

# Integrirani mikrosustav za proizvodnju biodizela

---

Šimičević, Albina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:149:738502>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Albina Šimičević

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Albina Šimičević

**INTEGRIRANI MIKROSUSTAV ZA  
PROIZVODNJU BIODIZELA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. Prof. dr. sc. Bruno Zelić
2. Dr. sc. Anita Šalić
3. Izv. prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko

Zagreb, rujan 2021.

## Sažetak

Proizvodnja biodizela, neotrovnog kapljevito goriva koje svoju sve širu primjenu pronalazi kao zamjena ili dodatak dizelu fosilnog podrijetla, u zadnje vrijeme privlači sve veću pozornost. Jedan od najpoznatijih i najznačajnijih reakcijskih puteva sinteze biodizela, reakcija transesterifikacije, predmet je brojnih istraživanja pa je tako analizirana i u okviru ovog rada. Kao jedan od novih reaktorskih sustava za proizvodnju biodizela transesterifikacijom sve veći interes i primjenu pronalaze mikroreaktori. Za provedbu reakcije transesterifikacije u mikroreaktorima, kao i u ostalim reakcijskim sustavima, potrebno je odrediti optimalne reakcijske uvjete potrebne kako bi se dobili iskorištenja te udjeli metilnih estera masnih kiselina u skladu s odgovarajućim standardima. Kao polazna sirovina u proizvodnji biodizela najčešće se koriste različita ulja i masti prirodnog podrijetla, a kao rezultat procesa transesterifikacije dobiva se produkt koji sadrži komponente koje je potrebno odvojiti kako bi se dobio biodizel čistoće u skladu s odgovarajućim standardima.

U okviru ovog rada, a u svrhu proizvodnje biodizela koji zadovoljava standarde, razvijen je integrirani mikrosustav u kojemu je prvo provedena reakcija transesterifikacije u mikroreaktoru, a zatim pročišćavanje biodizela u serijski povezanom mikrosustavu. Pročišćavanje je provedeno u mikroekstraktor s niskotemperaturnim eutektičkim otapalom koje iz biodizela uklanja zaostale reaktante i dobiveni glicerol pri čemu se dobiva biodizel visoke čistoće. Enzim lipaza, koji je korišten za provedbu reakcije transesterifikacije u mikroreaktoru, imobiliziran je na magnetske nanočestice što je omogućilo njegovo zadržavanje u mikroreaktoru i posljedično olakšalo proces pročišćavanja biodizela u serijski povezanom mikrosustavu te proces učinilo ekonomski opravdanim. Inaktivacija enzima metanolom, drugim reaktantom u procesu transesterifikacije koji se u pravilu dodaje u suvišku, jedan je od osnovnih izazova provedbe procesa transesterifikacije katalizirane enzimima. Kao jedno od procesnih rješenja ovog izazova primijenjen je mikroreaktorski sustav u kojemu su kao ulazne procesne struje korišteni čisti metanol te emulzija ulja i enzima pri čemu je proizveden biodizel uz iskorištenje od 94 % uz vrijeme zadržavanja,  $\tau = 20$  min. Dodatno je razvijen i integrirani sustav spajanjem mikroreaktora s mikroekstraktorom pri čemu je proizveden biodizel uz iskorištenje od 94 % za vrijeme zadržavanja,  $\tau = 20$  min, te uz udio glicerola od 0,019 % (w/w).

**Ključne riječi:** Biodizel, transesterifikacija, enzim lipaza, ekstrakcija eutektičkim otapalom, integrirani mikrosustav

## Summary

The production of biodiesel, a non-toxic liquid fuel that has been increasingly used as a replacement or addition to diesel of fossil origin, has recently attracted an increasing attention. One of the best known and most important reaction pathways of biodiesel synthesis, the transesterification reaction, is the subject of numerous studies and was analyzed in this paper. As one of the new reactor systems for biodiesel production by transesterification, microreactors have increased interest and application. To demonstrate transesterification reaction in microreactors, as well as in other reaction systems, it is necessary to determine the optimal reaction conditions needed in order to obtain yields and content of fatty acid methyl esters in accordance with relevant standards. As a starting material in the production of biodiesel, various oils and fats of natural origin are commonly used, and as a result of the transesterification process, a product is obtained that contains components that need to be separated in order to obtain the purity of biodiesel in accordance with relevant standards.

Purpose of this work was biodiesel production of purity defined by relevant quality standards. An integrated microsystem was developed in which the transesterification reaction was firstly carried out in the microreactor leading to the purification of biodiesel in a microsystem connected in series. Purification was performed in a microextractor using a deep eutectic solvent that removes residual reactants and produced glycerol where in the same time biodiesel of high purity is obtained. Lipase, which was used to carry out the transesterification reaction was immobilized on magnetic nanoparticles, which enabled enzyme retention in a microreactor and consequently facilitated the process of purification of biodiesel integrated microsystem and made the process economically sustainable. Inactivation of the enzyme by methanol, another reactant in the transesterification process which is generally added in excess, is one of the primary challenges of enzyme-catalyzed transesterification processes. As one of the possible process solutions, a microreactor system was used in which pure methanol and emulsion of oil and enzyme were used as process inlets where biodiesel was produced with a yield of 94 % for the retention time of  $\tau = 20$  min. Additionally, an integrated system was developed by combining the microreactor with a microextractor. In this system biodiesel was produced with a yield of 94 % for the retention time of  $\tau = 20$  min, and with glycerol content of 0,019 % (w/w).

**Key words:** Biodiesel, transesterification, lipase, extraction with deep eutectic solvents, integrated microsystem

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	3
2.1. Biodizel .....	3
2.2. Proizvodnja biodizela .....	3
2.2.1. Transesterifikacija .....	4
2.2.2. Enzimatska transesterifikacija.....	7
2.3. Mikroreaktori.....	9
2.3.1. Mikroreaktori za sintezu biodizela .....	9
2.3.2. Utjecaj izvedbe mikroreaktora na sintezu biodizela.....	13
2.4. Pročišćavanje biodizela .....	15
2.5. Imobilizacija enzima .....	19
3. Eksperimentalni dio.....	21
3.1. Materijali .....	21
3.1.1. Kemikalije .....	21
3.1.2. Oprema .....	22
3.2. Metode.....	22
3.2.1. Priprema otopina .....	22
3.2.2. Mjerenje aktivnosti enzima – spektrofotometrijska metoda (metoda 1.) .....	23
3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima – metoda početnih brzina (metoda 2.).....	23
3.2.4. Priprava eutektičkih otapala .....	24
3.2.5. Priprava emulzija.....	24
3.2.6. Priprava emulzija različitih koncentracija enzima i emulgatora u svrhu ispitivanja stabilnosti.....	26
3.2.7. Mjerenje koncentracije metilnih estera masnih kiselina (FAME) i glicerola plinskom kromatografijom.....	27
3.2.8. Sinteza biodizela u PTFE mikroreaktoru.....	27
3.2.9. Integrirani sustav za sintezu biodizela enzimatskom transesterifikacijom i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom.....	29
3.2.10. Integrirani sustav za sintezu biodizela transesterifikacijom pomoću enzima imobiliziranog na magnetne nanočestice i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom.....	31
4. Rezultati i rasprava.....	33
4.1. Sinteza biodizela u mikroreaktoru – sustav s 3 ulaza.....	33
4.2. Ispitivanje utjecaja metanola na aktivnost enzima lipaza.....	35
4.3. Sinteza biodizela u mikroreaktoru – sustav s 2 ulaza.....	36

4.4. Priprava i stabilnost emulzije ulje-enzim .....	37
4.5. Ispitivanje ovisnosti koncentracije enzima i koncentracije emulgatora na aktivnost enzima ....	38
4.6. Sinteza biodizela u mikroreaktoru – sustav s 2 ulaza i novom emulzijom.....	40
4.7. Mikroreaktorski sustav s enzimom imobiliziranim na magnetne nanočestice .....	41
4.8. Integrirani mikrosustav.....	42
5. Zaključak.....	46
6. Literatura .....	47
7. Prilozi .....	52



# 1. Uvod

Biodizel, odnosno metilni esteri masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Methyl Esters*, FAME), kapljevito je gorivo koje u zadnje vrijeme privlači sve više interesa kao ekološki prihvatljiva zamjena za dizel fosilnog podrijetla. Proizvodi se najčešće reakcijom transesterifikacije uz odgovarajući katalizator. Zamjenom kemijskih katalizatora s enzimom lipaza kao biokatalizatorom u procesu proizvodnje biodizela, izbjegava se nastanak i zbrinjavanje otpadnih alkalnih voda [1]. Osnovni izazovi enzimatski katalizirane sinteze biodizela povezani su s nastajanjem glicerola kao sporednog produkta i deaktivacijom enzima u prisutnosti metanola [2]. Kao jedan od pristupa koji se koriste za intenzifikaciju procesa u kojima se provode reakcije i separacijski procesi sve više se primjenjuju mikrosustavi. Provedbom reakcija i separacijskih procesa u mikrosustavima u pravilu dolazi do povećanja iskorištenja i brzine reakcije te povećanja učinkovitosti separacijskih procesa, kao posljedice velikog omjera površine i volumena mikrosustava te povezanih većih brzina prijenosa tvari i topline [3].

Prednosti različitih mikroreaktorskih sustava pokazane su na primjeru proizvodnje biodizela transesterifikacijom biljnog ulja kataliziranog enzimom lipaza [4]. Tako se primjerice u mikroreaktoru s tri ulaza reaktanti i enzim uvode zasebno čime se smanjuje kontakt enzima i metanola te posljedično inaktivacija enzima lipaza metanolom. S druge strane reakciju transesterifikacije je moguće provesti i u mikroreaktoru s dva ulaza u kojem se kao odvojene ulazne procesne struje primjenjuju metanol i emulzija dobivena miješanjem ulja i enzima uz dodatak emulgatora. Kao osnovni nedostatak ovog sustava treba istaknuti prethodnu pripravu emulzije ulja i enzima što u industrijskim procesima može biti dodatan izazov i nedostatak [5].

Nakon reakcije transesterifikacije iz smjese produkata potrebno je izdvojiti glicerol, metanol i neizreagirane reaktante. Alternativno rješenje za pročišćavanje biodizela je primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) koja su do sada korištena u šaržnim ekstraktorima [6]. U zadnje vrijeme intenzivirana su istraživanja na pročišćavanju biodizela u mikroekstrektoru kojeg odlikuju male dimenzije te veliki omjer površine i volumena zbog kojih utjecaj difuzije na proces ekstrakcije postaje zanemariv [7].

U ovome radu provedena je reakcija transesterifikacije ulja katalizirana enzimom lipaza u prisustvu metanola u dva mikroreaktora, s dva i s tri ulaza. U prvom sustavu su kao ulazne procesne struje korišteni metanol te emulzija ulja i enzima dok su u drugom sustavu ulazne procesne struje bile metanol, ulje i suspenzija enzima lipaza. Reakcija je provedena u mikroreaktoru izrađenom od politetrafluoroetilena (PTFE), a enzim lipaza je korišten u slobodnom ili imobiliziranom obliku. U pokusu provedenom s imobiliziranim enzimom su kao nosač korištene magnetne nanočestice koje su primjenom magnetnog polja jednostavno zadržane u mikroreaktoru [8]. Smjesa produkata je u integriranom sustavu odvođena u serijski spojeni mikroekstraktor u kojemu su glicerol i neizreagirani reaktanti odvojeni od biodizela pomoću niskotemperaturnog eutektičkog otapala [9]. Na ovaj način razvijen je integrirani mikrosustav za sintezu i pročišćavanje biodizela s idejom proizvodnje FAME prema zahtjevima odgovarajućih standarda [4].

## **2. Opći dio**

### **2.1. Biodizel**

U današnje vrijeme kada su dostupnost, pristupačnost i količine fosilnih goriva ograničene, javlja se potreba za proizvodnjom biogoriva iz raznih obnovljivih izvora [4]. Biodizel, kao gorivo prirodnog podrijetla, ekološki je prihvatljivije od konvencionalnih fosilnih goriva te uz postojeće zahtjeve za proizvodnju iz održivih i obnovljivih izvora energije te prisutnu zabrinutost zbog emisija stakleničkih plinova, sve više raste motivacija za njegovu proizvodnju i primjenu. Biodizel je moguće proizvoditi iz različitih sirovina kao što su biljna ulja poput sojinog, palminog, suncokretovog ili ulja uljane repice pa sve do sirovina poput otpadnih životinjskih masti, otpadnih jestivih ulja te algi.

Ovisno o primarnom alkoholu koji se koristi za njegovu proizvodnju transesterifikacijom, sastav biodizela može biti različit, ali najčešće se kao reaktant u proizvodnji biodizela koristi metanol pri čemu nastaju metilni esteri masnih kiselina, FAME [10].

Neke od važnijih prednosti biodizela u usporedbi s konvencionalnim gorivima jesu njegova biorazgradivost i netoksičnost, a kod primjene u motorima s unutarnjim izgaranjem treba istaknuti još i smanjene emisije sumpora, ugljikova monoksida, raznih ugljikovodika i čvrstih čestica te visoko plamište (najniža temperatura pri kojoj pare biodizela čine zapaljivu smjesu sa zrakom) [4]. Od nedostataka biodizela treba izdvojiti cijenu koja se može kretati od 1,5 \$ do 2,5 \$ po galonu u ovisnosti o sirovini, dok je s druge strane cijela konvencionalnog dizela po galonu svega od 0,20 \$ do 0,82 \$ [11].

### **2.2. Proizvodnja biodizela**

Jedan od najjednostavnijih procesa proizvodnje biodizela je miješanje biljnog ulja i dizela fosilnog podrijetla u određenom omjeru. Kako bi se ovaj proces intenzificirao i dobila homogena smjesa dviju viskozni kapljevin, biljno ulje se raspršuje u dizelu. Trošak ovog procesa je mali, međutim korištenje na ovaj način proizvedenog biodizela u današnjim dizelskim motorima nije preporučljivo zbog intenzivne korozije prisutnim slobodnim masnim kiselinama, moguće kontaminacije motora mikroorganizmima koji su prisutni u biljnim uljima te visoke viskoznosti biljnih ulja u odnosu na dizel fosilnog podrijetla.

Osim ovog, najjednostavnijeg procesa, danas se za proizvodnju biodizela najčešće koriste mikroemulzifikacija, piroliza i reakcija transesterifikacije.

U procesu mikroemulzifikacije miješaju se biljna ulja i organska otapala poput metanola ili etanola uz dodatak amfolita uslijed čega dolazi do formiranja dviju nemješljivih kapljevina od kojih je jedna biodizel.

Proces pirolize provodi se pri relativno velikim temperaturama (300 – 700 °C) bez ili uz korištenje katalizatora i u odsutnosti kisika [10]. Pri proizvodnji biodizela pirolizom najčešće se kao sirovine koriste otpadni polimerni materijali.

Transesterifikacija kao reakcija dobivanja biodizela iz biljnih ulja uz dodatak kratkolančanih alkohola metanola ili etanola najčešći je industrijski proces proizvodnje biodizela, a poznata je i pod nazivom alkoholiza [4]. Biodizel proizveden transesterifikacijom po svemu odgovara ekološki prihvatljivom prirodnom gorivu koje je neotrovno i čija primjena u motorima s unutarnjim izgaranjem rezultira smanjenom emisijom štetnih plinova. Unatoč brojnim prednostima, primjena biodizela povezana je i s nedostacima od kojih treba istaknuti skupe sirovine, nestabilnost pri izloženosti atmosferilijama, povećane emisije dušikovih oksida pri izgaranju te lošija svojstva na nižim temperaturama [10].

### **2.2.1. Transesterifikacija**

Najzastupljeniji proces proizvodnje biodizela, reakcija transesterifikacije, u najvećem broju slučajeva provodi se u šaržnim reaktorima iz različitih sirovina od kojih su najznačajnije jestiva biljna ulja, životinjske masti, otpadna nejestiva ulja te mikroalge [12]. Kao drugi reaktant u reakciji transesterifikacije koriste se kratkolančani alkoholi, najčešće metanol ili etanol. Reakcija transesterifikacije može se provoditi bez prisustva katalizatora pri superkritičnim uvjetima uz povišene temperature i tlakove, ali se u pravilu provodi u prisustvu katalizatora kao homogena ili heterogena [13]. U homogenu kataliziranoj reakciji transesterifikacije kao katalizatori se koriste kiseline ili baze, dok se kod upotrebe enzima kao katalizatora radi o heterogeno kataliziranoj reakciji [14]. U tablici 1. prikazane su specifičnosti reakcije transesterifikacije provedene bez i uz prisustvo katalizatora.

Tablica 1. Specifičnosti različitih oblika provedbe procesa transesterifikacije [10]

<p>Transesterifikacija pri superkritičnim uvjetima</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• povišeni tlakovi i temperature</li> <li>• veća količina alkohola</li> <li>• velika brzine reakcija</li> <li>• veća učinkovitost procesa</li> <li>• velika potrošnja energije</li> <li>• toplinska degradacija FAME</li> </ul>
<p>Kiselo katalizirana transesterifikacija</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• niže temperature, atmosferski tlak</li> <li>• nužna predobrada sirovina s velikim udjelom visoko lančanih masnih kiselina</li> <li>• veliki omjer metanol:ulje</li> <li>• voda inhibira proces</li> <li>• otežana separacija produkata</li> <li>• nužna neutralizacija katalizatora</li> </ul>
<p>Bazno katalizirana transesterifikacija</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• niže temperature, atmosferski tlak</li> <li>• mali omjer metanol:ulje</li> <li>• nužne pročišćene sirovine</li> <li>• otežana separacija produkata</li> <li>• nužna neutralizacija katalizatora</li> </ul>
<p>Enzimatska transesterifikacija</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• niske temperature i tlakovi</li> <li>• čisti produkt</li> <li>• nizak omjer metanol:ulje</li> <li>• jednostavna separacija produkata</li> <li>• sporedni proizvod glicerol može se dalje koristiti</li> <li>• dugo vrijeme zadržavanja</li> <li>• deaktivacija enzima</li> <li>• visoka cijena enzima</li> </ul>

Superkritična transesterifikacija provodi se pri temperaturama većim od 350 °C ne bi li se postigla visoka konverzija. S druge strane, ukoliko je temperatura procesa veća od 400 °C, nastupit će toplinska degradacija biodizela. Reakcija se odvija velikom brzinom te za odvijanje iste nije potrebno koristiti katalizator iako postoje primjeri superkritične transesterifikacije u kojima je brzina reakcije povećana primjenom heterogenog katalizatora [13].

U kiselo kataliziranoj transesterifikaciji najčešće se kao katalizatori primjenjuju sumporna te sulfonska kiselina. Iako je moguće postići visoke konverzije, ovaj proces

odlikuje velik broj nedostataka od kojih je najznačajniji korozija opreme. Uz to, kiselo kataliziranu transesterifikaciju karakteriziraju mala brzina reakcije, visoka potrošnja energije, formiranje glicerola i sporednih produkata koje je nužno separirati te obavezna neutralizacija katalizatora.

Natrijev i kalijev hidroksid najčešći su katalizatori u industrijskom procesu proizvodnje biodizela bazno kataliziranom transesterifikacijom [15]. U usporedbi s ostalim vrstama katalizatora koji se primjenjuju u procesu transesterifikacije, bazni katalizatori najmanje su korozivni, a rezultiraju i najvećim konverzijama. Reakcije bazno katalizirane transesterifikacije najčešće se provode pri temperaturi 60 °C. U ovim procesima moguće je onečišćenje nastalog biodizela vodom, slobodnim masnim kiselinama ili sapunom koji nastaje saponifikacijom ulja ili masti koje se koriste kao sirovine u proizvodnji biodizela. Stvaranje sapuna predstavlja problem u procesu pročišćavanja biodizela, a uz to se na ovaj proces troši i bazni katalizator čime se dodatno povećavaju troškovi procesa proizvodnje. Sapun nastao u procesu transesterifikacije potrebno je ukloniti iz biodizela i zbrinuti zajedno s otpadnom vodom koja u ovom procesu nastaje.

Neke od navedenih nedostataka kiselo i bazno katalizirane transesterifikacije moguće je izbjeći primjenom enzima kao katalizatora u procesu transesterifikacije. Enzimatska transesterifikacija ne zahtjeva velike količine energije jer se provodi pri nižim temperaturama, a sam proces je jednostavniji za provedbu od svih prethodno spomenutih. Pri enzimatskoj transesterifikaciji ne dolazi do reakcije saponifikacije te kao sporedni produkt nastaje čisti glicerol kojeg je moguće jednostavno separirati od biodizela, a enzim je nakon separacije moguće ponovno koristiti u reakciji transesterifikacije. Dva najveća ograničenja enzimatske transesterifikacije su velika cijena enzima te inhibicija enzima do koje dolazi u prisutnosti primarnog alkohola, najčešće metanola. Negativan utjecaj velike cijene enzima može se djelomično nadomjestiti njegovom imobilizacijom [16].

Najveći nedostatak u provedbi procesa transesterifikacije povezan je s prijenosom tvari između dviju nemješljivih faza, alkohola i ulja. Uz to, reakcija je reverzibilna te ukoliko se produkt ne odvodi kontinuirano nije moguće postići visoke konverzije. Sve ovo ima za posljedicu da se reakcija transesterifikacije kod industrijske proizvodnje biodizela provodi u šaržnim reaktorima kroz duže vremensko razdoblje što dodatno utječe na (ne)ekonomičnost ovog procesa. Stoga se u zadnje vrijeme šaržni industrijski procesi proizvodnje biodizela sve

više zamjenjuju kontinuiranim procesima pri čemu sve veću ulogu preuzima primjena mikroreaktora [17].

Kako bi se prethodno navedeni nedostaci procesa proizvodnje biodizela prevladali, uz primjenu mikroreaktora u literaturi su predloženi i drugi pristupi. Povećanje vremena zadržavanja reaktanata, povećanje omjera metanol:ulje, veći tlakovi i temperature ( $T > 350$  °C,  $p > 20$  MPa) te uvođenje dodatnog otapala poput tetrahidrofurana ili provođenje reakcije u superkritičnom metanolu neki su od mogućih pristupa. Treba istaći kako je pristup koji se temelji na provođenju reakcije u superkritičnom metanolu neznatno skratio proizvodnju biodizela, ali je s druge strane povećalo utrošak energije potreban za uklanjanje dodatne komponente iz reakcijskog sustava tijekom procesa pročišćavanja [18]. Neovisno o načinu proizvodnje, karakteristike dobivenog biodizela trebaju odgovarati propisanim standardima (EN 14214 [19]) [20] kako bi se mogla provjeriti njegova kvaliteta. Izabrana svojstva biodizela i dizela fosilnog podrijetla koja propisuju odgovarajući standardi prikazana su u tablici 2. [10].

Tablica 2. Usporedba izabranih svojstava biodizela i dizela fosilnog podrijetla propisana odgovarajućim standardima [10]

Svojstvo	Biodizel	Dizel
Specifična težina /15,5 °C	0,88	0,85
Kinematička viskoznost [mm <sup>2</sup> /s] / 40°C	1,9 – 6,0	1,3- 4,1
Gustoća [kg/L] / 20 °C	875 - 900	750 - 840
Plamište [°C]	100 -170	60 -80
Udio glicerola [%]	< 0,02	-

### 2.2.2. Enzimatska transesterifikacija

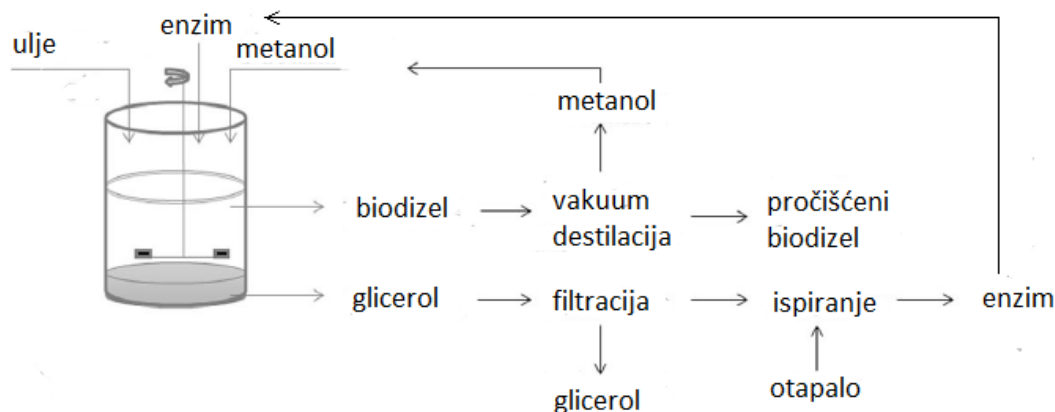
U zadnjih deset godina sve se više istražuje primjena enzima kao biokatalizatora u proizvodnji biodizela [21]. Korištenjem enzima u procesu proizvodnje izbjegava se nastajanje neželjenih produkata poput sapuna što vodi k jednostavnoj separaciji i

pročišćavanju biodizela (slika 1). Enzime je moguće ponovno koristiti te zahtijevaju manji utrošak energije pri primjeni u odnosu na kemijske katalizatore.

Dobrim enzimatskim katalizatorima u sintezi biodizela pokazale su se lipaze, enzimi koji kataliziraju hidrolizu lipida, a svrstane su u grupu esteraza [22]. Imaju mogućnost aktivacije na međupovršini voda-lipid na kojoj ubrzavaju hidrolizu lipida te su upravo zbog tog svojstva potencijalno dobri katalizatori u sintezi biodizela. Pokazalo se da lipaze podrijetlom iz *Thermomyces lanuginosus* (TIL) imaju zadovoljavajuće djelovanje kao biokatalizatori u mnogim procesima [23]. Komercijalno su dostupne, u imobiliziranom ili otopljenom obliku. U odnosu na lipaze drugog podrijetla pokazale su se učinkovitijim u sintezi biodizela, jeftinije su i toplinski stabilne.

Imobilizacija enzima povećava njegovu stabilnost i aktivnost te se enzim kao takav može ponovno koristiti u reakciji. Prilikom upotrebe imobiliziranog enzima u procesu moguća je akumulacija vode i glicerola na podlozi što vodi do deaktivacije enzima uz već spomenutu deaktivaciju u prisutnosti alkohola i probleme povezane s difuzijom.

Do sada je primjena enzima za proizvodnju biodizela ispitana u makro- i mezoreaktorima gdje su glavni problemi u provedbi reakcije transesterifikacije povezani s deaktivacijom enzima i neučinkovitim prijenosom tvari u ovom dvofaznom sustavu. Očekuje se kako će primjena mikroreaktora, zbog njihovih karakteristika, doprinijeti intenzifikaciji enzimatske transesterifikacije što je pokazano na nekim oglednim primjerima iz literature [4].



Slika 1. Pojednostavljeni shematski prikaz procesa enzimatske transesterifikacije [10]



## 2.3. Mikroreaktori

Mikroreaktori su reakcijski sustavi karakterističnih unutarnjih dimenzija u rasponu od 10 do 1000  $\mu\text{m}$  [24].

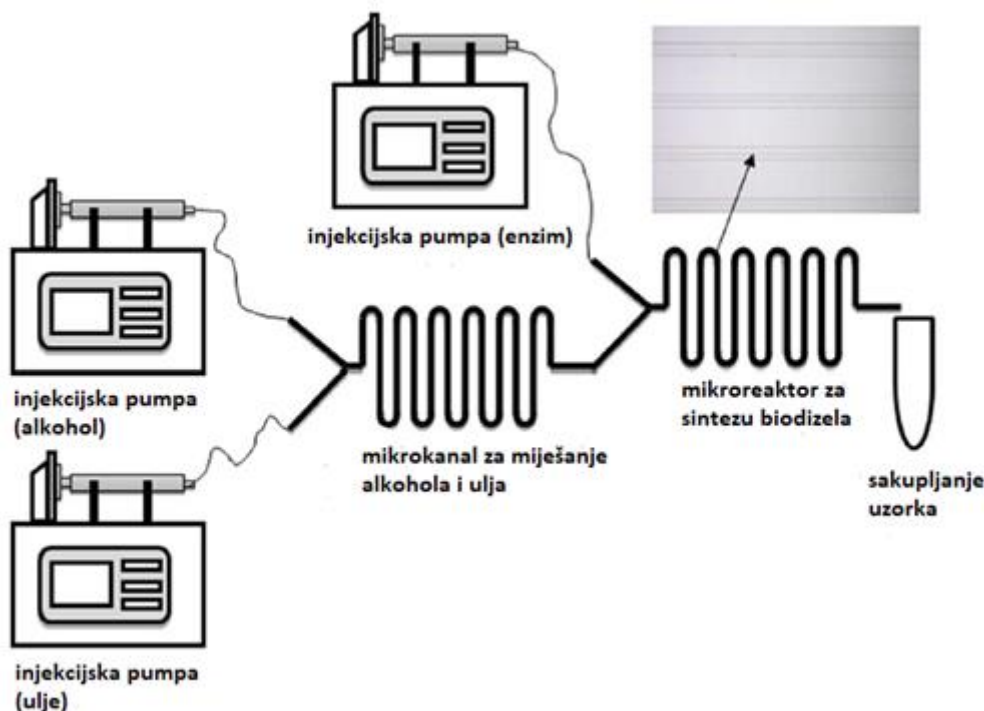
Mikroreaktore karakterizira velik omjer površine i volumena, kratak difuzijski put te zbog toga povezan intenzivan prijenos tvari i topline. Navedene prednosti pridonose visokim konverzijama u organskim sintezama u odnosu na uobičajene reaktore. Xie i sur. [17] su u svom radu naveli neke od najvažnijih prednosti mikroreaktora nad konvencionalnim reaktorima. Pri tome su istaknuti mali volumen reaktora, smanjenje veličine cjelokupnog postrojenja, velik omjer površine i volumena, smanjenu potrošnju energije, veći prijenos tvari i topline te konačno manje investicijske i proizvodne troškove.

Kao rezultat navedenih prednosti, u mikroreaktorima je zbog malih karakterističnih dimenzija moguće postići veće konverzije za kraće vrijeme zadržavanja [25]. Provedba reakcije transesterifikacije u mikroreaktorima zahtjeva kontrolu procesnih uvjeta te odabir prikladne vrste i geometrijskih karakteristika mikroreaktora [17].

### 2.3.1. Mikroreaktori za sintezu biodizela

Tri vrste mikroreaktora su do sada korištene za sintezu biodizela [17], cijevni mikroreaktori [4], mikrostrukturirani reaktori [26] i membranski mikroreaktori [27]. U do sada provedenim istraživanjima proizvodnje biodizela transesterifikacijom u mikroreaktorima pretežito su korišteni kemijski, kiseli ili bazični katalizatori [5], iako je u ovoj reakciji sve zastupljenija upotreba enzima kao katalizatora [4].

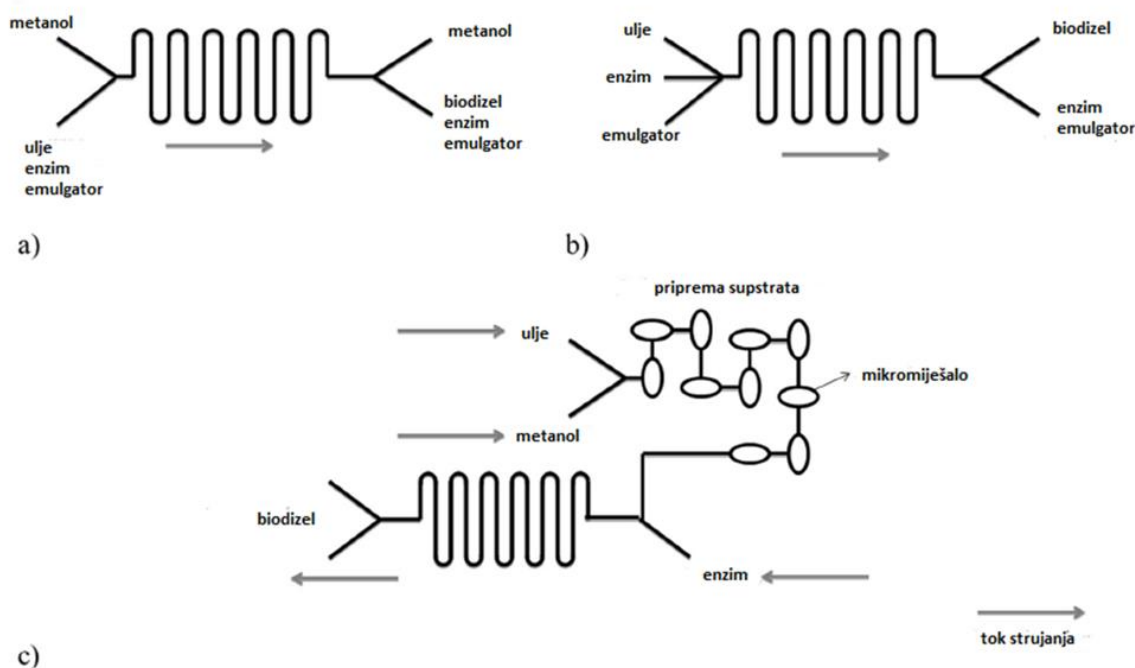
Cijevni mikroreaktori u pravilu su jednostavne izvedbe. Izgrađeni su od mreže kanala nano ili mikro dimenzija, duljine od nekoliko centimetara do jednog metra. Za dobavu reaktanata i katalizatora u cijevne mikroreaktore u pravilu se koriste precizne injekcijske/klipne pumpe. U osnovi su cijevni mikroreaktori za proizvodnju biodizela jednostavne izvedbe iako se serijski ili paralelnim povezivanjem više ovakvih reaktora mogu razviti i složeni reaktorski sustavi [10]. Na slici 2 je prikazana pojednostavljena shema cijevnog mikroreaktorskog sustava za enzimatsku proizvodnju biodizela s pripadajućim ulaznim i izlaznim procesnim tokovima.



Slika 2. Shematski prikaz cijevnog mikroreaktorskog sustava za enzimatsku sintezu biodizela [10]

Reaktante je u cijevni mikroreaktor moguće uvoditi kao čiste tvari ili smjese. Tako se za enzimatsku sintezu biodizela mogu koristiti tri različita sustava s obzirom na dobavu reaktanata i katalizatora. Prvi sustav je razvijen kako bi se spriječila inaktivacija enzima metanolom, a temelji se na upotrebi cijevnog mikroreaktora s dva ulaza pri čemu se na jedan ulaz dovodi metanol, dok se na drugi ulaz dovodi smjesa enzima, ulja i emulgatora (slike 2 i 3a). Ovakav pristup rezultira izlaznom procesnom strujom u kojem se iskorištenje FAME veće od 95 % postiže za relativno kratko vrijeme zadržavanja od približno 2 sata. U ovom sustavu problem predstavlja prethodno miješanje komponenti koje čine emulziju, a koje je moguće riješiti upotrebom dodatnog mikrosustava/mikromiksera za miješanje ulja i enzima. Drugi sustav podrazumijeva upotrebu mikroreaktora s tri ulaza čime se izbjegava prethodno miješanje komponenata reakcijske smjese prije uvođenja u mikroreaktor (slika 3b). U ovom sustavu ostvaren je udio FAME 98 % za vrijeme zadržavanja od 2 sata pri 40 °C te molarnom omjeru ulje:enzim:metanol = 10:1:1,24 [28]. U trećem sustavu se primjenom mikromiješala stvara smjesa ulja i metanola koja se uvodi u cijevni mikroreaktor s dva ulaza kao jedna procesna struja dok je treća procesna struja enzim (slika 3c). Na ovaj način se poboljšava miješanje reaktanata prije njihova uvođenja u mikroreaktor [10]. U ovom sustavu postignuto

je iskorištenje FAME od 99,53 % pri 50 °C, za omjer etanol:ulje = 9:1, 1 %-tnu koncentraciju enzima i vrijeme zadržavanja od 12 s [5].



Slika 3. Shematski prikaz sustava za enzimatsku sintezu biodizela u cijevnom mikroreaktoru [10]

Drugoj grupi mikrosustava za sintezu biodizela pripadaju mikrostrukturirani reaktori. Najčešće su izvedeni u obliku ploče na kojoj su izvedeni paralelni kanali promjera od 10 do nekoliko stotina mikrometara [10]. Mikrostrukturirane reaktore karakteriziraju brzi prijenos tvari i topline koje je moguće dodatno poboljšati ugradnjom mikromiješala [3] ili različitih vrsta prepreka protoku. Santana i sur. [29] su transesterifikaciju suncokretovog ulja kataliziranu natrijevim hidroksidom proveli u mikrokanalima s kružnim preprekama. Korišteni su mikrostrukturirani reaktori (duljina = 35 mm, širina = 1500 μm, visina = 200 μm) s tri i sedam kružnih prepreka ravnomjerno raspoređenih dužinom reaktora. U oba sustava postignuto je iskorištenje FAME od 99,99 % pri 50 °C, omjeru etanol:ulje = 9:1, 1 %-tnom koncentracijom enzima za vrijeme zadržavanja 12 s. Unutar kanala moguće je postaviti katalitički aktivnu fazu nasumično ili pravilnim rasporedom. Ovako izvedeni mikrostrukturirani reaktori najčešće se koriste, a u njima se postiže učinkovit prijenos tvari između reakcijske smjese i površine čestica katalizatora. Veliki pad tlaka prilikom strujanja kapljevine kroz mikrostrukturirani reaktor s nasumično raspoređenim katalizatorom

izbjegnut je kod izvedbe s pravilnim rasporedom katalizatora unutar paralelno postavljenih filamenata (slika 4.) [10].

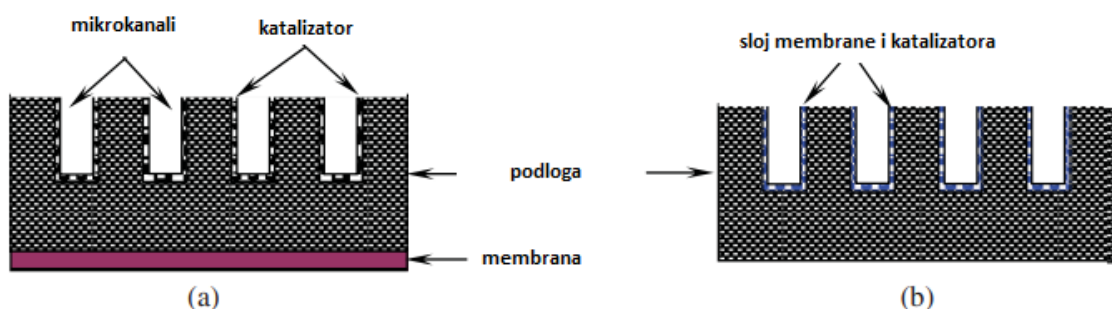


Slika 4. Mikrostrukturirani reaktor s pravilnom raspodjelom čestica katalizatora [8]

Treća grupa mikroreaktora za sintezu biodizela spaja prednosti membranskog reaktora i mikroreaktora i naziva se membranskim mikroreaktorima. U membranskim mikroreaktorima moguće je proizvoditi biodizel uz brzi prijenos tvari i topline i upotrebu manjih količina katalizatora pri manjim temperaturama. Dvije su vrste membranskih mikroreaktora, pločasti i cijevni.

Pločasti mikroreaktor izrađen je u obliku ploče na kojoj su urezani mikrokanali sa slojem katalizatora, dok je na donjoj strani ploče nanešen membranski sloj za provedbu separacije (slika 5a). Moguće je istovremeno provoditi sintezu i separaciju ukoliko se u mikrokanale ugradi membrana prekrivena slojem katalizatora (slika 5b).

Cijevni tip membranskog mikroreaktora izveden je kao porozna podloga u obliku cijevi u kojoj su ugrađeni mikrokanali i membrane. Mikrokanali za protjecanje kapljevine raspoređeni su unutar, a membrana je najčešće s vanjske strane cijevi [30].

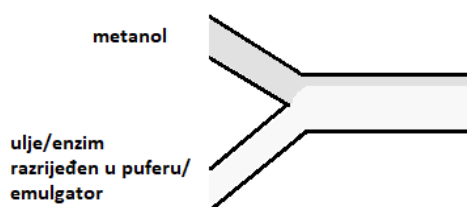


Slika 5. Pločasti mikroreaktori s membranskim slojem [30]

### 2.3.2. Utjecaj izvedbe mikoreaktora na sintezu biodizela

Uzevši u obzir broj ulaza dvije su moguće izvedbe mikoreaktora za sintezu biodizela, mikoreaktori s dva ili tri ulaza.

Kod izvedbe s dva ulaza (Y- ili T-oblik), jedna komponenta ulazi zasebno u reaktor, dok se druge dvije uvode zajedno. Prvi pristup podrazumijeva miješanje enzima i metanola koji tada čine jednu ulaznu procesnu struju dok je ulje druga procesna struja koja se uvodi u mikoreaktor. Ovakav pristup nije poželjan zbog deaktivacije enzima u prisustvu metanola što predstavlja izrazit problem pri provedbi kontinuiranog procesa. Drugi pristup uključuje enzim razrijeđen u puferu kao jednu procesnu struju, dok je druga procesna struja smjesa ulja i metanola. S obzirom na nemješljivost tih dviju komponenti, nužan je dodatak emulgatora kao dodatne komponente u reakcijskom sustavu. Takva emulzija nije stabilna duži vremenski period zbog čega ni ovaj pristup nije pogodan za provedbu sinteze biodizela u mikrosustavu. Kao najbolji pristup za provedbu sinteze biodizela u mikoreaktoru s dva ulaza pokazao se sustav u kojemu se kao jedna procesna struja uvodi metanol dok je druga procesna struja emulzija ulja i enzima koja nastaje uz dodatak pogodnog emulgatora (slika 6.). Ovakav pristup sintezi biodizela u mikoreaktoru rezultirao je iskorištenjem na biodizelu od 15 % za vrijeme zadržavanja od 4 minute što je 15 puta brže u odnosu na šaržni proces u kojem je za postizanje istog iskorištenja potrebno reakciju provoditi 1 sat.

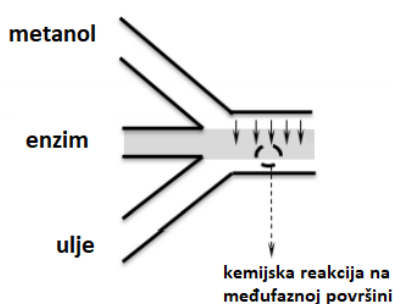


Slika 6. Shematski prikaz mikoreaktorskog sustava za proizvodnju biodizela s dva ulaza

[28]

Uvođenje nove komponente, emulgatora u sustav predstavlja dodatni izazov. Naime, emulgator je uz ostale nečistoće prisutne u reakcijskoj smjesi potrebno ukloniti iz konačnog produkta, biodizela. Nadalje, emulzija enzima i ulja koja se koristi kao jedna ulazna procesna struja rezultira povećanjem prisutnosti enzima u proizvedenom biodizelu što smanjuje, a u većini slučajeva i potpuno onemogućava ponovnu uporabu enzima lipaza u sintezi biodizela.

Zbog navedenih ograničenja sustava s dva ulaza, za sintezu biodizela u mikroreaktoru predložen je sustav s tri ulaza ( $\Psi$ -oblik) u kojemu se reaktanti, ulje i metanol te katalizator, enzim uvode u mikroreaktor kao odvojene procesne struje. Kao prvi korak u provedbi sinteze biodizela u ovom sustavu, bilo je potrebno odrediti položaj procesnih struja s obzirom na mjesto njihova uvođenja u mikroreaktor (slika 7). Sustav s tri ulaza u kojem se ulje uvodi kao središnja procesna struja je odbačen zbog nemješljivosti ulja s vodenim fazama. Metanol s obzirom na veći difuzijski koeficijent u odnosu na enzim difundira brže do druge faze. Tako je sustav u kojem se enzim uvodi u mikroreaktor u sredini, između ulja i metanola, najbolje rješenje, a pojednostavljeni prikaz ovog sustava je prikazan na slici 7 [28].



Slika 7. Shematski prikaz mikroreaktorskog sustava za sintezu biodizela s tri ulaza [28]

Sustav koji se u prethodnim istraživanjima u makroreaktorima pokazao kao optimalan je onaj u kojemu su reaktanti i katalizator uvođeni u omjeru ulje:metanol:enzim = 10:1,24:1 odnosno 450 g ulja, 55,95 g metanola i 45 g razrijeđenog enzima u puferu, a za uspješnu provedbu reakcije transesterifikacije bilo je potrebno vrijeme zadržavanja dulje od 10 sekundi [21]. Za vrijeme zadržavanja od 20 minuta iskorištenje FAME iznosilo je 32 % što je u šaržnom procesu ostvareno nakon 1,5 sata provedbe procesa. Tako se kao najbolji od svih analiziranih mikroreaktorskih sustava pokazao upravo ovaj s tri ulaza. Primjenom ovakvog sustava ne uvodi se dodatna komponenta – emulgator, uspostavljen je stabilan tok cijelom dužinom mikrokanala, jednostavna je separacija produkata te je moguća recirkulacija enzima.

Jedan od mogućih problema u radu s ovim mikrosustavom jest začepljenje mikrokanala, a kao rješenje primijenjen je politetrafluoroetilenski (PTFE) mikroreaktor većeg promjera mikrokanala. Provođenje reakcije u PTFE mikroreaktoru rezultiralo je iskorištenjem FAME od svega 8,9 % za vrijeme zadržavanja od 3 sata. Razlog tomu jest

smanjenje brzine prijenosa tvari kao posljedica povećanja promjera mikrokanala u odnosu na prethodno opisani stakleni mikroreaktor. Stoga je sinteza biodizela u PTFE mikroreaktoru dodatno optimizirana kako bi se povećalo iskorištenje na FAME [28]. Tako je uz veliki suvišak metanola (metanol: ulje = 90:1) postignuto 98 %-tno iskorištenje na FAME za vrijeme zadržavanja od 2 sata [4]. Povećanje iskorištenja na FAME moguće je i povećanjem vremena zadržavanja, ali se na ovaj način ne postiže značajno unaprjeđenje procesa. Isto tako, povećanjem koncentracije enzima u ulaznoj procesnoj struji moguće je povećati konverziju, odnosno iskorištenje na biodizelu, ali se ni na ovaj način ne postiže značajnije unaprjeđenje procesa, a s obzirom na visoku cijenu enzima ovakav pristup nije ekonomski opravdan. Najveći utjecaj na iskorištenje FAME pokazala je provedba sinteze biodizela uz velik suvišak metanola, odnosno povećanje omjera metanol:ulje u ulaznoj procesnoj struji (tablica 3) [28].

Tablica 3. Utjecaj vremena zadržavanja, koncentracije enzima i omjera metanol:ulje na iskorištenje FAME [28]

Utjecaj vremena zadržavanja		Utjecaj koncentracije enzima		Utjecaj omjera metanol:ulje	
$\tau$ (min)	iskorištenje FAME (%)	$\gamma_E$ (mg/mL)	iskorištenje FAME (%)	metanol:ulje	iskorištenje FAME (%)
180	8,849	0,1	8,849	3,4:1	8,849
270	9,729	0,2	9,505	17:1	40,938
360	1,245	0,3	10,282	34:1	87,179

## 2.4. Pročišćavanje biodizela

Pročišćeni biodizel dobiven procesom transesterifikacije podrazumijeva biodizel iz kojega su uklonjeni glicerol, neizreagirani trigliceridi i alkohol, katalizator te saponifikacijom nastali sapun. Do reakcije saponifikacije ne dolazi u slučaju kada se primjenjuje enzim lipaza kao katalizator u reakciji transesterifikacije te je time pojednostavljeno pročišćavanje biodizela.

Glicerol ima veću gustoću ( $1260 \text{ kg/m}^3$ ) od biodizela koja prema EN 14214 [19] mora biti između  $860$  i  $900 \text{ kg/m}^3$  [31]. Sukladno tome, nakon sinteze biodizela dolazi do formiranja dva sloja pri čemu je donji sloj faza bogata glicerolom, dok je gornji sloj faza bogata biodizelom u kojoj se mogu nalaziti tragovi glicerola, neizreagirani trigliceridi i alkohol, katalizator te saponifikacijom nastali sapun [10]. Prema nekim istraživanjima 60 do 80 % ukupnih troškova u proizvodnji biodizela otpada na njegovo pročišćavanje. Nakon dekantiranja, odnosno odvajanja glicerola od sirovog biodizela, potrebno je iz faze bogate biodizelom ukloniti alkohol. Na taj način pročišćeni biodizel nije moguće koristiti kao gorivo već je iz njega potrebno ukloniti tragove glicerola, sapuna, katalizatora, metanola, vode, ulja, čak i metala [32]. Prema europskoj normi EN 14214 [19] čistoća biodizela mora biti veća od 96,5 %.

Jedna od metoda pročišćavanja biodizela je ispiranje vodom, a ova metoda je poznata i kao mokro pranje. Mokro pranje se najviše koristi u industrijskoj proizvodnji biodizela, a najveći nedostatak ove metode je nastajanje velikih količina otpadnih voda koje je potrebno zbrinuti na odgovarajući način. Prema nekim istraživanjima potrebno je 10 litara vode kako bi se pročistila jedna litra biodizela uz zadovoljene propisane standarde [32]. Zbrinjavanje otpadnih voda nastalih procesom mokrog pranja predstavlja velik ekološki problem, ali i trošak.

Druga metoda pročišćavanja biodizela, suho pranje, provodi se uz korištenje različitih absorbensa, otapala ili ionskih izmjenjivača [6]. Smole koje su sastavni dio ionskih izmjenjivača teško se regeneriraju što je ujedno i najveći problem njihova korištenja pri pročišćavanju biodizela.

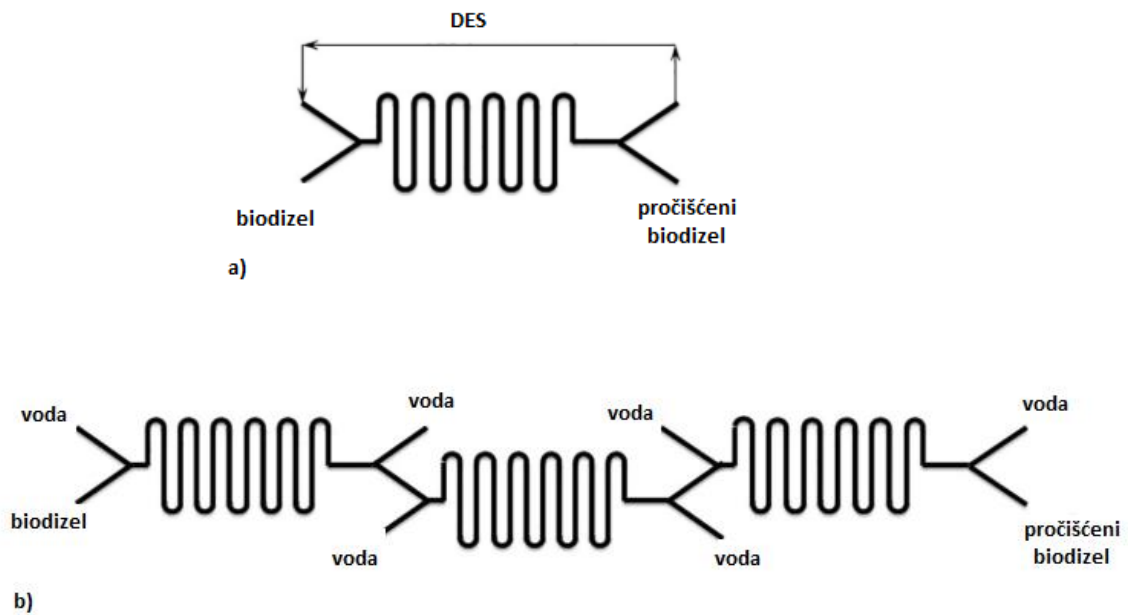
Današnja istraživanja povezana s pročišćavanjem biodizela usmjerena su prema korištenju membranskih procesa i ekstrakciji primjenom eutektičkih otapala.

Eutektička otapala (DES, engl. *Deep Eutectic Solvents*) pripadaju skupini “zelenih”, sigurnih otapala [33, 34, 35]. Nehlapljiva su, nezapaljiva i neotrovna, a mogu se jednostavno prirediti iz jeftinih komponenti [33]. Eutektička otapala pokazala su se dobrom alternativom za pročišćavanje biodizela iako je do sada njihova upotreba bila ograničena na šaržne procese. S obzirom na provedena preliminarna istraživanja te sve prednosti mikroekstraktora za očekivati je kako će se eutektička otapala uspješno i učinkovito primijeniti i u ovoj vrsti procesa pročišćavanja biodizela. Zbog malih dimenzija mikroseparatora i mikroekstraktora, smanjen je utjecaj difuzije na prijenos tvari u separaciji, odnosno on postaje zanemariv, a



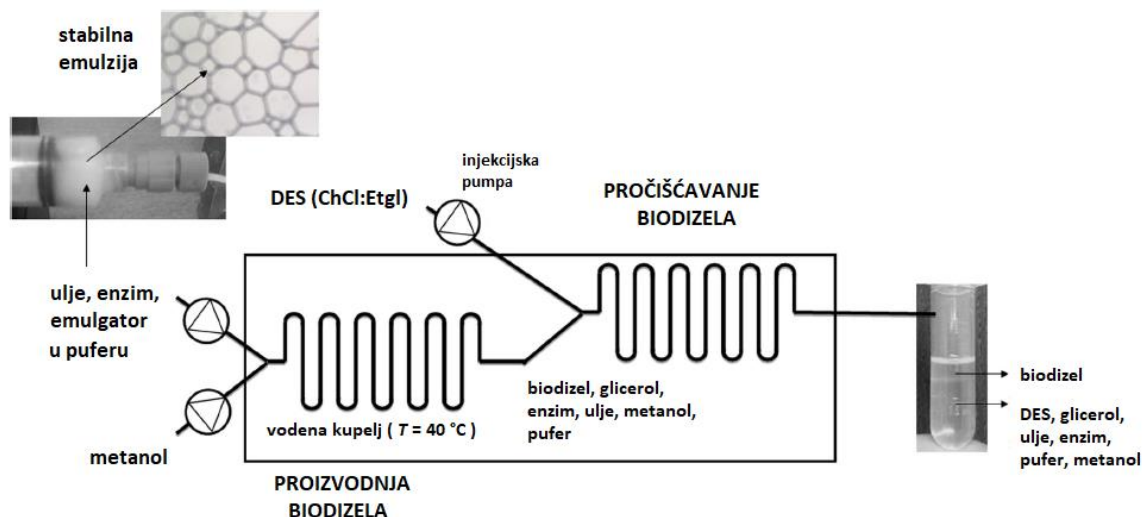
omjer površine i volumena je velik što zajedno utječe na povećanje učinkovitosti procesa ekstrakcije. Pročišćavanje sirovog biodizela sintetiziranog iz suncokretovog ulja i otpadnog jestivog ulja uspješno je provedeno eutektičkim otapalima u mikroekstraktoru [32]. Nakon sinteze u šaržnom reaktoru, biodizel je odvojen od glicerolne faze dekantiranjem u lijevku za odjeljivanje te je na taj način, nakon 24 sata, uklonjeno 97 % glicerola iz sirovog biodizela. Isti postupak je ponovljen kroz identično vremensko razdoblje čime je uklonjeno dodatnih 2,7 % zaostalog glicerola iz faze biodizela. Kako bi propisani standardi čistoće biodizela bili zadovoljeni (udio zaostalog glicerola u biodizelu manji od 0,02%), pročišćavanje se može nastaviti filtracijom, a potom centrifugiranjem. Nakon toga, udio zaostalog glicerola u biodizelu iznosio je svega 0,09 %.

Za uklanjanje malih, zaostalih količina glicerola u biodizelu korištena su eutektička otapala i mikroekstraktori. Velik je broj čimbenika koji utječu na uspješnost ekstrakcije od kojih su najvažniji temperatura, vrijeme trajanja ekstrakcije i odabir pogodnog ekstrakcijskog sredstva [32]. Eutektičko otapalo  $\text{ChCl}:\text{EtGl}$  korišteno je za pročišćavanje biodizela jer se prethodno pokazao uspješnim u razvoju integriranog sustava za sintezu i pročišćavanje biodizela. Nakon procesa pročišćavanja pomoću  $\text{ChCl}:\text{EtGl}$  eutektičkog otapala, udio glicerola u biodizelu bio je manji od 0,02% [4]. Kada je za uklanjanje glicerola u mikroekstraktoru kao otapalo korištena voda na način da je omjer sirovog biodizela i vode bio 1:5,5, učinkovitost procesa od 75,19 % je postignuta za vrijeme zadržavanja od 8,3 s. Ukoliko se kao ekstrakcijsko sredstvo koristio DES na bazi kolin klorida i etilen glikola, pri čemu je omjer sirovog biodizela bio 1:0,65, postignuta je učinkovitost procesa ekstrakcije od 98,35 % za vrijeme zadržavanja od 174 s. Iako je proces s eutektičkim otapalom trajao duže u odnosu na onaj proveden s vodom, veća učinkovitost procesa ekstrakcije postignuta je uz manju količinu korištenog eutektičkog otapala. Kako bi se proces pročišćavanja biodizela eutektičkim otapalima dodatno unaprijedio, razvijena su i eutektička otapala s različitim udjelom vode kao što je primjerice ono na bazi etilen glikola, glicerola i vode čijom primjenom se iz sirovog biodizela mogu ukloniti i ostala prisutna onečišćenja kao što je to primjerice  $\text{KOH}$  koji se može koristiti kao katalizator u transesterifikaciji. Provedena istraživanja su očekivano pokazala kako je ekstrakcija brža u mikroekstraktorima s kanalima manjih promjera jer je u takvim sustavima manji utjecaj difuzije, iako je korištenje mikrokanala većih promjera rezultiralo većim kapacitetom uređaja i posljedično većom količinom pročišćenog biodizela. U okviru ovih istraživanja razvijeni su različiti sustavi za pročišćavanje biodizela na mikrorazini od kojih je dio shematski prikazan na slici 8 [32].



Slika 8. Shematski prikaz sustava za pročišćavanje biodizela u mikroekstraktorima uz korištenje a) eutektičkih otapala b) vode [32]

Osim što eutektička otapala odlikuje veća učinkovitost i veći kapacitet u odnosu na vodu, njihovom primjenom se generira manje otpada, a moguće ih je i reciklirati i regenerirati [32]. Uz to mikroekstrakcijski sustav za pročišćavanje biodizela može se jednostavno integrirati s mikroreaktorom za njegovu sintezu. Primjer takvog integriranog sustava za proizvodnju i pročišćavanje biodizela na serijski spojenima mikroreaktoru i mikroekstrektoru prikazan je na slici 9 [10].



Slika 9. Integrirani mikrosustav za proizvodnju i pročišćavanje biodizela [10]

## 2.5. Imobilizacija enzima

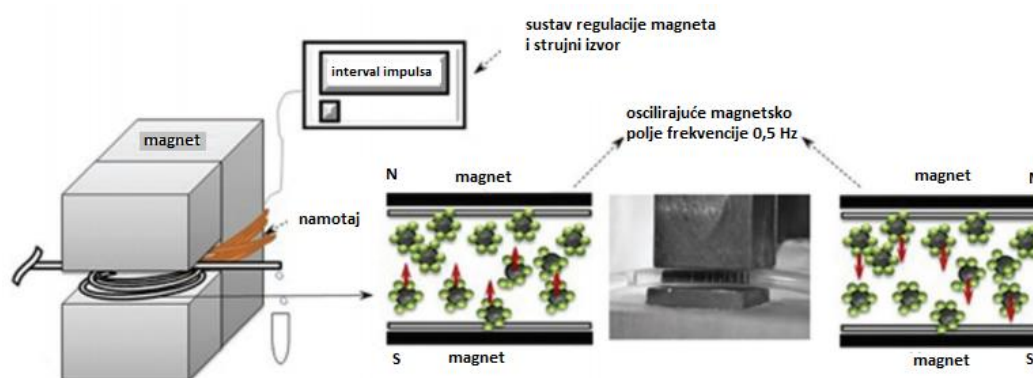
Kako bi se maksimalno povećao potencijal za upotrebu enzima kao katalizatora u (bio)kemijskim reakcijama sve se više primjenjuju imobilizirani enzimi. Enzimi u imobiliziranoj formi pokazuju bolju toplinsku i operativnu stabilnost pri različitim pH-vrijednostima i drugim reakcijskim uvjetima [36]. U odnosu na klasično suspendirani enzim, pokazuju veću otpornost na denaturaciju kojom dolazi do slabljenja funkcija enzima.

Jedan od načina imobilizacije enzima je imobilizacija na nanočestice koje su pokazale brojne prednosti pri korištenju u mikroreaktorskim sustavima. Magnetne nanočestice su zbog svoje biokompatibilnosti i male veličine pogodne za korištenje u biokatalizi koja se provodi u mikroreaktorima, iako je potencijal njihove primjene velik i u cijelom području kemijskog reakcijskog inženjerstva. Upotreba magnetnih nanočestica kao nosača katalizatora zahtjeva manje količine katalizatora, a na kraju provedbe kemijske reakcije moguće ih je lagano ukloniti iz reakcijske smjese pomoću magneta.

U praksi se najčešće primjenjuju magnetne nanočestice na osnovi željezovih oksida kao što su magnetit ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemit ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) i hematit ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Magnetne nanočestice su u pravilu čvrste podloge na koje su vezane biomolekule, a karakterizira ih velik omjer površine i volumena te su zbog svojih dimenzija pogodne za korištenje u mikroreaktorima. Njihov raspored i položaj u mikroreaktoru lako se kontrolira vanjskim magnetom kojim se jednostavno i uklanjaju iz sustava [8]. Osim što osiguravaju potencijalno veliku reakcijsku

površinu, zbog svoje veličine odlikuje ih i manji otpor prijenosu tvari. Kako bi se neka organska tvar vezala na površinu nanočestice, potrebno je površinu nanočestica modificirati za što se koriste različite kemikalije, ali se modifikacija površine nanočestica može provesti i pomoću laserskih zraka [37].

Jedan od načina zadržavanja magnetnih nanočestica s imobiliziranim enzimom u mikroreaktoru je i primjena elektromagneta s oscilirajućim magnetskim poljem. Korištenjem oscilirajućeg magnetskog polja, čiju frekvenciju i snagu je moguće regulirati, osigurava se pomicanje magnetnih nanočestica po cijeloj površini poprečnog presjeka kanala mikroreaktora čime su sve raspoložive čestice, odnosno sav imobilizirani enzim dostupni za molekule reaktan(a)ta (slika 10). Na ovaj način se za razliku od slučaja kada se za zadržavanje nanočestica u mikroreaktoru koristi permanentni magnet povećava dostupnost enzima za provedbu reakcije jer se u slučaju korištenja permanentnog magneta nanočestice grupiraju uz dio mikrokanala uz kojeg se magnet postavlja [8].



Slika 10. Mikroreaktorski sustav s oscilirajućim magnetskim poljem za provedbu (bio)kemijskih reakcija kataliziranih enzimom imobiliziranim na magnetne nanočestice [8]

### 3. Eksperimentalni dio

U okviru ovog istraživanja provedena je sinteza biodizela u mikroreaktorima reakcijom transesterifikacije kataliziranom enzimom lipaza podrijetlom iz *Thermomyces lanuginosus* (TIL). Kao ulazne procesne struje u mikroreatore su uvođeni metanol, ulje i enzim, a ovisno o tipu korištenog mikroreaktora ove komponente su uvođene kao čiste tvari ili u obliku emulzije. Stvaranje emulzije potpomognuto je korištenjem emulgatora, natrij dodecilsulfata (SDS). Reakcija je provedena u PTFE mikroreaktorima različitih dimenzija, s dva ili tri ulaza. Procesna struja po izlazu iz mikroreaktora uvođena je u mikroekstraktor za pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom na bazi kolin klorida te je na taj način razvijen integrirani sustav za kontinuiranu proizvodnju i pročišćavanje biodizela. U takvom integriranom sustavu korišten je enzim imobiliziran na magnetne nanočestice u mikroreaktoru smještenom u magnetnom polju.

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

U istraživanjima provedenim u okviru ovog rada korištene su sljedeće kemikalije: acetonitril (Fisher Chemicals, UK), arapska guma (Sigma-Aldrich Handels GmbH, Austrija), enzim lipaza, *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L) (Sigma-Aldrich Handels GmbH, Austrija), etanol (Gram-Mol, Hrvatska), F.A.M.E. mix GLC-10 (Sigma-Aldrich Handels GmbH, Austrija), heksanol (Sigma-Aldrich Handels GmbH, Austrija), izoamil-alkohol (Sigma-Aldrich Handels GmbH, Austrija), jestivo suncokretovo ulje (Zvijezda, Hrvatska), kalij dihidrogenfosfat (Lach:ner, Češka), kalij hidrogenfosfat (Merck, Njemačka), kalijev hidroksid (Lach:ner, Češka), kloroform (Fisher Chemicals, UK), klorovodična kiselina (BDH Prolabo, UK), metanol (BDH Prolabo, UK), natrij dodecilsulfat (SDS) (BDH Prolabo, UK, Sigma-Aldrich Handels GmbH, Austrija), p-nitrofenil acetat (Acros Organics, Belgija), polysorbate 40 (Tween 40) (ACROS Organics, UK), span 80 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Španjolska), triton X-100 (Fluka Chemie GmbH, Švicarska), tris(hidroksimetil) aminometan (TRIS) (BDH Prolabo, UK), tween 80 (BDH Prolabo, UK, Sigma-Aldrich Handels GmbH, Austrija).

### 3.1.2. Oprema

U istraživanjima provedenim u okviru ovog rada korištena je sljedeća oprema: Magnetska miješalica (MS-H-S, DLAB, SAD), magnetska miješalica (Tehtnica Rotamix S-10), miješalica (Tehtnica VIBROMIX 313EVT), pH elektroda (SCHOTT Instruments, Lab 860, Njemačka), plinski kromatograf (Shimadzu GC-2014, Tokyo, Japan opremljen ionizacijskim detektorom (Zebron ZB-wax, SAD) i kapilarnom kolonom (Phenomenex, Torrance, SAD)), PTFE mikroreaktori (Micronit Microfluidics B.V., Nizozemska) spektrofotometar (Shimadzu, UV-1601, Kyoto, Japan), tresilica (MRC Orbital Shaker, Njemačka), tresilica s regulacijom temperature (MRC Orbital Shaker Incubator, Njemačka), tresilica (ThermoMixer C, Eppendorf, Njemačka), ultrazvučna sonda (Bandelin Sonoplus HD 3100, Njemačka), visokotlačna injekcijska pumpa (NE-4000 Syringe Pump, New Era Pump Systems, SAD), visokotlačna injekcijska pumpa (PUMP33, Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, SAD), visokotlačna injekcijska pumpa (PHD 4400 Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, SAD), vodena kupelj (Thermomix 1420, Njemačka), vodena kupelj (THERMOMIX 1460), vortex (MX-S, DLAB, Kina).

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema otopina

Pufer za provođenje reakcije, 0,01 mol/L kalij-kalij fosfatni pufer (pH = 7,4), pripremljen je miješanjem 0,01 mol/L otopine kalij dihidrogen fosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) i 0,01 mol/L otopine kalij hidrogen fosfata ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) do postizanja pH = 7,4. pH-vrijednost je podešena na 7,4 dodavanjem otopine  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u otopinu  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . 0,01 mol/L otopina kalij dihidrogen fosfata pripremljena je otapanjem 0,136 g kalij dihidrogen fosfata u 100 mL destilirane vode dok je 0,01 mol/L otopina kalij hidrogen fosfata pripremljena otapanjem 0,174 g kalij hidrogenfosfata u 100 mL destilirane vode. Promjena pH-vrijednosti pri pripremi pufera praćena je pomoću pH elektrode (SCHOTT Instruments, Lab 860) uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici (Tehtnica Rotamix S-10) pri 25 °C.

Pufer za mjerenje aktivnosti, 0,05 mol/L TRIS (tris(hidroksimetil) aminometan)-HCl (pH = 8), pripremljen je miješanjem 0,05 mol/L otopine TRIS-a i 1 mol/L klorovodične kiseline (HCl) do postizanja pH = 8. Pufer je pripremljen na način da je prvo otopljeno 0,607 g TRIS u 100 mL destilirane vode. Željena vrijednost pH = 8 postignuta je dodavanjem 1 mol/L vodene otopine HCl u otopinu TRIS-a. Promjena pH-vrijednosti praćena je pomoću

pH elektrode (SCHOTT Instruments, Lab 860) uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici (Tehtnica Rotamix S-10) pri 25 °C.

### 3.2.2. Mjerenje aktivnosti enzima – spektrofotometrijska metoda (metoda 1.)

Aktivnost enzima lipaza određena je temeljem reakcije hidrolize 1,5 mol/L otopine *p*-nitrofenil acetata u acetonitrilu. 100 μL uzorka enzima lipaza dodano je u 3900 μL TRIS-HCl pufera zagrijanog u vodenoj kupelji (THERMOMIX 1460) na 40 °C i homogenizirano. 950 μ tako dobivene otopine preneseno je u kvarcnu kivetu, a mjerenje je započelo dodatkom 50 μL otopine *p*-nitrofenil acetata. Kiveta je postavljena u spektrofotometar (Shimadzu, UV-1601, Kyoto, Japan), a mjerenje je provedeno pri valnoj duljini od  $\lambda = 400$  nm. Za svaki uzorak enzima lipaza su provedena tri paralelna mjerenja u trajanju od 20 s.

Iz dobivene vrijednosti promjene apsorbancije u vremenu  $dA/dt$  ( $\text{min}^{-1}$ ) izračunata je volumna aktivnost, V.A. ( $\text{U cm}^{-3}$ ), enzima lipaze prema jednadžbi:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{dA}{dt}$$

gdje su:  $V_r$  – ukupni volumen uzorka u kiveti ( $\text{cm}^3$ ),  $\varepsilon$  – ekstincijski koeficijent ( $\text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $d$  – širina kivete (cm),  $V_E$  – volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim ( $\text{cm}^3$ ), a  $U$  predstavlja jedinicu enzimске aktivnosti ( $\mu\text{mol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ).

### 3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima – metoda početnih brzina (metoda 2.)

Aktivnost enzima lipaze u različitim koncentracijama SDS-a određena je metodom početnih brzina na temelju provedbe reakcije transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja metanolom u šaržnom reaktoru. Pri tome je ispitan utjecaj koncentracije SDS-a na enzim lipazu o čijoj aktivnosti ovisi brzina reakcije, odnosno brzina nastanka FAME. Reakcija se provodila u plastičnim epruветama od 2 mL u 4 paralele na tresilici (ThermoMixer C, Eppendorf, Njemačka) pri 40 °C i 900 1/min. Prije stavljanja na tresilicu, odnosno pokretanja reakcije, u epruветe je dodana reakcijska smjesa koja se sastojala od metanola, ulja i suspendiranog enzima ( $\gamma = 0,1\text{--}0,3$  mg/mL) u masenom omjeru 3:1:0,1 te je tako dobivena smjesa homogenizirana. Ovoj smjesi je dodan SDS na način da je njegova koncentracija u uzorku iznosila  $\gamma = 0,3$  mg/mL. Po jedna epruвета uklonjena je s tresilice nakon 1, 3, 5 i 10 minuta provedbe reakcije. Nakon provedbe reakcije uzorak je analiziran na plinskom

kromatografu. Iz tako određene ovisnosti koncentracija FAME o vremenu provedbe reakcije određena je volumna aktivnost enzima lipaza. U tablici 4. prikazani su početni sastavi reakcijske smjese korišteni pri mjerenju aktivnosti enzima ovom metodom.

Tablica 4. Početni sastavi reakcijske smjese korišteni za mjerenje aktivnosti enzima metodom početnih brzina (metoda 2.)

Koncentracija enzima (mg/mL)	Koncentracija SDS (mg/mL)	Metanol (mL)	Ulje (mL)	Pufer (mL)
0,3	0	1,5	0,5	0,05
0,1	0	1,5	0,5	0,05
0,1	0,3	1,5	0,5	0,05
0,2	0,3	1,5	0,5	0,05
0,3	0,3	1,5	0,5	0,05

### 3.2.4. Priprava eutektičkih otapala

Kolin klorid (ChCl) i glicerol (Gly) korišteni su za pripremu bezvodnog ChCl:Gly eutektičkog otapala. Nakon vaganja svake komponente prema željenom molarnom omjeru (ChCl:Gly = 1:3), komponente su stavljene u Schottovu bocu ( $V = 50$  ml) i pomiješane na magnetskoj miješalici (MS-H-S, DLAB, SAD) pri 200 1/min i 50 °C. Postupak je proveden 30 - 60 minuta do dobivanja homogene, bezbojne i prozirne kapljevine. Ovako pripremljeni ChCl:Gly DES je zatim ohlađen na temperaturu 25 °C i korišten u pokusima kao ekstrakcijsko sredstvo.

### 3.2.5. Priprava emulzija

Emulzija ulja i enzima pripremljena je na način da je u 27 mL suncokretovog ulja dodano 0,0089 g natrij dodecilsulfata (SDS) te je na taj način masena koncentracija SDS-a u emulziji bila 0,3 g/L. Potom je 2,7 mL razrijeđenog enzima (3 mL enzima lipaza, *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L) dodano je u 7 mL pufera za provođenje reakcije



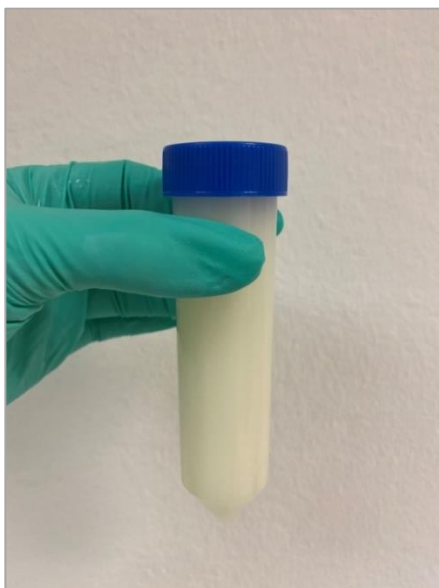
čime je postignuta koncentracija enzima u puferu  $\gamma = 0,3 \text{ g/L}$ ) dodano u smjesu ulja i emulgatora. Emulzija je pripravljena dvjema metodama:

- a) Miješanjem na miješalici do postizanja homogene otopine
- b) Miješanjem pomoću ultrazvučne sonde do postizanja homogene otopine

Priprava emulzije prvom metodom započela je vaganjem spomenutih masa komponenti, koje su se zatim miješale na miješalici (Tehtnica VIBROMIX 313EVT) pri 600 okr/min, približno pola sata do postizanja homogene otopine. Druga metoda pripreve emulzije provedena je na način da je prvo ulje zagrijano na temperaturu  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ , nakon čega su dodani emulgator i razrijeđeni enzim te je ova smjesa homogenizirana korištenjem ultrazvučne sonde (Bandelin Sonoplus HD 3100, Njemačka) u trajanju od 15 min pri frekvenciji od 25 kHz i amplitudi 70 % (slika 11). Emulzija dobivena ovim načinom pripreve prikazana je na slici 12, a sastavi različitih emulzija korištenih u ispitivanju prikazani su u tablici 5.



Slika 11. Ultrazvučna sonda (Bandelin Sonoplus HD 3100, Njemačka)



Slika 12. Emulzija ulje-pufer-enzim-SDS

### **3.2.6. Priprava emulzija različitih koncentracija enzima i emulgatora u svrhu ispitivanja stabilnosti**

S ciljem pronalaska stabilne emulzije ulje-enzim pripremljene su emulzije različitim načinima s različitim koncentracijama emulgatora u području koncentracija 0,1 – 1,0 g/L. Emulzije su prvo pripremljene u Falcon epruvetama volumena 15 mL miješanjem na magnetskoj miješalici (Tehtnica VIBROMIX 313EVT) na način da je u 4,5 mL ulja otopljeno 0,495 mg SDS-a (0,1 g/L). U ovako dobivenu smjesu ulja i emulgatora dodano je 0,45 mL enzima otopljenog u puferu za provođenje reakcije (10 puta razrijeđenog) kako bi se zadovoljio molarni omjer metanol : enzim : ulje = 1,0 : 0,124 : 0,1. Na isti način, dodatkom odgovarajuće mase emulgatora, pripremljene su i emulzije u kojima su koncentracije emulgatora bile 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 i 1,0 g/L. U ovako pripremljenim emulzijama analizirani su stabilnost enzima i moguće raslojavanje emulzija.

Dodatno su pripremljene i emulzije u kojima su koncentracije emulgatora bile 0,1 i 0,3 g/L, a miješanje je provedeno pomoću ultrazvučne sonde (Bandelin Sonoplus HD 3100, Njemačka) na način da je u čaši volumena 50 mL pomješano 30 mL ulja i 0,003 ili 0,009 g SDS-a (za koncentraciju emulgatora od 0,1 odnosno 0,3 g/L). U mješavinu ulja i emulgatora potom je dodano 3 mL enzima otopljenog u puferu za provođenje reakcije (0,3 g/L). Miješanje pomoću ultrazvučne sonde potom je provedeno u trajanju od 15 min na način kako je opisano u poglavlju 3.2.5.

Tablica 5. Sastavi različitih emulzija korištenih u sintezi biodizela priređeni miješanjem na miješalici i pomoću ultrazvučne sonde

	$\gamma$ (enzim) [mg/mL]	$\gamma$ (SDS) [mg/mL]	V(ulje) [mL]	V(pufer) [mL]	način priprave
<b>0.</b>	0,1	0,1	30	3	miješalica
<b>1.</b>	0,3	0,3	30	3	sonda
<b>2.</b>	0,3	0,1	30	3	sonda
<b>3.</b>	0,1	0,1	30	3	sonda
<b>4.</b>	0,1	0,3	30	3	sonda

### 3.2.7. Mjerenje koncentracije metilnih estera masnih kiselina (FAME) i glicerola plinskom kromatografijom

Masena koncentracija metilnih estera masnih kiselina i glicerola određena je plinskom kromatografijom temeljem prethodno pripremljenih baždarnih pravaca. Plinski kromatograf (Shimadzu GC-2014, Tokyo, Japan) je bio opremljen plameno ionizacijskim detektorom (Zebron ZB-wax) i kapilarnom kolonom duljine 30 m, promjera 0,53 mm i debljine 1  $\mu$ m (Phenomenex, Torrance, SAD). Protok plina nosioca, dušika, bio je 1,97 mL/min. Mjerenje je provedeno na temperaturi od 180 °C u trajanju od jedne minute nakon čega se temperatura gradijentno povećavala 5 °C u minuti do temperature 230 °C. Analiza uzorka je provođena 15 minuta. Retencijska vremena za pojedine komponente FAME bila su: palmitinska kiselina 7,740 min, stearinska kiselina 10,590 min, oleinska kiselina 10,867 min, linolna kiselina 11,575 min te linoleinska kiselina 12,615 min dok je retencijsko vrijeme za glicerol, koji je određivan pomoću iste metode, bilo 9,02 min [26].

### 3.2.8. Sinteza biodizela u PTFE mikroreaktoru

Sinteza biodizela provedena je korištenjem dvije različite vrste mikroreaktora s obzirom na broj i oblik ulaza.

Prva vrsta mikroreaktora korištena za sintezu biodizela je bila opremljena s tri ulaza u obliku +-spojnice za odvojeno dovođenje ulja, metanola i enzima lipaza. U pokusima su korišteni reaktori različitih duljina i promjera izrađeni od politetrafluoroetilena (PTFE)

karakterističnih dimenzija: a) duljina: širina: promjer = 30 cm: 1000  $\mu$ m: 1000  $\mu$ m, ukupni volumen 235,62  $\mu$ L i b) duljina: širina: promjer = 120 cm: 500  $\mu$ m: 500  $\mu$ m, ukupni volumen 235,62  $\mu$ L) (Micronit Microfluidics B.V., Nizozemska). Ulazne procesne struje, metanol, enzim i ulje, dovođene su u mikroreaktor pomoću visokotlačnih injekcijskih pumpi (PHD 4400 Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, SAD) u omjerima protoka 1:0,124:1. Uzorci na izlazu iz mikroreaktora su sakupljeni u Mamurnu otopinu (smjesa kloroforma i izoamil alkohola u volumnom omjeru 24 : 1) hlađenoj na ledu koja je korištena za zaustavljanje reakcije deaktivacijom enzima. Sinteza biodizela je provedena pri temperaturi 40 °C na način da je mikroreaktor bio uronjen u vodenu kupelj (Thermomix 1420, Njemačka) (slika 13).

Drugi način sinteze biodizela podrazumijeva upotrebu mikroreaktora s dva ulaza opremljenim s T-spojnicom. U mikroreaktor su pomoću visokotlačnih injekcijskih pumpi (PHD 4400 Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, SAD) odvojeno dovođeni metanol kao jedna ulazna struja, te emulzija ulja i enzima kao druga ulazna struja. Za provođenje pokusa korišteni su isti mikroreaktori opisani prethodno kod sustava za provođenje sinteze biodizela s tri ulaza: a) duljina: širina: promjer = 30 cm: 1000  $\mu$ m: 1000  $\mu$ m, ukupni volumen 235,62  $\mu$ L i b) duljina: širina: promjer = 120 cm: 500  $\mu$ m: 500  $\mu$ m, ukupni volumen 235,62  $\mu$ L) (Micronit Microfluidics B.V., Nizozemska). U ovim pokusima korišten je omjer volumnih protoka metanol:emulzija od 3,09:1. Na izlazu iz mikroreaktora uzorci su sakupljeni u Mamurnu otopinu koja je hlađena na ledu kako bi se zaustavila reakcija. Sinteza biodizela je provedena pri temperaturi 40 °C na način da je mikroreaktor bio uronjen u vodenu kupelj (Thermomix 1420, Njemačka) (slika 14.)

Sakupljeni uzorci razrijeđeni su u etanolu (razrjeđenje 100 puta) i analizirani plinskom kromatografijom na način kako je prethodno opisano.



Slika 13. Aparatura za provedbu sinteze biodizela u mikoreaktoru s tri ulaza opremljenim sa spojnicom +-oblika



Slika 14. Aparatura za provedbu sinteze biodizela u mikoreaktoru s dva ulaza opremljenim sa spojnicom T-oblika

### 3.2.9. Integrirani sustav za sintezu biodizela enzimatskom transesterifikacijom i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom

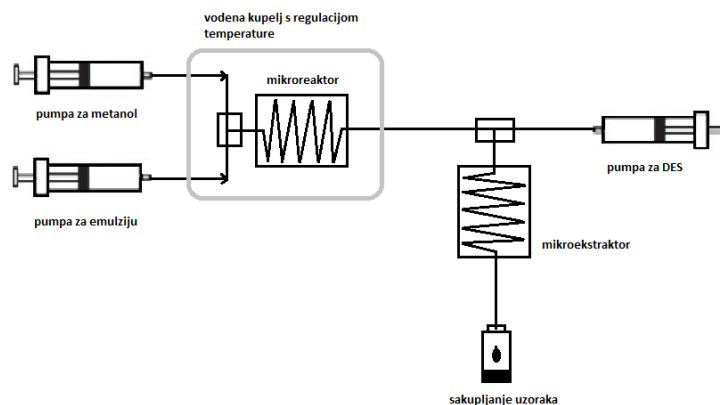
Nakon odabira odgovarajućeg sustava za proizvodnju biodizela u mikoreaktoru pri vremenu zadržavanja koje osigurava dostatan udio FAME u izlaznoj procesnoj struji, razvijen je integrirani sustav za sintezu biodizela enzimatskom transesterifikacijom i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom. Integrirani sustav sastojao se od mikoreaktora za sintezu biodizela i mikroekstraktora za pročišćavanje biodizela spojenih u seriju. Izlazna procesna struja mikoreaktora, reakcijska smjesa, je kao ulazna procesna struja

uvođena u mikroekstraktor, dok je kao druga ulazna procesa struja u dijelu sustava u kojemu se provodila ekstrakcija, pomoću spojnice T-oblika, uvođeno eutektičko otapalo (Slika 15). Za pročišćavanje biodizela je korišteno eutektičko otapalo ChCl:Gly (1:3) koje je dovođeno u mikroekstraktor (duljina: širina: promjer = 30 cm: 1000  $\mu$ m: 1000  $\mu$ m, ukupni volumen 235,62  $\mu$ L) (Micronit Microfluidics B.V., Nizozemska) pomoću visokotlačne injekcijske pumpe (PUMP33, Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, SAD). Omjer volumnih protoka (metanol:emulzija ulje-enzim) u mikroreaktoru iznosio je 3,09:1. Sinteza biodizela provedena je pri 40 °C na način da je mikroreaktor bio uronjen u vodenu kupelj (Thermomix 1420, Njemačka). U mikroseparatoru je omjer volumnih protoka reakcijska smjesa:DES iznosio 1:0,029. Na slici 16. prikazan je shematski prikaz integriranog sustava za sintezu biodizela enzimatskom transesterifikacijom i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom.



Slika 15. Termostatirani integrirani sustav za sintezu biodizela enzimatskom transesterifikacijom i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom (1 – pumpa za metanol, 2 – pumpa za emulziju, 3 – vodena kupelj s regulacijom temperature, 4 – pumpa za DES, 5 – sakupljanje uzorka)





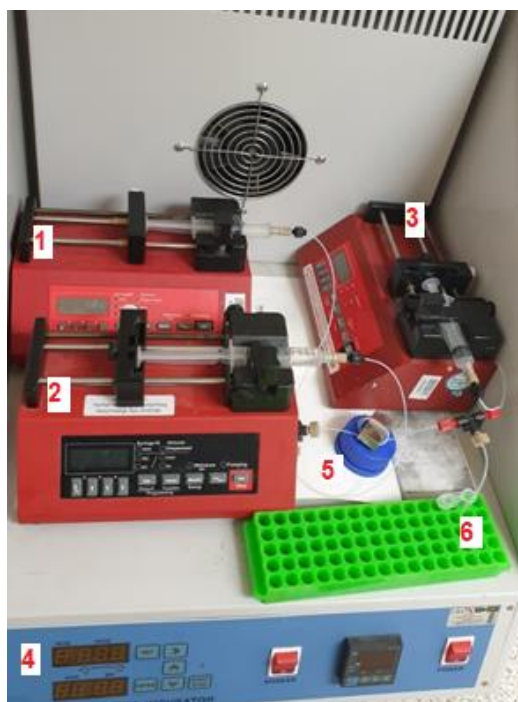
Slika 16. Shematski prikaz integriranog sustava za sintezu biodizela enzimatskom transesterifikacijom i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom

### 3.2.10. Integrirani sustav za sintezu biodizela transesterifikacijom pomoću enzima imobiliziranog na magnetne nanočestice i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom

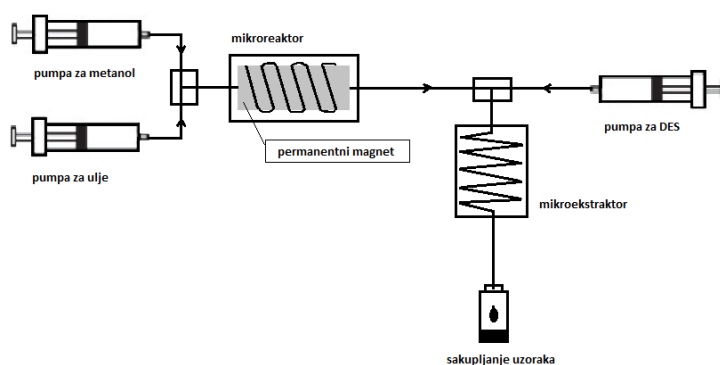
Magnetne nanočestice, koje su prethodno sintetizirane prema postupku opisanom u literaturi [38, 39], izložene su 2 %-tnoj otopini glutraldehida kako bi funkcionalne skupine glutraldehida omogućile imobilizaciju enzima lipaza. Tijekom 2 sata, 5 mg nanočestica miješalo se u 1 mL otopine glutraldehida na tresilici (MRC Orbital Shaker, Njemačka) pri 400 1/min. Nakon toga su nanočestice dva puta isprane fosfatnim puferom (pH = 7,4). Tako ispranim nanočesticama dodao se 1 mL enzima (Lipolase 100L) te je ova suspenzija miješana 28 sati pri 400 1/min. Nanočestice s imobiliziranim enzimom su odvojene od pufera i ostalih komponenata suspenzije upotrebom permanentnog magneta [40].

Tako pripremljene nanočestice s imobiliziranim enzimom su pomoću injekcije unesene u mikoreaktor izrađen od politetrafluoroetilena (PTFE), karakterističnih dimenzija: duljina: širina: promjer = 30 cm: 1000  $\mu$ m: 1000  $\mu$ m, ukupni volumen 235,62  $\mu$ L, u kojemu su zadržane pomoću magnetskog polja. U tako pripremljeni mikoreaktor su kao ulazne procesne struje pomoću visokotlačnih injekcijskih pumpi (NE-4000 Syringe Pump, New Era Pump Systems, SAD) uvođeni metanol i ulje koji prilikom strujanja kroz mikoreaktor prelaze preko magnetnih nanočestica. Po izlasku iz mikoreaktora, reakcijska smjesa je uvođena u serijski spojeni mikroekstraktor pomoću spojnice T-oblika kao jedna procesna struja dok je eutektičko otapalo ChCl:Gly (1:3) uvođeno u mikroekstraktor (duljina: širina: promjer = 30 cm: 1000  $\mu$ m: 1000  $\mu$ m, ukupni volumen 235,62  $\mu$ L) (Micronit Microfluidics B.V., Nizozemska) pomoću visokotlačne injekcijske pumpe (NE-4000 Syringe Pump, New Era Pump Systems, SAD) kao druga procesna struja. Sinteza biodizela u integriranom

sustavu (slika 17.) provedena je pri 40 °C na način da su i mikroreaktor i mikroekstraktor postavljeni u tresilicu (MRC Orbital Shaker, Njemačka) s regulacijom temperature (MRC Orbital Shaker Incubator, Njemačka). Shematski je ovaj sustav prikazan na slici 18.



Slika 17. Integrirani sustav za sintezu biodizela transesterifikacijom pomoću enzima imobiliziranog na magnetne nanočestice i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom (1 – pumpa za uvođenje metanola u sustav, 2 – pumpa za uvođenje ulja u sustav, 3 – pumpa za uvođenje DES-a u sustav, 4 – termostat za regulaciju temperature u sustavu, 5 – permanentni magnet, 6 – sakupljanje uzoraka)



Slika 18. Shematski prikaz integriranog sustava za sintezu biodizela transesterifikacijom pomoću enzima imobiliziranog na nanočestice i pročišćavanje biodizela eutektičkim otapalom



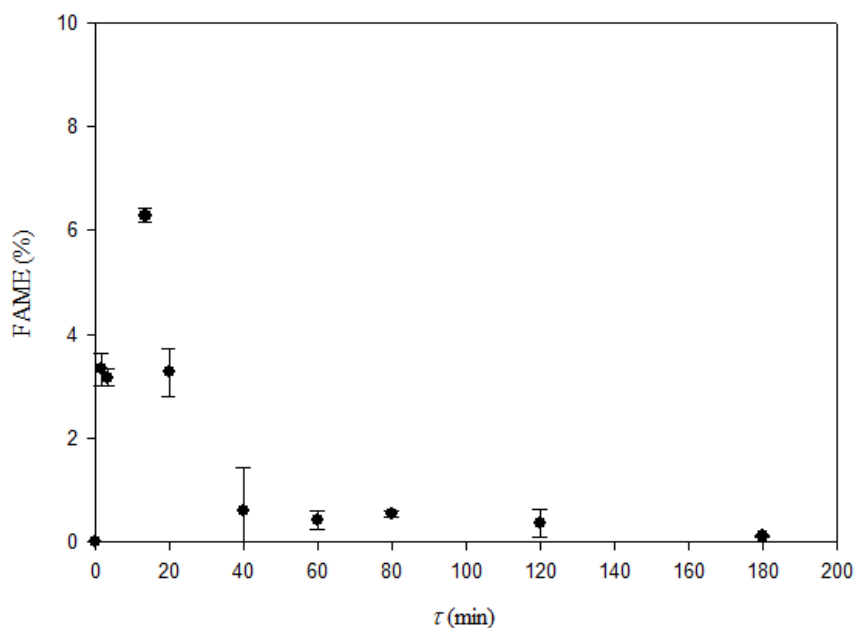
## 4. Rezultati i rasprava

Za enzimatsku sintezu biodizela korišteni su mikroreaktori s tri i dva ulaza. U mikroreaktorskom sustavu s tri ulaza kao zasebne procesne struje uvedeni su enzim, ulje i metanol, dok su u sustavu s dva ulaza kao ulazne procesne struje korišteni emulzija ulja i enzima te metanol. Pokusima provedenim u mikroreaktoru ispitan je utjecaj koncentracije metanola na aktivnost enzima. Razvijen je integrirani mikrosustav u kojem se provodila enzimatska sinteza biodizela i pročišćavanje reakcijske smjese dobivene transesterifikacijom pomoću DES-a. U integriranom sustavu ispitan je utjecaj vremena zadržavanja na udio FAME. Kako bi se proces učinio ekonomski opravdanim, enzim je imobiliziran na magnetske nanočestice i zadržan u mikroreaktoru integriranog sustava pomoću permanentnog magneta kako bi se ispitala mogućnost višekratnog korištenja enzima.

### 4.1. Sinteza biodizela u mikroreaktoru – sustav s 3 ulaza

Za proizvodnju biodizela enzimatskom transesterifikacijom karakteristični su nedostaci povezani s deaktivacijom enzima u prisustvu metanola [2, 4] te mala brzina reakcije u procesima koji se provode u šaržnim reaktorima [21]. U prethodno provedenim istraživanjima transesterifikacije suncokretovog ulja uz stehiometrijsku količinu metanola u šaržnom reaktoru postignut je udio FAME od 96 % za reakciju koja je provedena 24 sata [21]. Nadalje, transesterifikacijom biljnog ulja u mikroreaktoru s tri ulaza postignut je udio FAME od 32 % za vrijeme zadržavanja od 20 min i omjer volumnih protoka ulaznih procesnih struja ulje:metanol:enzim = 10:1,24:1 [28].

U istraživanju provedenom u okviru ovog rada, sinteza biodizela prvo je provedena u mikroreaktoru s tri ulaza opremljenim s +/-spojnicom za odvojeno dovođenje ulja, metanola i enzima. Ulje je u ovaj sustav dovođeno kao središnja procesna struja kako bi se što je više moguće izbjegao kontakt enzima s metanolom i na taj način spriječila deaktivacija enzima. Na slici 19. prikazan je utjecaj vremena zadržavanja na iskorištenje biodizela tijekom transesterifikacije provedene u mikroreaktoru s tri ulaza.

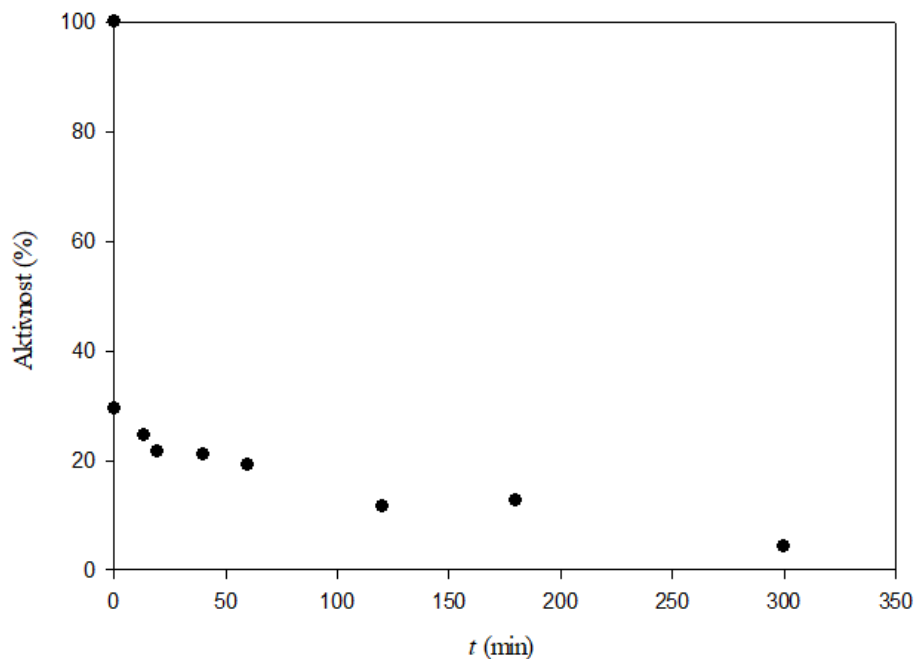


Slika 19. Utjecaj vremena zadržavanja na iskorištenje biodizela tijekom transesterifikacije provedene u mikroreaktoru s tri ulaza

Najveći udio FAME postignut u ovom pokusu iznosio je 6,3 % za vrijeme zadržavanja od 13,48 min. Daljnjim povećanjem vremena zadržavanja udio FAME se smanjuje sve do 0,1 % koji je postignut pri vremenu zadržavanja od 180 min. Mali udio FAME u ovim pokusima vjerojatno je posljedica kontakta enzima i metanola koji se odvio tijekom reakcije iako se njegovo nastajanje pokušalo smanjiti razdvajanjem enzima i metanola na ulazu odnosno postavljanjem ulja kao središnje procesne struje. Kako brzina difuzije u mikroreaktoru, zbog malih dimenzija sustava, nije ograničavajući čimbenik, vjerojatno je unatoč specifičnom načinu uvođenja reaktanata i enzima u mikroreaktor došlo do kontakta metanola i enzima te posljedično do deaktivacije enzima. Ovo je na neki način bilo očekivano jer je poznato da do deaktivacije enzima u prisutnosti organskog otapala dolazi zbog toga što se molekule organskog otapala ponašaju se kao specifični inhibitori u reakcijskoj smjesi, enzim mijenja strukturu u prisustvu organskog otapala i organska otapala utječu na glavna fizikalno-kemijska svojstva reakcijskog sustava, poput polarosti [41].

## 4.2. Ispitivanje utjecaja metanola na aktivnost enzima lipaza

S obzirom na male vrijednosti iskorištenja biodizela u pokusu provedenom pri velikom suvišku metanola, provedeno je ispitivanje utjecaja metanola na aktivnost enzima lipaza, kako bi se potvrdio negativni utjecaj velikog suviška metanola na postavljeni sustav. Pri tome je korišten enzim lipaza iste koncentracije kao i u prethodno provedenom procesu transesterifikacije ( $\gamma = 0,3 \text{ g/L}$ ) koji je bio pomiješan s metanolom u masenom omjeru = 0,124:1. Aktivnost enzima određena je spektrofotometrijski kroz vrijeme od 300 min. Referentna aktivnost u  $t = 0$  određena je za otopinu enzima u puferu. Grafički prikaz deaktivacije enzima lipaza metanolom prikazan je na slici 20.

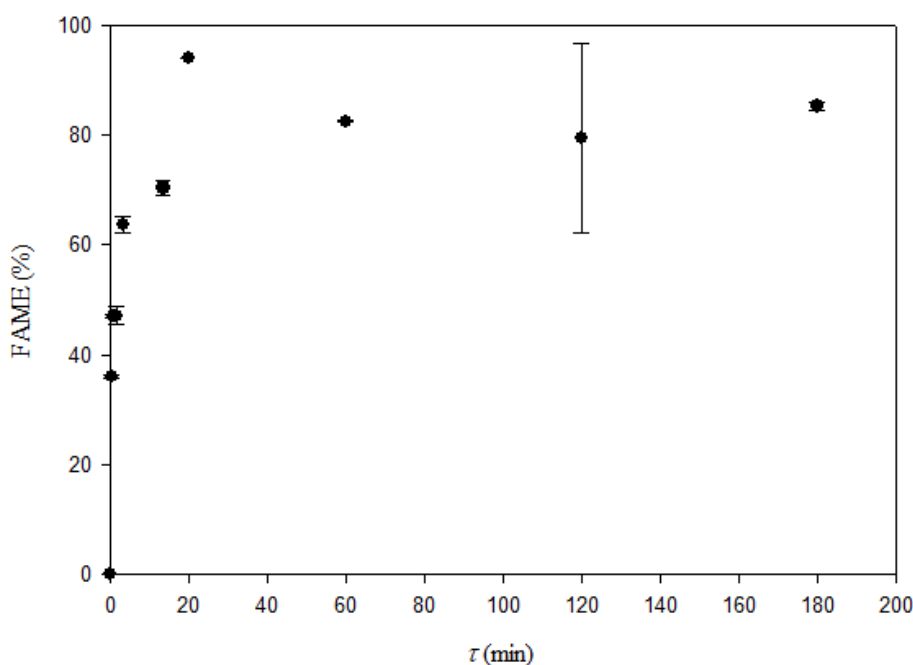


Slika 20. Dinamička promjena aktivnosti enzima u prisustvu metanola

Već nakon jedne minute, aktivnost enzima pada na 30 % početne aktivnosti te se kontinuirano smanjuje do kraja provedenog ispitivanja koja je u vremenu,  $t = 300 \text{ min}$  iznosila 4,18 % početne vrijednosti. Smanjenje aktivnosti enzima lipaza pod djelovanjem metanola snažno utječe na iskorištenje sinteze biodizela. U prisustvu polarnih otapala, kao što je metanol, koji imaju sposobnost raskinuti vezu enzima i molekula vodene faze te na taj način prodrijeti u strukturu enzima, očekivano je smanjenje aktivnosti zbog narušavanja strukture enzima [41].

### 4.3. Sinteza biodizela u mikroreaktoru – sustav s 2 ulaza

U sintezi biodizela koja je provedena u mikroreaktoru s dva ulaza iskorišteno je svojstvo enzima lipaza da zajedno s uljnom fazom formira emulzije uz dodatak emulgatora [22]. Zbog malog udjela FAME dobivenog sintezom biodizela u mikroreaktoru s tri ulaza, u nastavku rada korišten je mikroreaktor sa dva ulaza gdje su ulazne procesne struje bile metanol i emulzija ulje-enzim. Emulzija ulja i enzima ( $\gamma = 0,1 \text{ g/L}$ ) napravljena je dodatkom emulgatora SDS-a ( $\gamma = 0,1 \text{ g/L}$ ). Očuvanje aktivnosti enzima moguće je uvođenjem enzima u sustav u obliku emulzije, unatoč suvišku metanola. Utjecaj vremena zadržavanja na iskorištenje biodizela tijekom transesterifikacije provedene u mikroreaktoru opremljenom s dva ulaza prikazan je na slici 21.



Slika 21. Utjecaj vremena zadržavanja na iskorištenje sinteze biodizela tijekom transesterifikacije provedene u mikroreaktoru s 2 ulaza

Za manja vremena zadržavanja udio FAME se povećava do vrijednosti  $94,0 \pm 3,1 \%$  koje je ostvareno za vrijeme zadržavanja od  $\tau = 20 \text{ min}$ . U prijašnjim istraživanjima, udio FAME u opisanom sustavu iznosio je preko  $94,0 \%$ , ali za vrijeme zadržavanja od 2 sata čime je pokazana ponovljivost rezultata [4]. Daljnjim povećanjem vremena zadržavanja udio FAME pada te je iznosio  $82,5 \%$  za vrijeme zadržavanja od  $\tau = 60 \text{ min}$  i ne mijenja se značajnije za sva preostala analizirana veća vremena zadržavanja. Pri provedbi ovih pokusa opaženo je da pri većim vremenima zadržavanja dolazi do razdvajanja komponenata emulzije ulje-enzim što ima za posljedicu da u reaktor ne ulazi homogena smjesa komponenata

emulzije. Moguće je da je stoga pri većim vremenima zadržavanja u mikroreaktor uvedeno manje enzima što je utjecalo na smanjenje udjela FAME. Zbog ovoga nije bilo moguće istražiti ponovljivost pokusa, a ovakav sustav nije ni pogodan za provedbu pokusa u integriranom sustavu, s obzirom da takav sustav zahtijeva provođenje reakcije u dužem vremenskom periodu. Zbog toga je u nastavku istraživanja ispitan utjecaj različitih čimbenika koji mogu utjecati na pripravu i stabilnost emulzije ulje-enzim.

#### 4.4. Priprava i stabilnost emulzije ulje-enzim

S ciljem pronalaska stabilne emulzije ulje-enzim pripremljene su različitim načinima emulzije s različitim koncentracijama emulgatora u području koncentracija 0,1 – 1,0 g/L.

Proveden je test stabilnosti različitih emulzija, odnosno ispitano je moguće raslojavanje emulzija nakon pripreme. U tu svrhu pripravljene su emulzije miješanjem ulja, enzima otopljenog u puferu za provođenje reakcije (razrjeđenje 10 puta) i SDS na način da je masena koncentracija SDS-a u emulzijama bila 0,1, 0,15, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 i 1,0 g/L. Na slici 22. prikazane su emulzije netom nakon pripreme, dok su na slici 23. prikazane emulzije 24 sata nakon pripreme. Vidljivo je da je tijekom 24 sata došlo do raslojavanja svih emulzija bez obzira na koncentraciju SDS-a u emulziji.



Slika 22. Ispitivanje utjecaja koncentracije emulgatora SDS-a na stabilnost emulzija – izgled emulzija neposredno nakon pripreme



Slika 23. Ispitivanje utjecaja koncentracije emulgatora SDS-a na stabilnost emulzija – izgled emulzija 24 sata nakon pripreve

Ni jedna emulzija 24 sata nakon pripreve nije ostala stabilna, bez obzira na korištenu koncentraciju SDS-a. U svakoj emulziji došlo je do odvajanja faza koje se odvijalo različitim brzinama. Na temelju izmjerenih vrijednosti visina slojeva emulzija, izračunato je da se najsporije razdvajala emulzija koncentracije SDS-a od 0,3 g/L i to približnom brzinom od 0,0007 mm/s. Unatoč različitim metodama pripreve emulzija, različitim redoslijedom miješanja i dodavanja komponenti, sve emulzije su se nakon 24 sata razdvojile.

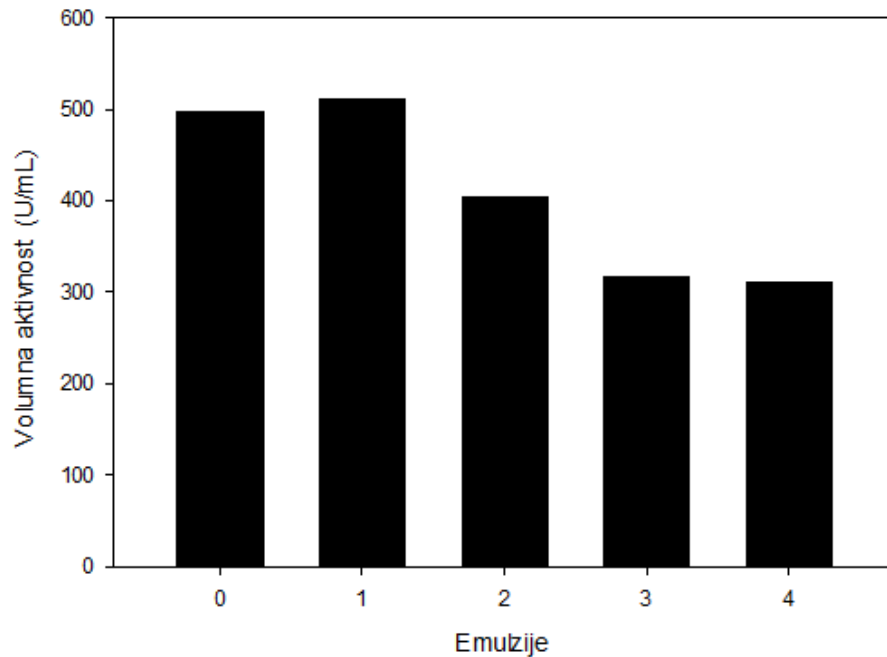
#### **4.5. Ispitivanje ovisnosti koncentracije enzima i koncentracije emulgatora na aktivnost enzima**

Pomoću miješalice i ultrazvučne sonde pripravljene su smjese i emulzije različitih koncentracija enzima i emulgatora (Tablica 5). Osim emulzije pripravljene na magnetskoj miješalici, u kojoj je koncentracija enzima bila 0,1 g/L, pomoću ultrazvučne sonde pripravljena je i emulzija u kojoj je koncentracija enzima bila 0,3 g/L. Na ovaj način se ispitao i utjecaj povećanja koncentracije enzima na stabilnost emulzije, kao i aktivnost enzima unutar same emulzije. Treba istaknuti da osim deaktivacije enzima zbog djelovanja ostalih komponenata koje tvore emulziju može doći i prilikom drugačijeg miješanja komponenti, zagrijavanja te hlađenja smjese, što se događa prilikom miješanja pomoću ultrazvučne sonde [42].

Emulzija 0. napravljena je kao referentna emulzija koja je prilikom mjerenja aktivnosti enzima služila za usporedbu s emulzijama pripremljenim ultrazvučnom sondom. Emulzije 1.-4. napravljene su pomoću ultrazvučne sonde, s različitim koncentracijama enzima lipaze i emulgatora SDS-a (prikazanim u Tablici 5.) Najstabilnijom emulzijom pokazala se emulzija 1 u kojoj su koncentracije enzima i emulgatora bile 0,3 g/L. Ovim

pokusom pokazano je da je stabilnost emulzije veća kod većih koncentracija emulgatora u emulziji s obzirom da se emulzija 2 ( $\gamma(\text{SDS}) = 0,1 \text{ g/L}$ ,  $\gamma(\text{enzim}) = 0,3 \text{ g/L}$ ) razdvojila netom nakon pripreve.

Na slici 24. prikazana je volumna aktivnost enzima u sustavima koji su u tablici 5. označeni kao 0, 1, 2, 3 i 4.



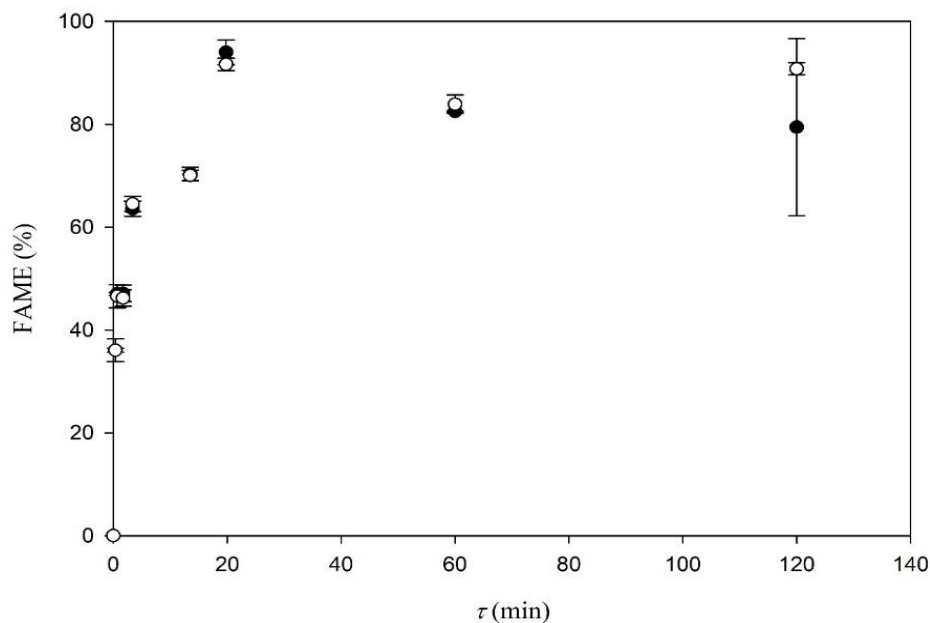
Slika 24. Volumna aktivnost enzima u emulzijama različitih koncentracija enzima i emulgatora

Uz stabilnost emulzije promatrana je i aktivnost enzima u pripremljenim emulzijama. Aktivnost enzima mjerena je metodom početnih brzina, na temelju reakcije transesterifikacije. Emulzija 0. je referentna emulzija korištena u ranijim eksperimentima [43], međutim njena smanjena stabilnost je razlog ispitivanja novoga načina pripreve emulzije. Kako bi se istraživanja mogla nastaviti, ali i uspoređivati s prethodno dobivenim rezultatima (slika 21.), uspoređivane su aktivnosti enzima u emulziji 0. s aktivnošću enzima u emulzijama 1.-4. Najveća aktivnost enzima lipaze dobivena je u emulziji 1 koja je pripremljena pomoću ultrazvučne sonde s jednakom koncentracijom enzima i emulgatora od 0,3 g/L. Kako je ova emulzija i najstabilnija, korištena je u svim pokusima provedenim u nastavku istraživanja.

## 4.6. Sinteza biodizela u mikoreaktoru – sustav s 2 ulaza i novom emulzijom

Kako bi proces proizvodnje biodizela dobio na dodatnoj ekološkoj opravdanosti, kao sirovina za sintezu biodizela u nastavku istraživanja korišteno je i otpadno ulje koje je dostupno u velikim količinama [44]. Iz literature je poznato kako se transesterifikacijom otpadnog ulja uz katalizator KOH (2%) u omjeru metanol:otpadno ulje = 9:1 mogu dobiti visoki udjeli FAME (92 %) [45].

U ponovljenom eksperimentu sinteze biodizela u mikoreaktoru opremljenom s dva ulaza, korištena je nova emulzija, pripremljena miješanjem ulja, enzima i emulgatora pomoću ultrazvučne sonde u kojoj je koncentracija enzima i SDS-a bila jednaka (0,3 g/L). Sinteza je provedena u PTFE mikoreaktoru promjera 1 mm, a u pokusima su korišteni jestivo i otpadno ulje. Na slici 25. prikazani su rezultati ovog pokusa.



Slika 25. Utjecaj vremena zadržavanja na iskorištenje biodizela u mikoreaktoru opremljenom s 2 ulaza (● – jestivo ulje, ○ – otpadno ulje)

Za vremena zadržavanja do 120 minuta ne postoji značajna razlika između iskorištenja FAME u sintezi provedenoj s jestivim i otpadnim uljem. Iskorištenje se s povećanjem vremena zadržavanja povećava te je pri vremenu zadržavanja  $\tau = 20$  min ono približno 90 % za obje vrste korištenog ulja. Značajnija razlika u iskorištenju FAME javlja se kod vremena zadržavanja  $\tau = 120$  min, gdje je ono za jestivo ulje približno 80 % dok je za otpadno ulje približno 90 %. Ova razlika može se objasniti činjenicom da jestivo ulje čine

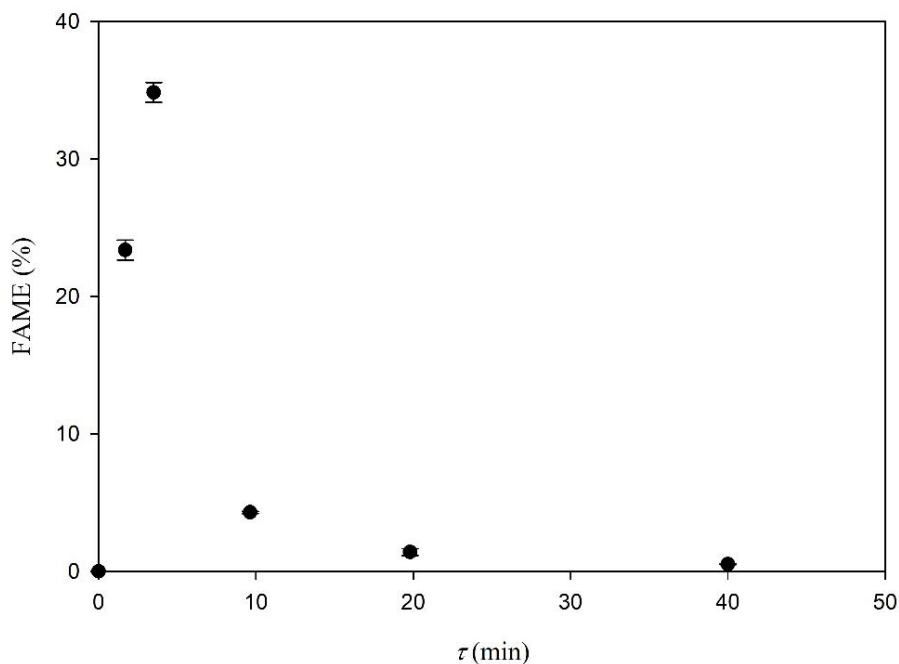


velike molekule viših masnih kiselina za koje se reakcija transesterifikacije odvija sporije u mikroreaktoru u odnosu na otpadno ulje koje je prethodno prošlo kroz proces prženja u kojem je došlo do pucanja dugih lanaca molekula viših masnih kiselina. Tako manje molekule otpadnog ulja reakcijom transesterifikacije brže prelaze u estere viših masnih kiselina, što za posljedicu daje povećanje iskorištenja reakcije provedene s otpadnim uljem.

#### **4.7. Mikroreaktorski sustav s enzimom imobiliziranim na magnetne nanočestice**

Imobilizirani enzim pokazuje veću toplinsku stabilnost i otpornost na deaktivaciju nego slobodni enzim. Nadalje trošak cjelokupnog procesa smanjuje se korištenjem imobiliziranog enzima, jer je jedan od najvećih nedostataka enzimatske transesterifikacije visoka cijena enzima, a njegovom imobilizacijom na nanočestice moguće ga je zadržati u sustavu pomoću magneta [8]. U istraživanju opisanom u literaturi, provedena je imobilizacija enzima na nanočestice bakra koji je kao takav korišten u sintezi biodizela transesterifikacijom jestivog ulja pri 45 °C te omjeru metanol:ulje = 2:1 pri čemu je postignut udio FAME od 96,5 % [46].

U ovom radu su metanol i ulje uvedeni u mikroreaktor opremljen s dva ulaza. Enzim imobiliziran na magnetne nanočestice je u mikroreaktoru bio zadržan pomoću permanentnog magneta. Na slici 26. prikazan je utjecaj vremena zadržavanja na sintezu biodizela u mikroreaktoru s enzimom imobiliziranim na magnetne nanočestice.



Slika 26. Utjecaj vremena zadržavanja na iskorištenje sinteze biodizela u mikroreaktoru s enzimom imobiliziranim na magnetne nanočestice

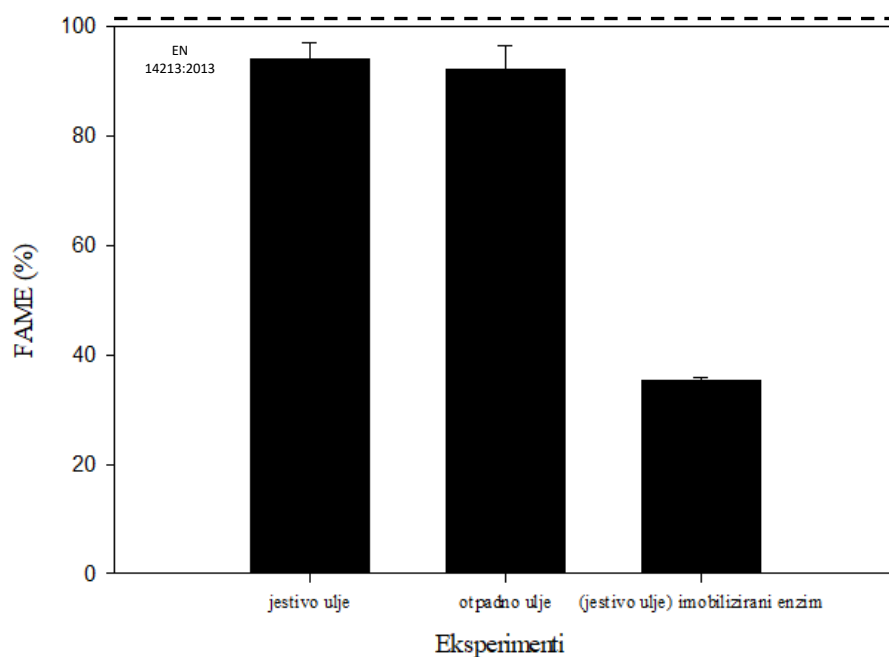
Za sintezu provedenu u sustavu s imobiliziranim enzimom, najveći udio FAME iznosio je  $35,3 \pm 0,4$  % za vrijeme zadržavanja od  $\tau = 3,5$  min. Udio FAME počinje naglo padati za vremena zadržavanja veća od  $\tau = 3,5$  min te je za vrijeme zadržavanja,  $\tau = 40$  min udio FAME iznosio 0,5 %. Navedeno je vjerojatno posljedica imobilizacije enzima uslijed koje dolazi do smanjenja aktivnosti enzima (iznosila je 57 % početne aktivnosti slobodnog enzima), ali i deaktivacije enzima u prisustvu metanola. Iako je sustav s imobiliziranim enzimom razvijen kako bi se spriječilo njegovo ispiranje iz sustava, smanjenje udjela FAME u izlaznoj procesnoj struji pri većim vremenima zadržavanja manjim dijelom može biti povezano i s ispiranjem enzima iz reaktora.

#### 4.8. Integrirani mikrosustav

Intenzifikacija procesa proizvodnje biodizela u šaržnom sustavu moguća je provedbom iste u sustavu s integriranim pročišćavanjem biodizela [21]. Integrirani mikrosustav podrazumijeva sustav za sintezu biodizela i njegovo pročišćavanje izvedeno spajanjem mikroreaktora i mikroekstraktora u seriju [4]. U ranijim istraživanjima je pokazano kako biodizel proizveden u integriranom mikrosustavu s pročišćavanjem pomoću niskotemperaturnog eutektičkog otapala ima karakteristike povezane s udjelom FAME i glicerola koje odgovaraju svojstvima biodizela propisanim odgovarajućim standardima

kvalitete [19]. U prethodno provedenim istraživanjima, uspješno su provedeni sinteza i pročišćavanje biodizela u integriranom mikrosustavu u kojem je za vrijeme zadržavanja između 20 i 40 min udio FAME iznosio preko 90 % [4]. Kao pogodno otapalo za pročišćavanje ekstrakcijom pokazalo se niskotemperaturno eutektičko otapalo  $\text{ChCl}:\text{Gly}$  (1:2,5) koje je uklonilo gotovo sav glicerol iz biodizela za vrijeme zadržavanja od 13,61 s [32].

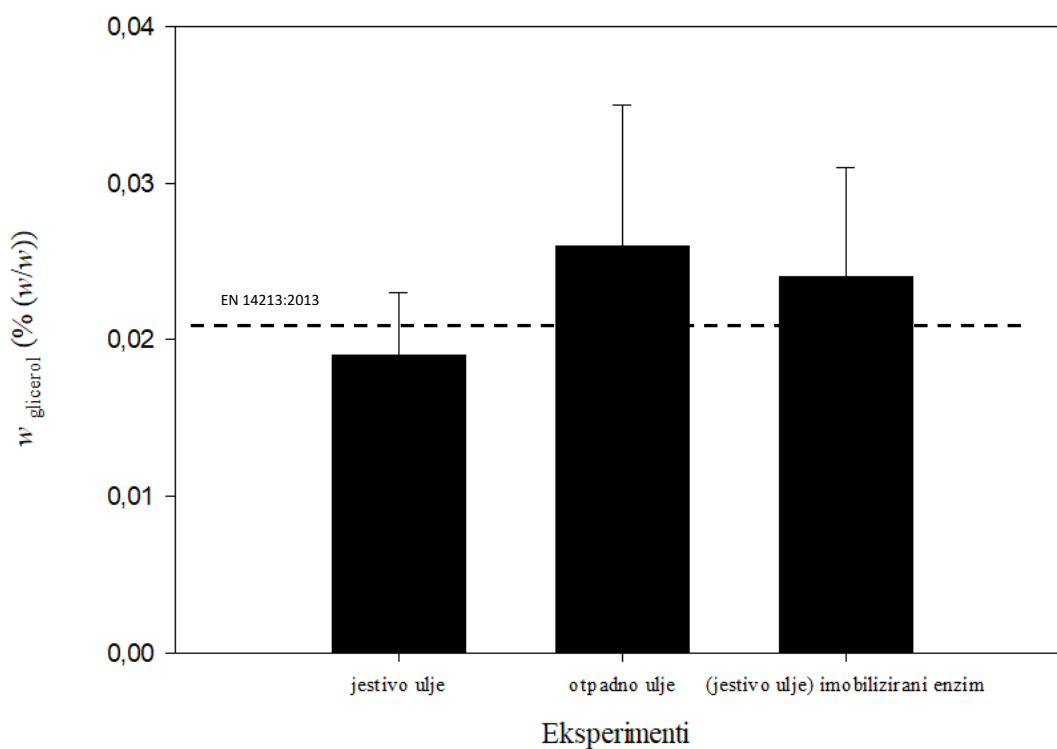
U ovom radu je u integriranom mikrosustavu biodizel sintetiziran iz jestivog i otpadnog ulja (pri vremenu zadržavanja  $\tau = 20$  min), sa slobodnim i imobiliziranim enzimom dok je pročišćavanje provedeno pomoću  $\text{ChCh}:\text{Gly}$  (1:3) DES-a u serijski spojenom mikroekstrктору. Na slikama 27. i 28. prikazani su rezultati procesa proizvodnje biodizela u integriranom mikrosustavu.



Slika 27. Udio FAME u pokusima proizvodnje biodizela provedenim u različitim integriranim mikrosustavima

Najveći udio FAME od  $94,0 \pm 3,1$  % dobiven je u eksperimentu u kojem je biodizel sintetiziran iz jestivog ulja u prisustvu slobodnog enzima u integriranom mikrosustavu. U pokusu u kojem je sinteza biodizela provedena iz otpadnog ulja u prisustvu slobodnog enzima dobiven je udio FAME od  $92,1 \pm 3,7$  %. U pokusu provedenom uz imobilizirani enzim i jestivo ulje kao sirovinu postignut je najmanji udio FAME od  $35,3 \pm 0,4$  %. Iako je

u sustavima sa slobodnim enzimom postignut veliku udio FAME, tek rezultati postignuti u sustavu s jestivim uljem zadovoljavaju udio FAME od 96,5 % koji je propisan standardom te je stoga potrebno provoditi daljnja istraživanja na oba sustava kako bi se proces unaprijedio s obzirom na ovaj pokazatelj kvalitete biodizela [19]. Mogući razlozi za najmanji udio FAME u sustavu s imobiliziranim enzimom su njegovo ispiranje iz mikroreaktora tijekom provedbe pokusa te smanjenja inicijalna aktivnost enzima kao posljedica imobilizacije. U pokusima provedenim sa slobodnim enzimom prostor za poboljšanje moguće je pronaći određivanjem uvjeta provedbe procesa pri kojima će se smanjiti negativan utjecaj metanola na aktivnost enzima.



Slika 28. Udio glicerola u biodizelu u pokusima proizvodnje biodizela provedenim u različitim integriranim mikrosustavima

Udio glicerola manji od 0,020 % (w/w) postignut je u pokusu provedenom sa slobodnim enzimom i jestivim uljem kao sirovinom i iznosio je  $0,019 \pm 0,004$  % (w/w) što je u okvirima čistoće biodizela propisanih standardima. Za biodizel dobiven iz otpadnog ulja u integriranom mikrosustavu sa slobodnim enzimom je udio glicerola bio  $0,026 \pm 0,009$  % (w/w), dok je za biodizel dobiven iz jestivog ulja uz korištenje imobiliziranog enzima udio glicerola bio  $0,024 \pm 0,007$  % (w/w).

Zaključno, sinteza biodizela provedena u integriranom mikrosustavu sa slobodnim enzimom, pri čemu je kao sirovina korišteno jestivo ulje, pokazao se najboljim ispitivanim sustavom i s obzirom na udio FAME i s obzirom na čistoću iskazanu preko udjela glicerola u biodizelu.

## 5. Zaključak

U ovom radu provedena je sinteza biodizela enzimatskom transesterifikacijom u mikroreaktoru. Najveći udio FAME dobiven je u mikroreaktoru s dva ulaza i iznosio je  $94,0 \pm 3,1$  % za vrijeme zadržavanja od  $\tau = 20$  min.

Razvijen je integrirani mikrosustav u kojemu je proizvodnja biodizela provedena u serijski spojenima mikroreaktoru i mikroekstratoru. Sinteza u mikroreaktoru provedena je sa slobodnim enzimom i enzimom imobiliziranim na magnetne nanočestice iz jestivog i otpadnog ulja dok je pročišćavanje biodizela provedeno u mikroekstratoru pomoću ChCh:Gly (1:3) DES-a. Proces proizvodnje biodizela pomoću lipaze imobilizirane na magnetskim nanočesticama zahtijeva daljnju optimizaciju iako je zbog načina provedbe reakcije transesterifikacije te povezane ekonomske održivosti procesa ovaj sustav potencijalno najzanimljiviji za primjenu.

Za pokus proveden sa slobodnim enzimom i jestivim uljem kao sirovinom u integriranom mikrosustavu dobiveni su najveći udio FAME od  $94,0 \pm 3,1$  % i najmanji udio glicerola u biodizelu od  $0,019 \pm 0,004$  % (w/w) za vrijeme zadržavanja od  $\tau = 20$  min što je u skladu s odgovarajućim standardima koji propisuju kvalitetu biodizela.

## 6. Literatura

- [1] Hama S., Tamalampudi S., Yoshida A., Tamadani N., Kuratani N., Noda H., Fukuda H., Kondo A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol-separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. *Biochem. Eng. J.* 55 (2011) 66-71
- [2] Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 355-360
- [3] Hessel V., Löwe H., Schönfeld F. Micromixers — a review on passive and active mixing principles. *Chem. Eng. Sci.* 60 (2005) 2479-2501
- [4] Šalić A., Jurinjak Tušek A., Sander A., Zelić B. Lipase catalysed biodiesel synthesis with integrated glycerol separation in continuously operated microchips connected in series. *New Biotechnol.* 47 (2018) 80-88
- [5] Santana H.S., Tortola D.S., Silva J.L. Jr., Taranto O.P. Biodiesel synthesis in micromixer with static elements. *Energy Convers. Manage.* 141 (2017) 28-39
- [6] Ho K.C., Shahbaz K., Rashmi W., Mjalli F.S., Hashim M.A., Alnashef I.M. Removal of glycerol from palm oil-based biodiesel using new ionic liquids analogues. *J. Eng. Sci. Technol.* 14 (2015) 98-111
- [7] Šalić A., Zelić B. Synergy of microtechnology and biotechnology: microreactors as an effective tool for biotransformation processes. *Food Technol. Biotechnol.* 56 (2018) 464-479
- [8] Šalić A., Pindrić K., Hojnik Podrepšek G., Leitgeb M., Zelić B. NADH oxidation in a microreactor catalysed by ADH immobilised on  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles. *Green Process. Synth.* 2 (2013) 569-578
- [9] Abbot A.P., Capper G., Davies D.L., Rasheed R.K., Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* 1 (2003) 70-71
- [10] Franjo M., Šalić A., Zelić B. Microstructured devices for biodiesel production by transesterification. *Biomass Convers. Biorefin.* 8 (2018) 1005-1020
- [11] Paulson N.D., Ginder R.G. The growth and direction of the biodiesel industry in the United States. *CARD Working Paper 470* (2007) 1-29

- [12] Van Gerpen J. Biodiesel processing and production. *Fuel. Process. Technol.* 86 (2005) 1097-1107
- [13] Farobie O., Matsumura Y. State of the art of biodiesel production under supercritical conditions. *Prog. Energy Combust. Sci.* 63 (2017) 173-203
- [14] Christopher L.P., Kumar H., Zambare V.P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Appl. Energy* 119 (2014) 497-520
- [15] Ma F., Hanna M.A. Biodiesel production: A review. *Bioresour. Technol.* 70 (1999) 1-15
- [16] Ognjanović N., Bezbradica D., Knežević Z. Optimization of the production of biodiesel by a commercial immobilized lipase in a solvent-free system using a response surface methodology. *J. Serb. Chem. Soc.* 73 (2008) 147-156
- [17] Xie T., Zhang L., Xu N. Biodiesel synthesis in microreactors. *Green Process. Synth.* 1 (2012) 61-70
- [18] Saka S., Kusdiana D. Biodiesel fuel from rapeseed oil as prepared in supercritical methanol. *Fuel* 80 (2001) 225-231
- [19] Liquid petroleum products—Fatty acid methyl esters (FAME) for use in diesel engines and heating applications—Requirements and test methods (EN 14214:2012+A2:2019)
- [20] Berrios M., Gutiérrez M.C, Martín M.A., Martín A. Obtaining biodiesel from spanish used frying oil: Issues in meeting the EN 14214 biodiesel standard. *Biomass Bioenergy.* 34 (2010) 312-318
- [21] Budžaki S., Šalić A., Zelić B., Tišma M. Enzyme-catalysed biodiesel production from edible and waste cooking oils. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 29 (2015) 329-333
- [22] Brozowski A.M., Savage H., Verma C.S., Turkenburg J.P., Lawson D.M., Svendsen A., Patkar S. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. *Biochemistry* 39 (2000) 15071-15082
- [23] Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 62 (2010) 197-212
- [24] Tiwari A., Rajesh V.M., Yadav S. Biodiesel production in micro-reactors: A review. *Energy Sustainable Dev.* 43 (2018) 143-161



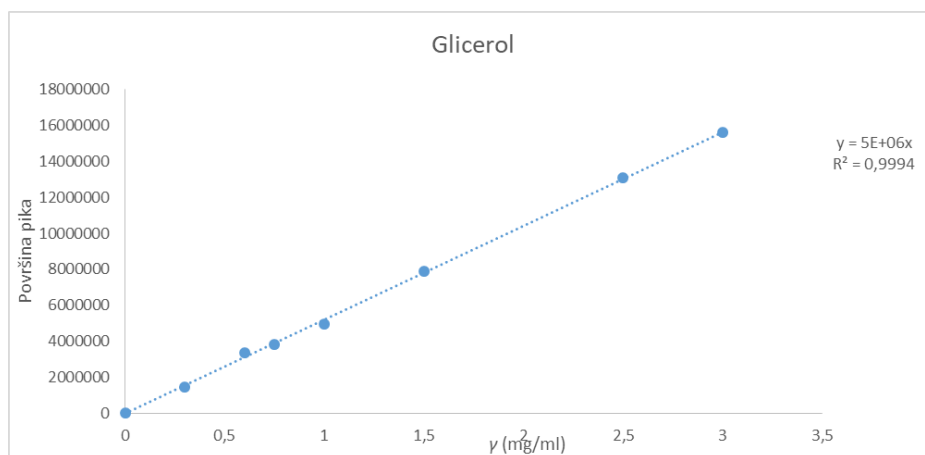
- [25] Madhawan A., Arora A., Das J., Kuila A., Sharma V. Microreactor technology for biodiesel production: a review. *Biomass Convers. Biorefin.* 8 (2017) 485-496
- [26] Mazubert A., Aubin J., Elgue S., Poux M. Intensification of waste cooking oil transformation by transesterification and esterification reactions in oscillatory baffled and microstructured reactors for biodiesel production. *Green Process. Synth.* 3 (2014) 419-429
- [27] Machsun A.L., Gozan M., Nasikin M., Setyahadi S., Yoo Y.J. Membrane microreactor in biocatalytic transesterification of triolein for biodiesel production. *Biotechnol. Bioprocess. Eng.* 15 (2010) 911-916
- [28] Gojun M., Pustahija L., Jurinjak Tušek A., Šalić A., Valinger D., Zelić B. Kinetic parameter estimation and mathematical modelling of lipase catalysed biodiesel synthesis in a microreactor. *Micromachines* 10 (2019) 759
- [29] Santana H.S., Silva J.L., Tortola D.S., Taranto O.P. Transesterification of sunflower oil in microchannels with circular obstructions. *Chin. J. Chem. Eng.* 26 (2018) 852-863
- [30] Tan X., Li K. Membrane microreactors for catalytic reactions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88 (2013) 1771-1779
- [31] He Y., Bagley D.M., Leung K.T., Liss S.N., Liao B.Q. Recent advances in membrane technologies for biorefining and bioenergy production. *Biotechnol. Adv.* 30 (2012) 817-858
- [32] Šalić A., Jurinjak Tušek A., Gojun M., Zelić B. Biodiesel purification in microextractors: Choline chloride based deep eutectic solvents vs water. *Sep. Purif. Technol.* 242 (2020) 116783
- [33] Shahbaz K., Mjalli F.S., Hashim M.A., AlNashef I.M. Eutectic solvents for the removal of residual palm oil-based biodiesel catalyst. *Sep. Purif. Technol.* 81 (2011) 216-222
- [34] Shahbaz K., Mjalli F.S., Hashim M.A., AlNashef I.M. Elimination of all free glycerol and reduction of total glycerol from palm oil-based biodiesel using non-glycerol based deep eutectic solvents. *Sep. Sci. Technol.* 48 (2013) 1184-1193
- [35] Tang B., Lee Y.J., Row K.H. Exploration of using deep eutectic solvents to separate methyl palmitate from simulated biodiesel mixtures. *Adv. Mater. Res.* 1101 (2015) 249-251

- [36] Sheldon R.A., Schoevaart R., Van Langen L.M. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): A novel and versatile method for enzyme immobilization (a review). *Biocatal. Biotransform.* 23 (2009) 141-147
- [37] Šalić A., Pindrić K., Hojnik Podrepšek G., Novosel N., Leitgeb M., Zelić B. NADH oxidation in a microreactor with an oscillating magnetic field. *J. Flow Chem.* 6 (2016) 27-32
- [38] Šulek F., Drogenik M., Habulin M., Knez Ž. Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. *J. Magn. Magn. Mater.* 322 (2010) 179-185
- [39] Šulek F., Knez Ž., Habulin M. Immobilization of cholesterol oxidase to finely dispersed silica-coated maghemite nanoparticles based magnetic fluid. *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 4596-4600
- [40] Halling P.J., Dunnill P. Magnetic supports for immobilized enzymes and bioaffinity adsorbents. *Enzyme Microb. Technol.* 2 (1980) 2-10
- [41] Kamal MdZ., Yedavalli P., Deshmukh M.V., Rao N.M. Lipase in aqueous-polar organic solvents: activity, structure and stability. *Protein Sci.* 22 (2013) 904-915
- [42] Sharma R., Deka B., Mandal A., Mahto V. Study the influence of sodium dodecyl sulfate on emulsification of heavy and waxy crude oils to improve their flow ability in low temperature conditions. *Asia-Pac. J. Chem. Eng.* 14 (2019) e2279
- [43] Bačić M., Ljubić A., Gojun M., Šalić A., Jurinjak Tušek A., Zelić B. Continuous integrated process of biodiesel production and purification – the end of the conventional two-stage batch process?. *Energies* 14 (2021) 403
- [44] Ghaly A.E., Dave D., Brooks M.S., Budge S. Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 6 (2010) 54-76

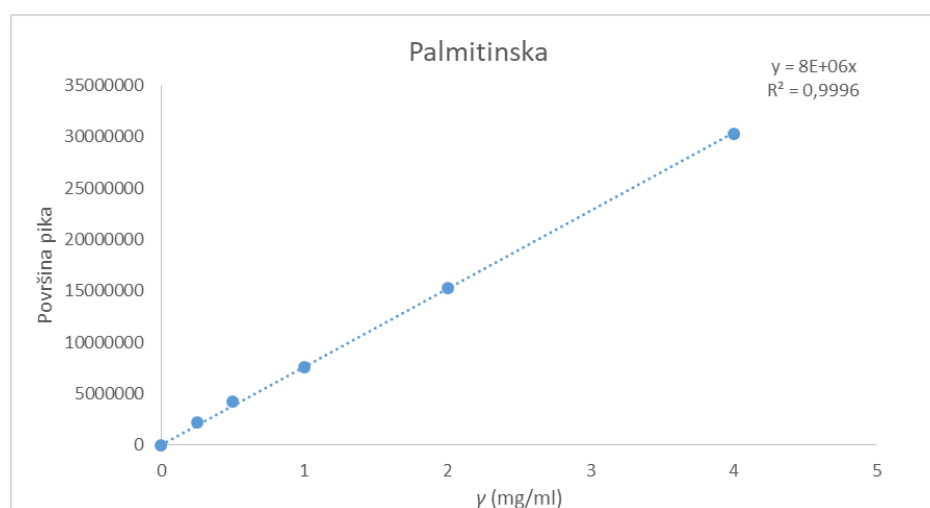
[45] Patil P.D., Gude V.G., Reddy H.K., Muppaneni T., Deng S. Biodiesel production from waste cooking oil using sulphuric acid and microwave irradiation processes. *J. Environ. Prot.* 3 (2012) 107-113

[46] Jiang W., Wang X., Yang J., Han H., Li Q., Tang J. Lipase-inorganic hybrid nanoflower constructed through biomimetic mineralization: A new support for biodiesel synthesis. *J. Colloid Interface Sci.* 514 (2018) 102-107

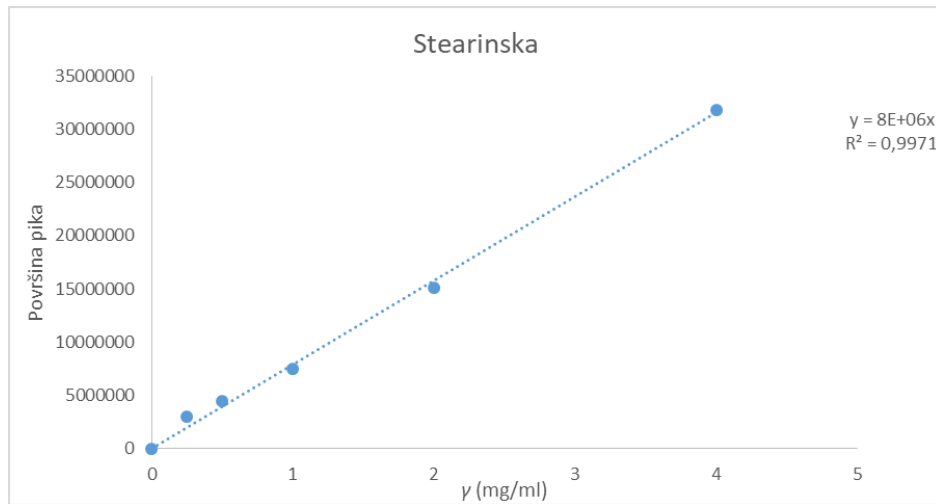
## 7. Prilozi



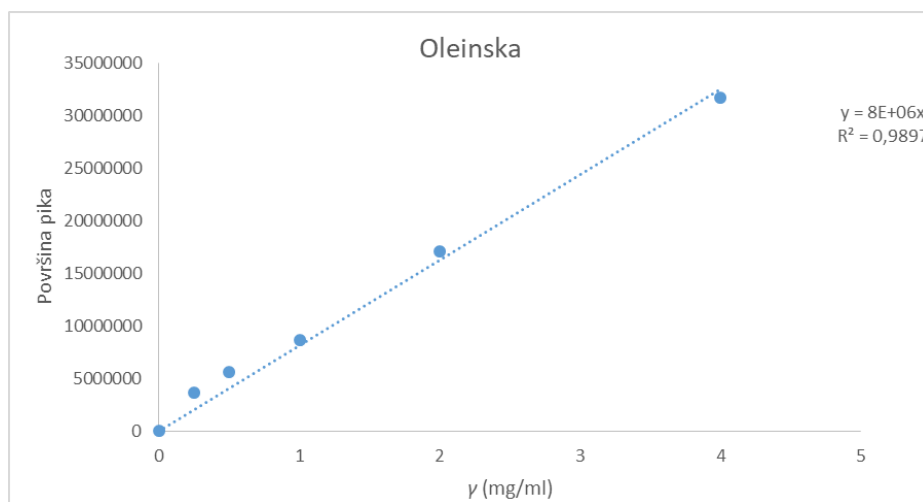
Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glicerola u biodizelu



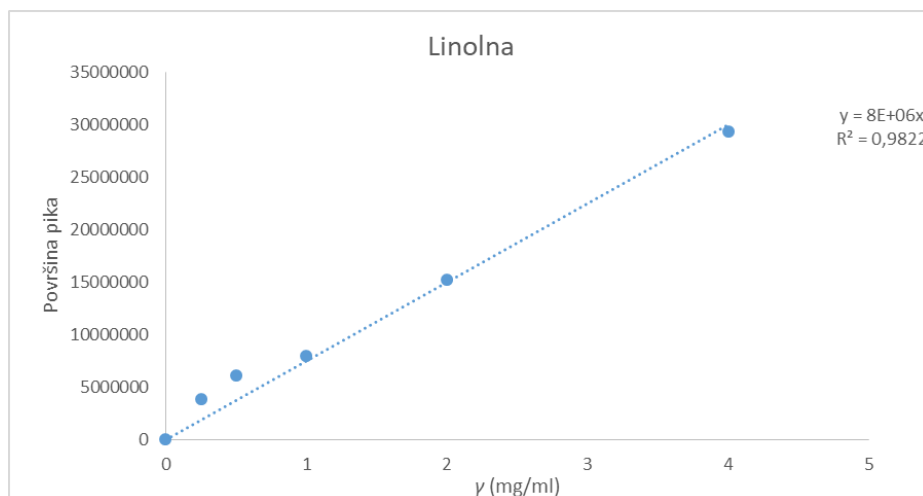
Prilog 2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije palmitinske kiseline u biodizelu



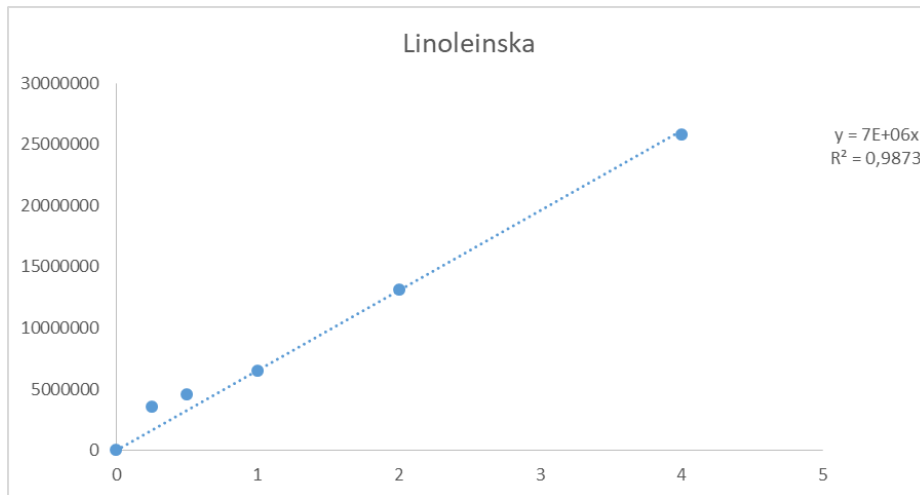
Prilog 3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije stearinske kiseline u biodizelu



Prilog 4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije oleinske kiseline u biodizelu



Prilog 5. Baždarni pravac za određivanje koncentracije linolne kiseline u biodizelu



Prilog 6. Baždarni pravac za određivanje koncentracije linoleinske kiseline u biodizelu