proces te prava alternativa kemijskoj transesterifikaciji. Usprkos tome, udio biodizela proizvedenog enzimskom transesterifikacijom je relativno malen jer i dalje u ovom procesu, kada se provodi na industrijskoj skali, prevladavaju nedostaci prvenstveno povezani s visokim troškovima enzima, malom brzinom reakcije i deaktivacijom enzima.<sup>9</sup>

## 2.3 Biokatalizatori

Biokatalizatori su organske molekule koje se u malenim količinama nalaze u živim organizmima i ubrzavaju određene biološki važne kemijske reakcije. Pod tim pojmom ubrajaju se enzimi, hormoni i vitamini <sup>12</sup> koji djeluju mehanizmom prikazanim na Slici 3. Enzimi imaju aktivno mjesto u koje se ugrađuje supstrat te nastaje kompleks enzim-supstrat što ujedno predstavlja i osnovnu razliku između kemijski i enzimski kataliziranih reakcija. Nakon stvaranja kompleksa dolazi do pretvorbe reaktanta u produkte, a enzim izlazi iz reakcije nepromijenjen te kao takav ulazi u novi ciklus.



Slika 3. Prikaz mehanizma enzimske sinteze

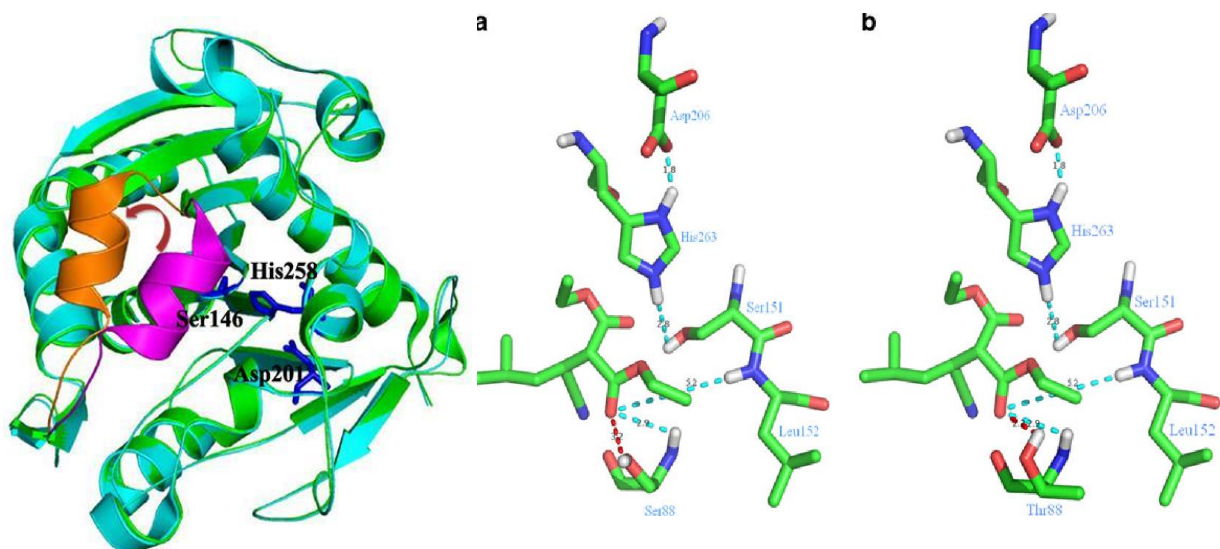
Jedan od glavnih ciljeva moderne kemije je pronalazak specifičnih spojeva koji će moći adekvatno zamijeniti konvencionalne katalizatore. U tom kontekstu, uporaba enzima pokazala se vrlo obećavajućom: enzimi su vrlo specifični, selektivni i pokazuju vrlo visoku aktivnost u blagim eksperimentalnim uvjetima (niski tlak i temperatura, vodeni medij itd.).

Među enzimima koji se najviše koriste prevladale su lipaze. Nasuprot većini enzima, lipaze pokazuju široki spektar specifičnosti i imaju afinitet prema različitim supstratima. To omogućuje korištenje enzima lipaze kao katalizatora u različitim reakcijama i njenu primjenu u kemijskoj, prehrambenoj, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji, medicini te u proizvodnji energije (biodizel).<sup>13</sup>

### 2.3.1 Enzim lipaza

Enzim lipaza (EC 3.1.1.3), odnosno kemijskim imenom triacilglicerol acilhidrolaza, je enzim biljnog, životinjskog ili mikrobnog podrijetla koji djeluje samo na dodirnoj površini između estera i vode. Može hidrolizirati trigliceride dugog lanca do diacilglicerola i karboksilata, te katalizirati i reverzibilnu reakciju, odnosno sintezu estera iz masnih kiselina i glicerola. Takvo ponašanje posljedica je strukture enzima lipaza koji se sastoji od hidrofilnog i hidrofobnog djela. Pored toga, enzim lipaza je učinkovita i u raznim reakcijama kao što su esterifikacija, transesterifikacija i aminoliza u organskim otapalima. Optimalna aktivnost enzimu lipaza je izmjerena u rasponu temperatura od 25 °C do 45 °C.<sup>14</sup>

Gotovo sve lipaze iz gljiva inaktivirane su na 50 °C osim lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* koja svoju aktivnost pokazuje i na temperaturama 55-60 °C. Mikrobne, termostabilne lipaze su od komercijalnog značaja te se nazire njihova potencijalna uporaba u industriji za provedbu organskih sinteza, razdvajanje racemičnih smjesa, kemijske analize, te hidrolizu masti i ulja. *Thermomyces lanuginosus* je termostabilan i spada u grupu termofila u kojima se enzimske reakcije provode na višim temperaturama što rezultira većim brzinama reakcija i topljivošću supstrata. Osim toga, proteini koje sadrže termofili u pravilu pokazuju veliku aktivnost prema organskim otapalima što je slučaj i s lipazom.<sup>14</sup>



Slika 2. Pojednostavljeni strukturni prikaz enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* i povezivanje preko trijada

Lipaza porijeklom iz gljive *Thermomyces lanuginosus* (ranije poznata kao *Humicola lanuginosa*) je protein molekulske mase 31.700 g/mol i sadrži 269 aminokiselina. Struktura joj je sferičnog oblika s katalitičkom trijadom sastavljenom od serina (Ser146), histidina (His258) i asparaginske kiseline (Asp201) unutar hidrofobnog dijela koji je blokiran „poklopcem“ načinjenim od 85 do 93 aminokiseline. Konformacijske promjene se događaju u prisutnosti analognog supstrata, a poklopac čini aktivno mjesto dostupnim za katalizu.<sup>15</sup> Zbog svojih vrlo poželjnih karakteristika, visoke aktivnosti i termostabilnosti moguća je upotreba enzima lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* u većini raspoloživih reakcijskih medija, ionskim kapljevinama, mikroemulzijama, dvofaznim sustavima voda-organsko otapalo, reakcijskim medijima bez otapala te u superkritičnim fluidima.<sup>13</sup>

## 2.4 Mikroreaktori

Po definiciji mikroreaktori su umanjeni reakcijski sustavi proizvedeni po načelima mikrotehnologije i mikroinženjerstva. Pojam „mikroreaktor“ najčešće se upotrebljava za reaktore čija je osnovna karakteristika smanjenja dimenzija. Posljedica mikroskopskog mjerila reaktora, pri čemu se tipične dimenzije kanala kreću od 10  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$ , je kratak difuzijski put molekula što rezultira vrlo visokim reakcijskim brzinama i smanjenjem ograničenja povezanih s prijenosom tvari i topline koje predstavljaju čest problem u konvencionalnim reakcijskim sustavima.<sup>16</sup>



Slika 3. Mikroreaktor širine kanala 500  $\mu\text{m}$  korišten u ovom radu

Pri usporedbi mikro- i makroskopskih sustava mogu se uočiti specifične razlike koje idu u prilog mikroreaktorima. Male dimenzije kanala omogućuju izrazito velik omjer međufazne površine i ukupnog volumena reaktora ima za posljedicu učinkovit prijenos tvari i topline čime se olakšava provedba reakcija u ovim sustavima, uz povećanu sigurnost, produktivnost, profitabilnost i učinkovitost samog procesa. Naime, kod mikroreaktora je omjer površine i volumena u rasponu

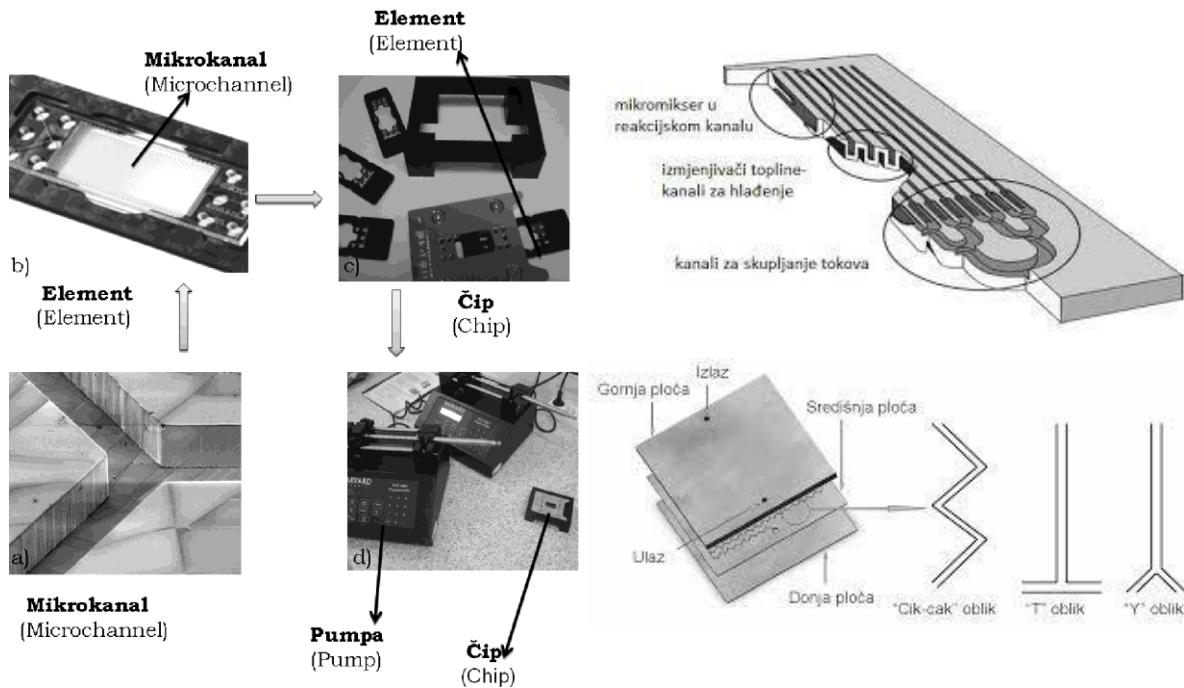
veličina  $10^3 \text{ m}^2/\text{m}^3 - 10^5 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , dok je ta vrijednost kod klasičnih reaktora oko  $10^2 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . Osim prethodno navedenog, smanjene količine i brojnosti otpadnih procesnih struja, kao i smanjeno vrijeme provedbe reakcije, osnovne su prednosti mikroreaktora. Kod mikroreaktora stijenka mikrokanala ima mnogo veći utjecaj na strujanje nego kod konvencionalnih reaktora. Za razliku od makroskopskih reaktora, u mikroreaktorima je tok fluida najčešće laminaran, a put prijenosa tvari i topline veoma kratak što pogoduje provedbi reakcija u kojima su prijenos tvari i topline ograničavajući čimbenici. Također, kratko vrijeme zadržavanja, male količine katalizatora, kompaktnost i jednostavnost dizajna, učinkovito miješanje, kratak difuzijski put molekula te bolja kontrola procesa i smanjena potrošnja energije samo su još neke u nizu prednosti.

S druge strane, zbog malog promjera mikrokanali se pri radu s viskozim i čvrstim sustavima lako začepuju, stoga se mikroreaktori još uvijek ne mogu primijeniti kao zamjena za postojeće reaktorske sustave. Mikroreaktori se uobičajeno dijele u dvije skupine i to obzirom na vrstu reakcije koja se u njima odvija. Tako se razlikuju mikroreaktori za provedbu kemijskih reakcija i mikroreaktori u kojima se provode biokemijske reakcije. Za provedbu biokemijskih reakcija najčešće se koriste enzimski mikroreaktori koji mogu biti s imobiliziranim (na stijenke mikrokanala ili na nosače) ili slobodnim enzimima. Enzimski mikroreaktori se dijele u tri skupine ovisno o funkciji koju obavljaju te mogu biti mikroreaktori za kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenata koji se zbog svoje strukture teško analiziraju (senzori za kemijske analize), mikroreaktori za procjenu kinetičkih parametara enzimskih procesa i mikroreaktori za provedbu procesa enzimski kataliziranih sinteza. Mikroskopski sustav moguće je kategorizirati i prema procesu koji se u njemu zbiva, stoga se razlikuju mikroreaktori za šaržne i kontinuirane procese.<sup>17</sup>

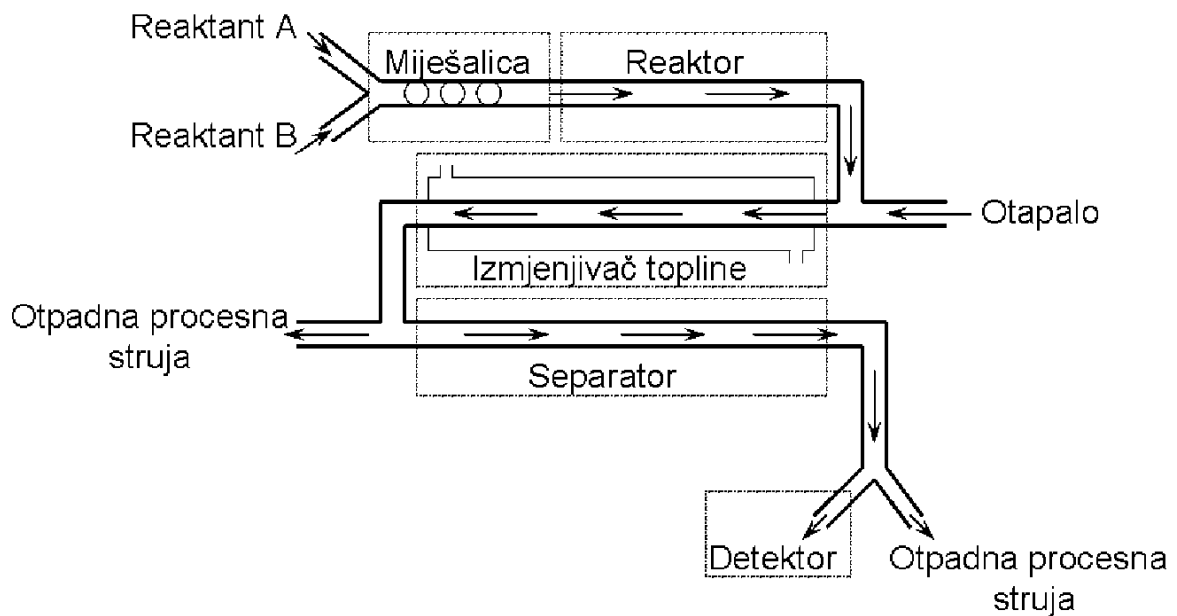
#### 2.4.1 Struktura, izvedba, svojstva i primjena mikroreaktora

Elementarna strukturna jedinica mikroreaktora je mikrokanal koji može biti kružnog ili pravokutnog oblika, a površina poprečnog presjeka kanala je u rasponu od nekoliko  $\mu\text{m}^2$  do  $1 \text{ mm}^2$ . Mikrokanali se različitim tehnikama urezuju u prikladni materijal (najčešće staklo) pravokutnog oblika. Te pločice se nazivaju elementom mikroreaktora te mogu biti izvedene s nekoliko ulaznih/izlaznih procesnih struja. Ulazne i izlazne procesne struje u pravilu su izvedene putem Y, T ili  $\Psi$  spojnica. Primijenjena tehnika urezivanja i sam materijal pločice izravno utječu na svojstva površine mikrokanala, stoga se kao posljedica mogu razviti različiti oblici strujanja fluida u mikrokanalima pri istim brzinama strujanja što može imati različit utjecaj na karakteristike provedenog procesa. Elementi mikrokanala su ugrađeni u kućište, mikroreaktorski čip, preko kojeg

se mogu povezivati s ostalim sastavnicama reaktorskog sustava (pumpe, miješala...) ili međusobno pomoću vanjskih kapilarnih cijevi (Slika 6). Tako se povećava ukupni protok i učinkovitost procesa.<sup>17</sup>



Slika 4. Osnovne strukturne jedinice mikroreaktora i presjek mikroreaktora s prikazom različitih konfiguracija mikrokanala



Slika 5. Shema mikroreaktorskog sustava za analizu i provedbu procesa ( $\mu$ -TAS)

Posljednjih godina, razvitkom mikrotvornica, veliki broj istraživanja usmjeren je k razvoju integriranih mikrosustava tzv. mikrosustava za provedbu i analizu procesa -  $\mu$ -TAS (engl. *micro-total-analysis-system*). Takvi se sustavi sastoje od pumpa, ventila, miješalica, reaktora, separatora i druge procesne opreme za nesmetano obavljanje proizvodnje, analize i pročišćavanja dobivenog produkta. U idealnim uvjetima takvi sustavi obavljaju pripremu uzorka, miješanje, separaciju, detekciju i obradu podataka na jednom, potpuno integriranome čipu (Slika 7).<sup>16,17</sup>

Mikroreaktori, iako kao jedinka malog volumena, međusobnim serijskim ili paralelnim povezivanjem elemenata ili čipova, mogu svojim dimenzijama biti veći od klasičnih laboratorijskih reaktora. Povećanje kapaciteta i uvećanje mjerila provodi se paralelnim i serijskim spajanjem čipova u jednu cjelinu (engl. *numbering-up* ili *scaling-out*) koje je mnogo jednostavnije od ekonomski neisplativog i dugotrajnog klasičnog uvećanja procesa (engl. *scale-up*). Poznata su dva osnovna načina povećanja broja strukturnih jedinica kod mikroreaktora: vanjsko (engl. *external numbering-up*) koji se odnosi na povezivanje više čipova s jednim elementom u paralelne sustave te unutarnje povećanje (engl. *internal numbering-up*) što obuhvaća serijsko spajanje više elemenata unutar jednog čipa i uključuje zajednički ulazni tok i jedan izlazni tok odnosno jedan zajednički spremnik za produkt. Glavni nedostatak serijskog spajanja tj. uvećanja je ograničen broj jedinica koji se mogu ugraditi na jedan čip jer se ovakvim spajanjem stvara izrazito velik pad tlaka u sustavu. Zbog toga je češće primjenjivana metoda vanjsko uvećanje, iako zauzima više prostora i ekonomski je manje isplativija.

Mikroreaktori su pogodni za provedbu procesa koji se zbivaju u jednofaznim kapljevitim ili plinskim sustavima, u dvofaznima (kapljevina-kapljevina, plin-kapljevina, kapljevina-krutina) i u trofaznim (plin-plin-krutina, plin-kapljevina-krutina) sustavima. Dobro miješanje i difuzija su osnovni preduvjeti za uspješnost reakcije, jer brzina reakcije ne ovisi samo o koncentraciji reaktanata nego i o brzini međufaznog prijenosa tvari.<sup>17</sup>



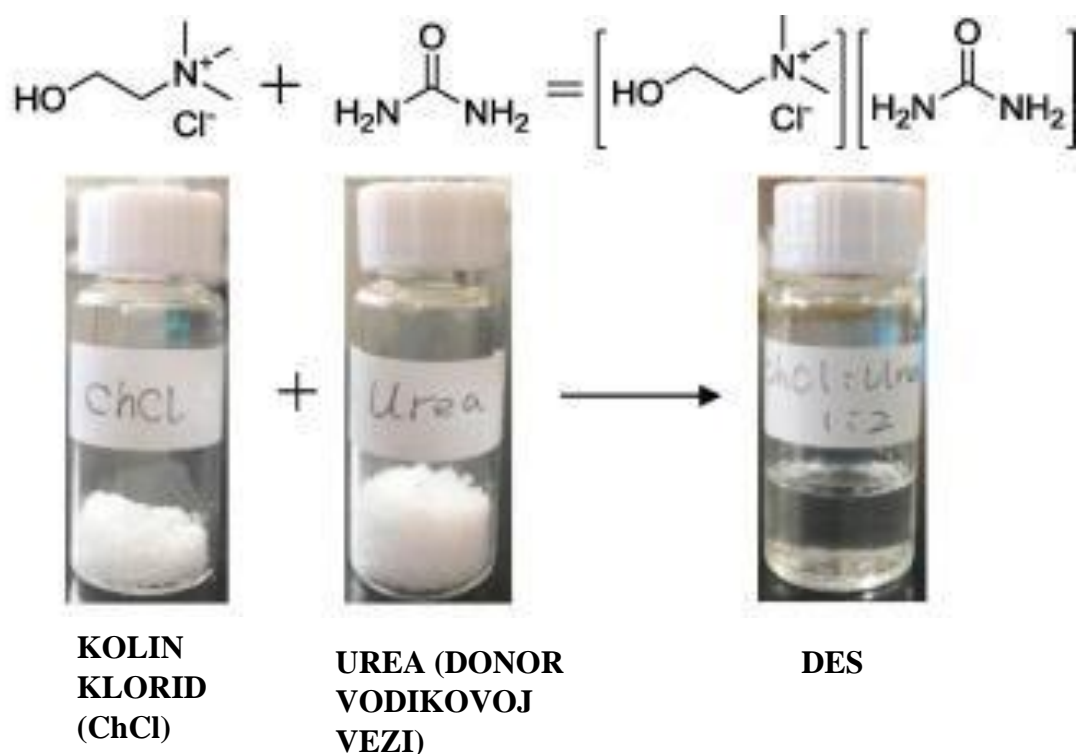
## 2.5 Ionske kapljevine i eutektičke smjese

Brojne tvrtke su promijenile svoj stav o uobičajenim načinima proizvodnje i razvoja proizvoda koristeći pri tome napredak u kemijskim istraživanjima i inženjerstvu u zaštiti okoliša uz usvajanje održivih procesa.

U 1990-im, Paul Anastas i John Warner postulirali su 12 principa Zelene kemije, koji su i danas u uporabi. Pri tome se oslanjaju na reduciranje ili potpunom eliminiranju toksičnih otapala i ostalih opasnih tvari u kemijskim procesima i analizama, kao i regeneraciji otpada iz tih procesa. Ova načela predlažu ekološki povoljne radnje počevši od planiranja proizvoda do njegove sinteze, prerade, analize te odredišta nakon uporabe. Glavni cilj je minimizirati okolišne i profesionalne opasnosti koje su povezane s industrijskim aktivnostima.<sup>18</sup>

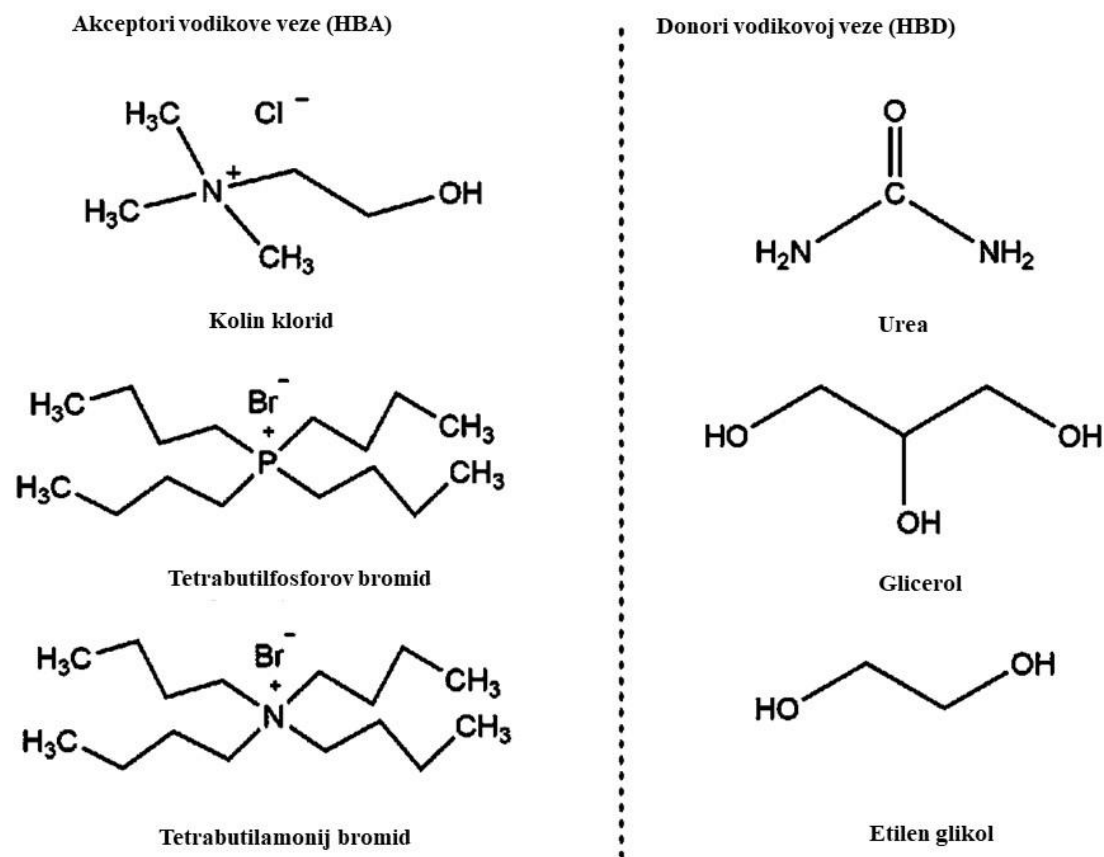
Danas još uvijek nisu svi proizvodni procesi kemijske industrije u potpunosti anulirali primjenu hlapljivih organskih otapala te se organska otapala koriste u barem jednom proizvodnom stupnju, čime nastaju velike količine otpadnih, za okoliš štetnih tvari. U cilju smanjenja količine nastalog otpada, provodi se postupna zamjena hlapljivih organskih otapala s ekološki prihvatljivim otapalima ili novim postupcima. Najčešće se to postiže provođenjem sinteze bez prisutnosti otapala ili zamjenom postojećih otapala vodom, superkritičnim otapalima ili ionskim kapljevina. Posljednjih se godina se brojna istraživanja baziraju na mogućnostima primjene ionskih kapljevina u različitim industrijskim procesima povezanih uz nove postupke i zamjenu toksičnih organskih otapala.<sup>19</sup>

Po definiciji ionske kapljevine su organske soli koje su pri sobnoj temperaturi u kapljevitom stanju, a zbog svojih specifičnih svojstava prikladne su za raznovrsnu uporabu. Nastaju ionskom vezom između kationa i aniona te imaju visok stupanj nesimetričnosti, zbog čega je onemogućena njihova kristalizacija.



Slika 6. Postupak sinteze DES-a

Potruga za ekološki pogodnim otapalima jedna je od glavnih istraživačkih aktivnosti zelene kemije. U zadnje vrijeme se kao potencijalno alternativno otapalo za konvencionalna organska otapala i ionske kapljevine sve više ističu eutektička otapala (DES, engl. *Deep Eutectic Solvents*). DES i ionske kapljevine posjeduju mnoge sličnosti kao što su niska hlapljivost, visoka toplina, stabilnost i vodljivost, ali njihova razlika leži u kemijskom procesu formiranja i u izvoru njihovih polaznih materijala. Glavni nedostaci ionskih kapljevine su zahtjevnost pročišćavanja i sinteze, toksičnost i visoka cijena, gdje do izražaja dolaze prednosti DES-a. DES je jeftino otapalo, jednostavno za pripremu iz brojnih i široko dostupnih početnih materijala. DES se definira kao smjesa dvije ili tri jeftine i sigurne komponente koje imaju sposobnost samoasocijacije vezanjem vodikovom vezom pri čemu se dobiva eutektička mješavina s talištem nižim od svake sastavnice dobivenog otapala.<sup>20</sup> DES se dobiva miješanjem akceptora vodikove veze (HBA) (kao što je kvaterna amonijeva sol) i donora vodikove veze (HBD) u odgovarajućem molarnom omjeru (Slika 8).



Slika 7. Najčešće komponente koje se koriste za sintezu DES-a

Kolin klorid i urea su najčešće korištene komponente za sintezu DES-a. Kad su spojevi koji čine DES primarni metaboliti, odnosno, aminokiseline, organske kiseline, šećeri ili derivati kolina, na ovaj način dobiveni DES naziva se prirodno eutektičko otapalo (NADES). Pojam NADES prvi su uveli Choi i sur.<sup>21</sup>, a pretpostavili su da metaboliti prisutni u visokim koncentracijama u stanicama mogu zajedno s vodom i lipidima tvoriti novu tekuću fazu. NADES bi se mogao koristiti za biosintezu, skladištenje i transport raznih slabo topljivih spojeva u vodi, jer se pokazao kao vrlo kvalitetno otapalo pri otapanju nekih prirodnih sastojaka koji se nalaze u stanicama. Iz ekološke i ekonomske perspektive, NADES također nudi brojne prednosti, uključujući biorazgradivost, održivost, niske troškove i jednostavnu pripremu. Takva su svojstva zanimljiva za primjenu u analitičkoj kemiji i za područja koja se odnose na zdravlje ljudi kao što su farmaceutici, hrana i kozmetika.<sup>22</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu provedena je enzimska sinteza biodizela u mikroreaktoru opremljenom s dva ulaza i dva izlaza te širine kanala 500  $\mu\text{m}$  iz otpadnog jestivog ulja uz korištenje nepročišćenog i komercijalnog enzima lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*.

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1 Otpadno jestivo ulje

Kao osnovna sirovina za sintezu biodizela upotrebjeno je otpadno jestivo ulje iz domaćinstva (proizvedeno prženjem krumpirića).

##### 3.1.2 Katalizator

Katalizator korišten za sintezu biodizela u reakciji transesterifikacije je komercijalni enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L; SIGMA ALDRICH, Njemačka) te nepročišćeni enzim lipaza porijeklom iz istoga mikroorganizma proizveden na Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek.

##### 3.1.3 Kemikalije

Izoamilni alkohol, natrijev dodecil sulfat (Sodium dodecyl sulfate, SDS) te F.A.M.E. mix GLC – 10 nabavljeni su od tvrtke SIGMA ALDRICH, Njemačka. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS, Trometamol), metanol, klorovodična kiselina (1 mol/L), *n*-heptan i acetonitril bio je proizvođača VWR CHEMICALS, BDH PROLABO, Ujedinjeno Kraljevstvo. Kalijev dihidrogen fosfat proizveden je od tvrtke Lach:Ner, s.r.o, Češka, dikalijev hidrogenfosfat od MERCK Darmstadt, Njemačka te Bradford reagens od BioRad, Njemačka,, a 4-nitrofenil acetat i kalijev hidroksid od ACROS ORGANICS, Belgija. Etanol je nabavljen od proizvođača Gram mol d.o.o, Hrvatska, a dinatrij hidrogen fosfat od tvrtke Kemika, Hrvatska. Korišteno otpadno jestivo ulje bilo je iz kućne upotrebe.

### 3.1.4 Priprema otopina

#### **Pufer za provođenje reakcije – 0,1 mol/L kalij-kalij fosfatni pufer**

Pufer se priprema miješanjem 100 mL 0,1 mol/L otopine kalijeva dihidrogen fosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) uz dodatak 0,1 mol/L vodene otopine dikalijeva hidrogen fosfata ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) do postizanja pH 7,4. Promjena pH prati se pH-metrom, a miješanje se provodi na magnetnoj miješalici pri 25 °C.

#### **Pufer za mjerenje aktivnosti – 0,05 mol/L TRIS-HCl**

0,05 mol/L vodena otopina TRIS-a se priprema na način da se 0,607g TRIS-a otopi u 100 mL destilirane vode. Zatim se ova otopina miješa na magnetnoj miješalici pri 25 °C uz dodatak 1 mol/L HCl do postizanja pH 8,0.

#### **Marmurna otopina**

Za pripravu marmur otopine miješaju se izoamilni alkohol i kloroform u volumnom omjeru 1:24. Tako pripremljena otopina čuva se na sobnoj temperaturi, a služi za zaustavljanje enzimske reakcije.

#### **Bradfordov reagens za određivanje koncentracije enzima**

Za pripremu 100 mL Bradford otopine pomiješano je 20 mL Bradford reagensa s 80 mL destilirane vode, odnosno u omjeru 1:4.

#### **Pufer za pročišćavanje enzima – natrij fosfatni pufer**

Za pripravu pufera za pročišćavanje enzima potrebno je napraviti 0,1mol/L vodene otopine natrijeva hidrogenfosfata/ $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (3,54 g natrijeva hidrogenfosfata otopi se u 1 L ultra čiste vode) i 0,01 mol/L vodene otopine kalijeva dihidrogenfosfata/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (otapa se 0,136 g kalijeva dihidrogenfosfata u 100 mL ultra čiste vode). Pufer se priprema miješanjem 0,1 mol/L otopine natrijeva hidrogenfosfata uz dodatak 0,01 mol/L otopine kalijeva dihidrogenfosfata do postizanja pH 8,0. Promjena pH prati se pH-metrom uz miješanje na magnetnoj miješalici pri 25 °C.

### 3.1.5 Aparatura

Za provedbu eksperimenta korištene su injekcijske pumpe PHD 4400 Syringe Pump Series i 33 Syringe Pump Series te metalni klipovi volumena 8 mL za pumpe PHD 4400 Syringe Pump Series (Harvard Apparatus, SAD). Centrifuga Universal 320 R bila je od proizvođača Hettich, Njemačka, kupelj Thermomix 1420 bila je od proizvođača Braun, Njemačka te tresilica Tehnica Vibromix 313 EVT od proizvođača Domel, Slovenija. pH metar Lab 860 nabavljen je od proizvođača Schott Instruments GmbH, Njemačka, a pH elektroda Blue Line 16 pH od tvrtke SI Analytics GmbH, Njemačka. Magnetna mješalica IKA-COMBIMAG RCT bila je od proizvođača IKA, Kina, a magnetna mješalica uz pH metar Tehnica Rotamix S-10 je bila od tvrtke Domel, Slovenija. Spektrofotometar (Shimadzu UV-1601) i plinski kromatograf s FID detektorom, Shimadzu GC-2014 nabavljeni su od proizvođača Shimadzu, Japan. Kapilarna kolona Zebron ZB-Wax korištena u plinskom kromatografu ( $L = 30$  m, I.D. 0,53 mm, debljina filma 1,00  $\mu\text{m}$ ) je bila od proizvođača Phenomenex, SAD.

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Određivanje aktivnosti enzima lipaza

Enzimsku aktivnost enzima lipaza temelji se na solvolizi 0,5 mol/L *p*-nitrofenil acetata (pNPA) (0,054g nitrofenil acetata otapa se u 600  $\mu\text{L}$  acetonitrila). 100  $\mu\text{L}$  uzorka doda se u 3.900  $\mu\text{L}$  0,05 mol/L TRIS-HCl pufera, pH 8 te se ručno homogenizira. U kvarcnu kivetu se otpipetira 950  $\mu\text{L}$  ove smjese koja se termostatira na 40 °C, a mjerenje započinje dodatkom 50  $\mu\text{L}$  0,5 mol/L *p*-nitrofenil acetata. Promjena apsorbancije mjeri se spektrofotometrijski (UV-1601, Shimadzu, Japan) pri valnoj duljini  $\lambda = 400$  nm tijekom 20 s. Iz dobivene vrijednosti promijenjene apsorbancije u vremenu ( $\Delta A/\Delta t$ ) izračunata je volumna aktivnost (V.A.) (jednadžba 1):

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

gdje je:

V.A. volumna aktivnost enzima lipaze (U/mL)

$V_r$  – ukupni volumen reakcijske smjese (mL)

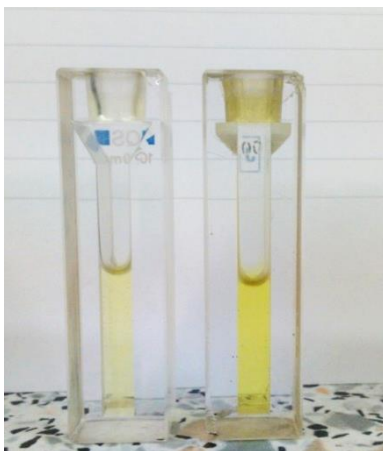
$V_E$  – volumen enzima lipaza dodanog u test (mL)

$d$  – promjer kivete (cm) – 1 cm

$\varepsilon$  – ekstincijski koeficijent (0,0123 mL/( $\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$ ))

$\Delta A/\Delta t$  – promjena apsorbancije u vremenu (-).

Na isti način provedeno je i mjerenje aktivnosti nepročišćenog enzima uz iznimku koncentracije otopine *p*-nitrofenil acetata koja je u ovim mjerenjima bila 0,1 mol/L.



Slika 8. Promjena boje tijekom određivanja aktivnosti enzima lipaza kao posljedice dodatka pNPA (lijeva kiveta prije dodatka pNPA, desna kiveta nakon dodavanja pNPA)

### 3.2.2 Pročišćavanje nekomercijalnog enzima

Pročišćavanje enzima provedeno je u dva stupnja, prvo je enzim izoljen i resuspendiran nakon čega je provedena dijaliza. Isoljavanje, odnosno taloženje je provedeno s točno određenom masom amonijeva sulfata (70% u odnosu na koncentraciju zasićenja – 514,72 g) koja je izračunata prema formuli:

$$m \text{ (g)} = 0,7 \cdot 514,72 \cdot V_{\text{uzorak}}$$

Isoljavanje se odvija postupnim dodavanjem soli uz miješanje na magnetnoj miješalici u ledenoj kupelji. Nakon toga se dobivena suspenzija centrifugira 20 minuta na 14.000 okr/min i temperaturi 4 °C. Nakon centrifugiranja dobiveni talog se resuspendira u 4,5 mL natrij fosfatnog pufera, pH 8,00. Potom se ova suspenzija dijalizira na 4 °C (u hladnjaku) 48 h s dvije izmjene fosfatnog pufera pH 8,00. Poslije svakog koraka mjeri se koncentracija proteina (Bradfordičina metoda) te aktivnost enzima u talogu i supernatantu.<sup>23</sup>



Slika 11. Dijaliza uzorka enzima lipaza TL u natrij-fosfatnom puferu pH 8,00

### 3.2.3 Određivanje koncentracije proteina – Bradfordičina metoda

Bradfordičina metoda je indirektna metoda određivanja koncentracije proteina. Temelji se na mjerenju apsorbancije otopine proteina pomoću spektrofotometra dok se koncentracija proteina izračunava pomoću prethodno izrađenog baždarnog dijagrama. Metoda se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Brilliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein:boja, koji u kiselom mediju pokazuje maksimum apsorbancije pri valnoj duljini,  $\lambda = 595 \text{ nm}$ .<sup>24</sup>



Slika 12. Kemijska struktura Bradfordičina reagensa

Koncentracija proteina u uzorku određuje se dodatkom 0,2 mL Bradfordovog reagensa u volumen od 0,8 mL uzorka (1.000 puta razrijeđen u fosfatnom puferu, pH 8,00) u plastičnoj kivetici. Postupak se provodi u tri paralele. Po isteku 5 minuta i nastanku plavog obojenja, na sobnoj temperaturi spektrofotometrijski se mjeri apsorbancija uzoraka na valnoj duljini,  $\lambda = 595 \text{ nm}$ . Uz pomoć baždarnog pravca izračunavaju su koncentracije proteina u uzorcima. Baždarni pravac određen je mjerenjem apsorbancije različitih poznatih koncentracija (0, 1,0, 2,5, 5,0, 7,5 i 10 mg/L) otopine BSA (*Bovine serum albumine*) pri istoj valnoj duljini. (Prilog 7.7)

### 3.2.4 Utjecaj temperature na aktivnost enzima

Uporaba marmurne otopine kao inhibitora reakcije nije poželjna pri pokusima provedenim za manje protoke, odnosno većim vremenima zadržavanja zbog toga što sadrži lako hlapljive komponente. Stoga je ispitan utjecaj temperature na aktivnost enzima lipaze. Eksperiment je proveden tako što je smjesa enzima lipaze i reakcijskog pufera (kalij-kalij fosfatni pufer, pH 7,4) termostatirana u vodenoj kupelji na temperaturama od 25 °C do 80 °C, s korakom 5 °C. Aktivnost enzima je mjerena kako je prethodno opisano (poglavlje 3.2.1).

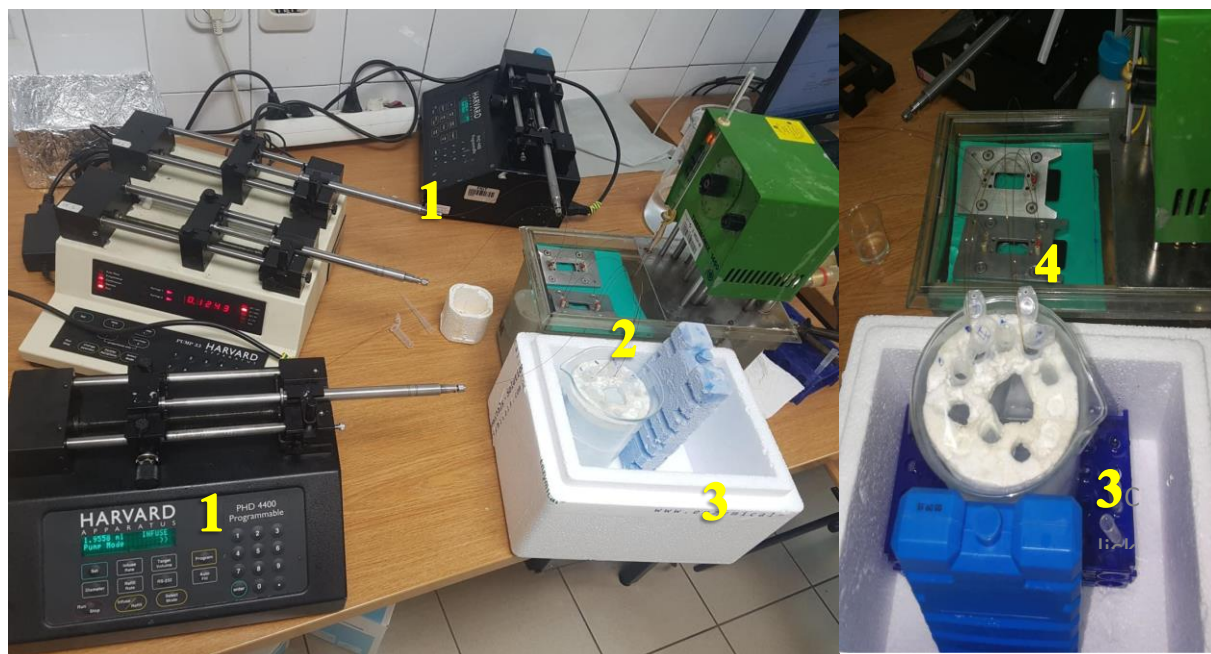


### 3.2.5 Priprava bezvodnog eutektičkog otapala (DES)

Za pripravu bezvodnog DES-a upotrijebljeni su kolin klorid (20,16 g) i glicerol (38,88 g) u molarnom omjeru 1:3,0. Pretodno navedene mase se nakon odvage stavljaju se u čašu i miješaju na magnetskoj miješalici (200 okr/min) pri temperaturi 50 °C. Proces se provodi 30-60 min dok se ne dobije homogena, bezbojna i prozirna kapljevina koja se potom hladi na sobnu temperaturu.

### 3.2.6 Sinteza biodizela u mikroreaktoru

Biodizel je proizveden u staklenom mikroreaktoru širine kanala 500  $\mu\text{m}$  s dva ulaza i dva izlaza (Y-konfiguracija). Reaktanti su dovođeni pomoću dvije klipne pumpe koje su silikatnim cjevčicama povezane s mikroreaktorom. Mikroreaktor je termostatiran na 40 °C u vodenoj kupelji (Slika 13). Klipovi su napunjeni reaktantima pri čemu su otpadno jestivo ulje pomiješano s SDS-om, reakcijskim puferom i enzimom bili u jednom (smjesa), a metanol u drugom klipju. Omjeri protoka pojedinih procesnih struja ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) postavljeni su na temelju omjera reaktanata korištenih u pokusu sinteze biodizela u kotlastom reaktoru i bili su: ulje: metanol: enzim lipaza = 1 : 0,1243 : 0,1. Protoci su proporcionalno mijenjani ovisno o željenom vremenu zadržavanja reakcijske smjese i volumenu produkta kako je prikazano u Tablici 3.



Slika 13. Aparatura korištena za provedbu eksperimenta - klipne pumpe (1), vodena kupelj (2), ledena kupelj (3), mikroreaktor (4)

Izlazi mikroreaktora, odnosno produkti sinteze su silikatnim cjevčicama odvođeni u epruvetu koja se nalazila u ledenoj kupelji. U epruvetu je, netom prije početka sakupljanja uzorka, stavljeno 200  $\mu\text{L}$  Marmurne otopine koja ima ulogu inhibitora enzimske reakcije. Na taj način se zaustavljala daljnja reakcija tijekom skupljanja uzorka, odnosno tijekom reakcije je bio ograničen isključivo na provedbu reakcije u mikroreaktoru. Uzorci su prikupljeni do trenutka dok volumen uzorka i marmurne otopine nije bio u omjeru 1 : 1 (Slika 14).<sup>25</sup>



Slika 14. Prikupljeni uzorak u kojem se nalazi 200  $\mu\text{L}$  marmurne otopine i 200  $\mu\text{L}$  reakcijske smjese

Tablica 3. Protoci procesnih struja i vremena zadržavanja za pokuse provedene u mikroreaktoru

uzorak	1	2	3	4	5	6
$Q$ emulzija, $\mu\text{L}/\text{min}$	16,00	8,00	6,00	4,00	3,00	1,95
$Q$ metanol, $\mu\text{L}/\text{min}$	1,9888	0,9944	0,7458	0,4972	0,3729	0,2424
$\tau$ , min	0,46	0,92	1,23	1,85	2,46	3,79
$4 \cdot \tau$ , min	1,85	3,69	4,92	7,38	9,84	15,14
vrijeme sakupljanja, min	5,56	11,12	14,82	22,24	29,65	45,61
uzorak	7	8	9	10	11	12
$Q$ emulzija, $\mu\text{L}/\text{min}$	0,241	0,375	0,450	0,550	0,760	1,100
$Q$ metanol, $\mu\text{L}/\text{min}$	0,0300	0,0466	0,0559	0,0684	0,0945	0,1367
$\tau$ , min	30,63	19,69	16,41	13,42	9,71	6,71
$4 \cdot \tau$ , min	122,51	78,75	65,63	53,69	38,85	26,85
vrijeme sakupljanja, min	369,00	237,19	197,67	161,71	117,03	80,86

### 3.2.7 Kemijska sinteza biodizela

Kemijska sinteza biodizela provedena je na način da je 60 mg ulja otopljeno u 4 mL izooktana u epruveti volumena 10 mL u koju je dodano 200  $\mu$ L metanolne otopine KOH ( $c = 2$  mol/L). Smjesa se homogenizira na tresilici te se ostavlja na sobnoj temperaturi da se reakcija odvije, odnosno kako bi se reakcijska smjesa izbistrila (taloženje glicerolnog sloja na dnu epruvete). Nakon odvajanja slojeva, dodaje se 1 g natrijeva hidrogenkarbonata monohidrata za neutralizaciju smjese. Bistra otopina (gornji sloj reakcijske smjese) otpipetira se u vijalice za analizu na GC-u.

### 3.2.8 Analiza produkata plinskom kromatografijom

Na plinskom kromatografu (Shimadzu GC-2014, Japan) s FID detektorom provodi se analiza udjela metilnih estera masnih kiselina u sintetiziranom biodizelu. Korištena je kolona Zebron ZB-Wax ( $L = 30$  m, I.D. 0,53 mm,  $d = 1,00$   $\mu$ m, Phenomenex, SAD). Za vrijeme od jedne minute provodi se zagrijavanje uzoraka na temperaturi od 180  $^{\circ}$ C, dok FID detektor radi na temperaturi od 240  $^{\circ}$ C. Ukupno trajanje analize za svaki uzorak iznosi petnaest minuta, a kao plin nosioc koristio se helij (protok na koloni: 2,41 mL/min, ukupni protok: 14,5 mL/min,  $p = 22,4$  kPa) dok se u kasnijim analizama kao plin nosioc koristio dušik. Uzorak je razrijeđen 100 puta kako bi dobivene vrijednosti bile u rasponu baždarnog dijagrama, a kao otapalo se pri određivanju koncentracije FAME koristio *n*-heptan, odnosno za analizu glicerola etanol. Potom je uzorak homogeniziran na Vortex miješalici te profiltriran (nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filteri, pora : 0,45  $\mu$ m, promjer : 25 mm, Macherey-Nagel GmbH and Co., Njemačka). Na ovaj način dobiveni uzorak je raspodijeljen u dvije vijalice i analiziran na GC-u. Koncentracije estera masnih kiselina i glicerola određene su pomoću unaprijed izrađenih baždarnih pravaca (Prilog).

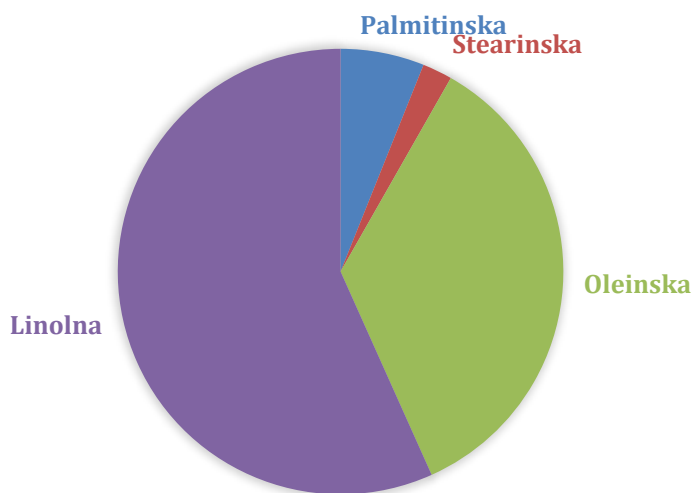
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

S ciljem uspješne sinteze biodizela uz biokatalizator (enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*) proveden je niz eksperimenata čiji su rezultati prikazani u nastavku. Najprije je provedena kemijska sinteza biodizela koja se koristila kao referenta vrijednost za izračun konverzije i sadržaja slobodnih masnih kiselina u proizvedenom biodizelu. Izrađeni su baždarni pravci koji su služili kao podloga za daljnje pokuse (poglavlje 4.1). Za učinkovitu provedbu procesa nužno je poznavanje optimalne temperature za provedbu procesa transesterifikacije te je stoga ispitan utjecaj temperature na aktivnost enzima lipaze (poglavlje 4.2). Kako bi se sirovi nekomercijalni enzim lipaza dobiven fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na čvrstim nosačima mogao koristiti, provedeno je njegovo pročišćavanje u dva stupnja, odnosno nakon isoljavanja enzim je dodatno pročišćen dijalizom. Tijekom procesa pročišćavanja praćeni su aktivnost enzima i koncentracija proteina (poglavlje 4.3). Sinteza biodizela provedena je u mikroreaktoru s dva ulaza i dva izlaza te širine kanala 500  $\mu\text{m}$  pri čemu su ispitana 4 različita sustava (komercijalni enzim – pufer, komercijalni enzim-DES, pročišćeni enzim – pufer, pročišćeni enzim – DES). Konverzija je izračunata na temelju koncentracija komponenata reakcijske smjese određenih plinskom kromatografijom i prethodno izrađenim baždarnim pravcima (poglavlje 4.4).

### 4.1 Kemijska sinteza biodizela

Kemijskom sintezom biodizela određen je sadržaj slobodnih masnih kiselina čije su baždarne krivulje prikazane u Prilozima 7.2-7.6. Među raznim biljnim uljima pogodnim za proizvodnju biodizela maslinovo, suncokretovo i palmino ulje se najčešće koriste u kuhanju. Stoga se masne kiseline koje prevladavaju u tim uljima, odnosno palmitinska, stearinska i oleinska kiselina smatraju najzastupljenijim masnim kiselinama u otpadnim jestivim uljima. Plinskom kromatografijom je utvrđeno da se u korištenom uzorku otpadnog jestivog ulja iz kućanstva nalaze palmitinska, stearinska, oleinska i linolna kiselina te su koncentracije redom iznosile 83,57, 29,77, 481,97 i 779,72 mg/mL, prikazane preko udjela na Slici 15. Vrijednosti koncentracija estera su zbrojene te je dobiveno da je ukupna koncentracija FAME u uzorku 1.375,03 mg/mL kada je u kromatografskoj analizi korišten helij kao plin nosioc. Vidljivo je da je najzastupljenija masna kiselina u jestivom ulju linolna kiselina. Također, određena je i ukupna koncentracija FAME u uzorku u kromatografskoj analizi (dušik kao plin nosioc) koja je iznosila 986,06 mg/mL. Pri različitim procesima pripreme hrane kao što su kuhanje i prženje ulje mijenja svoja fizikalna i kemijska svojstva te tako hrana dobiva bolji okus. Zbog ekonomskih čimbenika prženje se provodi

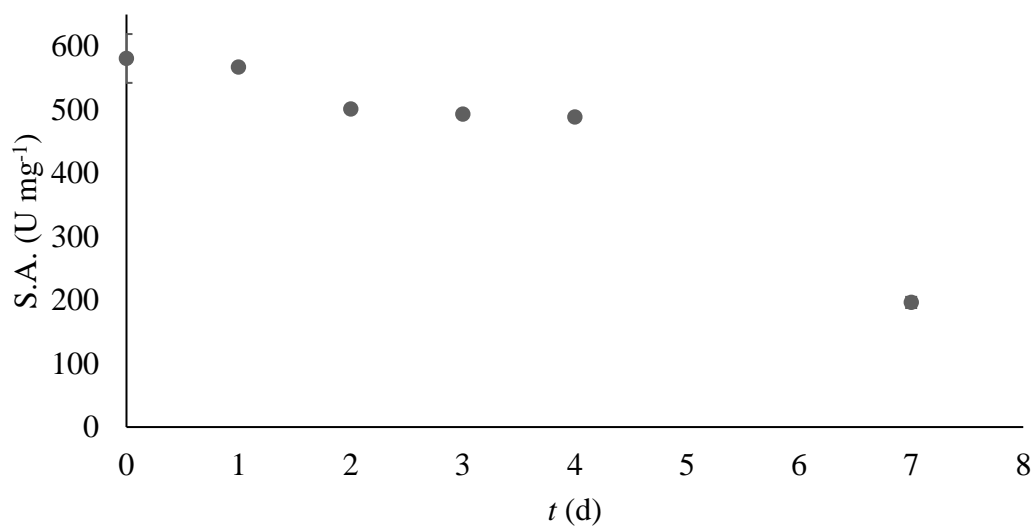
višeputno u istom ulju pri visokom temperaturama uz prisustvo kisika, što osim promjene fizikalno-kemijskih svojstava može uzrokovati i promjene u sastavu ulja.



Slika 15. Udjeli detektiranih masnih kiselina u analiziranom uzorku otpadnog jestivog ulja

Na Slici 15. prikazani su udjeli palmitinske (6%) , stearinske (2%) , oleinske (35%) i linolne (57%) kiseline u korištenom uzorku otpadnog jestivog ulja.

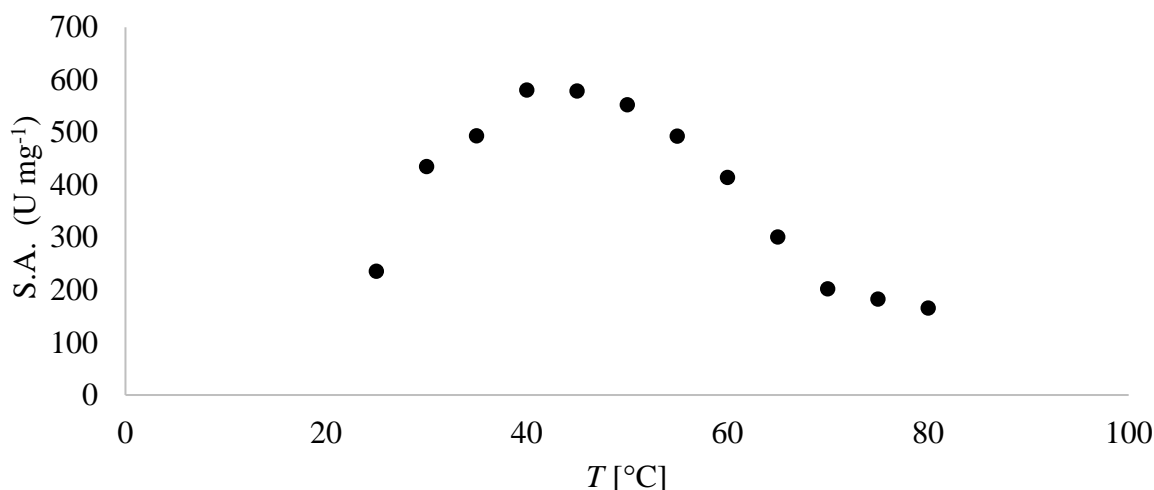
#### 4.2 Aktivnost komercijalnog enzima lipaze



Slika 16. Dinamička promjena aktivnosti komercijalnog enzima lipaze

Na Slici 16. prikazana je ovisnost aktivnosti enzima o vremenu. Test je proveden tijekom tjedan dana te se uočava veliki pad aktivnosti posljednjeg dana provedbe pokusa. Prva četiri dana provedbe testa aktivnost je vrlo visoka, i smanjuje se približno 20 %. Dužim zadržavanjem u klipovima mikroreaktorskog sustava te dužim kontaktom s ostalim komponentama emulzije, ona se nakon 7 dana smanjuje gotovo na trećinu inicijalne vrijednosti. Zbog toga se eksperiment mora provesti u što kraćem roku, a dugotrajno zadržavanje enzima u klipu mikroreaktora nije preporučljivo.

Enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* koji je korišten u ovom radu sadrži 269 aminokiselina, od toga ih 90-ak služi kao poklopac koji blokira trijade u hidrofobnom djelu molekule. Hidrofobne aminokiseline omogućuju proteinima veliku hidrofobnost, što povećava termostabilnost proteina te se prema tome aktivnost enzima lipaze uočava i pri većim temperaturama što je pokazano u pokusu u kojemu je ispitivan utjecaj temperature na aktivnost enzima lipaze.



Slika 17. Utjecaj temperature na aktivnost enzima lipaze

Na Slici 17. prikazano je ovisnost aktivnosti enzima lipaze o promjeni temperature, pri čemu je optimalna temperatura za provedbu reakcije transesterifikacije kataliziranu enzimom lipaza 40 °C. Porastom temperature iznad te vrijednosti, aktivnost enzima lipaze se smanjuje, a najniža aktivnost zabilježena je pri najvećoj ispitivanoj temperaturi (80 °C).

### 4.3 Pročišćavanje sirovog ekstrakta enzima lipaze

Aktivnost enzima i koncentracija proteina praćeni su tijekom svih faza procesa pročišćavanja enzima dobivenog fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na čvrstim nosačima (Tablica 4). Osim ovih pokazatelja u Tablici 4 prikazana je i promjena volumena uzorka tijekom provedbe procesa pročišćavanja enzima lipaze.

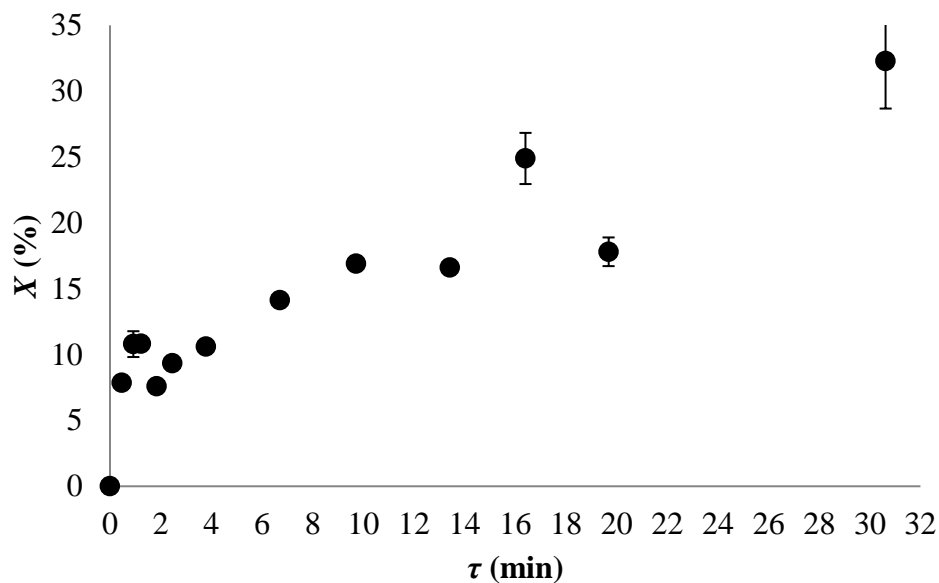
Tablica 4. Volumen, aktivnost i koncentracija enzima lipaze tijekom procesa pročišćavanju

<b>Korak pročišćavanja</b>	<b>Volumen (mL)</b>	<b>Ukupno (U)</b>	<b>Ukupno proteina (mg)</b>	<b>V. A. (U/mL)</b>	<b>Sadržaj proteina (mg/mL)</b>	<b>S. A. (U/mg)</b>
Izvorni uzorak	40,0	2231,28	730,85	55,781	18,271	3,053
Precipitacija	40,0	3571,99	674,13	89,300	16,853	5,299
Supernatant	36,0	1524,53	523,44	42,348	14,540	2,910
Talog	3,5	328,88	58,29	93,967	16,654	5,640
Dijaliza	3,0	135,66	38,62	45,220	12,873	3,510

Tablica 4. prikazuje promjenu aktivnosti nekomercijalnog enzima tijekom pročišćavanja koje je provedeno u dva stupnja – isoljavanje i dijaliza. Isoljavanjem se sadržaj proteina u uzorku smanjio (8%), ali su se povećale volumna (60%) i specifična aktivnost (73%). Nakon centrifugiranja suspenzija je razdvojena na talog i supernatant pri čemu je talog resuspendiran u natrij fosfatnom puferu. U talogu je zaostao veći dio enzima lipaza, te manji dio ostalih proteina, što je rezultiralo povećanjem volumne (5%) i specifične aktivnosti (6%) uz pad koncentracije proteina (91%). Posljedično u supernatantu je zaostao manji dio enzima lipaza i veći dio ostalih proteina. Talog s enzimom lipaza je suspendiran i dijaliziran, ali je nakon dijalize u rezultirajućoj suspenziji smanjena aktivnost enzima lipaze i njegova koncentracija. Uzevši u obzir početnu specifičnu aktivnost enzima u sirovom ekstraktu, nakon procesa pročišćavanja enzima njegova specifična aktivnost je povećana 17%.

#### 4.4 Sinteza biodizela u mikroreaktoru

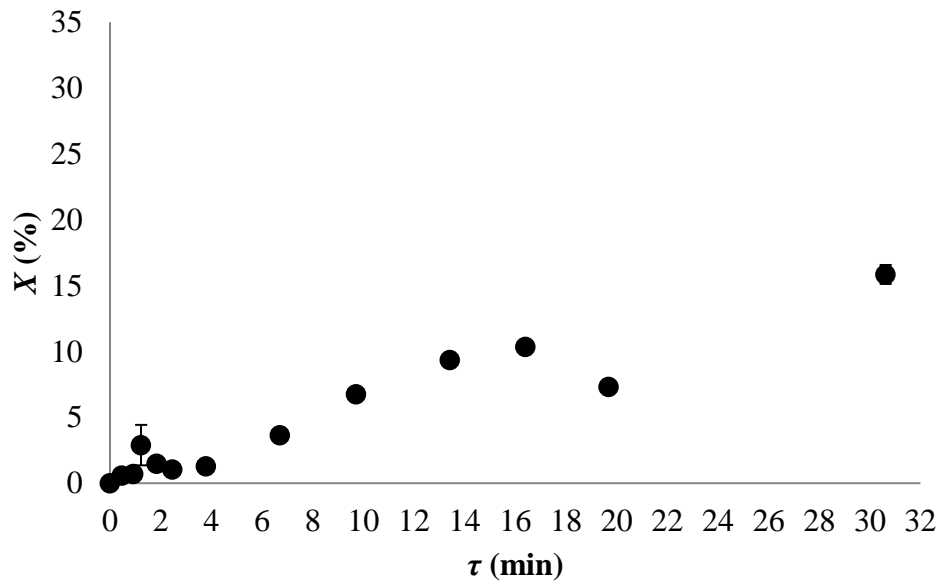
Sinteza biodizela provedena je u mikroreaktoru s dva ulaza i dva izlaza i širine kanala 500  $\mu\text{m}$  te je kao katalizator korišten komercijalni i nepročišćeni enzim lipaza podrijetlom iz *Thermomyces langinosus* (Lipolase 100L). Reakcija transesterifikacije je provedena u vodenom mediju (pufer) i DES-u. Eksperimentalni rezultati dobiveni u ovim pokusima su uspoređeni, a kao kriterij usporedbe korišteni su konverzija, odnosno koncentracija dobivenog nusprodukta, glicerola.



Slika 18. Utjecaj vremena zadržavanja na konverziju za sustav 1

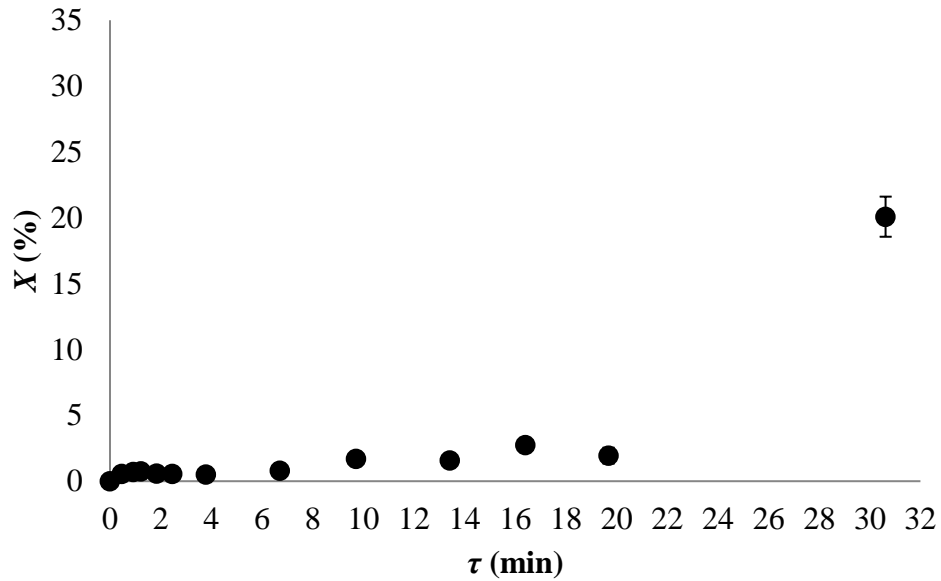
Na Slici 18. prikazana je ovisnost konverzije o vremenu zadržavanja, u mikroreaktorskom sustavu s dva ulaza i dva izlaza za reakciju transesterifikacije uz komercijalni enzim lipaza za reakciju provedenu u puferu. Najveća konverzija od  $X = 32,28 \%$  dobivena je za vrijeme zadržavanja od  $\tau = 30,63 \text{ min}$ .





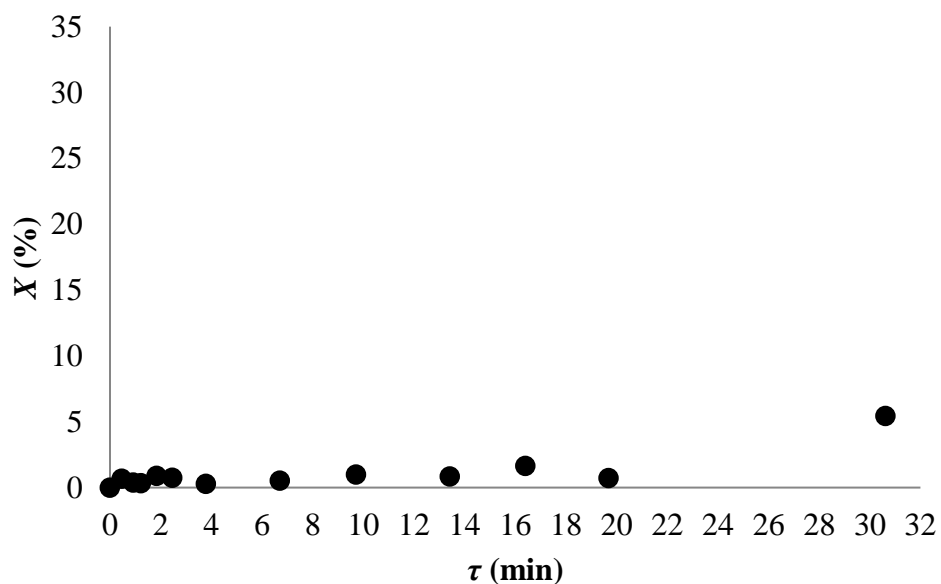
Slika 19. Utjecaj vremena zadržavanja na konverziju za sustav 2

Za reakciju transesterifikaciju provedenu u eutektičkom otapalu s komercijalnim enzimom lipaza (Slika 19), maksimalna konverzija od  $X = 15,85$  % postignuta je pri istom vremenu zadržavanja kao i u pokusu provedenom u puferu ( $\tau = 30,63$  min). Osim ovoga treba istaknuti da se u oba reakcijska sustava (sustavi 1 i 2) konverzija povećava s povećanjem vremena zadržavanja što se može pripisati dužem međufaznom kontaktu i boljem stupnju izmiješanosti faza koje se postižu pri većim vremenima zadržavanja. Za reakciju provedenu u eutektičkom otapalu postignuta je dva puta manja konverziju u sustavu 2 što se može pripisati većoj stabilnosti i aktivnosti enzima lipaze u vodenom sustavu (pufer) u odnosu na stabilnost i aktivnost enzima u DES-u.



Slika 20. Utjecaj vremena zadržavanja na konverziju za sustav 3

U sustavu 3 su kao jedna procesna struja korišteni emulzija izrađena od otpadnog ulja, pročišćenog enzima i SDS-a dok je drugu procesnu struju činio metanol. Iz rezultata pokusa prikazanih na Slici 20. vidljivo je da je konverzija raste s porastom vremena zadržavanja pri čemu je maksimalna konverzija od  $X = 20,08 \%$  postignuta pri najvećem ispitivanom vremenu zadržavanja,  $\tau = 30,63 \text{ min}$ .



Slika 21. Utjecaj vremena zadržavanja na konverziju za sustav 4

U sustavu 4 kao jedna ulazna procesna struja korištena je emulzija ulja, pročišćenog enzima, DES-u i SDS-a dok je druga procesna struja bio metanol. U ovom pokusu maksimalna konverzija od  $X = 5,45\%$  ponovno je postignuta pri najdužem vremenu zadržavanja,  $\tau = 30,63$  min (Slika 21.). Općenito, manja konverzija koja je postignuta u sustavima 3 i 4 posljedica je manje aktivnosti nepročišćenog enzima koji je korišten u ovim pokusima, a koja je bila značajno manja od aktivnosti komercijalnog enzima lipaze korištenog u pokusima provedenim sa sustavima 1 i 2.

U svim ovim pokusima konverzija raste s povećanjem vremena zadržavanja što je i očekivana posljedica dužeg kontakta komponenata reakcijskog sustava pri ovim uvjetima. Manja odstupanja od novog trenda vidljiva u pokusima provedenim sa sustavima 1 i 2 vjerojatno su posljedica pada aktivnosti enzima tijekom provedbe procesa sinteze biodizela u mikroreaktoru. Isto je pokazano i u pokusu u kojemu je ispitivana dinamička promjena aktivnosti enzima (poglavlje 4.2).

Tablica 5. Usporedba maksimalne vrijednosti konverzije i koncentracije glicerola u pokusima provedenim u mikroreaktoru s različitim sustavima

Sustav	1	2	3	4
$X, \%$	<b>32,28</b>	15,85	20,08	5,45
$\gamma$ (FAME) ( $\text{mg mL}^{-1}$ )	<b>111,04</b>	39,08	49,51	13,44
$\tau, \text{min}$	<b>30,63</b>	30,63	30,63	30,63
$\gamma$ (glicerol), mg/MI	<b>12,55</b>	4,95	1,60	1,02

Maksimalna konverzija u svim sustavima postignuta je za najveće ispitivano vrijeme zadržavanja,  $\tau = 30,63$  min. Pri istim uvjetima u svim analiziranim sustavima postignuta je i najveća koncentracija glicerola. Uspoređujući sve analizirane sustave najveća konverzija od  $X = 32,28\%$  postignuta je u sustavu 1 u kojemu su korišteni komercijalni enzim i pufer. Treba istaknuti da primjena emulgatora može negativno utjecati na učinkovitost provedbe procesa transesterifikacije kataliziranog enzimom lipaza čije korištenje je nužno jer su enzim i ulje nemješljivi. Poznato je da prisustvo emulgatora može dovesti do smanjenje aktivnosti i stabilnosti enzima i posljedično smanjenja proizvodnje biodizela. Iako je prisustvo DESa rezultiralo manjom konverzijom za očekivati je da bi daljnjom optimizacijom procesa uz upotrebu DES-a moglo rezultirati povećanjem

konverzije procesa proizvodnje biodizela. Naime, DES veže na sebe glicerol koji je sporedni produkt ovog procesa i time pomiče ravnotežu reakcije transesterifikacije u smjeru nastajanja produkta, odnosno u smjeru nastajanja biodizela. Uz ovo treba uzeti u obzir da je za katalitičku aktivnost enzima lipaza potrebno prisustvo 5-10 % vode stoga je u daljnjem radu s ovim sustavom potrebno koristiti vodeni DES, odnosno DES pripremljen s određenim postotkom vode.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je kao sirovina za proizvodnju biodizela reakcijom transesterifikacije korišteno otpadno jestivo ulje iz domaćinstva, nastalo prženjem krumpira. Obzirom na cijenu i dostupnost, pokazalo se vrlo kvalitetnim resursom, zadovoljavajućih svojstava pri čemu posebno treba istaknuti povoljan sadržaj slobodnih masnih kiselina.

Kao katalizatori za reakciju transesterifikacije korištene su komercijalna i pročišćena lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* koje se odlikuju specifičnošću i selektivnošću te pokazuju vrlo visoku aktivnost u blagim eksperimentalnim uvjetima (niski tlak i temperatura, vodeni medij...).

Komercijalni enzim lipaza pokazao je najveću aktivnost pri temperaturi 40 °C.

Najveći konverzija od  $X = 32,28 \%$  postignut je pri najdužem vremenu zadržavanja,  $\tau = 30,63$  min u sustavu u kojemu je korišten komercijalni enzim –suspendiran u puferu.

Prisustvo DESa i korištenje pročišćenog enzima lipaza proizvedenog fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na čvrstim nosačima rezultirali su manjim konverzijama što je posljedica manje aktivnosti ovog enzima kao negativnog utjecaja bezvodnog DES-a na reakciju transesterifikacije kataliziranu enzimom lipaza za koju je poznato da se mora odvijati u prisustvu 5-10 % (w) vode.

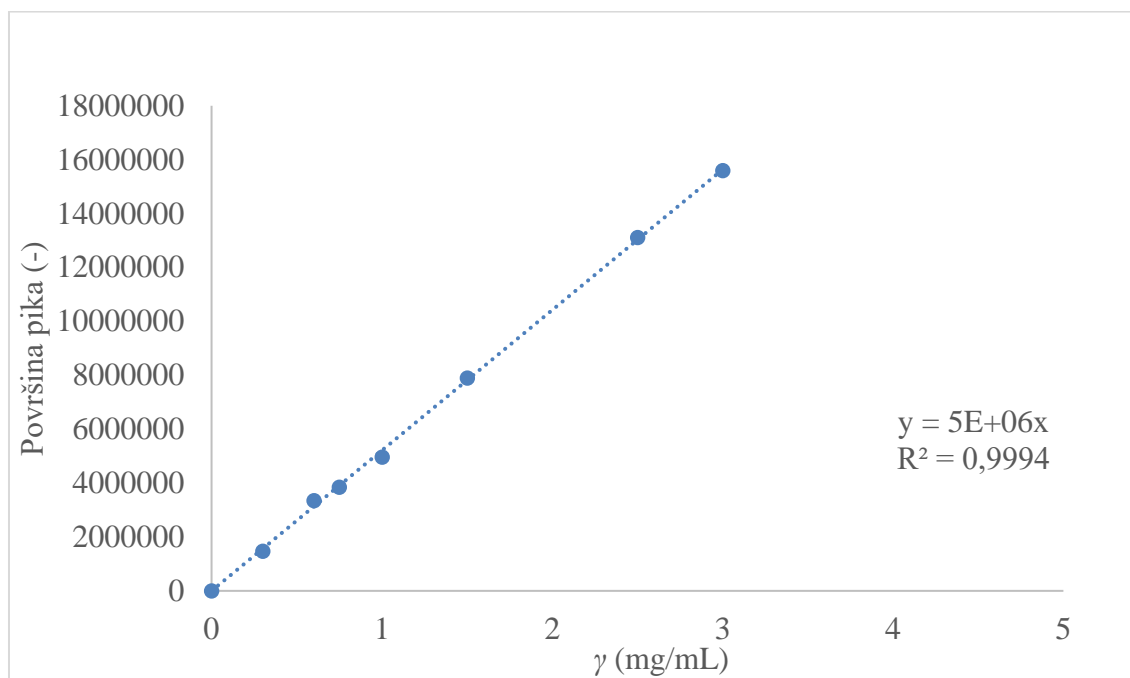
## 6. LITERATURA

1. Sinčić, D. Biodizel-svojstva tehnologije i proizvodnje. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.
2. Kiš, D., Jurić, T., Emert, R., Plaščak, I. Alternativno gorivo-biodizel. Poljoprivreda, 12 (2006) 41-46
3. Direktiva EU o obnovljivim izvorima energije  
(<https://ec.europa.eu/energy/en/topics/renewable-energy/renewable-energy-directive>)  
(pristupljeno 1. kolovoza 2019.)
4. Sinčić, D. Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela I. Kemija u industriji 63 (2014) 19-31
5. Parlov Vuković, J. Primjena spektroskopije NMR u analizi biodizela. Kemija u industriji 65 (2016) 17-24
6. Kent Hoekman, S., Broch, A., Robbins, C., Cenicerros, E., Natarajan, M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. Renewable and Sustainable Energy Reviews 16 (2012) 143-169
7. Bušić, A., Kundas, S., Morzak, G., Belskaya, H., Marđetko, N., Ivančić Šantek, M., Komes, D., Novak, S., Šantek, B. Recent trends in biodiesel and biogas production. Food Technology and Biotechnology 56 (2018) 152-173
8. Moazeni F., Chen Y.-C., Zhang G. Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. Journal of Cleaner Production 216 (2019) 117-128
9. Lam, M. K., Lee, K. T., Mohamed, A. R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. Biotechnology Advances 28 (2010) 500-518
10. Uredba o kakvoći goriva NN 141/05  
([https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005\\_11\\_141\\_2651.html](https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2005_11_141_2651.html)) (pristupljeno 1. kolovoza 2019.)
11. Skala, D., Glišić, S., Biodizel I. Istorijat, proizvodnja i standardi. Hemijska industrija 58 (2004) 73-78
12. Biokatalizatori enciklopedija  
(<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=7748>) (pristupljeno 3.kolovoza 2019.)
13. Fernandez-Lafuente, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 62 (2010) 197-212

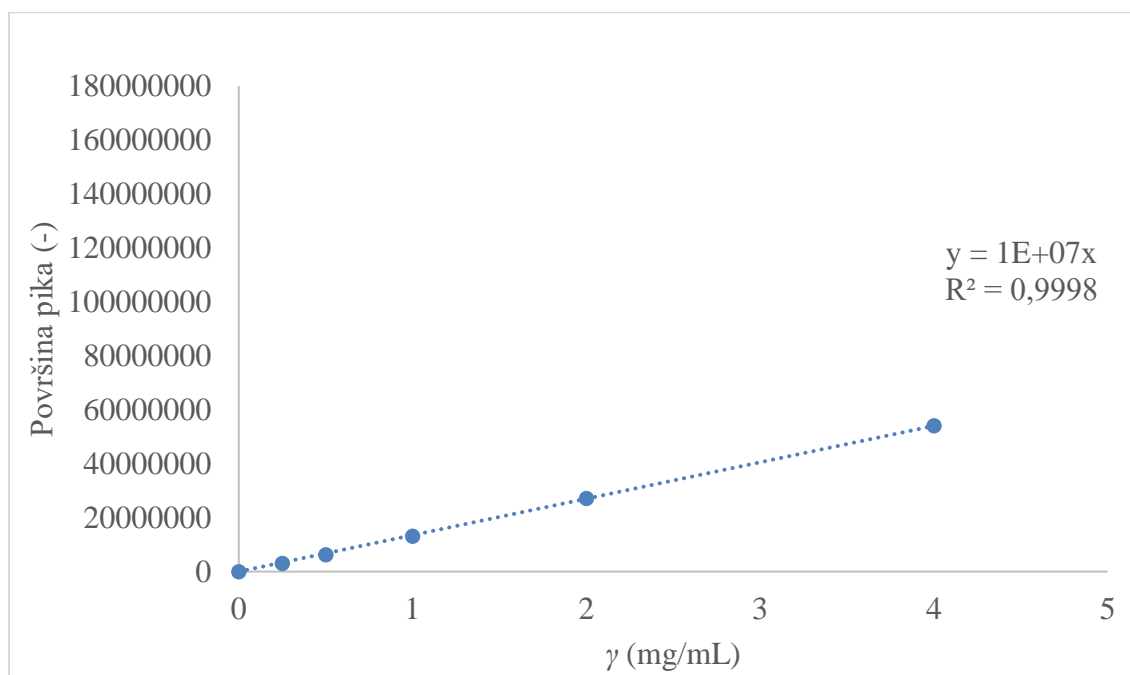
14. Zheng, Y.-Y., Guo, X.-H., Song, N.-N., Li, D.-C. Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene cloning, expression and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 69 (2011) 127-132
15. Turcu, M.C. *Lipase-catalyzed approaches towards secondary alcohols: Intermediates for Enantio purgedrugs*. Turun Yliopiston, University of Turku, 2010.
16. Šalić A., Zelić B. Mikroreaktori - prenosiva postrojenja za proizvodnju biodizelskoga goriva. *Goriva i maziva* 2 (2011) 85-110
17. Šalić A., Tušek, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B. Mikroreaktori, *Kemija u industriji* 59 (2010) 227–248
18. De Marco, B. A., Rechelo, B. S., Tótolí, E. G., Kogawa, A. C., Salgado, H. R. N. Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal* 27 (2019) 1–8
19. Sander A. Ionske kapljevine u službi zelene kemije, *Polimeri: časopis za plastiku i gumu*, 33 (2012) 127-129
20. Sander A. Nastavni materijali kolegija Toplinsko-procesno inženjerstvo. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2019
21. Vanda, H., Dai, Y., Wilson, E. G., Verpoorte, R., Choi, Y. H. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie* 21 (2018) 628-638
22. El Achkar, T., Fourmentin, S., Greige-Gerges, H. Deep eutectic solvents: An overview on their interactions with water and biochemical compounds. *Journal of Molecular Liquids* 288 (2019) 111028
23. Singh, M. K., Singh, J., Kumar, M., Thakur, I. S. Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04, produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 110 (2014) 92–99
24. Strlec, I., Kovač, T. *Praktikum iz biokemije*, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2013
25. Budžaki, S., Šalić, A., Zelić, B., Tišma, M. Enzyme catalysed biodiesel production from edible and waste cooking oils. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 29 (2015) 329-333

## 7. PRILOZI

### 7.1 Baždarni dijagram za glicerol

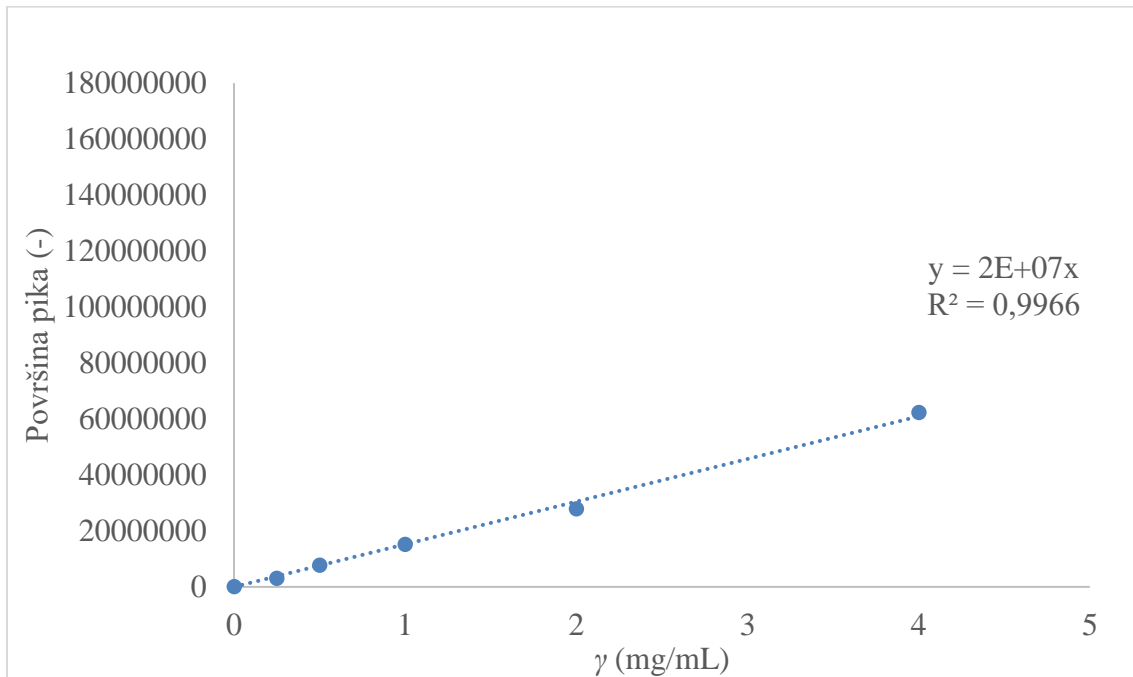


### 7.2 Baždarni dijagram za ester palmitinske kiseline

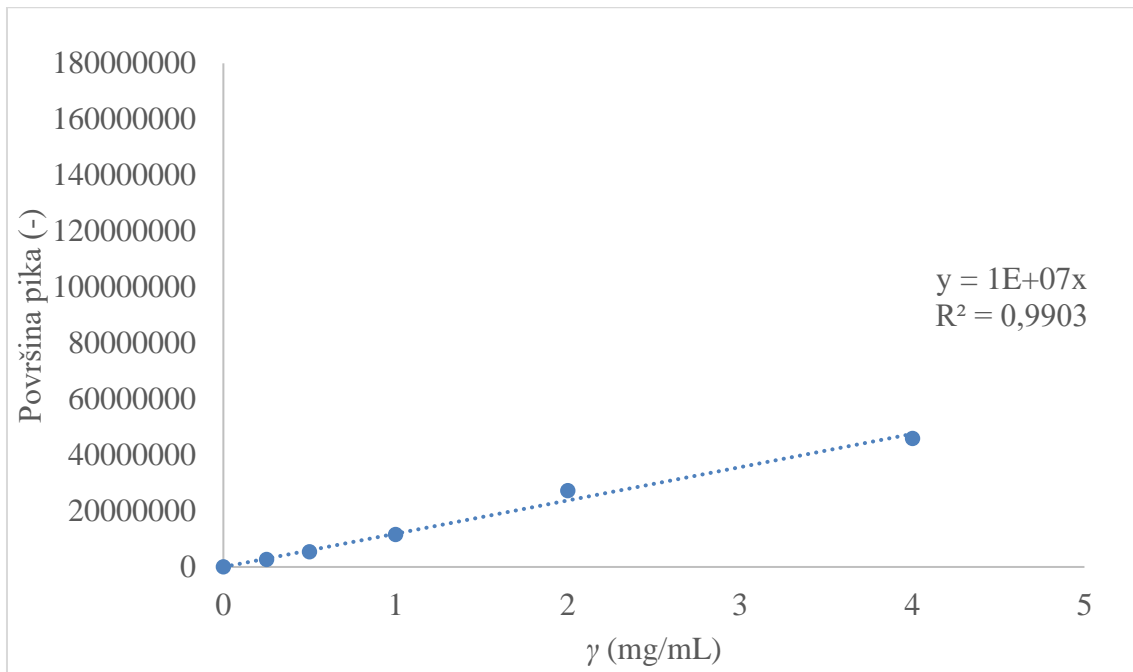




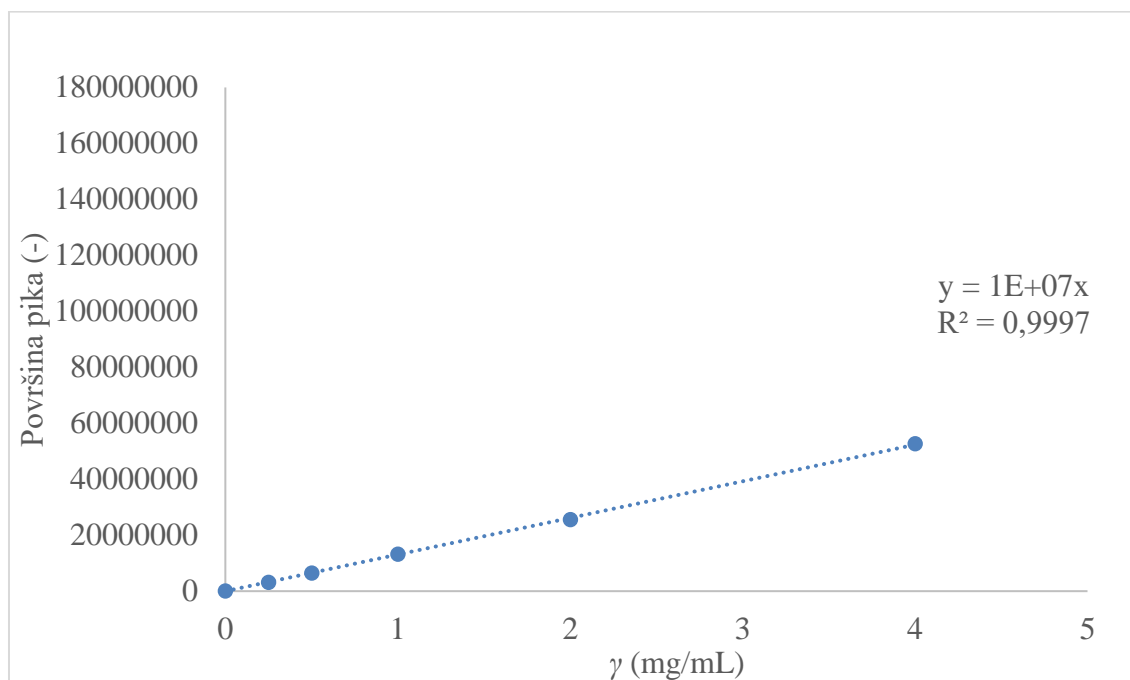
### 7.3. Baždarni dijagram za ester stearinske kiseline



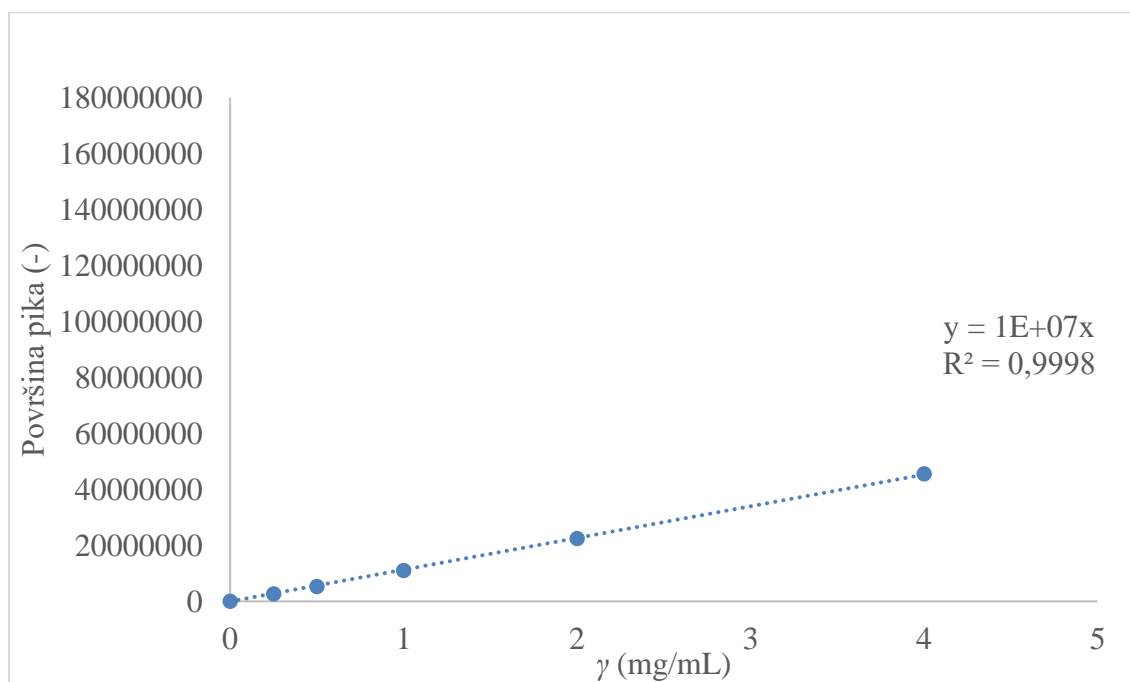
### 7.4 Baždarni dijagram za ester oleinske kiseline



### 7.5 Baždarni dijagram za ester linolne kiseline



### 7.6 Baždarni dijagram za ester linoleinske kiseline



## 7.7 Baždarni dijagram za Bradfordičinu metodu

