

Transesterifikacija jestivog suncokretovog ulja u mikroreaktoru katalizirana komercijalnim enzimom lipaza

Ljubić, Anabela

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:276708>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-26**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Anabela Ljubić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2019.

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

Kandidat **Anabela Ljubić**

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

Povjerenstvo u sastavu:

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

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

Prof. dr. sc. Gordana Matijašić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu

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

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

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Anabela Ljubić

TRANSESTERIFIKACIJA JESTIVOG SUNCOKRETOVOG ULJA U MIKROREAKTORU
KATALIZIRANA KOMERCIJALNIM ENZIMOM LIPAZA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Bruno Zelić
2. dr. sc. Anita Šalić, znanstveni suradnik
3. prof. dr. sc. Gordana Matijašić

Zagreb, rujan 2019.

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Bruni Zeliću na vodstvu, savjetima, odvojenom vremenu i strpljenju pri izradi ovog rada.

Veliko hvala Martinu Gojunu, mag. ing. oecoing. i dr. sc. Aniti Šalić. za neposredno vodstvo, strpljenje, razumijevanje, mnogobrojne savjete i objašnjenja, kojima su mi približili ovo područje, te za pomoć i razgovore u satima provedenima u laboratoriju pri izvedbi eksperimentalnog dijela, a također i što su uvijek bili na raspolaganju za pitanja.

Hvala mojoj obitelji na stalnoj potpori i svim prijateljima s kojima je svaki period života, pa tako i ovaj studentski, mnogo ljepši, lakši i zabavniji.

U konačnici, najveća hvala mojim roditeljima koji su uvijek bili puni ljubavi, razumijevanja i podrške te moj najveći oslonac tijekom svih godina.

SAŽETAK

Zbog sve manjih zaliha fosilnih goriva, ali i štetnog utjecaja na okoliš, proizvodnja biogoriva danas privlači sve više pažnje. Kao alternativno gorivo i zamjena za fosilni dizel sve se više nameće biodizel. Biodizel ekološki prihvatljivim čine njegova biorazgradivost, netoksičnost i niske emisije stakleničkih plinova, kao i ostalih tvari koje štete okolišu. Najzastupljeniji postupak proizvodnje biodizela je transesterifikacija raznih ulja uz metanol u kotlastim reaktorima uz kiseline ili lužine kao katalizatore. Zbog visokih troškova i malih brzina reakcije u ovim procesima, danas se sve više istražuju mogućnosti primjene drugih tehnologija i katalizatora. Velika poboljšanja procesa predviđaju se provedbom procesa transesterifikacije uz korištenje enzima lipaze kao katalizatora. Primjena enzima lipaze u procesu transesterifikacije, u usporedbi s kiselinama i lužinama kao katalizatorima, rezultira blažim reakcijskim uvjetima i manjom količinom nastalih nusprodukata. Također, sve se više uočavaju i prednosti kontinuirane proizvodnje biodizela pri čemu primjena mikroreaktora rezultira brojnim prednostima u odnosu na konvencionalne, šaržne procese. Intenzivniji prijenos tvari i energije u mikroreaktorima, koji je posljedica velikog omjera površine i volumena reaktora, rezultira povećanjem ukupne brzine reakcije te posljedično znatnom uštedom energije i sirovina. Veliki omjer površine i volumena posljedica je izvedbe reaktorskog sustava, odnosno činjenice da je mikroreaktor mreža mikrokanala, čije su dimenzije 10 μm – 500 μm , pri čemu su mikrokanali izvedeni urezivanjem u čvrstu pločicu. Strujanje u mikrokanalima većinom je laminarno zbog njihovog malog promjera što posljedično omogućuje precizniju regulaciju procesa.

U ovom radu biodizel je proizveden enzimatskom transesterifikacijom jestivog suncokretovog ulja metanolom pri čemu je kao katalizator korišten komercijalni i pročišćeni (proizveden fermentacijom na pogači buče) enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*. Sinteza je provedena u mikroreaktoru s dva ulaza pri čemu je jedna procesna struja bila čisti metanol, a drugi emulzija koju su činili ulje, enzim i emulgator suspendirani u vodenom puferu ili eutektičkom otapalu. Najveća konverzija postignuta je u sustavu s emulzijom ulja i komercijalnog enzima suspendiranog u vodenom puferu te ona iznosi 28,85 % za vrijeme zadržavanja ($\tau = 16,4$ min) te se taj sustav može smatrati najboljim izborom za daljnju optimizaciju procesa proizvodnje biodizela.

Ključne riječi: transesterifikacija, jestivo suncokretovo ulje, enzim lipaza, mikroreaktori

SUMMARY

Due to a significant decrease of fossil fuel resources, but also due to their significant negative impact of the environment, production of biofuels attracts more and more attention every day. Nowadays, biodiesel imposes as an alternative fuel instead of fossil diesel. Biodiesel is environmentally acceptable because of its biodegradability, non-toxicity and low emission of greenhouse gasses as well as due to the emission of other substances that harm the environment. The most common process of biodiesel production is transesterification of different oils with methanol in a batch reactor using acids or bases as catalysts. Due to high costs and low reaction rates in these processes, possibilities of applying some other technologies and catalysts are being explored. Significant process improvements are predicted by implementation of transesterification using lipase as a catalyst. Application of lipase in the transesterification process, comparing to acids and bases as catalysts, results with mild reaction conditions and less by-product. Likewise, advantages of continuous production of biodiesel are being more and more noticed whereby application of microreactors results with many advantages compared to conventional, batch processes. More intensive mass and heat transfer in microreactors, which is a result of high surface-to-volume ratio of the reactor, leads to higher reaction rate and consequently to considerable savings in energy and raw material consumption. High surface-to-volume ratio is a result of the reactor's structure, regarding the fact that a microreactor is build-up of microchannels, whose dimensions are 10 μm – 500 μm , whereby microchannels are made by cutting on a solid plate. Flow in microchannels is mostly laminar due to their small diameter which consequently allows more precise regulation of the process.

In this paper biodiesel was produced by enzymatic transesterification of edible sunflower oil with methanol whereby a commercial and purified (produced by fermentation on squash cake) enzyme lipase from *Thermomyces lanuginosus* was used as a catalyst. Synthesis was carried out in a microreactor with two inlets where one process flow was methanol and the second one was an emulsion made of oil, enzyme and emulsifier suspended in a water buffer or deep eutectic solvent. The highest conversion of 28,85 % for residence time $\tau = 16,4$ min was obtained in the system with an emulsion of oil and commercial enzyme suspended in a water buffer. This system could be considered the best choice for future biodiesel production process optimization.

Key words: transesterification, edible sunflower oil, lipase, microreactor

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Biodizel.....	3
2.1.1. Prednosti i nedostaci biodizela	3
2.1.2. Procesi proizvodnje biodizela.....	4
2.2. Transesterifikacija	5
2.2.1. Nekatalitička transesterifikacija	6
2.2.2. Katalitička transesterifikacija	6
2.3. Lipaza	7
2.4. Mikroreaktor	8
2.4.1. Struktura mikroreaktora.....	9
2.4.2. Značajke mikroreaktora.....	10
2.4.3. Enzimatski katalizirana transesterifikacija suncokretovog ulja	11
2.5. Pročišćavanje biodizela	12
2.5.1. Eutektička otapala	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO	14
3.1. Materijali	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Oprema	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Kemijska sinteza biodizela	15
3.2.2. Sinteza biodizela u mikroreaktoru	15
3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima lipaze.....	18
3.2.4. Bradfordičina metoda određivanja koncentracije proteina.....	19
3.2.5. Pročišćavanje nekomercijalnog enzima	19
3.2.6. Određivanje koncentracije FAME i glicerola.....	20

3.2.7. Utjecaj temperature na aktivnost enzima lipaze	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. Kemijska sinteza biodizela	22
4.2. Aktivnost komercijalnog enzima lipaze	23
4.3. Pročišćavanje ekstrakta lipaze dobivene fermentacijom na čvrstim nosačima	24
4.4. Sinteza biodizela u mikroreaktoru	25
5. ZAKLJUČAK.....	30
6. LITERATURA	31
7. PRILOZI.....	33
8. ŽIVOTOPIS	39

1. UVOD

Život bez fosilnih goriva danas je gotovo nezamisliv te je njihova velika potrošnja dovela do skorog iscrpljivanja ograničenih količina zaliha sirove nafte. Isto tako, visoka emisija ugljikovog dioksida pri izgaranju fosilnih goriva jedan je od uzročnika problema povezanih s globalnim zatopljenjem i onečišćenjem zraka.¹ Također, u atmosferu dospijevaju i drugi nusprodukti sagorijevanja dizela u motorima s unutarnjim izgaranjem kao što su sulfati i aromati jer dizelska goriva u pravilu sadrže neželjene primjese. Zbog svega toga porastao je interes za biogorivima koja su ekološki prihvatljivija, a zalihe su im trenutno neograničene.

Ideja o biogorivima seže na početak 20. stoljeća, prije pojave nafte, te je ponovno zaživjela osamdesetih godina prošlog stoljeća kada su krenula intenzivna ispitivanja biljnih ulja kao zamjene za naftna goriva. Korištenje biljnih ulja kao goriva uzrokovalo je brojne probleme u radu dizelskih motora, a najčešće je dolazilo do začepljenja kao posljedice nastajanja taloga povezanog s visokom viskoznošću biljnih ulja i njihovoj podložnosti procesima oksidacije. Kako bi se navedeno prevladalo biljna ulja su se miješala s fosilnim dizelom, no to se pokazalo kao kratkoročno rješenje, također zbog pojavljivanja taloga.

Zbog svega toga predložena je pretvorba ulja u druge oblike koji bi imali bolja svojstva. Kao dobro rješenje pokazali su se esteri masnih kiselina i nižih alkohola te se danas pod pojmom biodizel podrazumijevaju upravo ovi spojevi.² Biodizel se najčešće proizvodi transesterifikacijom koja se u industriji većinom odvija u kotlastim reaktorima uz baze i kiseline kao katalizatore. Troškovi takvih procesa vrlo su visoki, pa je tako visoka i cijena biodizela. Kako bi on postao konkurentan fosilnom dizelu potrebno je pronaći jeftiniji i učinkovitiji proces proizvodnje biodizela.

U pogledu potrošnje energije, značajne uštede moguće je postići korištenjem enzima kao katalizatora, prvenstveno zbog blagih reakcijskih uvjeta koji su za djelovanje enzima potrebni. U procesima proizvodnje biodizela koristi se lipaza, enzim koji katalizira istovremeno hidrolizu, esterifikaciju i transesterifikaciju, a pogodan je i zbog znatne aktivacije na međufaznoj površini koja se pojavljuje u sustavu ulja i metanola.³

Jedan od načina unaprjeđenja procesa proizvodnje biodizela je i primjena procesne opreme koja bi omogućila veće konverzije i bržu reakciju. S obzirom da se mikroreaktorski sustavi sve više koriste za kemijske i biokemijske reakcije zbog brojnih prednosti koje su povezane s njihovim malim dimenzijama, očekuje se njihova velika uloga u povećanju ekonomičnosti procesa sinteze biodizela.

Pojam mikroreaktor označava reaktor kojeg čini mreža mikrokanala dimenzija 10 μm – 500 μm . Glavne karakteristike mikroreaktorskih sustava su velik omjer međufazne površine i volumena te laminarno strujanje. Tako je u procesima omogućen bolji prijenos tvari i topline, lakše nadziranje procesnih uvjeta i korištenje manjih količina reaktanata i katalizatora te su zbog toga mikroreaktorski sustavi učinkovitiji i sigurniji u odnosu na procese koji se provode u klasičnim, makroskopskim sustavima.⁴

U ovom radu proveden je proces sinteze biodizela transesterifikacijom jestivog suncokretovog ulja u mikroreaktoru kataliziran enzimom lipaza. U pokusima je korišten komercijalni enzim i pročišćeni enzim dobiven uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na čvrstim nosačima. Reakcija je provedena u puferu i u eutektskom otapalu. Učinkovitost sustava uspoređena je praćenjem konverzije za različita vremena zadržavanja, a dobiveni rezultati su podloga za daljnju optimizaciju procesa sinteze biodizela.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biodizel

Prema kemijskom sastavu, biodizel se najčešće definira kao metilni ester masnih kiselina (engl. *fatty acids methyl esters*, FAME) dobivenih iz ulja ili masti biljnog ili životinjskog porijekla. Masne kiseline se u prirodi rijetko nalaze u čistom obliku pa su ulja i masti glavna sirovina za proizvodnju biodizela.⁵ Ulja i masti su najbrojniji pripadnici skupine lipida, a po strukturi su triacilgliceroli ili trigliceridi, odnosno triesteri alkohola glicerola i triju masnih kiselina. Masne kiseline u pravilu imaju od 12 do 20 ugljikovih atoma pri čemu je broj gotovo uvijek paran, a molekule su uglavnom nerazgranate. Ako su im sve veze jednostruke, te su masne kiseline zasićene, a one s dvostrukom vezom su nezasićene. Ukoliko triglicerid sadrži više zasićenih masnih kiselina radi se o masti, odnosno krutini pri sobnoj temperaturi, a ako je više nezasićenih tada je riječ o ulju koje je u kapljevitom stanju.⁶

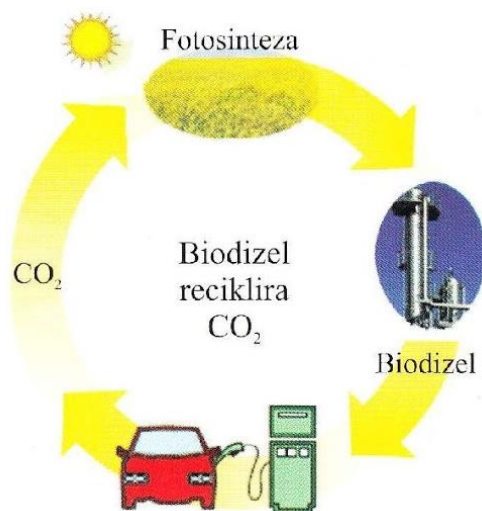
Kao sirovina za proizvodnju biodizela u ovom radu razmatrat će se samo biljna ulja jer biljne i životinjske masti kao krutine nisu pogodne za korištenje u dizelskim motorima.⁷ Svojstva biodizela uvelike ovise o tome od kojih je masnih kiselina sastavljeno ulje koje se koristi kao sirovina, odnosno o strukturi estera koji ga čine. Neka od tih svojstava su toplinske značajke, viskoznost, mazivost i cetanski broj koji je mjera kvalitete paljenja.² Konkretno, u suncokretovom ulju koje je korišteno u ovom radu, najveći udio od zasićenih masnih kiselina imaju palmitinska i stearinska dok su od nezasićenih masnih kiselina najzastupljenije oleinska, linoleinska i linolna.

Najčešće korišteni alkohol u procesu proizvodnje biodizela je metanol zbog najniže tržišne cijene. Korištenje metanola u procesu proizvodnje biodizela rezultiralo je i definicijom pojma biodizel u europskim normama kao metilnog estera viših masnih kiselina.^{2,6}

2.1.1. Prednosti i nedostaci biodizela

Biodizel je alternativno gorivo čije su sirovine za proizvodnju obnovljive jer oslobođen ugljikov dioksid nakon njegovog izgaranja koriste biljke za fotosintezu. Ugljikov dioksid se pritom troši i na sintezu ulja te je tako zatvoren krug biodizela (Slika 1.) čijim se korištenjem kao goriva koncentracija ugljikovog dioksida u atmosferi znatno ne povećava. Isto tako, plinovi nastali gorenjem biodizela ne sadrže toliko ugljikova monoksida, policikličkih aromata, čvrstih čestica i drugih opasnih tvari što ga uz biorazgradivost i netoksičnost čini ekološki prihvatljivijim u odnosu na fosilni dizel i slična goriva.⁵ Biodizel u odnosu na fosilni dizel također ima bolju mazivost, odnosno veću sposobnost smanjivanja trenja između pokretnih dijelova.

Bitno je istaknuti i ekonomske i gospodarske čimbenike koji idu u prilog korištenju biodizela. Naime, proizvodnjom biodizela mnoge zemlje smanjile bi svoju ovisnost o uvozu nafte, a time i potaknule zapošljavanje u ruralnim područjima zbog veće proizvodnje biljaka koje su izvori ulja korištenih u procesu proizvodnje biodizela.^{2,8}



Slika 1. Zatvoreni krug CO₂ pri proizvodnji i korištenju biodizela²

Od nedostataka upotrebe biodizela najčešće se ističu manji sadržaj energije u odnosu na fosilni dizel te veća koncentracija dušikovih oksida nastalih izgaranjem biodizela. Također, velike probleme može uzrokovati nastanak kristalića estera pri nižim temperaturama, zbog čega dolazi do začepljenja filtera i nastajanja taloga kada se biodizel koristi u zimskim mjesecima. Pri skladištenju treba paziti da ne dođe do oksidacije pa se biodizel ne smije dovoditi u kontakt s metalima poput olova, kositra i cinka jer oni kataliziraju taj proces.⁵ Biodizel je dobro otapalo za mnoge organske tvari kao što su guma i lak pa je potrebno voditi računa o odabiru materijala od kojeg su izrađeni motori.²

2.1.2. Procesi proizvodnje biodizela

Kao što je spomenuto, da bi se dobio produkt sličnih svojstava fosilnom dizelu, odnosno biodizel, biljna ulja prevode se u oblike pogodnije za dugoročnu upotrebu u dizelskim motorima.

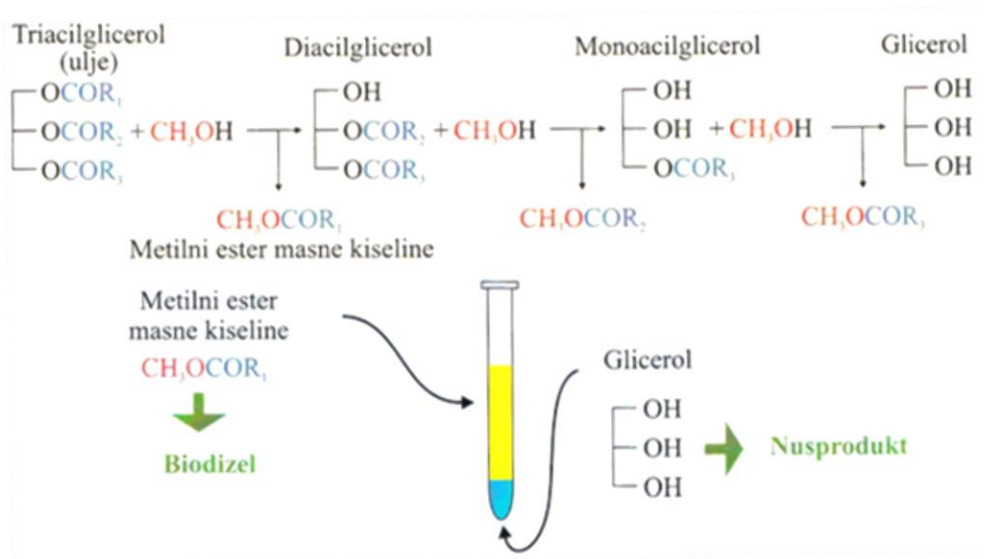
Prvi način pretvorbe ulja u biodizel je mikroemulzifikacija. Ona se provodi miješanjem biljnih ulja s metanolom ili etanolom te ionskim ili neionskim tenzidima.² Na ovaj način se dobiva stabilna koloidna emulzija s promjerom kapljica 1 - 150 nm koja ima manju viskoznost u odnosu na samo ulje. Kod primjene biodizela dobivenog mikroemulzifikacijom problemi su nepotpuno izgaranje i nastajanje naslaga koksa.

Drugi postupak pretvorbe ulja u biodizel je piroliza, odnosno toplinsko kreiranje, koja podrazumijeva pretvorbu jedne tvari u drugu zagrijavanjem bez prisustva kisika.⁷ Pirolizom se proizvode različiti produkti manje viskoznosti slični onima koji se dobiju kreiranjem u petrokemijskoj industriji. Ovim procesom osim željenih produkata nastaje i mnogo neželjenih, ovisno o uvjetima provedbe procesa i korištenim sirovinama, što predstavlja veliki nedostatak pirolize koja je ujedno i vrlo skup proces.³

Najčešći postupak proizvodnje biodizela je transesterifikacija koja će se detaljnije opisati u daljnjem tekstu.

2.2. Transesterifikacija

Transesterifikacija je, kao što je spomenuto, najčešći način proizvodnje biodizela. Općenito, to je reakcija kojoj podliježu esteri te se u prisutnosti katalizatora jedna alkoksilna skupina mijenja drugom pri čemu je proces reverzibilan. Kako bi se ravnoteža pomaknula na stranu produkta dodaje se alkohol u suvišku.⁹ Konkretno, ako se govori o transesterifikaciji ulja ili masti, iz estera trovalentnog alkohola glicerola dobiju se esteri nižeg alkohola, a proces se može nazvati i alkoholizom (Slika 2.).² Uz biodizel također nastaje i nusprodukt glicerol kojeg je potrebno ukloniti ili izdvojiti za daljnju upotrebu. Isto vrijedi i za neizreagirane reaktante i katalizator, što povećava troškove procesa proizvodnje, a time i dobivenog goriva.⁷



Slika 2. Pojednostavljeni shematski prikaz reakcije transesterifikacije²

2.2.1. Nekatalitička transesterifikacija

Transesterifikacija se može provoditi i bez katalizatora, no tada su potrebne vrlo visoke temperature da bi došlo do značajnije konverzije te se postupak ustvari provodi pri superkritičnim uvjetima. Kao superkritični fluid, metanol ima svojstva koja u procesu transesterifikacije omogućuju nastajanje jednofaznog sustava čime se znatno povećava brzina reakcije.⁵ Njegova kritična točka je na temperaturi od 239 °C te je iznad te vrijednosti nemoguće dobiti kapljevitu fazu bez obzira na vrijednost tlaka.^{5,10} Pri takvim uvjetima fluid se smatra plinom koji je ipak mnogo gušći u odnosu na uobičajene plinove, odnosno ima svojstva između plina i kapljevine pa se naziva superkritičnim fluidom.¹⁰ Reakcija transesterifikacije u superkritičnim uvjetima se provodi najčešće na temperaturama između 350 i 400 °C jer bi ispod ovog temperaturnog područja konverzija bila premala, dok bi pri većim temperaturama došlo do razlaganja dobivenih estera. Unatoč visokoj konverziji i smanjenju troškova separacije produkta koje donosi reakcija bez katalizatora, ovaj proces zasad je neisplativ zbog visokog utroška energije za postizanje potrebne temperature.³

2.2.2. Katalitička transesterifikacija

Katalitička transesterifikacija može biti homogena ili heterogena, ovisno o fazi u kojoj se nalaze produkti, reaktanti i katalizator. Kod homogene katalize svi sudionici su u istoj fazi, a kod heterogene katalizator je u različitom agregatnom stanju od reaktanta i produkata. Posebna vrsta katalitičke transesterifikacije je biokataliza koja se provodi uz upotrebu enzima iz stanica mikroorganizama.¹¹

Industrijski procesi transesterifikacije najčešće se odvijaju uz prisutnost homogenog katalizatora koji može biti kiselina ili baza.¹² Općenito je prednost homogenih katalizatora ta što je svaki atom katalizatora zbog visokog stupnja disperzije pristupačan reaktantima pa su reakcije brže, a također se mogu provoditi u blagim uvjetima, te je potrebna manja koncentracija katalizatora.¹¹ Nedostatci homogene katalize se očituju u pročišćavanju produkta jer je takve katalizatore potrebno neutralizirati i izdvojiti iz dobivenog produkta. Također može doći do saponifikacije u slučaju primjene baznog katalizatora, odnosno reakcije slobodne masne kiseline i katalizatora te nastajanja sapuna, dok se u slučaju korištenja kiselih katalizatora mogu odvijati razne paralelne neželjene reakcije. Sve to uzrokuje probleme sa zbrinjavanjem rezultirajućih otpadnih voda.³ Od kiselih se katalizatora najviše koriste sumporna i sulfonska kiselina, no upotreba baznih katalizatora poput kalijevog i natrijevog hidroksida nešto je zastupljenija. Razlog tome je odvijanje bazno kataliziranih reakcija pri blažim reakcijskim uvjetima, manji intenzitet

korozije opreme te niži omjer alkohola i ulja u odnosu na procese koji se provode uz kisele katalizatore.^{3,13}

Kako bi se izbjegao problem separacije katalizatora moguće je koristiti čvrste, odnosno heterogene kisele i bazne katalizatore.¹⁴ Čvrsti katalizator može se i reciklirati pa je zato potrebna manja količina katalizatora. S druge strane, zbog formiranja višefaznog sustava, intenzitet prijenosa tvari i topline se smanjuje, a time i brzina kemijske reakcije. Kao pogodni bazni heterogeni katalizatori izdvajaju se oksidi i karbonati metala, posebice alkalijskih i zemnoalkalijskih, a od kiselih heterogenih katalizatora najzastupljeniji su zeoliti i razne krutine modificirane ionskom izmjenom.¹³

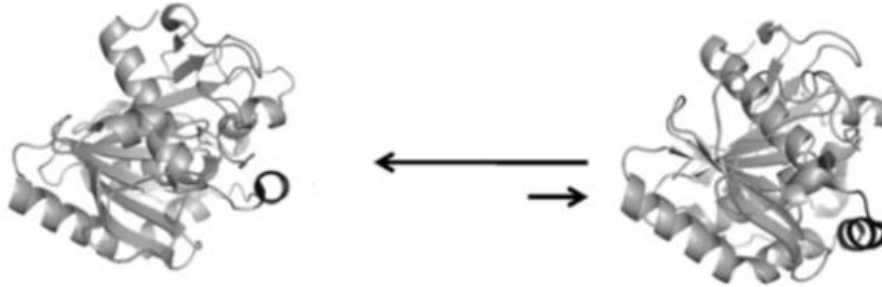
Ako se kao katalizator koristi enzim, izbjegava se nastanak neželjenih nusprodukata te se dobiveni glicerol zbog čistoće može koristiti u drugim procesima. Time je olakšana separacija produkta koji je isto tako visoke čistoće, a i enzima koji je pogodan za ponovnu upotrebu. Također, enzimi zahtijevaju blaže reakcijske uvjete od homogenih katalizatora čime se može uštedjeti energija, a omjer alkohola i ulja je nizak pa se štede i sirovine.³ Negativne strane upotrebe enzimatskih katalizatora su njihova visoka cijena, relativno mala brzina reakcije i deaktivacija enzima, odnosno smanjenje stabilnosti i aktivnosti enzima posebice u kontaktu s polarnim molekulama poput etanola ili metanola koji se koriste u procesu transesterifikacije.¹⁵

2.3. Lipaza

Enzim koji se najčešće koristi u reakciji transesterifikacije je lipaza. Općenito su enzimi po sastavu proteini koji mogu sadržavati i neproteinski dio nazvan kofaktor. Djeluju specifično, odnosno pojedini enzim katalizira jednu ili manji broj reakcija neke tvari koja se naziva supstrat. S obzirom na vrstu reakcije koju kataliziraju, dijele se u šest skupina. Zajedno s nukleazama i proteazama, lipaze spadaju u skupinu hidrolaza, a kataliziraju reakcije hidrolize.

Supstrati čiju hidrolizu ubrzava enzim lipaza su esteri.⁶ Enzim lipaza je značajan za primjenu u industriji jer obuhvaća veći broj supstrata i reakcija te ne katalizira nužno hidrolizu, već može katalizirati alkoholizu, aminolizu, interesterifikaciju i druge slične reakcije, ovisno u kojem se mediju provodi reakcija.¹⁶ Aktivni centri, odnosno mjesta gdje se veže supstrat, kod enzima lipaze su zaklonjeni polipeptidnim lancem u homogenom hidrofilnom mediju te se takva konformacija naziva zatvorenom. U tom obliku enzim lipaza nije aktivan, a do aktivacije dolazi tek u kontaktu s hidrofobnom molekulom poput ulja. Pritom se polipeptidni lanac pomiče pa konformacija prelazi u otvorenu te aktivni centri postaju dostupni za reakciju (Slika 3.). Promjene u konformacijama povezuju se s fenomenom međufazne aktivacije.^{17,18} Taj fenomen

podrazumijeva znatno povećanje aktivnosti na međufaznoj površini koja nastaje kada supstrat ima koncentraciju iznad granice topljivosti te tvori emulziju ili je u obliku micela.¹⁵



Slika 3. Prelasci lipaze iz zatvorene (lijevo) u otvorenu konformaciju (desno) pri čemu je polipeptidni lanac koji zaklanja aktivne centre zaokružen crnom bojom¹⁸

Prva komercijalna lipaza razvijena je 1988. godine za primjenu u industriji detergenata i od tada je količina dostupne komercijalne lipaze znatno porasla. Zbog najniže cijene i visoke stabilnosti sve se više ističu lipaze dobivene iz mikroorganizma *Thermomyces lanuginosus*.^{15,16} Enzim lipaza može se upotrijebiti u imobiliziranom ili slobodnom obliku. Imobilizirani oblik donosi prednosti poput jednostavnog ponovnog korištenja i povećanja stabilnosti zbog smanjenja utjecaja miješanja, a slobodni oblik omogućuje bolju difuziju te izbjegavanje gomilanja nusprodukata u nosaču koji deaktiviraju enzim.¹⁵

2.4. Mikroreaktor

Mikroreaktor (Slika 4.) je procesni uređaj za provođenje kemijskih i biokemijskih reakcija, a takav se naziv počeo primjenjivati ponajprije zbog dimenzija mikrokanala, njegove osnovne strukturne jedinice, koje se kreću između 10 μm i 500 μm . Zbog takve izvedbe, mikroreaktori imaju brojne prednosti u odnosu na uobičajene makrosustave kao što su intenzivniji prijenos tvari i topline, laminaran tok i jednostavan prijenos u veće mjerilo. Najčešće se dijele na mikroreaktore u kojima se provode kemijske ili biokemijske reakcije. Za provedbu biokemijskih reakcija najviše se koriste enzimatski mikroreaktori pri čemu enzimi mogu biti slobodni ili imobilizirani na stjenci mikrokanala ili na nosaču.

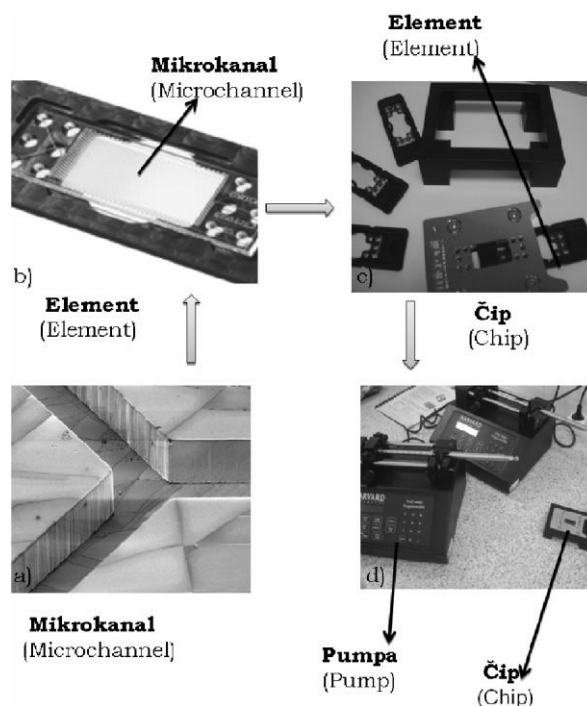


Slika 4. Mikroreaktor

2.4.1. Struktura mikroreaktora

Temeljna strukturna jedinica mikroreaktora je mikrokanal koji može biti kružnog ili pravokutnog poprečnog presjeka, a izrađuje se urezivanjem u pravokutne pločice koje se nazivaju elementi mikroreaktora.¹⁹ Elementi su načinjeni od materijala odgovarajućeg za reakcijski sustav, odnosno kemijski kompatibilnog s reakcijskom smjesom i pogodnog za korištenu metodu analize. Najčešće se kao materijal za izradu mikroreaktora izabire staklo zbog svoje inertnosti i prozirnosti, no mogući materijali za izradu su i kvarc, silikon, metali i polimeri. Kao metode urezivanja mikrokanala najčešće se koriste lasersko bušenje, fotolitografija i mokro jetkanje.²⁰ O materijalu i metodi urezivanja ovisi hrapavost površine mikrokanala koja je kod mikroreaktora vrlo važna, a njen će se utjecaj obrazložiti u sljedećem odjeljku.

Elementi mogu imati jedan ili više ulaznih, odnosno izlaznih procesnih tokova koji se spajaju ili razdvajaju „Y“ ili „T“ ili „Ψ“ - spojnica. Elementi se ugrađuju u kućišta od čvrstog materijala čime se dobiva mikroreaktorski čip. Tako je olakšano spajanje serijski ili paralelno, kao i spajanje s vanjskim cijevima. Preko vanjskih cijevi čip se spaja s visokotlačnim i preciznim pumpama kojima se uvode reaktanti. Svi ti dijelovi, uz mogućnost povezivanja različitih detektora, čine mikroreaktorski sustav (Slika 5.).^{19,20}



Slika 5. Osnovne strukturne jedinice mikroreaktorskog sustava¹⁹

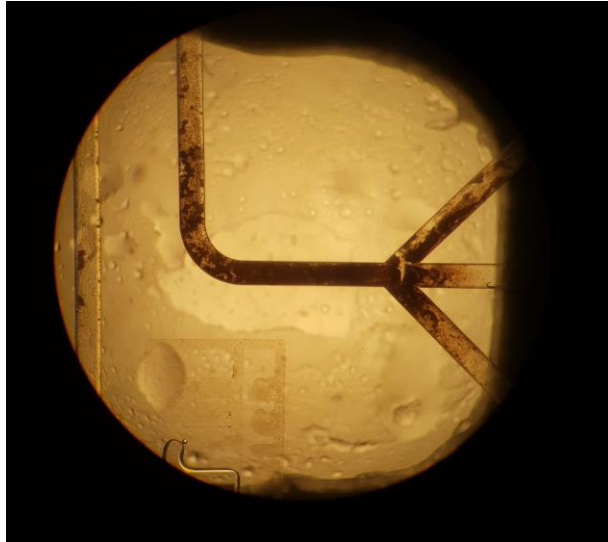
2.4.2. Značajke mikroreaktora

Kao što je spomenuto, male dimenzije mikroreaktora uzrok su višestrukih prednosti ovih reaktora u odnosu na makroskopske reaktore te uz to određuju njegove značajke.

U mikroreaktoru je tok fluida najčešće laminaran čime se znatno pojednostavljuje modeliranje i kontrola procesa. Pritom je potrebno voditi računa o hrapavosti mikrokanala jer zbog smanjenja njihovih dimenzija upravo hrapavost ima velik utjecaj na oblik strujanja, a time i na samu provedbu procesa. Mali promjer mikrokanala rezultira velikim omjerom površine i volumena mikroreaktora čime se povećava intenzitet procesa te smanjuje put prijenosa tvari i topline. Mikroreaktori su zbog toga prikladni za izvedbu reakcija kontroliranih upravo tim dvama procesima te općenito čine proces učinkovitijim. Visoka učinkovitost omogućuje korištenje manjih količina reaktanata i katalizatora te nastajanje manjih količina otpadnih tokova pa se takvi procesi smatraju sigurnijima, ekonomičnijima i ekološki prihvatljivijima od onih koji se provode u konvencionalnim reaktorima.¹⁹

Osim što je moguća istovremena provedba više procesa u jednom mikrokanalu, također je moguće spojiti više elemenata serijski ili paralelno kako bi se povećali učinkovitost procesa i protok. Paralelno povezivanje čipova s ciljem povećanja kapaciteta (engl. *numbering-up*) mnogo je jednostavnije u usporedbi s uvećanjem kod klasičnih reaktora. U takvom je sustavu moguće provoditi kontinuirani proces bez prestanka, čak i u slučaju problema s jednim od čipova i njegovoj zamjeni.^{19,20}

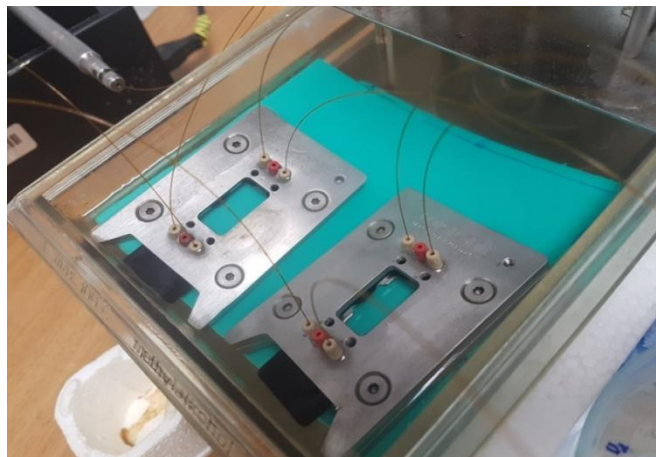
Jedan od nedostataka pri rukovanju mikroreaktorima je krhkost mikrokanala ukoliko su izrađeni od stakla ili silicija, što najčešće i jest slučaj, a veliki je problem i začepljenje mikrokanala (Slika 6.) pri radu s viskozim sustavima ili sustavima koji sadrže čvrste čestice. Zbog toga se mikroreaktori, unatoč brojnim prednostima, još uvijek ne mogu koristiti za sve procese te je potrebno daljnje istraživanje i prilagodba pojedinim sustavima.¹⁹



Slika 6. Začepljenje mikrokanala

2.4.3. Enzimatski katalizirana transesterifikacija suncokretovog ulja

Koristeći prednosti slobodnih enzima kao katalizatora transesterifikacije suncokretovog ulja i mikroreaktora kao procesne opreme istražuju se mogućnosti primjene takvog načina sinteze biodizela. Za uspješnu reakciju potrebno je odabrati u kojoj će se kombinaciji sirovine uvoditi u sustav budući da najveći broj mikroreaktora koji se koriste ima dva ulaza i dva izlaza (Slika 7.). Pritom je potrebno paziti na formiranje različitih faza zbog nemješljivosti komponenata reakcijske smjese te na utjecaj pojedinih komponenata reakcijske smjese na aktivnost enzima.



Slika 7. Mikroreaktori s dva ulaza i dva izlaza u kućičtima

Prva mogućnost uvođenja reaktanata i katalizatora podrazumijeva uvođenje ulja kao samostalne struje te mješavine enzima, pufera i metanola u drugoj struji. Za takvu konfiguraciju nije potreban emulgator budući da su metanol i enzim u puferu mješljivi te se dobiva jednolika raspodjela faza pri strujanju, no duga izloženost enzima velikim količinama metanola uzrokuje znatan pad aktivnosti enzima. Sljedeća moguća kombinacija, kojom bi se smanjio pad aktivnosti, je uvođenje enzima u puferu kao samostalne struje te emulzije ulja i metanola uz emulgator u drugoj struji. Uz emulgator Triton X-100, koji se pokazao najboljim pri ispitivanju stabilnosti emulzije, uočeno je da je takva emulzija ipak vrlo nestabilna pri provedbi reakcije te zahtjeva učestalo miješanje. Zbog svega navedenog, kao najpovoljnija kombinacija koristi se uvođenje ulja i pufera uz natrijev dodecil sulfat (SDS) kao emulgator u jednoj struji, a metanola u drugoj. Tako se smanjuje pad aktivnosti enzima jer nije izložen metanolu duže vrijeme, a uz korištenje SDS-a postignuta je stabilnost emulzije i nakon dužeg perioda te jednolika raspodjela faza pri strujanju uz minimalni utjecaj samog emulgatora na aktivnost enzima. Nedostatak kod takvog načina sinteze je moguća enzimatska hidroliza ulja zbog dužeg kontakta ulja i enzima, no korištenjem mikroreaktora, kojim se skraćuje vrijeme provedbe reakcije, hidrolizu se može izbjeći. Također, postotak vode u sustavu ne smije biti velik jer i voda može potaknuti neželjenu hidrolizu i narušiti aktivnost enzima. S druge strane određena količina vode je potrebna da bi se održala specifična 3D struktura lipaze te je iz literature poznato da taj udio mora biti između 5 i 10 % za postizanje optimalnih rezultata.¹⁵

Aktivnost lipaze ovisna je o temperaturi te maksimum ima na 40 - 45 °C pa se reakcija provodi upravo pri toj temperaturi.¹² Nakon provedbe reakcije, na izlazu iz reaktora potrebno je reakciju zaustaviti za što se koriste različiti pristupi.¹⁵

2.5. Pročišćavanje biodizela

Nakon provedene reakcije, dobiveni biodizel mora se pročistiti kako bi se dobila čistoća koja odgovara propisanim parametrima kvalitete što znači da se moraju ukloniti neizreagirani reaktanti, enzim i nusprodukti, primarno glicerol. Glicerol je topljiv u vodi te ima veću gustoću od biodizela pa se odvaja u donjem sloju, no unatoč tome dobiveni biodizel uglavnom ni tada ne zadovoljava propisanu čistoću pa je potrebno daljnje pročišćavanje.

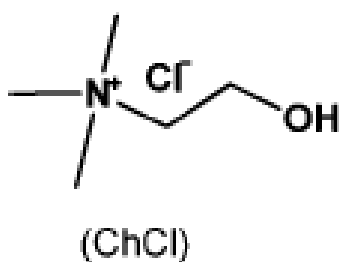
Najčešće korištena metoda pročišćavanja biodizela je mokro pranje vodom, no tako se dobivaju velike količine otpadnih voda, a također se može izgubiti dio biodizela što čini tu metodu ekološki i ekonomski nepovoljnom. Zbog toga se razvijaju alternativne metode bez korištenja vode, kao što su suho pranje uz korištenje različitih adsorbensa, ionskih izmjenjivača i otapala pri čemu se oni u pravilu ne mogu regenerirati. U procesima pročišćavanja biodizela sve

više se koriste membranski procesi separacije poput mikro-, ultra- i nanofiltracije koji su ekološki prihvatljiviji. U zadnje vrijeme intenzivirana su istraživanja u kojima se za pročišćavanje biodizela koriste eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES).³

2.5.1. Eutektička otapala

Eutektička otapala ubrajaju se u novu generaciju *zelenih otapala* što znači da odgovaraju smjernicama *zelene kemije* koja nalažu da otapala moraju biti jednostavna za upotrebu, nisko hlapiva, netoksična i stabilna, no ipak jednostavna za recikliranje i biorazgradiva. Zbog jednostavnije i ekonomičnije pripreme eutektičkih otapala u odnosu na ostala zelena otapala poput ionskih kapljevine, sve se više istražuje mogućnost njihove primjene.^{15,21}

Eutektička otapala su smjesa dviju ili više komponenata koje mogu biti u krutom ili kapljevitom stanju i koje stupaju u interakcije. U određenom omjeru komponenata, smjesa ima znatno niže talište nego svaka pojedina komponenta. Talište eutektičkih otapala je uglavnom ispod 100 °C te su stoga u pravilu u kapljevitom stanju pri sobnoj temperaturi. Kod pripreme takvih otapala uobičajena je upotreba kolin klorida (ChCl) kojem je potrebno dodati proton donor poput glicerola, etilen-glikola ili uree kako bi molekule mogle tvoriti vodikove veze. Kolin klorid (Slika 8.) po strukturi je kvaterna amonijeva sol te se u pripravi eutektičkih otapala koristi prvenstveno zbog niske cijene, biorazgradivosti i netoksičnosti, a također i jer je lako dostupna sirovina koja se može dobiti ekstrakcijom iz biomase ili jednostavnom sintezom. Općenito, brojnim kombinacijama raznih kvaternih amonijevih soli i donora vodikove veze može se dobiti velik broj različitih eutektičkih otapala.



Slika 8. Molekula kolin klorida²¹

Neka od fizikalno-kemijskih svojstava eutektičkih otapala, osim niskog tališta uzrokovano interakcijama halidnog aniona i atoma vodika, jesu gustoća veća u odnosu na vodu i velika viskoznost na sobnoj temperaturi. Također je bitno svojstvo eutektičkih otapala visoka topljivost mnogih tvari, pogotovo ugljikova dioksida i metalnih oksida, dok je za uspješno pročišćavanje biodizela važna vrlo dobra topljivost glicerola.²¹ Za potrebe pročišćavanja biodizela najboljim se eutektičkim otapalom pokazala kombinacija kolin klorida i etilen glikola.³

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Za provedbu eksperimenata korištene su sljedeće kemikalije:

- amonijev sulfat, Merck, Njemačka
- acetonitril, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Bradford reagens, BioRad, Njemačka
- etanol, Gram-mol d.o.o., Hrvatska
- F.A.M.E. mix GLC-10, Sigma-Aldrich, Austrija
- n-heptan, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- izoamilni alkohol, Sigma-Aldrich, Austrija
- izooktan, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- jestivo suncokretovo ulje, Zvijezda, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat, Lach-ner d.o.o., Češka
- kalijev hidrogenfosfat, Merck, Njemačka
- kalijev hidroksid, Acros Organics, Belgija
- kloroform, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- klorovodična kiselina, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L), Sigma-Aldrich, Njemačka (komercijalni enzim)
- metanol, VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- natrijev dodecil sulfat, Sigma-Aldrich, Austrija
- natrijev hidrogenfosfat, Kemika, Hrvatska
- natrijev hidrogenkarbonat monohidrat, Kemika, Hrvatska
- 4-nitrofenil acetat, Acros Organics, Belgija
- tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS), VWR Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo

3.1.2. Oprema

U eksperimentima je korištena sljedeća oprema:

- centrifuga Universal 320 R, Hettich, SAD
- filter Chromafil Xtra RC-20/25 0,45 µm, Macherey-Nagel, Njemačka
- kolona Zebron ZB-Wax, Phenomenax, SAD
- magnetska miješalica Combimag Reo, Ika, Kina

- magnetska miješalica Rotamix S-10, Tehnica, Slovenija
- mikroreaktor širine kanala 500 μm , Micronit, Nizozemska
- pH elektroda BlueLine 16 pH, SI Analytics, Njemačka
- pH metar Lab 860, Schott Instruments, Njemačka
- plinski kromatograf s FID detektorom, GC-2014, Shimadzu, Japan
- pumpa PHD 4400 i metalni klipovi volumena 8 mL, Harvard Apparatus, SAD
- pumpa Pump 33, Harvard Apparatus, SAD
- spektrofotometar UV-1601, Shimadzu, Japan
- tresilica Vibromix 313 EVT, Tehnica, Slovenija
- vodena kupelj Thermomix 1460, Braun, Njemačka

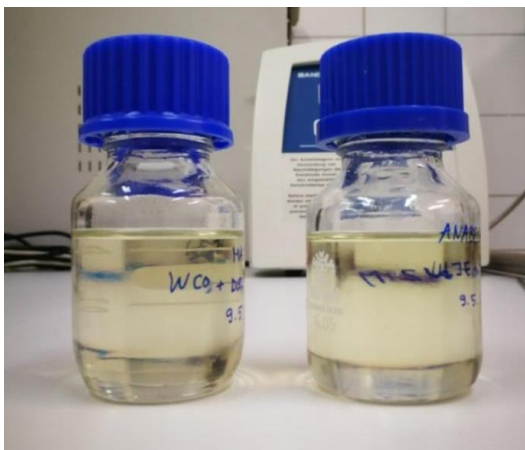
3.2. Metode

3.2.1. Kemijska sinteza biodizela

Kemijska sinteza biodizela provedena je u tikvici volumena 10 mL iz 60 mg jestivog suncokretovog ulja, 4 mL izooktana i 200 μL otopine kalijevog hidroksida u metanolu koncentracije 2 mol L^{-1} . Smjesa je dobro protresena i ostavljena da reagira na sobnoj temperaturi. Nakon bistrenja smjese odvoji se donji sloj koji sadrži glicerol te se u gornji doda 1 g natrijeva hidrogenkarbonata monohidrata zbog neutralizacije. Nakon neutralizacije, u tako dobivenoj smjesi određena je koncentracija FAME na plinskom kromatografu.

3.2.2. Sinteza biodizela u mikroreaktoru

Sintezi biodizela u mikroreaktoru prethodila je priprema reakcijskog pufera, a zatim potrebnih emulzija jestivog suncokretovog ulja i enzima uz kombinacije komercijalnog ili pročišćenog nekomercijalnog enzima u puferu ili DES-u čime se dobiju 4 različite emulzije (Slika 9.).



Slika 9. Emulzije ulja i enzima u DES-u

U svakoj emulziji volumni omjer ulja i faze koja sadrži enzim bio je 8:1, a koncentracija emulgatora SDS-a iznosila je $0,1 \text{ g L}^{-1}$. U slučaju komercijalnog enzima, druga faza sadržavala je enzim i fosfatni pufer, $c = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 ili DES u volumnom omjeru 1:9. Fosfatni pufer pripremljen je otapanjem 0,174 g kalijevog hidrogenfosfata u 100 mL destilirane vode i 0,136 g kalijevog dihidrogenfosfata u 100 mL destilirane vode te miješanjem ovako dobivenih otopina u potrebnom omjeru kako bi se dobila željena pH-vrijednost. Kod emulzije s pročišćenim nekomercijalnim enzimom i puferom jedna je faza čisti enzim, a kod korištenja DES-a omjer enzima i DES-a 1:9. Nakon što su svi sastojci pomiješani, emulzije su stavljene na tresilicu 25 min pri 600 okr min^{-1} . Količine svake od kemikalija u ove četiri emulzije prikazane su u Tablici 1.

Tablica 1. Sastav emulzija korištenih za sintezu biodizela u mikroreaktoru

1.	80 mL ulja + 9 mL fosfatnog pufera + 1 mL komercijalnog enzima + 0,009 g SDS-a
2.	80 mL ulja + 9 mL DES-a + 1 mL komercijalnog enzima + 0,009 g SDS-a
3.	8 mL ulja + 1 mL pročišćenog enzima + 0,0009 g SDS-a
4.	8 mL ulja + 0,9 mL DES-a + 0,1 mL pročišćenog enzima + 0,0009 g SDS-a

Biodizel je sintetiziran u mikroreaktoru s dva ulaza i dva izlaza s „Y-spojnica“ te je izrađen od stakla kojem su dimenzije kanala sljedeće: širina $500 \mu\text{m}$, visina $50 \mu\text{m}$ i duljina 332 mm što daje ukupni volumen od $8,3 \mu\text{L}$. Dvije klipne pumpe bile su spojene na reaktor silikatnim cjevčicama pri čemu je prvi metalni klip napunjen jednom od pripremljenih emulzija, a drugi metanolom. Mikroreaktor je stavljen u vodenu kupelj zagrijanu na $40 \text{ }^\circ\text{C}$ te su uzorci skupljani u epruvete uronjene u ledenu kupelj u kojima se nalazilo $100 \mu\text{L}$ Marmurne otopine, odnosno mješavine kloroforma i izoamilnog alkohola u volumnom omjeru 24:1 (Slika 10.).



Slika 10. Aparatura za sintezu biodizela u mikoreaktoru

Protoci na pumpama namješteni su prema omjeru tvari za sintezu biodizela u šaržnom reaktoru prema radu Budžaki et al.¹² te prikazani u Tablici 2. Korišten je omjer emulzija : metanol = 1 : 0,1243 te su prema tim protocima izračunata vremena zadržavanja uz korištenje formule:

$$\tau = \frac{V}{Q} \quad (1)$$

gdje je:

τ – vrijeme zadržavanja [min]

V – volumen mikoreaktora [μL]

Q – zbroj volumnih protoka procesnih struja [$\mu\text{L min}^{-1}$].

Prije početka sakupljanja svakog od uzorka bilo je potrebno pustiti da se reakcija provodi do uspostave ravnotežnog stanja, odnosno $4 \cdot \tau$, kako bi se sustav u potpunosti ustabilio. Za svaki protok sakupljano je 100 μL uzorka.

Tablica 2. Protoci procesnih struja te pripadajuća vremena zadržavanja, ravnotežna vremena i vremena skupljanja uzoraka za provedbu sinteze biodizela u mikroreaktoru

uzorak	1	2	3	4	5	6
Q emulzija ($\mu\text{L min}^{-1}$)	16,00	8,00	6,00	4,00	3,00	1,95
Q metanol ($\mu\text{L min}^{-1}$)	1,9888	0,9900	0,7458	0,4972	0,3729	0,2424
τ (min)	0,46	0,92	1,23	1,85	2,46	3,79
$4 \cdot \tau$ (min)	1,85	3,69	4,92	7,38	9,84	15,14
vrijeme sakupljanja (min)	5,56	11,12	14,82	22,24	29,65	45,61
uzorak	7	8	9	10	11	12
Q emulzija ($\mu\text{L min}^{-1}$)	0,24	0,38	0,45	0,55	0,76	1,10
Q metanol ($\mu\text{L min}^{-1}$)	0,0300	0,0466	0,0559	0,0684	0,0945	0,1367
τ (min)	30,63	19,69	16,41	13,42	9,71	6,71
$4 \cdot \tau$ (min)	122,51	78,75	65,63	53,69	38,85	26,85
vrijeme sakupljanja (min)	369,00	237,19	197,67	161,71	117,03	80,86

3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima lipaze

Aktivnost komercijalnog enzima lipaze mjerena je spektrofotometrijski te je za svako mjerenje pripravljena smjesa 100 μL emulzije i 3900 μL TRIS/HCl pufera, $c = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0. Pufer je pripremljen otapanjem 0,607 g TRIS-a u 100 mL destilirane vode, a pH-vrijednost mu je podešana dodatkom otopine klorovodične kiseline koncentracije 1 mol L^{-1} . U svaku od 3 kvarcne kivete dodano je 950 μL dobivene smjese pri čemu su kivete postavljene u vodenu kupelj na temperaturu $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Netom prije postavljanja kivete u spektrofotometar, dodano je 50 μL $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ otopine 4-nitrofenil acetata u acetonitrilu za koju je otopljeno 0,054 g 4-nitrofenil acetata u 600 μL acetonitrila. Mjerila se apsorbancija u vremenskom intervalu od 20 s pri valnoj duljini, $\lambda = 400 \text{ nm}$.

Mjerenje aktivnosti nekomercijalnog enzima provodilo se na isti način, a jedina razlika bila je korištenje razrijeđene otopine 4-nitrofenil acetata koncentracije $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ koja se dobije tako da se otopina koncentracije $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ 5 puta razrijedi acetonitriplom.

Vrijednosti volumne aktivnosti enzima izračunate su prema formulama:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon d V_E} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (2)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{c_E} \quad (3)$$

gdje je:

V.A. – volumna aktivnost enzima lipaze [U mL⁻¹]

V_r – ukupni volumen smjese [mL]

V_E – volumen enzima lipaze dodanog u smjesu [mL]

d – duljina kivete [cm]

ε – molarni apsorpcijski koeficijent 4-nitrofenil acetata [mL (μmol · cm)⁻¹]

ΔA/Δt – promjena apsorpcije u vremenu [-]

S.A. – specifična aktivnost enzima [U mg⁻¹]

c_E – koncentracija enzima [mg mL⁻¹].

3.2.4. Bradfordičina metoda određivanja koncentracije proteina

Koncentracija enzima lipaze u uzorku određivana je dodatkom 200 μL Bradfordičinog reagensa (pripremljenog miješanjem Bradford reagensa sa destiliranom vodom u omjeru 1:4) i 800 μL uzorka, prethodno 1.000 puta razrijeđenog fosfatnim puferom, c = 0,01 mol L⁻¹, pH 8,0 u plastičnu kivetu. Korišteni fosfatni pufer pripremljen je otapanjem 0,136 g kalijevog dihidrogen fosfata u 100 mL ultračiste vode te 3,54 g natrijevog hidrogenfosfata u 1 L ultračiste vode, a ovako dobivene otopine su miješane u potrebnom omjeru da se dobije željena pH-vrijednost. Nakon 5 minuta mjeri se apsorpcija spektrofotometrijski pri valnoj duljini, λ = 595 nm, a postupak se uvijek provodio u tri paralelna mjerenja. Prethodno je izrađen baždarni dijagram (Prilog 6.1.) korištenjem otopina poznatih koncentracija govedjeg serumskog albumina (BSA) te je pomoću ovakvog baždarnog pravca određena nepoznata koncentracija proteina, odnosno lipaze u uzorcima.

3.2.5. Pročišćavanje nekomercijalnog enzima

Nekomercijalni enzim dobiven je uzgojem mikroorganizma *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče pri čemu je fermentacija uz cirkulaciju zraka trajala 5, 6 i 7 dana u inkubatoru pri 45 °C. Nakon fermentacije provedena je ekstrakcija enzima u trajanju od 30 min pomoću fosfatnog pufera, c = 0,1 mol L⁻¹, pH 7 te je na 1 g uzorka korišteno 5 mL pufera. Uzorci su profiltrirani preko nabranog filter papira te postavljeni u centrifugu 10 min pri 4 °C i 10.000 okr min⁻¹. Tako dobiveni ekstrakti čuvani su u zamrzivaču.

Kako bi se provelo pročišćavanje dobivenog ekstrakta enzima, najprije je uzorak podvrgnut isoljavanju amonijevim sulfatom pri čemu je potrebna masa amonijeva sulfata izračunata prema formuli:

$$m = 0,7 \cdot 514,72 \cdot V_{uzorak} \quad (4)$$

gdje je:

m – masa potrebnog amonijeva sulfata [g]

V_{uzorak} – volumen uzorka nepročišćenog enzima [L].

Isoljavanje se provodilo postupnim dodatkom soli u uzorak postavljen na magnetsku miješalicu i u ledenu kupelj. Potom je dobivena smjesa centrifugirana 20 min na $14.000 \text{ okr min}^{-1}$ i $4 \text{ }^\circ\text{C}$ te su talog i supernatant odijeljeni. Talog je potom otopljen u 4,5 mL fosfatnog pufera, $c = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0 i dijaliziran 24 sata s dvije izmjene fosfatnog pufera, $c = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 8,0 (Slika 11.). Nakon svakog koraka pročišćavanja mjerena je aktivnost dobivenih uzoraka i određena koncentracija proteina Bradfordičinom metodom.²²



Slika 11. Dijaliza taloga u fosfatnom puferu

3.2.6. Određivanje koncentracije FAME i glicerola

Koncentracija FAME i glicerola nakon provedenih sinteza biodizela određivala se na plinskom kromatografu GC-2014 s FID detektorom uz korištenje kapilarne kolone Zebron ZB-Wax ($L = 30 \text{ m}$, $I.D. = 0,53 \text{ mm}$, $d = 1,00 \text{ } \mu\text{m}$) i plin nosioc helij za prvi sustav, $p = 22,4 \text{ kPa}$, a za preostale sustave uz plin nosioc dušik, $p = 22,4 \text{ kPa}$. Prije analize kojom se određuje sadržaj

FAME, uzorak je razrjeđen *n*-heptanom 100 puta, homogeniziran i profiltriran filtrom promjera pora 0,45 μm, a svaki uzorak analiziran je dva puta. Za određivanje koncentracije glicerola postupak je isti uz korištenje etanola umjesto *n*-heptana kao otapala. Koncentracije u uzorcima dobivene su iz baždarnih dijagrama (Prilozi 6.2. – 6.12.) za koje je korišten standard metilnih estera masnih kiselina F.A.M.E. mix GLC-10. Pikovi su identificirani te su im određena retencijska vremena čije su vrijednosti prikazane u Tablici 3. Na temelju poznatih koncentracija masnih kiselina u standardu izrađeni su baždarni dijagrami, a na isti je način izrađen baždarni dijagram za glicerol. Konverzije u sustavima određene su usporedbom dobivenih vrijednosti koncentracija s rezultatima provedene kemijske sinteze biodizela pri čemu je ukupna koncentracija FAME u uzorku dobivena zbrajanjem koncentracija estera palmitinske, stearinske, oleinske, linolne i linoleinske kiseline u uzorku.

Tablica 3. Retencijska vremena pojedinih masnih kiselina i glicerola u sustavima plinova nosioca helija i dušika

plin nosioc	<i>t</i> (min)	
	helij	dušik
glicerol	8,2	8,8
palmitinska kiselina	7,74	8,20
stearinska kiselina	10,59	11,57
oleinska kiselina	10,87	11,9
linolna kiselina	11,58	12,00
linoleinska kiselina	12,62	13,1

3.2.7. Utjecaj temperature na aktivnost enzima lipaze

S obzirom da se sinteza biodizela provodila u vodenoj kupelji na 40 °C, napravljeno je ispitivanje aktivnosti enzima pri različitim temperaturama. Ispitane su aktivnosti komercijalnog enzima od 25 °C do 80 °C u temperaturnim intervalima od 5 °C.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedena je kemijska sinteza biodizela katalizirana kalijevim hidroksidom, kao i četiri biokemijske sinteze biodizela u mikroreaktoru katalizirane enzimom lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*. U mikroreaktorskim sintezama korišteni su isti omjeri reaktanata kao i u kemijskoj sintezi, ali različiti sustavi enzim-otapalo, odnosno kombinacije komercijalnog enzima i pročišćenog enzima pri čemu su kao reakcijski medij korišteni fosfatni pufer ili DES. Sustavi su međusobno uspoređeni na temelju konverzija pri određenim vremenima zadržavanja izračunatih na temelju kemijske sinteze biodizela. Također, na temelju koncentracija glicerola u pojedinim sustavima i uzorcima analizirano je pročišćavanje biodizela DES-om u istom sustavu u kojem se provodi i sinteza biodizela.

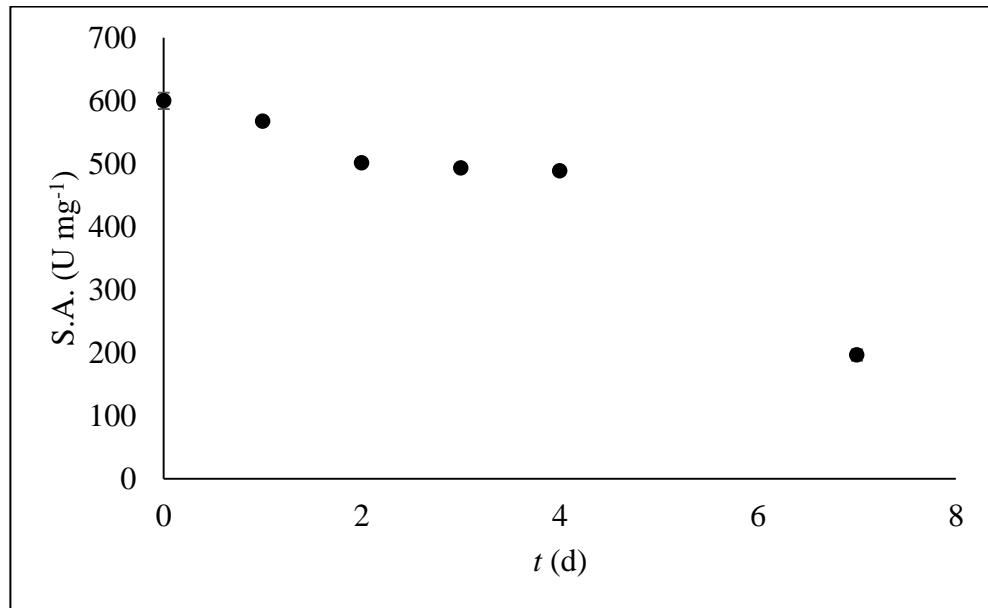
Praćena je i aktivnost komercijalnog enzima kroz određeno vremensko razdoblje te pri različitim temperaturama. Provedeno je pročišćavanje ekstrakta lipaze, odnosno nekomercijalnog enzima. Pri postupku pročišćavanja praćene su aktivnost enzima i koncentracija proteina u svakom koraku. U konačnom pročišćenom uzorku određena je koncentracija proteina te dinamička promjena aktivnosti enzima. Na temelju tako dobivenih podataka uspoređena su oba enzima te analiziran njihov utjecaj na sintezu biodizela u mikroreaktoru.

4.1. Kemijska sinteza biodizela

Nakon provedbe kemijske sinteze biodizela analizom na plinskom kromatografu dobivene su vrijednosti koncentracija estera palmitinske, stearinske, oleinske i linolne kiseline u uzorku te su redom iznosile: 105,52, 35,43, 516,85 i 931,82 mg mL⁻¹. Vrijednosti koncentracija estera su zbrojene te je dobiveno da je ukupna koncentracija FAME u uzorku 1.583,22 mg mL⁻¹ kada je u kromatografskoj analizi korišten helij kao plin nosioc. Vidljivo je da je najzastupljenija masna kiselina u jestivom suncokretovom ulju linolna kiselina. Također, određena je i ukupna koncentracija FAME u uzorku u kromatografskoj analizi kada je korišten dušik kao plin nosioc koja je iznosila 986,06 mg mL⁻¹.

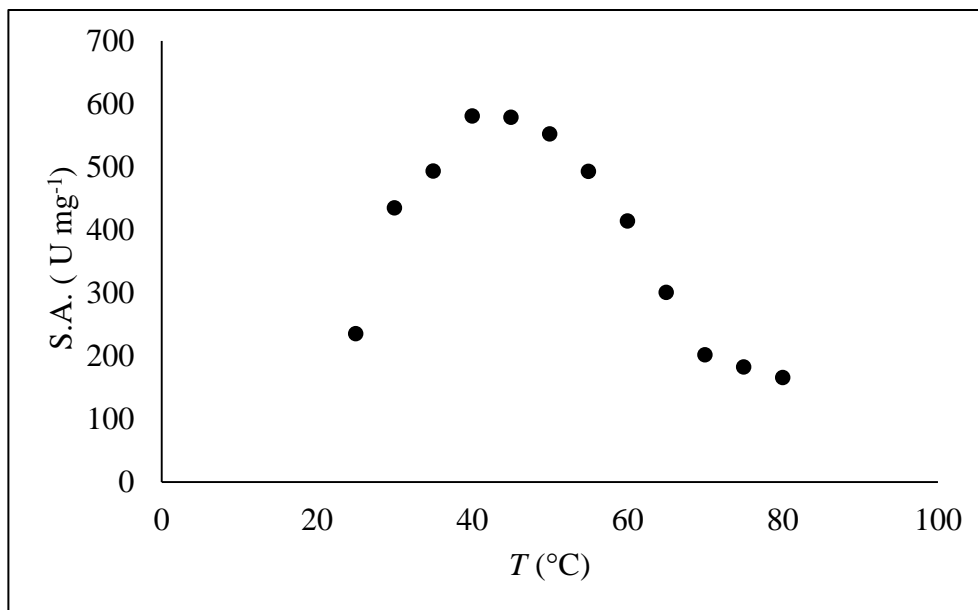
4.2. Aktivnost komercijalnog enzima lipaze

Prilikom rada s komercijalnim enzimom lipaza (*Lipolase 100 L*), svakodnevno je praćena aktivnost enzima u emulziji s fosfatnim puferom kao reakcijskim medijem. Na Slici 12. prikazan je pad specifične aktivnosti enzima lipaze kroz period od 7 dana. Obzirom na značajan pad aktivnosti nakon 7 dana provedbe pokusa (podaci nedostupni između četvrtog i sedmog dana), proces sinteze biodizela u mikroreaktoru bilo je potrebno prekinuti nakon 4-5 dana njegove provedbe te pripremiti svježu emulziju (Tablica 1.).



Slika 12. Aktivnost komercijalnog enzima lipaze

Također je mjerena aktivnost enzima pri različitim temperaturama te je uočen maksimum aktivnosti pri temperaturi od 40 °C čime je potvrđen izbor temperature optimalne za provedbu sinteze biodizela u mikroreaktoru pronađen u literaturi (Slika 13.).¹⁵



Slika 13. Utjecaj temperature na aktivnost enzima lipaze

4.3. Pročišćavanje ekstrakta lipaze dobivene fermentacijom na čvrstim nosačima

Koncentracija proteina i aktivnost enzima lipaze praćeni su tijekom procesa pročišćavanja enzima lipaze, odnosno ekstrakta dobivenog fermentacijom na čvrstim nosačima (Tablica 4.). Mjerenja su provedena u izvornom uzorku - nepročišćenom ekstraktu, uzorku dobivenom nakon isoljavanja – precipitatu, supernatantu i talogu dobivenom nakon što je precipitat resuspendiran i centrifugiran te u resuspendiranom talogu nakon dijalize.

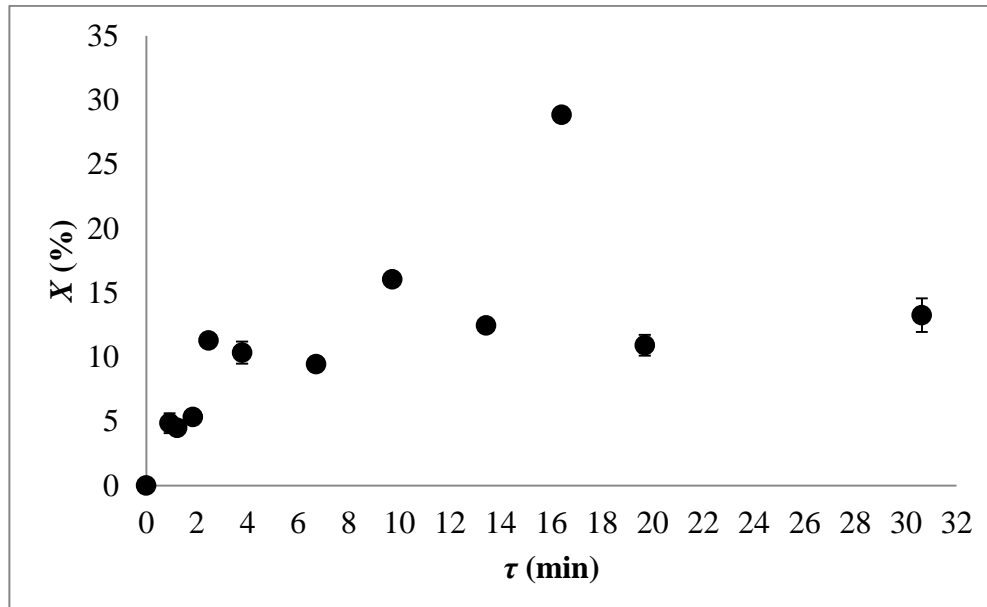
Tablica 4. Aktivnost nekomercijalnog enzima po koracima pri pročišćavanju

Korak pročišćavanja	Volumen (mL)	Ukupno (U)	Ukupno proteina (mg)	V. A. (U mL ⁻¹)	Sadržaj proteina (mg mL ⁻¹)	S. A. (U mg ⁻¹)
Izvorni uzorak	40,0	2231,28	730,85	55,781	18,271	3,053
Precipitacija	40,0	3571,99	674,13	89,300	16,853	5,299
Supernatant	36,0	1524,53	523,44	42,348	14,540	2,910
Talog	3,5	328,88	58,29	93,967	16,654	5,640
Dijaliza	3,0	135,66	38,62	45,220	12,873	3,510

Iz rezultata prikazanih u Tablici 4. vidljivo je da je koncentracija proteina tijekom procesa pročišćavanja (od izvornog uzorka do dijalize) pala u odnosu na onu u početnom uzorku. Isto vrijedi i za volumnu aktivnost enzima. Međutim, specifična aktivnost uzorka enzima je nakon dijalize nešto viša nego u izvornom uzorku što ukazuje na uspješno provedeno pročišćavanje ekstrakta. Dodatan pokazatelj uspješnosti procesa pročišćavanja je i niska vrijednost specifične

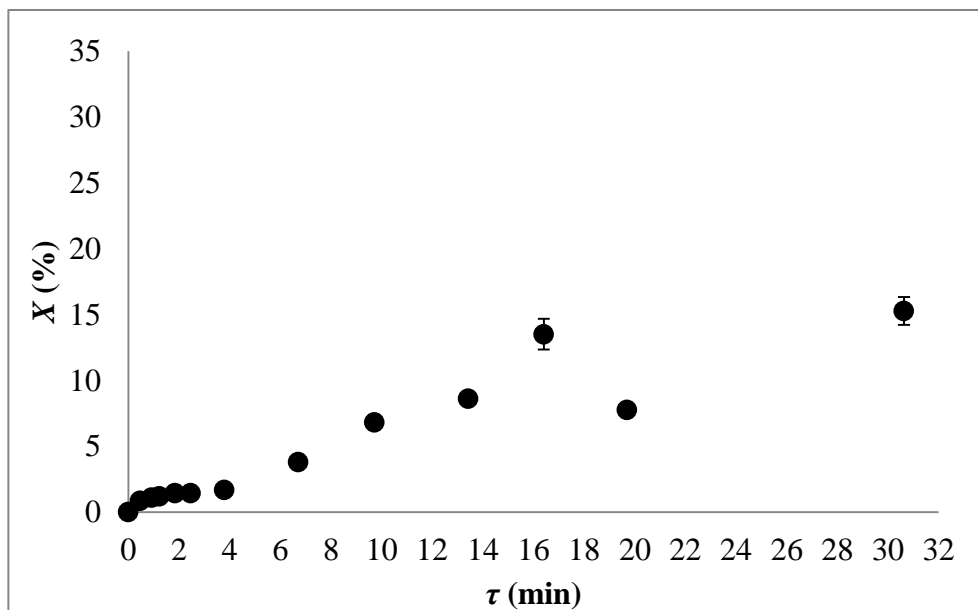
aktivnosti enzima u supernatantu nakon centrifugiranja te posljedično visoka vrijednost istog pokazatelja u talogu.

4.4. Sinteza biodizela u mikroreaktoru



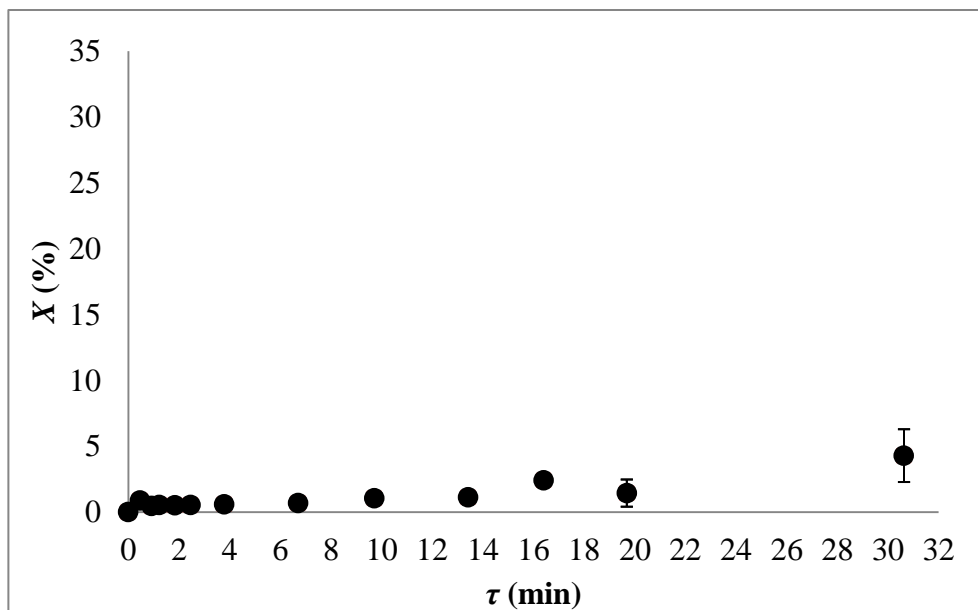
Slika 14. Utjecaj vremena zadržavanja na konverziju za sustav 1

Na Slici 14. prikazani su rezultati sinteze biodizela uz komercijalni enzim u puferu (sustav 1) pri čemu je maksimalna konverzija biodizela postignuta pri vremenu zadržavanja ($\tau = 16,4$ min) i iznosila je $X = 28,85$ %. U sustavu 1 kao prva ulazna procesna struja je korištena emulzija ulja, komercijalnog enzima u fosfatnom puferu i SDS-a dok je druga ulazna procesna struja bila metanol. Vidljivo je da se konverzija povećava s povećanjem vremena zadržavanja pri čemu za vremena zadržavanja veća od $\tau = 16,4$ min dolazi do smanjenja konverzije što može biti posljedica smanjenja aktivnosti enzima tijekom provedbe pokusa ili inhibicije metanolom.



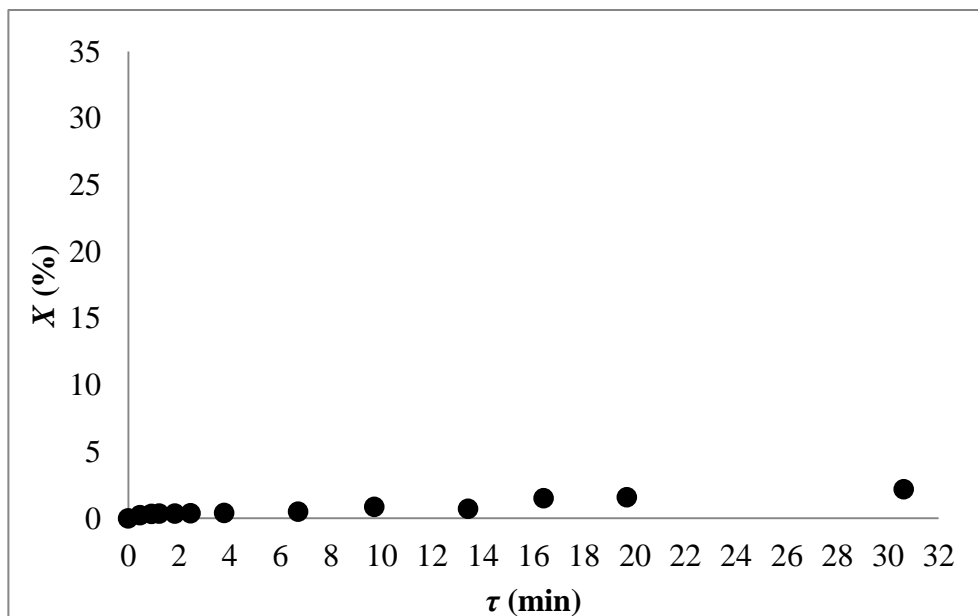
Slika 15. Utjecaj vremena zadržavanja na konverziju za sustav 2

U sustavu 2 kao prva ulazna procesna struja je korištena emulzija ulja, komercijalnog enzima u DES-u i SDS-a dok je druga ulazna procesna struja kao i u prethodnom pokusu bila metanol. Iz rezultata prikazanih na Slici 15. vidljivo je da je maksimalna konverzija u sustavu 2 postignuta pri najvećem vremenu zadržavanja ($\tau = 30,63$ min) te je iznosila $X = 15,27$ %. U ovom pokusu konverzija se povećava praktički linearno s povećanjem vremena zadržavanja. U usporedbi s prethodnim pokusom maksimalna konverzija je praktički dva puta manja što je vrlo vjerojatno posljedica toga što je u ovom pokusu umjesto pufera kao glavna komponenta reakcijskog medija korišten DES.



Slika 16. Utjecaj vremena zadržavanja na konverziju za sustav 3

U sustavu 3 kao prva ulazna procesna struja je korištena emulzija ulja, pročišćenog enzima u puferu i SDS-a dok je metanol uveden kao druga procesna struja. Iz rezultata prikazanih na Slici 16. vidljivo je da je maksimalna konverzija u ovom sustavu (sustav 3) također postignuta za najveće vrijeme zadržavanja ($\tau = 30,63$ min) te je iznosila $X = 4,29$ %. Kao i u prethodnom pokusu i u ovom pokusu je konverzija praktički linearno rasla s povećanjem vremena zadržavanja, ali je njena vrijednost značajno manja od one postignute u sustavima 1 i 2 što je vjerojatno posljedica toga što je u ovom sustavu korišten pročišćeni enzim čija je aktivnost znatno manja (oko 170 puta) od one komercijalnog enzima korištenog u prethodnim pokusima.



Slika 17. Utjecaj vremena zadržavanja na konverziju za sustav 4

Iz rezultata prikazanih na Slici 17. vidljivo je da je maksimalna konverzija u sustavu 4 postignuta također pri najvećem vremenu zadržavanja ($\tau = 30,63$ min) i iznosila je $X = 2,18$ %. U sustavu 4 kao prva ulazna procesna struja je korištena emulzija ulja, pročišćenog enzima u DES-u i SDS-a dok je metanol uveden kao druga procesna struja.

U sva četiri sustava konverzija raste s vremenom zadržavanja uz iznimku sustava 1 za veća vremena zadržavanja. Ovo povećanje konverzije s vremenom zadržavanja je očekivano i posljedica je dužeg kontakta komponenata reakcijske smjese te posljedično veće količine nastalog produkta. Kako je prethodno komentirano smanjenje konverzije s povećanjem vremena zadržavanja za sustav 1 može biti posljedica pada aktivnosti enzima. Kako su pokusi u svakom od sustava trajali po nekoliko dana vrlo vjerojatno je došlo i do pada aktivnosti enzima što je pokazano i ranijim pokusima (Slika 12.). Osim ovoga, u sustavu 1 je primijećeno i taloženje enzima u puferu te razdvajanje pojedinih komponenata emulzije nakon 4-5 dana provedbe pokusa što je vjerojatno također utjecalo na smanjenje konverzije pri većim vremenima zadržavanja.

Tablica 5. Usporedba optimalnih rezultata pokusa provedenih za sustave 1, 2, 3 i 4

Sustav	1	2	3	4
X (%)	28,85	15,27	4,29	2,18
γ (FAME) (mg mL ⁻¹)	114,37	30,6	9,66	4,33
τ (min)	16,64	30,63	30,63	30,63
γ (glicerol) (mg mL ⁻¹)	10,68	5,97	0,38	0,52

U Tablici 5. prikazana je usporedba maksimalnih konverzija dobivenih u sva četiri sustava s pripadajućim vremenima zadržavanja, koncentracijama FAME i koncentracijama glicerola. Najveća konverzija je postignuta u sustavu 1 gdje je reakcijski medij bio fosfatni pufer pri čemu je ova konverzija postignuta za kraće vrijeme zadržavanja u odnosu na ostale sustave.

Usporedbom rezultata dobivenih u sustavima 1, 3 i 4, veća konverzija u sustavu 1 može se objasniti značajno većom volumnom aktivnošću komercijalnog enzima u odnosu na volumnu aktivnost pročišćenog enzima. Nadalje, usporedbom rezultata dobivenih u sustavima 1 i 2, gdje je korišten komercijalni enzim, niža konverzija u sustavu 2 zasigurno je posljedica prisutnosti DES-a koji je korišten u ovom sustavu umjesto pufera koji je bio korišten u sustavu 1. Poznato je iz literature da je prisustvo vode neophodno za održavanje 3D strukture enzima lipaza (optimalni udio vode u reakcijskoj smjesi treba biti od 5 do 10 %).¹⁵ Kako je u sustavu 2, gdje je umjesto pufera korišten DES, udio vode iznosio približno 1 %, manje vrijednosti konverzije su bile i očekivane. Stoga bi u daljnjim pokusima transesterifikaciju bilo potrebno provesti s vodenim DES-ovima, odnosno DES-ovima koji u svom sastavu imaju i vodu.

U Tablici 5. prikazane su i koncentracije glicerola, nusprodukta nastalog tijekom sinteze biodizela u mikroreaktoru. Najveće vrijednosti koncentracija glicerola u svakom od sustava su očekivano dobivene pri najvećim konverzijama, odnosno pri najvećim vremenima zadržavanja.

5. ZAKLJUČAK

Iz rezultata provedenih eksperimenata može se zaključiti sljedeće:

- Određena je ovisnost aktivnosti komercijalnog enzima lipaze o vremenu i temperaturi te je uočen znatan pad aktivnosti enzima lipaze tijekom sedam dana provedbe pokusa, dok je maksimalna aktivnost enzima lipaze izmjerena pri temperaturi od 40 °C.
- Provedeno je pročišćavanje ekstrakta enzima lipaze, odnosno nekomercijalnog enzima dobivenog fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na čvrstim nosačima. Nakon pročišćavanja sirovog ekstrakta enzima lipaze došlo je do 15 %-tnog porasta vrijednosti specifične aktivnosti enzima koja je iznosila 3,51 U/mg.
- Od četiri različita sustava korištena za sintezu biodizela u mikroreaktoru kao najbolji se pokazano onaj u kojemu je kao prva procesna struja u reaktor uvođena emulzija koja je sadržavala komercijalni enzim u fosfatnom puferu dok je kao druga ulazna procesna struja korišten metanol pri čemu je postignuta konverzija $X = 28,85 \%$ za vrijeme zadržavanja $\tau = 16,4$ min.
- U svim provedenim pokusima i za sve sustave konverzija u pravilu raste s porastom vremena zadržavanja.

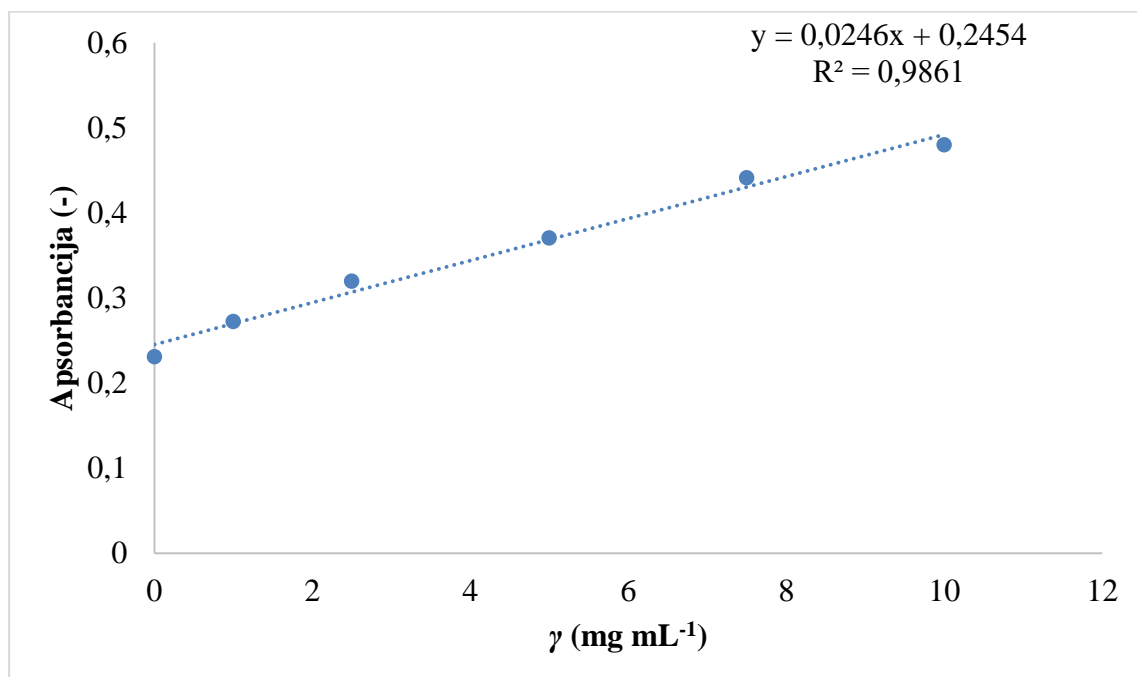
6. LITERATURA

1. Demirbas, A., Progress and recent trends in biodiesel fuels, *Energy Convers. Manage.*, 50 (2009) 14-34.
2. Sinčić, D., Biodizel: svojstva i tehnologija proizvodnje, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.
3. Franjo, M., Šalić, A., Zelić, B., Microstructured devices for biodiesel production by transesterification, *Biomass Conv. Bioref.* 8 (2018) 1005-1020.
4. Šalić, A., Zelić, B., Microreactors - portable factories for biodiesel fuel production, *Goriva Maziva*, 50 (2011) 85-110.
5. Sinčić, D., Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela I, *Kem. Ind.*, 63 (2014) 19-31.
6. McMurry, J., Osnove organske kemije, Zrinski d.d., Čakovec, 2014., str. 538-541.
7. Ma, F., Hanna, M. A., Biodiesel production: A review, *Bioresour. Technol.*, 70 (1999) 1-15.
8. Kondić, V., Višnjić, V., Pisačić, K., Bojanić, B., Prednosti, nedostaci i ekološki učinci biodizelskog goriva, *Teh. Glas.*, 9 (2015) 260-263.
9. Wade, L. G. ml., *Organska kemija, Školska knjiga*, Zagreb, 2017., str. 1005-1006.
10. Atkins, P., de Paula, J., *Atkins' Physical Chemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2006., str. 17.
11. Zrnčević, S., *Kataliza i katalizatori*, HINUS, Zagreb, 2005., str. 5-6.
12. 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.
13. Semwal, S., Arora, A. K., Badoni, R. P., Tuli, D. K., Biodiesel production using heterogeneous catalysts, *Bioresour. Technol.*, 102 (2011) 2151-2161.
14. Sinčić, D., Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela III, *Kem. Ind.*, 63 (2014) 83-91.
15. 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.
16. Sørensen, M. H., Ng, J. B. S., Bergström, L., Alberius, P. C. A., Improved enzymatic activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in a hydrophobic particulate mesoporous carrier, *J. Colloid Interface Sci.*, 343 (2010) 359-365.

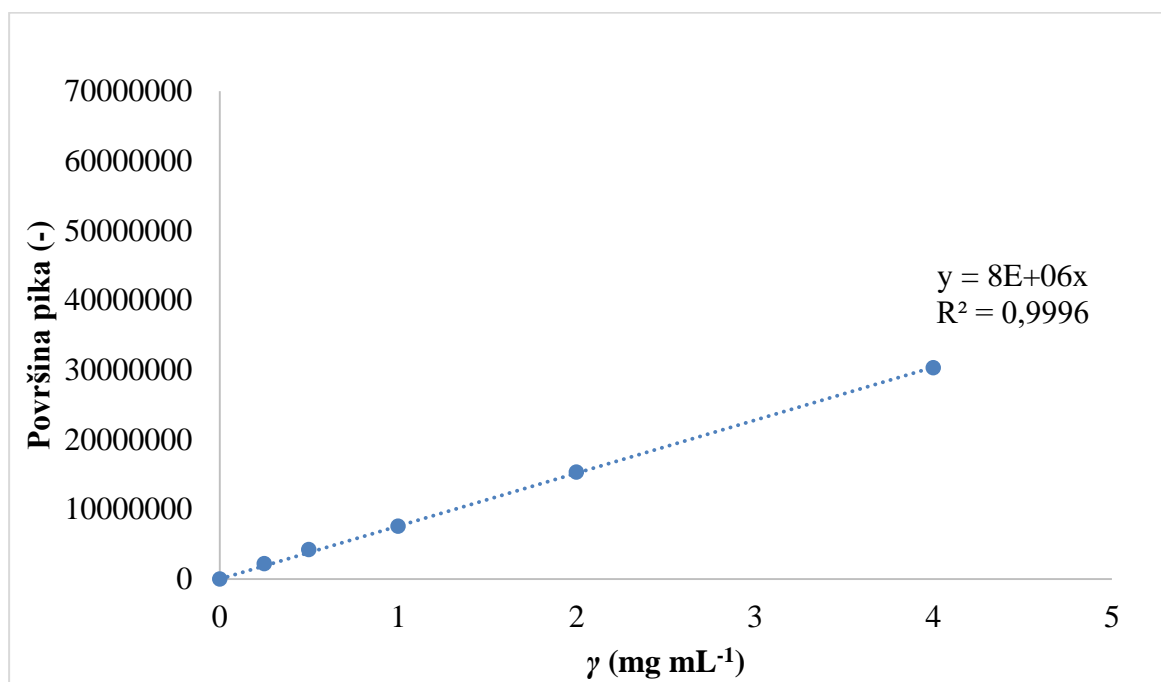
17. Anobom, C. D., Pinheiro, A. S., De-Andrade, R.A., Aguiéiras, E. C. G., Andrade, G. C., Moura, M. V., Almeida, R. V., Freire, D. M., From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases, *BioMed Res. Int.*, 2014 (2014) 1-11.
18. Fernandez-Laufente, R., Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 62 (2010) 197-212.
19. Šalić, A., Tušek, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B., Mikroreaktori, *Kem. Ind.*, 59 (2010) 227-248.
20. Šalić, A., Zelić, B., Synergy of microtechnology and biotechnology: Microreactors as an effective tool for biotransformation processes, *Food Technol. Biotechnol.*, 56 (2018) 464-479.
21. Zhang, Q., De Oliverira Vigier, K., Royer, S., Jerome, F., Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012) 7108-7146.
22. Singh, M. K., Singh, J., Kumar, M., Thakur, I. S., Novel lipase from basidiomycetes *Schizophyllum commune* ISTL04 produced by solid state fermentation of *Leucaena leucocephala* seeds, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 110 (2014) 92-99.

7. PRILOZI

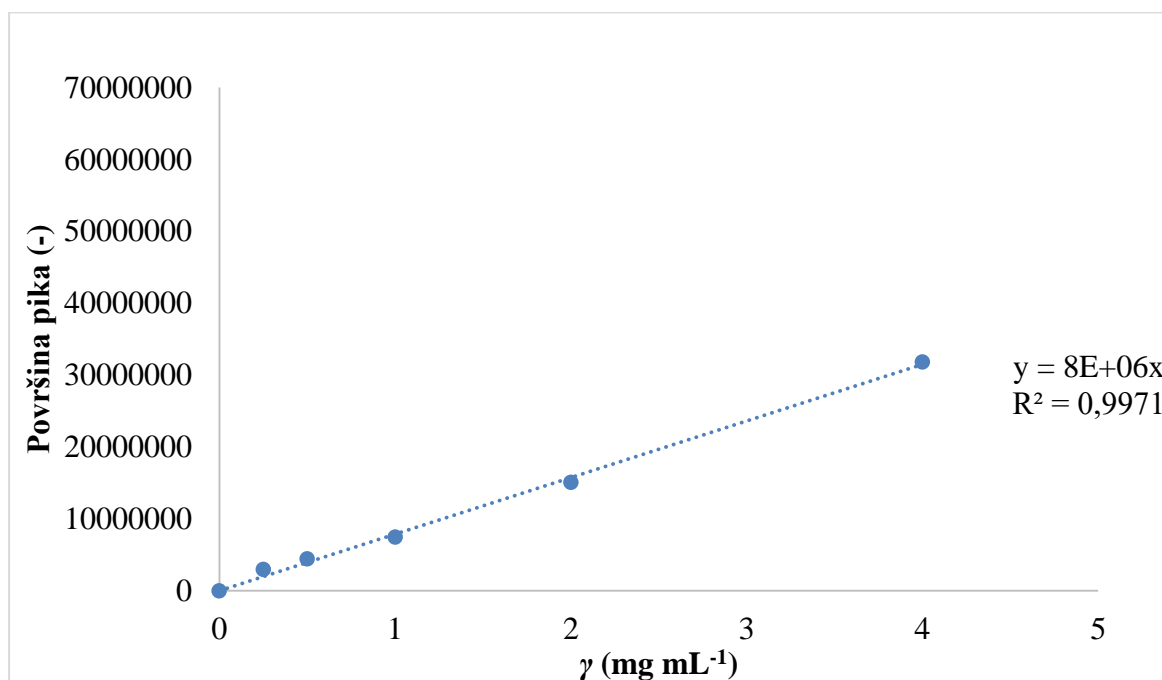
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina



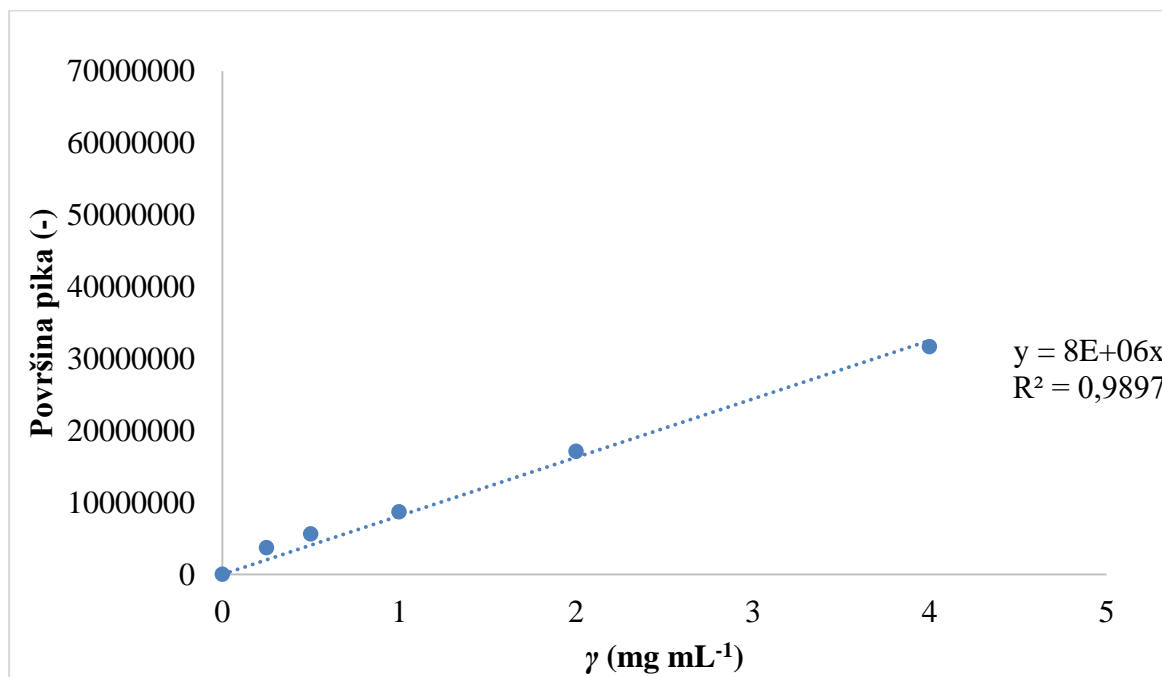
Prilog 2. Baždarni dijagram estera palmitinske kiseline uz plin nosioc helij



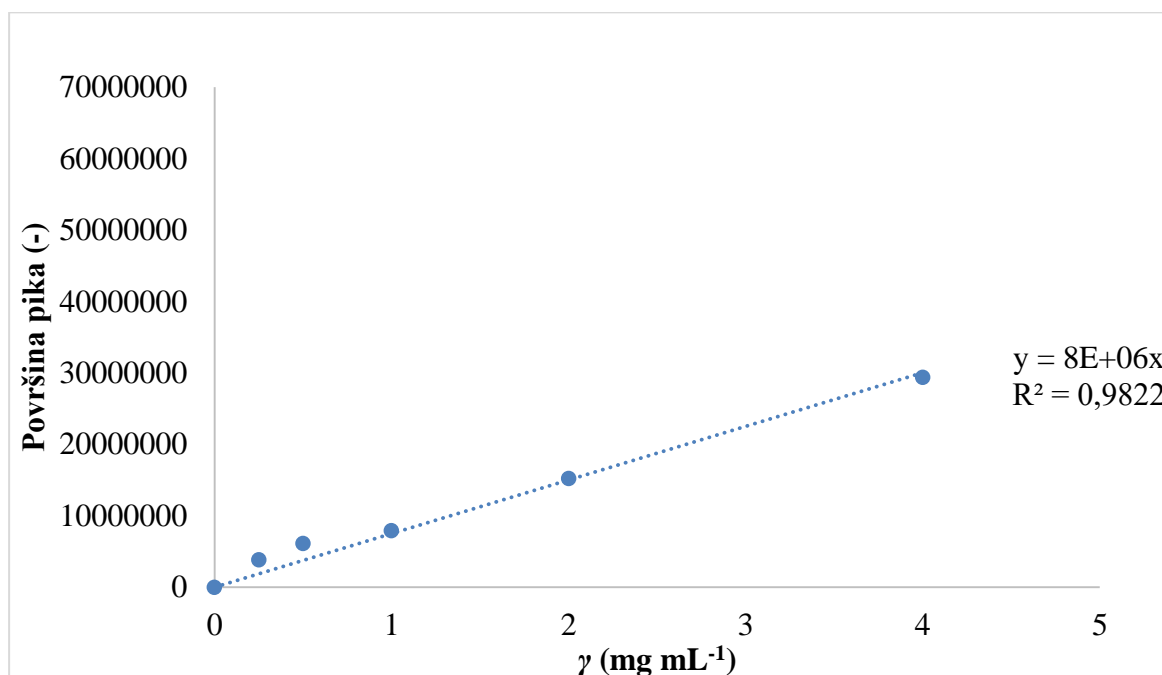
Prilog 3. Baždarni dijagram estera stearinske kiseline uz plin nosioc helij



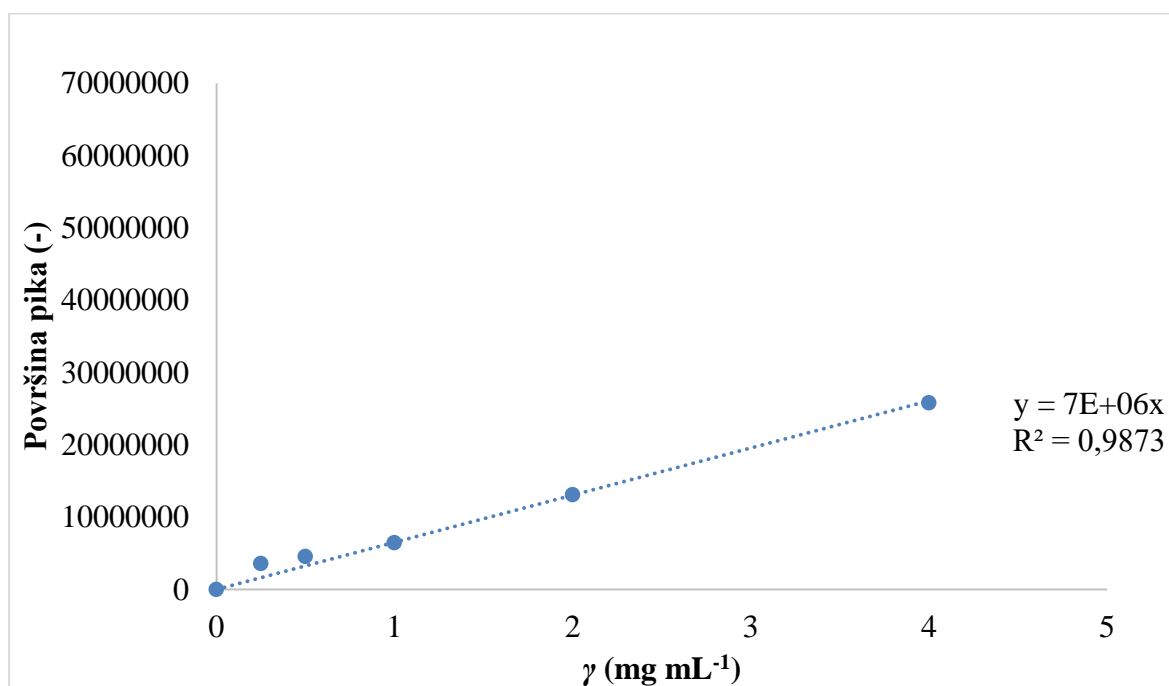
Prilog 4. Baždarni dijagram estera oleinske kiseline uz plin nosioc helij



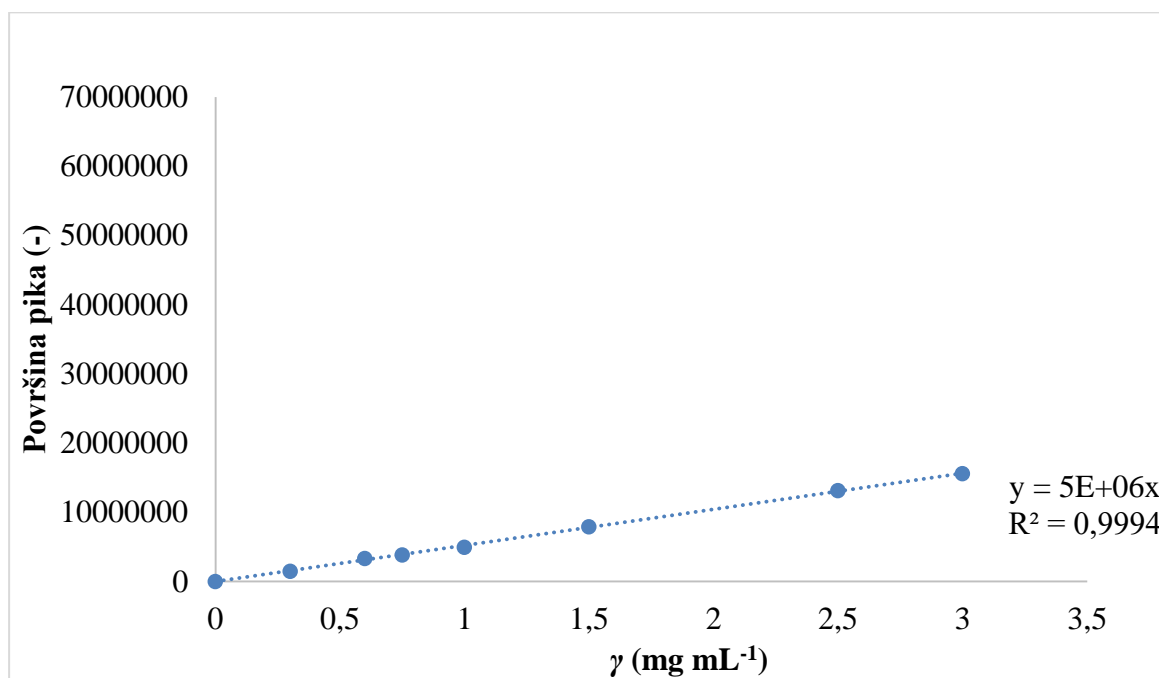
Prilog 5. Baždarni dijagram estera linolne kiseline uz plin nosioc helij



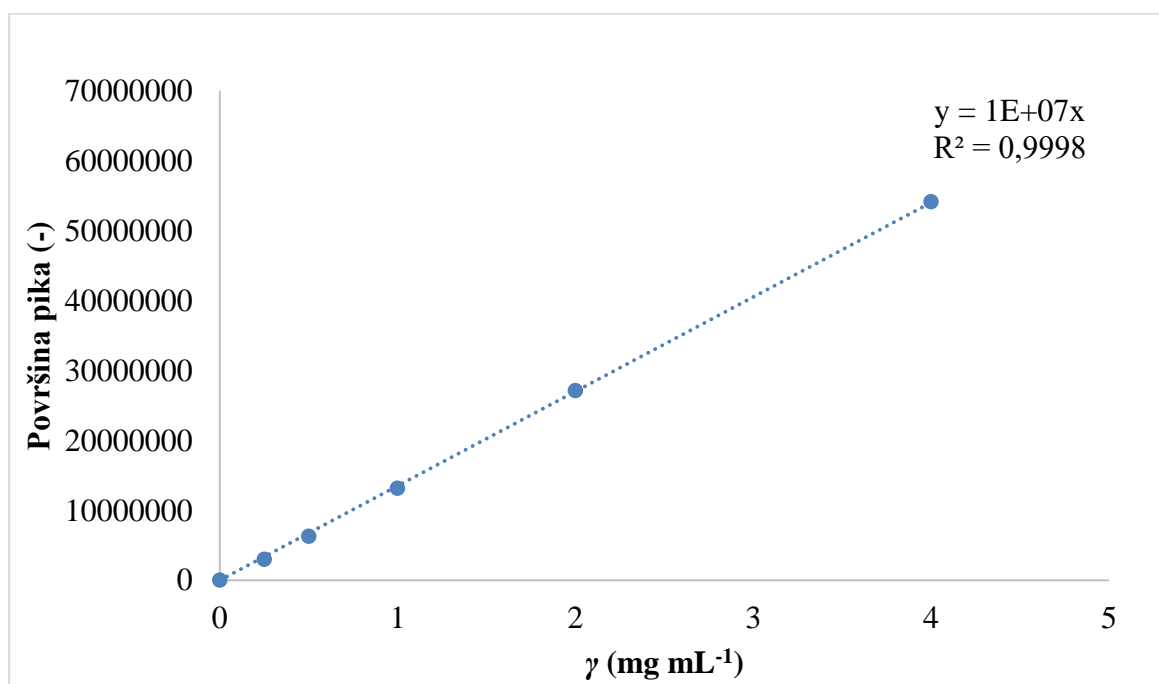
Prilog 6. Baždarni dijagram estera linoleinske kiseline uz plin nosioc helij



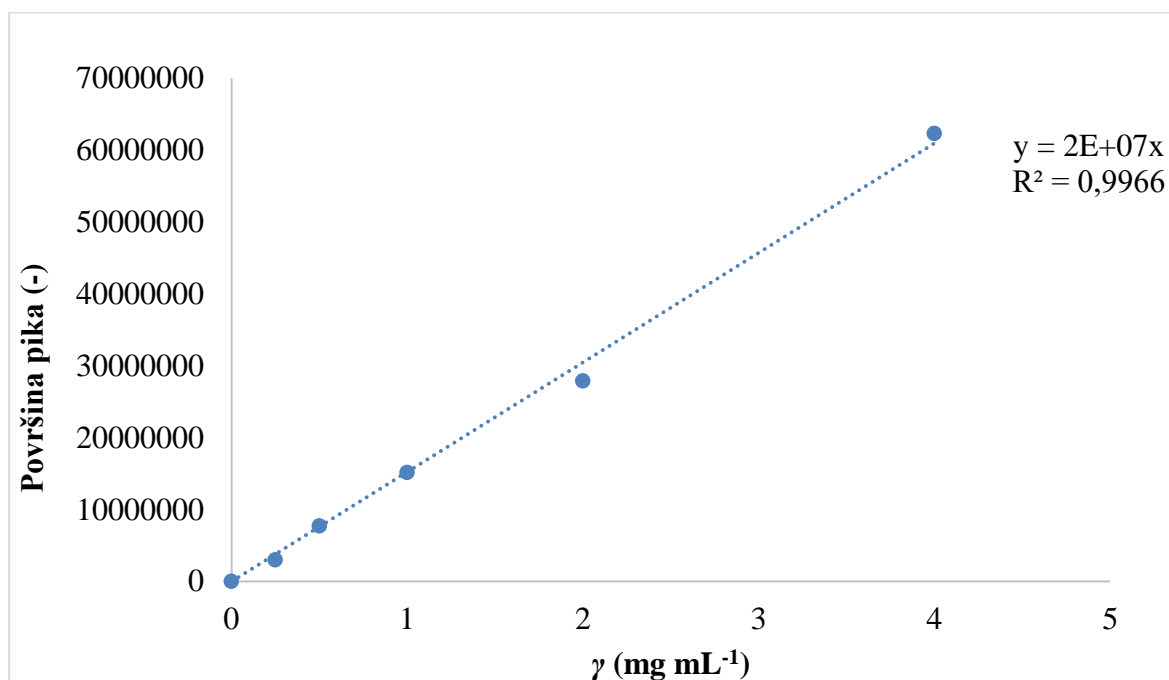
Prilog 7. Baždarni dijagram glicerola uz plin nosioc helij



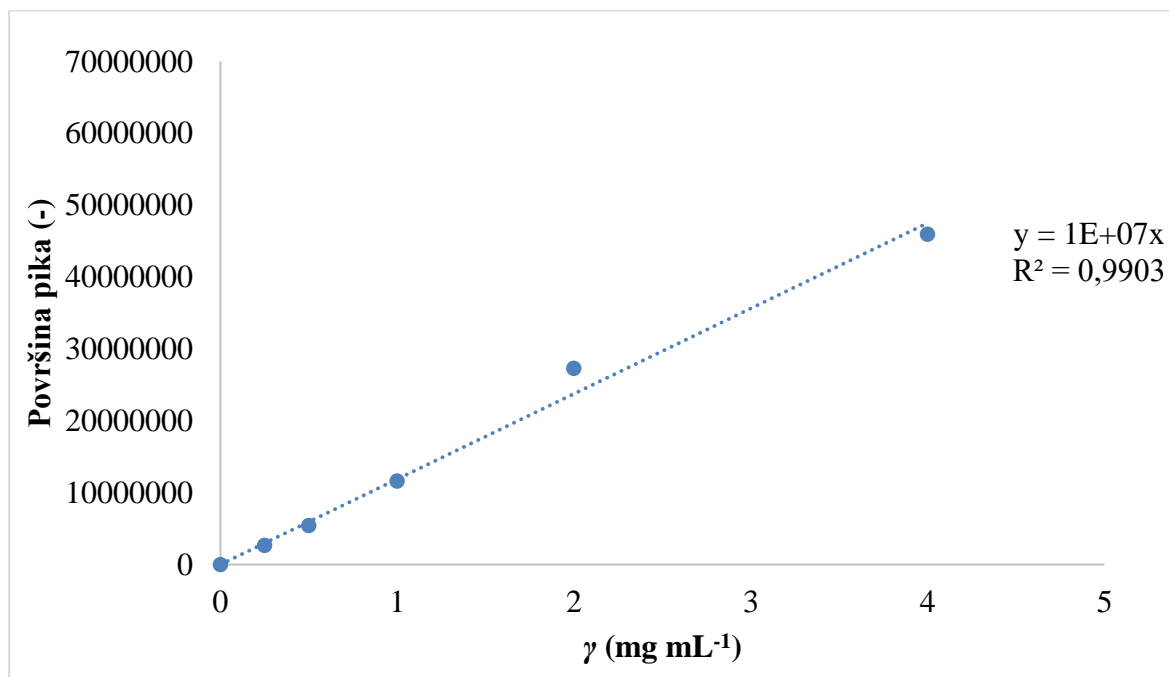
Prilog 8. Baždarni dijagram estera palmitinske kiseline uz plin nosioc dušik



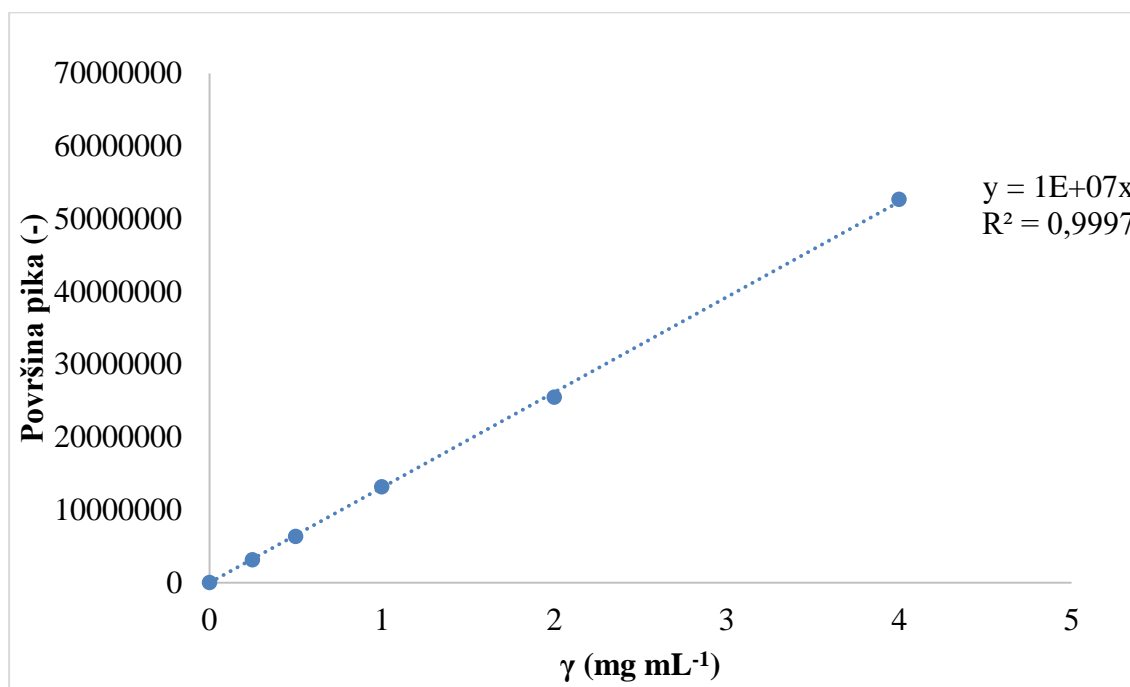
Prilog 9. Baždarni dijagram estera stearinske kiseline uz plin nosioc dušik



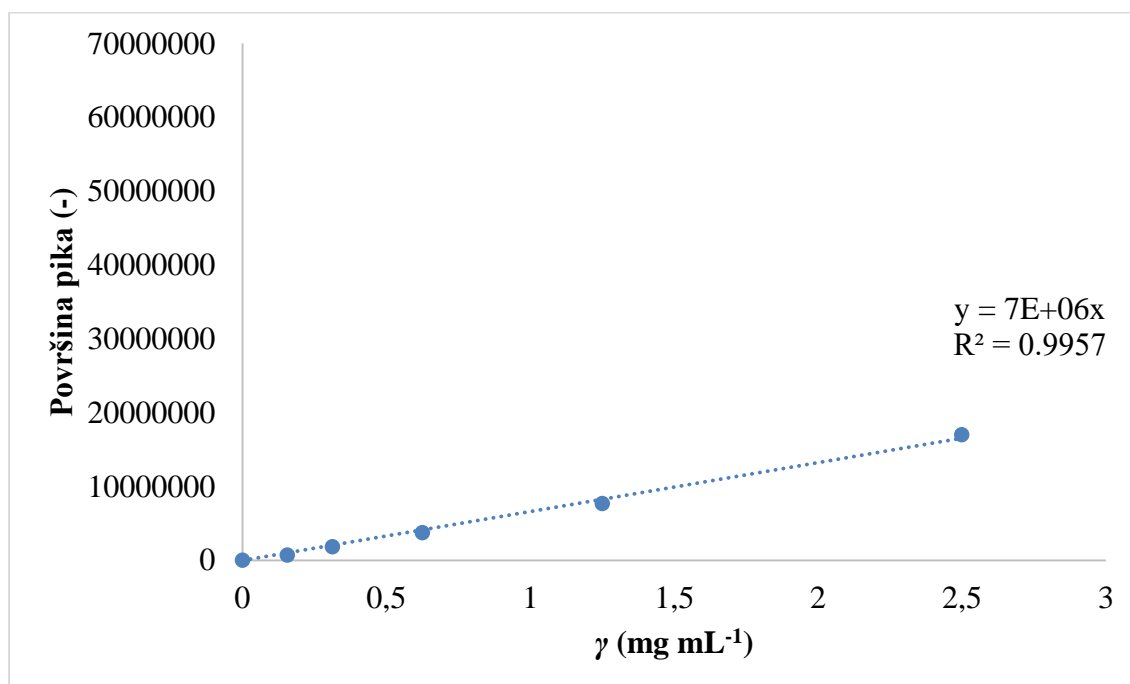
Prilog 10. Baždarni dijagram estera oleinske kiseline uz plin nosioc dušik



Prilog 11. Baždarni dijagram estera linolne kiseline uz plin nosioc dušik



Prilog 12. Baždarni dijagram glicerola uz plin nosioc dušik



8. ŽIVOTOPIS

Anabela Ljubić [REDACTED] U Ivancu je završila Osnovnu školu Ivana Kukuljevića Sakcinskog i Osnovnu glazbenu školu Ladislav Šaban te je sudjelovala na državnim natjecanjima iz fizike, matematike i hrvatskog jezika, dok je na državnom natjecanju iz kemije osvojila 2. mjesto. Potom je upisala Prvu gimnaziju Varaždin, smjer prirodoslovno-matematička gimnazija i tijekom tog razdoblja sudjelovala na državnim natjecanjima iz kemije i fizike, a proglašena je i najboljom maturanticom škole.

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo upisala je u Zagrebu 2016. godine te je primila nagradu Fakulteta za najbolju studenticu 1. godine (2016./2017.) i 2. godine (2017./2018.) preddiplomskih studija.