Sinteza biodizela u mikroreaktorima upotrebom komercijalne i nepročišćene lipaze porijeklom iz Thermomyces lanuginosus

Ostojčić, Marta

Master's thesis / Diplomski rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:561071

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Marta Ostojčić

SINTEZA BIODIZELA U MIKROREAKTORIMA UPOTREBOM KOMERCIJALNE I NEPROČIŠĆENE LIPAZE PORIJEKLOM IZ *Thermomyces lanuginosus*

DIPLOMSKI RAD

Osijek, travanj 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Energija i okoliš
Tema rada je prihvaćena na VI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018. održanoj 29. Ožujka 2018.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*
Pomoć pri izradi:

Sinteza biodizela u mikroreaktorima upotrebom komercijalne i nepročišćene lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*

Marta Ostojčić, 459-DI

Sažetak: Biodizel se danas industrijski proizvodi u kotlastim reaktorskim sustavima transesterifikacijom biljnih jestivih ulja i/ili životinjskih masti i otpadnih jestivih ulja s kratkolančanim alkoholima kao što su metanol i etanol uz natrijevu lužinu kao najčešće korišteni katalizator. Glavni nedostatci i ograničenja procesa industrijske proizvodnje biodizela transesterifikacijom su brzina reakcije, reverzibilnost, neiskorištavanje prednosti kontinuiranih proizvodnih procesa i dr. Kako bi se prevladali navedeni nedostatci intenzivno se radi na poboljšanju postojećih i razvoju novih tehnologija. Pri tome se od novih tehnologija sve više koriste mikroreaktorski sustavi koje između ostalog odlikuju djelotvorno prenošenje tvari i topline što u procesu proizvodnje biodizela uslijed intenziviranja kontakta komponenata reakcijskog sastava rezultira povećanjem brzine kemijske reakcije. U ovom radu provedena je enzimska sinteza biodizela uz komercijalnu i nepročišćenu lipazu porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* (proizvedenu fermentacijom na pogači konoplje) iz metanola i svježeg i otpadnog jestivog ulja. Analiziran je mikroreaktorski sustav s tri ulaza koji omogućuje odvojeno uvođenje ulja, metanola i enzima. Rezultati ispitivanja procesa sinteze biodizela provedenih u mikro sustavima uspoređeni su s rezultatima pokusa provedenog u kotlastom makroreaktoru te je potvrđeno da mikroreaktori značajno intenziviraju proces proizvodnje biodizela.

Ključne riječi: biodizel, lipaza, mikroreaktori

Rad sadrži: 49 stranica
15 slika
5 tablica
12 priloga
13 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

1.	izv. prof. dr. sc. *Marina Tišma*	predsjednik
2.	izv. prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*	član-mentor
3.	izv. prof. dr. sc. *Ivica Strelec*	član
4.	izv. prof. dr. sc. *Natalija Velić*	zamjena člana

Datum obrane: 26. travnja 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of Thermodynamics and Reaction Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program process engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Energy and environment
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Councilat its session no. 6 held on March 29, 2018
Mentor: *Sandra Budžaki,* PhD, associate prof.
Technical assistance:

Biodiesel synthesis in microreactors using commercial and nonpurified lipase from *Thermomyces lanuginosus*

Marta Ostojčić, 459-DI

Summary: Biodiesel is nowadays manufactured in the batch reactor systems by transesterification of vegetable edible oils and/or animal fats and waste edible oils with short chain alcohols such as methanol and ethanol with sodium hydroxide as the most common catalyst. The main deficiencies and limitations of the process of industrial biodiesel production by transesterification are reaction rate, reversibility, non-exploitation of the advantages of continuous production processes etc. In order to overcome these shortcomings there is an intensive effort to improve the existing and to develop new technologies. In this context, microreactor systems are increasingly being used whose advantages are the efficient transfer of mass and heat which in the process of biodiesel production due to intensification of the contact of components of the reaction mixture results an increase the rate of rate of chemical reaction rate. In this paper, the enzymatic synthesis of biodiesel was carried out with the commercial and nonpurified lipase derived from *Thermomyces lanuginosus* (produced by fermentation on hemp oil cake) from methanol and edible or waste cooking oil. The three-input microreactor system is analysed, allowing separated introduction of oil, methanol and enzyme. The results of the synthesis of biodiesel in microreactors were compared with the results obtained in the batch macroreactor and it was confirmed that microreactors significantly intensify the biodiesel production process.

Key words: biodiesel, lipase, microreactors

Thesis contains: 49 pages
15 figures
5 tables
12 supplements
13 references

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Marina Tišma*, PhD, associate prof. — chair person
2. *Sandra Budžaki*, PhD, associate prof. — supervisor
3. *Ivica Strelec*, PhD, associate prof. — member
4. *Natalija Velić*, PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: April 26, 2018

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Ovaj rad izrađen je u sklopu projekta *Razvoj integriranog mikrosustava za biokatalitičku proizvodnju biodizela (DeMSy(BioPro)^2*; IP-2016-06-7993) koji je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici izv. prof. dr. sc. Sandri Budžaki za sve savjete, odvojeno vrijeme i neizmjernu strpljivost za brojne upite pri izradi ovog rada .

Veliko hvala doc. dr. sc. Aniti Šalić za pomoć pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada i sate provedene u laboratoriju.

Hvala svim mojim dragim prijateljima i kolegama bez kojih ovaj prekrasni period života ne bi bio isti.

Veliko hvala mojoj obitelji, braći te nećacima Davidu, Niki i Fabiu, što su uvijek bili uz mene pružajući mi sreću i usmjeravajući me na pravi put.

Na kraju, najveća hvala mojoj najvećoj podršci, mojim divnim roditeljima, koji su zaslužni za sve što sam do sada postigla, koji su bili tu i u sretnim i u teškim trenutcima pružajući mi ogromnu, neiscrpnu ljubav i potporu. Bez Vas ovo ne bi bilo moguće!

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. BIODIZEL 4

2.1.1. Transesterifikacija 6

2.2. LIPAZE 8

2.3. REAKTORSKI SUSTAVI ZA PROIZVODNJU BIODIZELA 9

2.3.1. Kotlasti reaktori 9

2.3.2. Mikroreaktori 11

3. EKSPERIMENTALNI DIO 15

3.1. ZADATAK 16

3.2. MATERIJALI 16

3.2.1. Sirovine 16

3.2.2. Katalizator 16

3.2.3. Sastav reakcijskih smjesa 16

3.2.4. Kemikalije 17

3.2.5. Aparatura 20

3.3. METODE 20

3.3.1. Određivanje koncentracije proteina 20

3.3.2. Određivanje aktivnosti lipaze 21

3.3.3. Određivanje udjela slobodnih masnih kiselina u sirovinama 23

3.3.4. Sinteza biodizela u kotlastom reaktoru 23

3.3.5. Sinteza biodizela u mikroreaktoru 25

3.3.6. Određivanje udjela metilnih estera masnih kiselina u biodizelu 27

3.3.7. Određivanje udjela glicerola u biodizelu 28

3.3.8. Određivanje gustoće i viskoznosti biodizela 28

4. REZULTATI I RASPRAVA 31

4.1. KONCENTRACIJA PROTEINA 32

4.1.1. Komercijalna lipaza (Lipolase 100L) 32

4.1.2. Nepročišćena lipaza 32

4.2. AKTIVNOST LIPAZE 32

4.2.1. Komercijalna lipaza (Lipolase 100L) 32

4.2.2. Nepročišćena lipaza 32

4.3. UDIO SLOBODNIH MASNIH KISELINA 32

4.3.1. Svježe jestivo suncokretovo ulje i otpadno jestivo ulje iz restorana 32

4.4. UDIO METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA U BIODIZELU 33

4.5. UDIO GLICEROLA U BIODIZELU 36

4.6. GUSTOĆA BIODIZELA 37

4.7. VISKOZNOST BIODIZELA 38

5. ZAKLJUČCI 39

6. LITERATURA 41

7. PRILOZI.....43

1. UVOD

Posljednjih desetljeća zabilježen je značajni porast potrošnje energije i to ponajviše izgaranjem fosilnih goriva čije se rezerve smanjuju, a cijena raste. Zbog toga je predvidljiva mogućnost smanjenja iskorištavanja nafte u bliskoj budućnosti i njena zamjena alternativnim gorivima - biogorivima.

Biodizel je alternativno gorivo kojim se vrlo uspješno može zamijeniti konvencionalno dizelsko gorivo. Njegova industrijska proizvodnja u svijetu je raširena dugi niz godina, no problem potpune komercijalizacije predstavlja prodajna cijena koja je još uvijek viša u odnosu na fosilni dizel. Posljedica visoke cijene biodizela je visoka cijena sirovine kao i nedostatci i ograničenja trenutne tehnologije proizvodnje koji proizlaze iz energetske zahtjevnosti procesa. Zbog svega navedenog, istraživanja su usmjerena prema pronalaženju jeftinijih sirovina, poboljšanju postojećih i razvoju novih tehnologija proizvodnje kao i uvođenje novih katalizatora - biokatalizatora.

Od novijih sirovina postepeno se uvode otpadna jestiva ulja i nejestiva ulja i lipaze kao biokatalizatori koji su ekološki prihvatljiviji od katalizatora koji se trenutno koriste u industrijskoj proizvodnji. Sukladno tome postojeće tehnologije proizvodnje biodizela se prilagođavaju novim uvjetima proizvodnje iz spomenutih sirovina s lipazama, a od novih tehnologija sve više se koriste mikroreaktorski sustavi.

U ovom radu provedene su, u svrhu međusobnog uspoređivanja, sinteze biodizela iz svježeg jestivog i jestivog otpadnog ulja sa komercijalnom i nepročišćenom lipazom u kotlastom i mikroreaktoru. Eksperimentalni dio rada proveden je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek u Laboratoriju za procesno inženjerstvo i na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. BIODIZEL

Biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina biljnih i/ili životinjskih ulja i masti (Uredba o kakvoći biogoriva, NN 141/2005), a predstavlja biogorivo čijim se sagorijevanjem, za razliku od fosilnih goriva, u atmosferu ne ispuštaju nove količine ugljikovog dioksida već se u atmosferu vraća onaj ugljikov dioksid koji je biljka iz nje uzela u procesu fotosinteze. Zbog toga je biodizel ekološki prihvatljivo gorivo čiju proizvodnju i korištenje potiču poljoprivreda, ekologija, industrija motora, naftne kompanije i energetika.

Sirovine za proizvodnju biodizela su jestiva i nejestiva biljna ulja i životinjske masti, ulja algi i otpadna jestiva ulja zaostala nakon pripreme hrane (eng. *waste cooking oil*, WCO) kao i otpadna ulja iz prehrambene industrije.

Biodizel se proizvodi pirolizom, mikroemulzifikacijom ili transesterifikacijom, a sastav konačnog produkta, određen je sastavom sirovine iz koje se proizvodi. S obzirom na sirovinu i postupke proizvodnje biodizel se klasificira prema generacijama na biogoriva prve, druge, treće i četvrte generacije. Ako su sirovine za njegovu proizvodnju jestiva biljna ulja i životinjske masti onda pripada prvoj generaciji biogoriva, ako se dobiva iz otpadnih ulja restorana, domaćinstava i industrije onda pripada drugoj generaciji biogoriva, a ako se dobiva iz ulja makro- i mikro- algi onda pripada trećoj generaciji biogoriva. Ukoliko se biodizel dobiva iz genetski modificiranih algi i drugih mikroorganizama koji neposredno proizvode biodizel koji se lako izdvaja bez razaranja biomase, takav biodizel pripada četvrtoj generaciji biogoriva.

Prednosti biodizela u odnosu na konvencionalni dizel su netoksičnost, biorazgradivost, proizvodnja iz obnovljivih izvora, visoka točka vrelišta (iznad 120 °C), smanjena emisija onečišćivača i dobra maziva svojstva. Nedostatci su uzrokovanje manje radne snaga motora (5 – 9%) i veća potrošnja kisika (7 – 10%), lošija fizikalno-kemijska svojstva na niskim temperaturama zbog relativno visoke viskoznosti, lošija termička i oksidacijska stabilnost zbog prisustva nezasićenih veza, kemijska reaktivnost sa gumenim i plastičnim materijalima elemenata sistema za napajanje motora gorivom, sposobnost otapanja naslaga sa rezervoara i cijevi što uzrokuje češću zamjenu filtera i ulja.

U motorima sa unutrašnjim izgaranjem biodizel se može koristiti kao čisti biodizel ili kao dodatak fosilnom dizelu, s manjim (1,5 - 5%) ili većim udjelom (5 - 30%).Takva goriva nose oznaku Bxx, gdje xx označava postotni udio biodizela. Na tržištu se mogu pronaći B5, B20 i

čisti biodizel B100. Korištenjem biodizela kao pogonskog goriva smanjuje se ovisnost zemalja o uvozu nafte što značajno utječe na nacionalnu ekonomiju.

Biodizel je prvo alternativno gorivo s karakteristikama definiranim odgovarajućim standardom. Karakteristike biodizela, kemijske i fizikalne, propisane su američkim standardom ASTM D 6751 i europskom normom EU 14214 koja je s obzirom na članstvo Republike Hrvatske u Europskoj uniji preuzelo i naše zakonodavstvo. Dakle, u Republici Hrvatskoj kvalitativna svojstva biodizela podliježu standardu HRN:EN 14214 (HZN 2014), a prikazana su u **Tablici 1**.

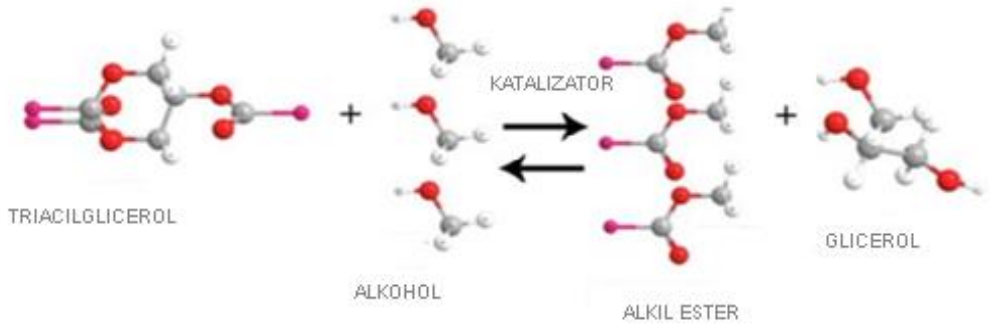
Tablica 1 Svojstva biodizela prema HRN:EN 14214

Svojstvo	Mjerna jedinica	Minimum	Maksimum	Test metoda
Udio metilnih estera masnih kiselina	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Gustoća pri 15 °C	kg/m^3	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viskoznost pri 15 °C	mm^2/s	3,50	5,00	EN ISO 3104
Točka zapaljenja	°C	101	-	EN ISO 2719 EN ISO 3679
Cetanski broj	-	51,0	-	EN ISO 5165
Korozija bakrene trake (3h pri 50 °C)	stopa	klasa 1		EN ISO 2160
Oksidacijska stabilnost (pri 110 °C)	h	8,0	-	EN 14112 prEN 15751
Kiselinski broj	mgKOH/g	-	0,50	EN 14104
Jodni broj	g I_2/100g	-	120	EN 14111 EN 16300
Metil esteri linoleinske kiseline	% (m/m)	-	12,0	EN 14103
Polinezasićeni (>=4 dvostruke veze) metil esteri	% (m/m)	-	1,00	EN 15779
Udio metanola	% (m/m)	-	0,20	EN 14110
Udio monoglicerida	% (m/m)	-	0,70	EN 14105
Udio diglicerida	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Udio triglicerida	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Slobodni glicerol	% (m/m)	-	0,02	EN 14105 EN 14106
Ukupni glicerol	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Udio vode	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Ukupna kontaminacija	mg/kg	-	24	EN 12662
Udio sulfoniranog pepela	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Udio sumpora	mg/kg	-	10,0	EN ISO 20846 EN ISO 20884 EN ISO 13032
Metali 1.skupine (Na+K)	mg/kg	-	5,0	EN 14108 EN 14109 EN 14538

Metali 2.skupine (Ca+Mg)	mg/kg	-	5,0	EN 14538
Udio fosfora	mg/kg	-	4,0	EN 14107 EN 16294

2.1.1. Transesterifikacija

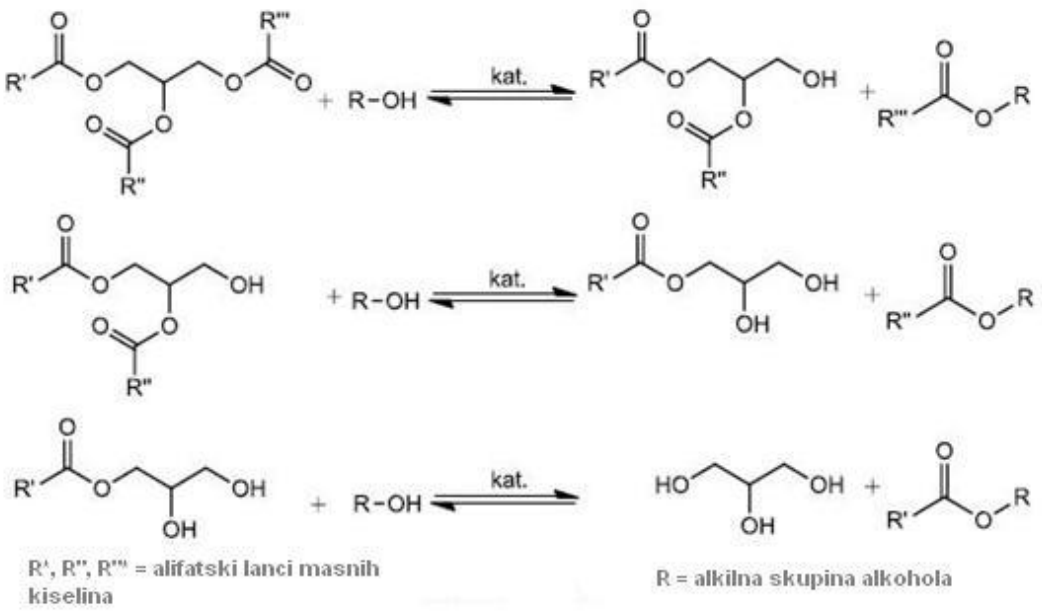
Najčešći način proizvodnje biodizela je proces transesterifikacije (**Slika 1**). Transesterifikacija predstavlja reakciju alkohola (najčešće metanola) sa triacilglicerolima biljnih ulja, životinjskih masti, otpadnih ulja ili ulja algi, pri čemu nastaje smjesa alkilnih estera masnih kiselina – biodizel (u slučaju metanola – metilnih estera masnih kiselina) i glicerol. Reakcija je reverzibilna i izvodi se u prisustvu katalizatora koji povećava brzinu reakcije i prinos željenog proizvoda (Predojević, 2010.).



Slika 1 Transesterifikacija triacilglicerola

Za transesterifikaciju se upotrebljavaju primarni i sekundarni alifatski alkoholi sa 1 – 8 ugljikovih atoma, najčešće metanol i etanol. Metanol se češće koristi zbog svojih fizikalnih i kemijskih karakteristika: polarnosti molekule i niže cijene u odnosu na druge alkohole.

Reakcija transesterifikacije se provodi u tri stupnja (**Slika 2**), pri čemu se odvija konverzija triacilglicerola u diacilglicerole, zatim diacilglicerola u monoacilglicerole, te monoacilglicerola u glicerol. U svakom stupnju nastaje i jedna molekula metil estera odgovarajuće masne kiseline. Stehiometrijski gledano molarni omjer ulja i alkohola treba biti 1:3, alkohol je mjerodavni reaktant. No, zbog reverzibilnosti reakcije potrebno je u reakcijskoj smjesi imati alkohol u suvišku kako bi se ravnoteža reakcije pomaknula u smjeru stvaranja metilnih estera masnih kiselina, tj. biodizela. Omjer ulja i alkohola, prema literaturnim navodima, kreće se čak do 1:245 (Lam, Lee i Mohamed, 2010; Leung, Wu i Leung, 2010).



Slika 2 Tri stupnja reakcije transesterifikacije (Racar, 2014.)

Transesterifikacija se može provoditi s ili bez dodatka katalizatora (kako bi se ubrzalo uspostavljanje ravnoteže reakcije). Kao katalizatori se koriste jake kiseline ili baze te enzimi (biokatalizatori). U industrijskoj proizvodnji biodizela se najčešće kao katalizator koristi natrijeva lužina zbog svoje dostupnosti, relativno niske cijene, mogućnosti postizanja visokih konverzija u kratkom vremenu te znatno manje korozivnosti u usporedbi s kiselim katalizatorima. Iako transesterifikacija katalizirana lužinom daje visoke prinose biodizela u kratkom vremenu, postoje i nedostatci ovakvog procesa poput velike energetske zahtjevnosti (temperatura oko 80 °C), velike količine otpadne vode koja nastaje u procesu pročišćavanja proizvedenog biodizela što uzrokuje otežano izdvajanje glicerola i katalizatora iz reakcijske smjese zbog nastajanja nusprodukata – sapuna u reakciji saponifikacije (reakcija kiselina i baza) ukoliko sirovina sadrži povećan udio slobodnih masnih kiselina (preko 1%). Navedeni nedostatci se mogu izbjeći korištenjem biokatalizatora, enzima lipaza, gdje se u reakciji gliceridi najprije prevode u slobodne masne kiseline iz kojih se pomoću metanola dobiju metilni esteri masnih kiselina. Iz toga proizlazi da enzimski kataliziranoj transesterifikaciji pogoduju i ulja lošije kvalitete koja imaju veći udio slobodnih masnih kiselina u svom sastavu kao što su jestiva ulja iz restorana ili domaćinstva koja zaostaju nakon procesa pripreme hrane pri čemu imaju viši udio slobodnih masnih kiselina nastalih djelovanjem visokih temperatura tijekom pripreme hrane.

Analiza prinosa i kvalitete biodizela provodi se preko kemijske analize sirovine (sadržaj vlage, sadržaj slobodnih masnih kiselina), praćenja procesnih uvjeta (molni udio alkohol:ulje,maseni odnos katalizator:ulje, temperatura, tlak i vrijeme reakcije te brzina miješanja reakcijske smjese) i određivanja fizikalno – kemijskih svojstava biodizela (udio slobodnih masnih kiselina, udio metilnih estera masnih kiselina, udio glicerola, gustoća i viskoznost).

2.2. LIPAZE

Lipaze (EC 3.1.1.3.), odnosno triacilglicerol acilhidrolaze, su enzimi biljnog, životinjskog i mikrobnog podrijetla s optimalnom aktivnošću od 25 °C do 45 °C. Lipaze su efikasni biokatalizatori hidrolize, esterifikacije i transesterifikacije u ne vodenim medijima, kao što su organska otapala i superkritični fluidi, te kataliziraju reakcije alkoholize, aminolize i hidrolize organskih karbonata, stoga se koriste u industriji deterdženata, obradi otpadnih voda, kozmetici, farmaciji itd. (Oliveira et al., 2017).

Lipaze kao katalizatori u procesu transesterifikacije, za razliku od kiselih i lužnatih katalizatora omogućuju potpunu konverziju svih masnih kiselina prisutnih u ulju, slobodnih i vezanih, u estere i lako odvajanje dobivenog glicerola od estera. Nedostatak ovih katalizatora, za razliku od kiselina i lužina, je njihova visoka cijena i mala stabilnost, zbog čega se još uvijek ne koriste u industrijskoj proizvodnji biodizela.

Upravo se zbog toga istražuju jeftiniji načini proizvodnje lipaza, a jedan od takvih je i uzgoj različitih gljiva, između ostalog i *Thermomyces lanuginosus*, u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (različitom otpadu i nusproduktima iz prehrambene industrije, i poljoprivredne proizvodnje) pri čemu mikroorganizam kao jedan od svojih produkata metabolizma luči lipazu u podlogu.

Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* je protein sastavljen od 269 aminokiselina, molekulske mase 31 700 g/mol. Enzim lipaza sferičnog je oblika s katalitičkim mjestom sastavljenim od serina, histidina i asparaginske kiseline unutar hidrofobnog dijela enzima koji je blokiran gornjim slojem od 85 do 93 aminokiseline. Zbog svoje visoke aktivnosti i stabilnosti, lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* našla je široku primjenu u dvofaznim sustavima voda-organsko otapalo, reakcijskim medijima bez otapala, u ionskim kapljevinama, superkritičnim fluidima te u mikroemulzijama (Turcu, 2010.).

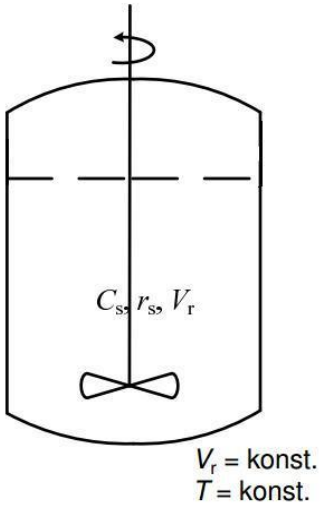
2.3. REAKTORSKI SUSTAVI ZA PROIZVODNJU BIODIZELA

2.3.1. Kotlasti reaktori

Proizvodnja biodizela provodi se u kotlastim (šaržnim), polukontinuiranim i kontinuiranim reaktorskim sustavima. Kontinuirani reaktorski sustavi primjenjuju se u proizvodnji biodizela kada je sirovina iz koje se proizvodi visoke čistoće što znači da sadržaj slobodnih masnih kiselina u takvoj sirovini ne prelazi 0,5%. Kod kontinuiranih reaktorskih sustava veličina reaktora je manja u odnosu na kotlasti reaktor za isti kapacitet proizvodnje pa samim tim i manji investicijski troškovi, jednostavnije praćenje procesa i proizvod je ujednačenije kvalitete. Sve navedeno predstavlja prednosti kontinuiranih reaktorskih sustava u odnosu na šaržne i polukontinuirane reaktorske sustave. Proizvodnja biodizela u polukontinuiranom reaktorskom sustavu provodi se u kotlastim reaktorima uz kontinuirano odvođenje nastalog produkta (Budžaki i sur.,2017.).

Današnja industrijska proizvodnja bazira se na kotlastim reaktorskim sustavima.

Shema kotlastog reaktora prikazana je na **Slici 3**. Izvedbu kotlastog reaktorskog sustava čine zatvoreni kotao – kotlasti reaktor , miješalo, otvori za ulaz i izlaz reakcijske smjese, otvori za uzorkovanje i plašt za izmjenu topline. Karakteristike ovog sustava su da je on zatvorenog tipa, odnosno da tijekom reakcije nema izmjene tvari s okolinom budući da se reakcijska smjesa unese u reaktor, reakcija započinje i traje određeno vrijeme nakon čega se sadržaj reaktora prazni. Još jedna karakteristika kotlastog reaktora je idealno miješanje, odnosno homogenost sustava što znači da je sastav smjese u svakoj točki isti. Sve veličine stanja (koncentracija supstrata, temperatura i dr.) ovise o vremenu što znači nestacionaran rad reaktora dok je volumen reakcijske smjese stalan i ne ovisi o vremenu.



Slika 3 Shema kotlastog reaktora (C_s – koncentracija supstrata, r_s – reakcijska brzina, V_r – reakcijski volumen = ¾ V_{ukupni}) (Tišma, 2016.)

Prednost proizvodnje biodizela u kotlastim reaktorima predstavlja procesiranje sirovina različite kvalitete po šarži pri čemu se procesni parametri optimiraju za svaku šaržu posebno te se na taj način postiže maksimalna konverzija i kvaliteta proizvedenog biodizela. Nedostatak ovog načina proizvodnje je međusobna neujednačenost u kvaliteti proizvoda po pojedinoj šarži.

Glavni nedostatci i ograničenja trenutne tehnologije proizvodnje biodizela su brzina i reverzibilnost reakcije, kao i energetska zahtjevnost procesa (utrošak toplinske energije za zagrijavanje reakcijske smjese, utrošak vode za pročišćavanje proizvoda kao i zbrinjavanje nastale otpadne vode u postupku pročišćavanja). Kako bi se prevladali navedeni nedostatci, a sam proces unaprijedio, intenzivno se radi na poboljšanju postojećih i razvoju novih tehnologija. Pri tome se od novih tehnologija sve više koriste mikroreaktorski sustavi koje, između ostaloga, odlikuje učinkoviti prijenos tvari i topline što kod procesa proizvodnje biodizela, uslijed intenziviranja kontakta kapljevitih komponenata reakcijske smjese, rezultira povećanjem brzine kemijske reakcije.

2.3.2. Mikroreaktori

Mikroreaktor se može definirati kao umanjen sustav za provedbu kemijskih reakcija, proizveden primjenom mikrotehnologije i mikroinženjerstva. Glavna karakteristika mikroreaktorskog sustava je smanjenje volumena procesne opreme na red veličine od desetak nanolitara do jednog mililitra.

Osnovna građevna jedinica mikroreaktorskog sustava je mikrokanal izrazito malih dimenzija, pravokutnog ili kružnog poprečnog presjeka. Mreža paralelnih mikrokanala, pogodnom tehnikom urezana u čvrstu, najčešće staklenu pločicu, naziva se elementom mikroreaktora (**Slika 4**). Primijenjena tehnika urezivanja utječe na hrapavost unutarnje površine mikrokanala što kasnije utječe na profil strujanja fluida koji je vrlo bitan za karakteristike procesa koji se u njima zbiva.



Slika 4 Element mikroreaktora

Element mikroreaktora može imati nekoliko ulaznih i izlaznih procesnih tokova koji se međusobno spajaju u zajednički tok na ulazu u mikroreaktor ili razdvajaju na izlazu pomoću spojnica u obliku slova Y, za dva procesna toka i u obliku slova T za tri procesna toka. Element mikroreaktora se ugrađuje u metalno kućište (**Slika 5**) koje omogućuje spajanje više elemenata te spajanje elemenata na pumpe, najčešće klipne, za dovod supstrata, katalizatora te na različite detektore.



Slika 5 Čip (element mikroreaktora ugrađen u kućište)

Kako bi se povećao ukupni protok i time učinkovitost procesa više se čipova međusobno povezuje u ćeliju.

Unatoč malom volumenu mikroreaktora, zbog mogućnosti serijskog i paralelnog spajanja više elemenata ili čipova mikroreaktori mogu svojim dimenzijama biti veći od konvencionalnih laboratorijskih reaktora (Šalić i sur., 2010.).

Postoje dvije mogućnosti povećanja broja strukturnih jedinica kod mikroreaktora: vanjsko (eng. *external numbering – up*) koji se odnosi na povezivanje više čipova s jednim elementom u paralelne sustave te unutarnje povećanje (eng. *internal numbering – up*) što podrazumijeva serijsko spajanje više elemenata unutar jednog čipa i uključuje zajednički ulazni tok i jedan izlazni tok odnosno jedan zajednički spremnik za produkt. Glavni nedostatak unutarnjeg povećanja je ograničen broj jedinica koji se mogu ugraditi na jedan čip jer takvo povezivanje elemenata ima za posljedicu izrazito velik pad tlaka u sustavu. Zbog toga se češće primjenjuje vanjsko uvećanje iako zauzima više prostora i ekonomski je manje isplativije (Šalić i sur., 2010.).

Strujanje fluida kroz mikrokanal je najčešće laminarno, za razliku od makroreaktora gdje ono može biti i turbulentno, a oblik strujanja se procjenjuje subjektivno. Razlikuju se mjehuričasto, segmentirano, prijelazno, segmentirano – uzburkano, uzburkano, strujanje u filmu i anularno strujanje (Šalić i sur.).

Miješanje procesnih struja u mikrokanalu posljedica je difuzije, a događa se na međufaznoj površini. Ono se može poboljšati smanjenjem volumnih protoka procesnih struja ili zaustavljanjem strujanja u svrhu produljenja vremena kontakta dva fluida, a mogu se ugraditi i mikromiješalice. Mikromiješalice se mogu podijeliti na pasivne i aktivne. Aktivne zahtijevaju primjenu vanjskog rada i, unatoč boljim rezultatima, zahtijevaju veće troškove proizvodnje i

energetski su zahtjevnije pa se, kad je god moguće, upotrebljavaju pasivne (protustrujni tok fluida, paralelni tok, recirkulacija, sudar mlazova).

Zahvaljujući mikroskopskim dimenzijama mikroreaktori imaju mnoge prednosti u odnosu na makro sustave. Zauzimaju manje prostora, za reakcije se koriste manje količine reaktanata i katalizatora, znatno je veći omjer međufazne površine i volumena reaktora pa dolazi do intenzivnijeg prijenosa tvari i energije, također smanjenje količine otpadnih procesnih struja, a smanjuje se i vrijeme provedbe reakcije. Zbog toga mikroreaktori nalaze sve više novih mogućnosti primjene, a ponajviše u medicini i farmaceutskoj industriji. Glavni nedostatak je taj što se još uvijek ne mogu primijeniti kao zamjena za sve postojeće sustave, a zbog malog promjera mikrokanala u radu s viskoznim i čvrstim sustavima može doći do njihovog začepljenja (Šalić i sur., 2010.) što kasnije predstavlja problem.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada je provesti enzimsku sintezu biodizela u mikroreaktorskom sustavu koristeći komercijalnu i nepročišćenu lipazu porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus.* Rezultati pokusa sinteze biodizela provedenih u mikro sustavima uspoređeni su s rezultatima pokusa provedenih u kotlastom makroreaktoru.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Sirovine

Kao sirovine za sintezu biodizela korišteni su svježe jestivo suncokretovo ulje *Tena* (Čepin d.d.) i otpadno jestivo ulje iz restorana.

3.2.2. Katalizator

Katalizator korišten za sintezu biodizela u reakciji transesterifikacije je komercijalni enzim lipaza (Lipolase 100L; SIGMA ALDRICH, Njemačka) (KL) te sirovi, nepročišćeni ekstrakt enzima lipaze proizveden nakon uzgoja *Thermomyces lanuginosus* na pogači konoplje. Sirovi, nepročišćeni ekstrakt lipaze (nepročišćena lipaza - NL) dobiven je ekstrakcijom 1 g pogače u 5 mL 0,1 mol/L fosfatnog pufera nakon 10 dana uzgoja. Tako dobiveni ekstrakt je centrifugiran (15000 g, 10 min), zatim filtriran preko nabranog filter papira i skladišten u zamrzivaču na -18 °C.

3.2.3. Sastav reakcijskih smjesa

Za provedbu sinteza biodizela korištene su reakcijske smjese sastava danog u **Tablici 2.**

Tablica 2 Sastav reakcijskih smjesa za sintezu biodizela

Reakcijska smjesa	Sirovina	Lipaza	Fosfatni pufer	pH
1	svježe jestivo ulje	komercijalna lipaza u puferu	0,1 mol/L	7,0
2	svježe jestivo ulje	komercijalna lipaza	-	-
3	svježe jestivo ulje	komercijalna lipaza u puferu	0,01 mol/L	7,4
4	otpadno jestivo	komercijalna lipaza u puferu	0,01 mol/L	7,4

	ulje			
5	otpadno jestivo ulje	komercijalna lipaza	-	-
6	svježe jestivo ulje	sirovi enzimski ekstrakt	0,1 mol/L	7,0

Nakon provedene transesterifikacije s navedenim reakcijskim smjesama dobiveni su uzorci biodizela označeni kao 1, 2, 3, 4, 5 i 6.

3.2.4. Kemikalije

Tijekom eksperimentalnog dijela rada korištene su slijedeće kemikalije: natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4; Kemika, Zagreb, Hrvatska), natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4; T.T.T. d.o.o., Sv. Nedjelja, Hrvatska), 1 mol/L fosfatna kiselina (H_3PO_4; T.T.T. d.o.o., Sv. Nedjelja, Hrvatska), 1 mol/L natrijev hidroksid (NaOH; KEFO, Ljubljana, Slovenija), Tris baza ($NH_2C(CH_2OH)_3$; ACROS ORGANICS, SAD), 1 mol/L klorovodična kiselina (HCl; Carlo Erba reagents, Rodano, Italija), arapska guma (ACROS ORGANICS, SAD), *p*-nitrofenil palmitat ($C_{22}H_{35}NO_4$; Alfa Aesar, Njemačka), 2-propanol ($(CH_3)_2CHOH$; Alkaloid, AD, Skopje, Makedonija), kloroform ($CHCl_3$; Carlo Erba, Francuska), izoamilni alkohol ($C_5H_{12}O$; Kemika, Zagreb, Hrvatska), N-heptan 99+% (C_7H_{16}; NORMAPUR, BDH PROLABO, UK), metil heptadekanoat ($CH_3(CH_2)_{15}COOCH_3$; analytical standard; SIGMA-ALDRICH CO, Švicarska), etanol 96% (C_2H_5OH; GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska), metanol (CH_3OH; J.T.Baker, SAD), glicerol ($C_3H_8O_3$; Kemika, Zagreb, Hrvatska), natrijev dihidrogenfosfat dihidrat (NaH_2PO_4 x $2H_2O$; Kemika, Zagreb, Hrvatska), natrijev bikarbonat ($NaHCO_3$; Kemika, Zagreb, Hrvatska), Bradford reagens (BioRad, Njemačka), F.A.M.E. mix GLC – 10 (Sigma Aldrich).

Priprema otopina:

Priprema otopine natrij-natrij fosfatnog pufera

Za pripremu 500 mL 0,1 mol/L fosfatnog pufera (PB) otopljeno je u 480 mL destilirane vode, u laboratorijskoj čaši na magnetnoj miješalici, 2,69 g natrijevog dihidrogenfosfata (NaH_2PO_4) i 5,43 g natrijevog hidrogenfosfata (Na_2HPO_4). pH otopine podešen je na 7,0 dodatkom 1 mol/L fosforne kiseline (H_3PO_4) ili 1 mol/L natrijevog hidroksida (NaOH). Otopina je iz čaše

prenesena u odmjernu tikvicu od 500 mL, nadopunjena destiliranom vodom do oznake te je otopina prenesena u Shott-ovu bocu i skladištena u hladnjaku na +4 °C.

Za pripravu 0,01 mol/L PB iz 0,1 mol/L PB odmjereno je 25 mL i stavljeno u čašu sa 200 mL destilirane vode, pH je podešen na 7,4 te je prenesena u odmjernu tikvicu od 250 mL, nadopunjena destiliranom vodom do oznake i spremljena u laboratorijsku bocu u hladnjak na +4 °C.

Priprema 1 mol/L Tris baze

Za pripremu 100 mL 1 mol/L Tris baze otopljeno je 12,114 g Tris baze u 80 mL destilirane vode, u laboratorijskoj čaši na magnetnoj miješalici. Otopina je prenesena u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjena destiliranom vodom do oznake te skladištena u hladnjaku na +4 °C u laboratorijskoj boci.

Priprema 56,98 mmol/L Tris-HCl pufera

Za pripremu 200 mL 56,98 mmol/L Tris-HCl pufera dodano je u laboratorijsku čašu na magnetnoj miješalici 11,4 mL 1 mol/L Tris baze i 170 mL destilirane vode. Podešena je pH vrijednost otopine 1 mol/L klorovodičnom kiselinom (HCl) na pH 8,0 te je otopina prenesena u odmjernu tikvicu od 200 mL, nadopunjena je destiliranom vodom do oznake i skladištena u hladnjaku na +4 °C u laboratorijskoj boci.

Priprema 10,2564 mmol/L otopine *p*-nitrofenil palmitata (*p*NPP-a) u 2-propanolu

0,0310 g *p*NPP-a, prethodno izvaganog u eppendorficu, otopljeno je na način da se mikropipetom dodao 1 mL 2-propanola, promiješao na vortex miješalici te tako djelomično otopljeni *p*NPP prebacio u staklenu epruvetu obloženu aluminijskom folijom. Postupak je ponovljen sa još 7 mL 2-propanola dok se sav *p*NPP kvantitativno nije prenio u staklenu epruvetu pri čemu je ukupni volumen iznosio 8 mL.

Priprema otopine supstrata – kontrola raspada supstrata (KRS)

Za pripremu 80 mL otopine supstrata za provjeru kontrole raspada supstrata (KRS-a) u laboratorijsku čašu, omotanu aluminijskom folijom na magnetnoj miješalici pri 40 °C, dodano je 72 mL 56,98 mmol/L otopine Tris-HCl pufera pH 8,0 i potom je u njoj otopljeno 0,0821 g emulgatora 0,1% w/v arapske gume. Arapska guma otapana je na način da se mikropipetom dodao 1 mL Tris-HCl pufera iz čaše u eppendorficu sa odvaganom arapskom gumom te

promiješao na vortex miješalici i prenio nazad u čašu, a postupak je ponavljan dok sva arapska guma u eppendorfici nije otopljena. U pripremljeni pufer s emulgatorom kap po kap je dodano 8 mL 10,2564 mmol/L otopine *p*NPP u 2-propanolu. Tako pripremljena otopina prenesena je u laboratorijsku bocu omotanu aluminijskom folijom te je odmah korištena.

Priprema otopine za kontrolu ekstrakta (KE)

Za pripremu 80 mL otopine za kontrolu ekstrakta (KE) u laboratorijsku čašu na magnetnoj miješalici je dodano 72 mL 56,98 mmol/L otopine Tris-HCl pufera pH 8,0 i potom je otopljeno 0,0821 g emulgatora 0,1% w/v arapske gume. Arapska guma otapana je na način da se mikropipetom dodao 1 mL Tris-HCl pufera iz čaše u eppendorficu sa odvaganom arapskom gumom te promiješao na vortex miješalici i prenio nazad u čašu, a postupak je ponavljan dok sva arapska guma u eppendorfici nije otopljena. U pripremljeni pufer s emulgatorom dodano je 8 mL 2-propanola. Tako pripremljena otopina čuvana je u hladnjaku na +4 °C u laboratorijskoj boci.

Priprema Marmur otopine

Za pripremu Marmur otopine pomiješani su kloroform i izoamilni alkohol u volumnom omjeru 24:1. Tako pripremljena otopina čuvana je na sobnoj temperaturi.

Priprema Bradford otopine za određivanje ekstraktibilnih proteina

U laboratorijskoj čaši pomiješan je Bradford reagens sa destiliranom vodom u omjeru 1:4. Za pripremu 100 mL Bradford otopine pomiješano je 20 mL Bradford reagensa sa 80 mL destilirane vode.

Priprema razrjeđenja komercijalne lipaze

Komercijalnu lipazu (Lipolase 100L) bilo je potrebno razrijediti za određivanje aktivnosti i koncentracije proteina kako bi rezultati bili u rasponu baždarne krivulje. Razrjeđivano je kako slijedi:

100 mL enzima + 900 mL fosfatnog pufera (0,1 mol/L) … 10x razrjeđenje

100 mL otopine razrjeđenja 10x + 900 mL fosfatnog pufera … 100x razrjeđenje

100 mL otopine razrjeđenja 100x + 900 mL fosfatnog pufera … 1000x razrjeđenje

100 mL otopine razrjeđenja 1 000x + 900 mL fosfatnog pufera … 10000x razrjeđenje

500 mL otopine razrjeđenja 10 000x + 500 mL fosfatnog pufera … 20 000x razrjeđenje

500 mL otopine razrjeđenja 20 000x + 500 mL fosfatnog pufera … 40 000x razrjeđenje

3.2.5. Aparatura

Za potrebe izvođenja eksperimenta korištena je slijedeća aparatura: kotlasti reaktor (DURAN GLS 80, Njemačka), Liebigovo hladilo, vodena kupelj (Memmert WNB 14), magnetna miješalica (IKA WERK, Njemačka), pH metar (Hanna Instruments 2211 pH/ORP Meter), Vortex miješalica (TEHTNICA Vibromix 10; Vibrofix VF1, IKA WERK, Njemačka), centrifuga (HERMLE Z 326 K, Njemačka), tehnička vaga (OHAUS, SAD), analitička vaga (CRYSTAL 200 CE, Gibertini, Italija), plinski kromatograf (GC-2014 s FID detektorom, kolona: Zebron ZB-WAX (*L* = 30 m, *I.D*. = 0,53 mm, *d* = 1,00 µm), plin nosioc: helij, *p* = 22,4 kPa; SHIMADZU, Japan), Ostwaldov viskozimetar, piknometar, mikroreaktori:input 3T i output 2Y (Micronit, Nizozemska).

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je standardnom Bradfordičinom metodom određivanja koja se temelji na nespecifičnom vezanju anionskog oblika boje Coomassie Briliant Blue G-250 za bazične i aromatske bočne ogranke proteina, uslijed čega dolazi do stvaranja kompleksa protein:boja, koji u kiselom mediju pokazuje apsorpcijski maksimum pri 595 nm.

Koncentracija proteina određivana je na dva načina, prema protokolu 1 i protokolu 2.

Protokol 1 (ukoliko je očekivana koncentracija proteina veća – komercijalna lipaza Lipolase 100L): Koncentracija proteina određena je tako da se volumenu od 100 µL pripremljenog uzorka enzima lipaze doda 2 mL Bradfordovog reagensa. Postupak je proveden u najmanje tri paralele. Nakon razvijanja boje na sobnoj temperaturi, po isteku 5 min, mjerena je apsorbancija uzoraka na 595 nm uz slijepu probu koja se sastoji od 100 µL 0,1 mol/L fosfatnog pufera pH 7,0 i 2 mL Bradfordovog reagensa.

Protokol 2 (ukoliko je očekivana koncentracija proteina manja – nepročišćena lipaza porijeklom iz *T. lanuginosus*): Koncentracija proteina određena je tako da se volumenu od 0,8 mL uzorka nepročišćene lipaze doda 0,2 mL Bradfordovog reagensa. Postupak je proveden u najmanje tri paralele. Nakon razvijanja boje na sobnoj temperaturi, po isteku 5 min, mjerena je apsorbancija uzoraka na 595 nm.

Koncentracija proteina izračunata je iz baždarnog dijagrama za proteine pripremljenog sa poznatim koncentracijama goveđeg serumskog albumina. Baždarni dijagram dobiven je tako da je volumenu od 0,8 mL uzorka BSA koncentracija dodano 0,2 mL Bradfordovog reagensa. Nakon razvijanja boje na sobnoj temperaturi, po isteku 5 min, mjerena je apsorbancija pri 595 nm. Iz dobivenih apsorbancija i poznatih koncentracija napravljen je dijagram na kojemu je na apscisi prikazana koncentracija proteina, a na ordinati vrijednosti apsorbancije pri 595 nm (**Prilog 1**).

3.3.2. Određivanje aktivnosti lipaze

Enzimska aktivnost lipaze određena je *end-point* testom ili testom fiksnog vremena uz supstrat *p*-nitrofenil palmitat prema modificiranoj metodi Palacios-a i suradnika (Palacios et al., 2014). Mjerenje je provedeno u tri paralele prema protokolu prikazanom u **Tablici 3** za komercijalnu lipazu te u **Tablici 4** za nepročišćenu lipazu proizveden biološkom obradom pogače konoplje uz pomoć gljive *Thermomyces lanuginosus*.

Tablica 3 Protokol i sastav reakcijske smjese za određivanje aktivnosti komercijalne lipaze

Reagensi	Glavna proba	Kontrola raspada supstrata
Otopina supstrata	3,9 mL	3,9 mL
Predinkubacija 5 min pri 40 °C		
Komercijalna lipaza, 0,1 mol/L PB pH 7,0	100 µL	
Fosfatni pufer, 0,1 mol/L		100 µL
Kratko vorteksiranje, inkubacija 5 min pri 40 °C		
Marmur otopina	1,5 mL	1,5 mL
Vorteksiranje 30 s, centrifugiranje 10 min pri 15 000 g Mjerenje apsorbancije gornjeg sloja pri 410 nm		

Tablica 4 Protokol i sastav reakcijske smjese za određivanje aktivnosti nepročišćene lipaze

Reagensi	Glavna proba	Kontrola raspada supstrata	Kontrola ekstrakta
Otopina supstrata	3,9 mL	3,9 mL	
Otopina za kontrolu ekstrakta			3,9 mL
Predinkubacija 5 min pri 40 °C			
Nepročišćena lipaza, 0,1 mol/L PB pH 7,0	100 µL		100 µL
Fosfatni pufer, 0,1 mol/L		100 µL	
Kratko vorteksiranje, inkubacija 5 min pri 40 °C			
Marmur otopina	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Vorteksiranje 30 s, centrifugiranje 10 min pri 15 000 g Mjerenje apsorbancije gornjeg sloja pri 410 nm			

Nakon centrifugiranja iz epruveta je mikropipetom otpipetirano 1,5-2 mL gornjeg sloja u PMMA kivete. Spektrofotometar je nuliran destiliranom vodom prije mjerenja apsorbancije uzoraka. Aktivnost lipaze izražena je u internacionalnim jedinicama za mjerenje aktivnosti enzima (U) pri čemu je jedna jedinica definirana kao ona količina lipaze koja razgradi 1 µmol *p*-nitrofenil palmitata za 1 minutu.

Vrijednost volumne aktivnosti komercijalne lipaze izračunata je prema jednadžbi (1) dok je vrijednost volumne aktivnosti nepročišćene lipaze izračunata prema jednadžbi (2)

$$V.A. = \frac{\left(A_{GP,410\,nm} - A_{KRS,410\,nm}\right) \cdot D_f \cdot V_{uk}}{t \cdot V_{uz} \cdot d \cdot \varepsilon} \left[\frac{U}{mL}\right] \quad (1)$$

$$V.A. = \frac{\left(A_{GP,410\,nm} - A_{KRS,410\,nm} - A_{KE,410\,nm}\right) \cdot D_f \cdot V_{uk}}{t \cdot V_{uz} \cdot d \cdot \varepsilon} \left[\frac{U}{mL}\right] \quad (2)$$

gdje je:

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

$A_{GP,\,410\,nm}$ – apsorbancija glavne probe izmjerene na valnoj duljini od 410 nm

$A_{KRS,\,410\,nm}$ – apsorbancija kontrole raspada supstrata izmjerene na valnoj duljini od 410 nm

A_{KE} - apsorbancija kontrole ekstrakta izmjerene na valnoj duljini pri 410 nm

D_f – faktor razrjeđenja

V_{uk} – ukupni volumen reakcijske smjese (mL)

t – vrijeme trajanja testa (min)

V_{uz} – volumen uzorka dodanog u test (mL)

d – promjer kivete (cm) – 1 cm

ε - molarni apsorpcijski koeficijent *p*-nitrofenola (0,29866 mL/µmol cm).

3.3.3. Određivanje udjela slobodnih masnih kiselina u sirovinama

Masti i ulja, osim masnih kiselina (MK) vezanih za triacilglicerole, sadrže uvijek i slobodne masne kiseline (SMK) čiji udio ovisi o upotrjebljenoj sirovini, načinu dobivanja i uvjetima skladištenja, a njihov udio izražava se kao kiselinski broj, kiselinski stupanj ili kao postotak oleinske kiseline.

Udio slobodnih masnih kiselina određivanje u dvije paralele, titracijski sa 0,1 mol/L natrijevim hidroksidom (NaOH) do vidljive promjene boje u tikvici. U Erlenmayerovu tikvicu od 300 mL odvagano je 5 g ulja te je dodano 50 mL neutralne smjese etera i etanola u omjeru 1:1, te uz nekoliko kapi fenolftaleina kao indikatora (1%-tna otopina u 96%-tnom alkoholu) titriran je sa 0,1 mol/L NaOH do promjene boje iz prozirne u ružičastu.

Udio SMK izražen je kao % oleinske kiseline, a izračunat je prema sljedećoj jednadžbi:

$$\%SMK = \frac{10 \cdot b}{a}\ 0{,}282\ [\%\ oleinskekiseline] \qquad (4)$$

gdje je:

a- odvagana količina uzorka (g)

b-volumen NaOH utrošen za titraciju (mL).

3.3.4. Sinteza biodizela u kotlastom reaktoru

Sinteza biodizela provedena je u kotlastom reaktoru sa komercijalnom i nepročišćenom lipazom. Korištena je slijedeća aparatura: kotlasti reaktor volumena 1 L, spojen na Liebigovo hladilo, koje sprječava gubitak metanola iz reakcijske smjese, vodena kupelj, koja održava temperaturu reakcijske smjese na 40 °C te magnetna miješalica za osiguravanje homogenosti reakcijske smjese (**Slika 6**). Reakcijska smjesa za sintezu biodizela u kotlastom reaktoru sa komercijalnom lipazom sastojala se od 450 g svježeg jestivog suncokretovog ulja ili otpadnog ulja iz restorana, 55,95 g metanola te 4,5 g komercijalne lipaze ili 45 g komercijalne lipaze

pripremljene u fosfatnom puferu u omjeru 1:10. Za sve sinteze u okviru ovoga rada sa komercijalnom lipazom omjer ulja i metanola bio je 1:3,4.



Slika 6 Sinteza biodizela u kotlastom reaktoru

Reakcija započinje dodavanjem enzima nakon što se reakcijska smjesa (ulje i metanol) homogenizira i termostatira na 40 °C. Nakon završetka sinteze, odnosno nakon 24h, reakcijska smjese prebačena je u lijevak za odjeljivanje kako bi se smjesa nastalih metilnih estera masnih kiselina (biodizel) razdvojila od ostalih komponenti (glicerol, voda, lipaza, metanol) (**Slika 7**). Gornja faza u lijevku za odjeljivanje sastoji se od smjese metilnih estera masnih kiselina (biodizela – lipofilna faza), a donja faza od vode (nastale reakcijom i vode koja je u sastavu pufera ušla u reaktor ako je lipaza bila pripremljena u puferu), lipaze, metanola i glicerola (hidrofilna faza). Nakon separacije, dobivenom biodizelu određen je udio metilnih estera masnih kiselina, udio glicerola te gustoća i viskoznost.



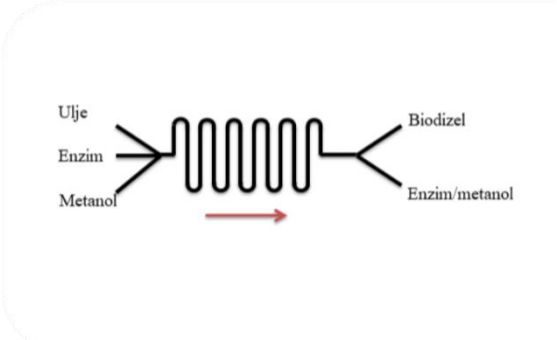
Slika 7 Separacija biodizela od ostalih komponenti reakcijske smjese (glicerol, voda, lipaza, metanol) nakon transesterifikacije

Prema eksperimentalnom dijelu prezentiranom u radu Budžaki i sur., 2015., u okviru ovog diplomskog rada provedene su sinteze biodizela s komercijalnom lipazom u puferu molariteta 0,01 mol/L i pH 7,4 (reakcijske smjese 3 i 4). Nadalje, da bi se dobiveni rezultati mogli usporediti sa rezultatima sinteze biodizela u kotlastom reaktoru sa nepročišćenom lipazom (reakcijska smjesa 6), provedena je sinteza sa komercijalnom lipazom u puferu molariteta 0,1 mol/L i pH 7,0 (reakcijske smjesa 1) s obzirom da je nepročišćena lipaza nakon fermentacija iz pogače konoplje ekstrahirana u 0,1 mol/L puferu pH 7,0.

Reakcijska smjesa za sintezu biodizela s nepročišćenom lipazom sastojala se od 163,63 g svježeg jestivog suncokretovog ulja, 20,35 g metanola te 16,36 g sirovog ekstrakta nepročišćene lipaze. Uzorci za određivanje metilnih estera masnih kiselina su uzimani kontinuirano. Reakcija se odvijala 368,5 h, da bi se utvrdilo koliki je najveći udio metilnih estera masnih kiselina moguće dobiti. Nakon završetka sinteze reakcijska smjesa je prebačen u lijevak za odjeljivanje te se nakon separacije komponenti dobivenom biodizelu odredio udio metilnih estera masnih kiselina, udio glicerola te gustoća i viskoznost.

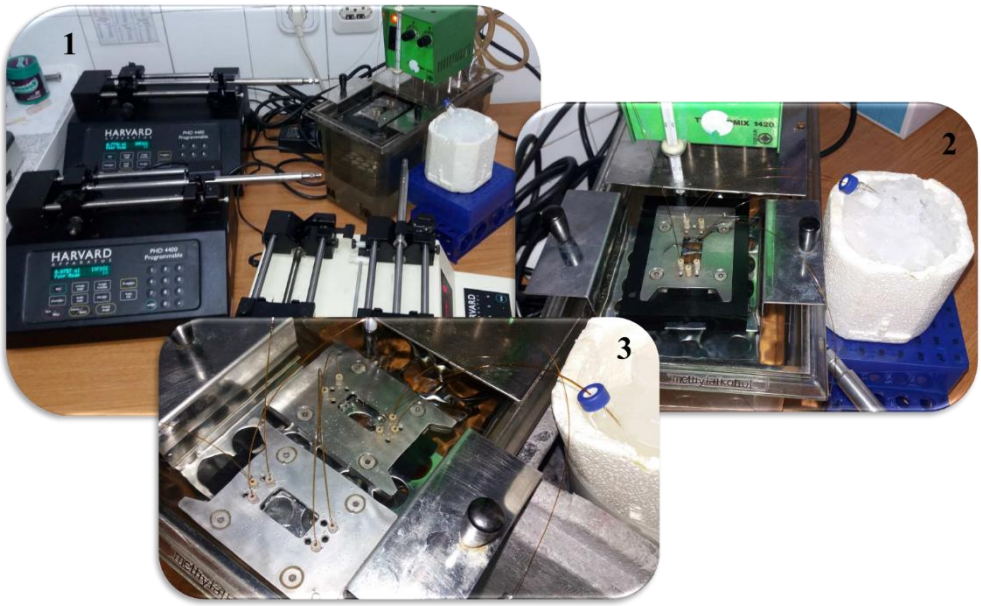
3.3.5. Sinteza biodizela u mikroreaktoru

Za sintezu biodizela je ispitan mikroreaktorski sustav s tri ulaza, koji omogućuje odvojeno uvođenje svježeg jestivog ulja, metanola i lipaze, i dva izlaza (**Slika 8**).



Slika 8 Shematski prikaz mikroreaktorskog sustava

Sinteza je prvo provedena u jednom mikroreaktoru, a zatim su spojena dva identična mikroreaktora u svrhu povećanja vremena zadržavanja.



Slika 9 Mikroreaktorski sustav s jednim (1 i 2) i dva serijski spojena mikročipa (3)

Aparatura za sintezu biodizela u mikroreaktorskom mjerilu sastojala se od jednog i/ili dva mikroreaktora sa 3T ulaza i 2Y izlaza (**Slika 9**) dimenzija L = 332 mm, W = 250 µm, H = 50 µm, tri pumpe (d = 9,525 mm) za dovod supstrata i katalizatora , cjevčica za dovod supstrata iz klipa pumpe do mikroreaktora i skupljanje sintetiziranog biodizela, vodene kupelji i mikroskopa. U klipove tri pumpe stavljeni su svježe rafinirano suncokretovo ulje, metanol i lipaza. Omjeri protoka pumpi (µL/min) postavljeni su na temelju omjera reaktanata iz sinteze biodizela u kotlastom reaktoru ulje:metanol:lipaza=10:1,243:1. Protoci su proporcionalno

mijenjani ovisno o željenom vremenu zadržavanja reakcijske smjese u mikroreaktoru. Vrijeme zadržavanja računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$\tau = \frac{V}{Q'}[min] \quad (3)$$

gdje je:

τ-vrijeme zadržavanja (s)

V-volumen mikroreaktora (*V* = 4,15 µL)

Q'-zbroj volumnih protoka reaktanata (µL/min).

Sintetizirani biodizel skupljan je u vijalici na ledu te je nakon skupljene dovoljne količine određen udio metilnih estera masnih kiselina na plinskom kromatografu.

3.3.6. Određivanje udjela metilnih estera masnih kiselina u biodizelu

Udio metilnih estera masnih kiselina u sintetiziranom biodizelu određen je na plinskom kromatografu (GC-2014 s FID detektorom, kolona: Zebron ZB-WAX (*L* = 30 m, *I.D*. = 0,53 mm, *d* = 1,00 µm), plin nosioc: helij, *p* = 22,4 kPa;) uz heptan kao otapalo. U eppendorficu je mikropipetom odmjereno 1800 µL heptana i 200 µL biodizela, kako bi razrjeđenje bilo 10x, odnosno 1980 µL heptana i 20 µL biodizela za razrjeđenje 100x, kako bi dobivene vrijednosti bile u rasponu baždarnog dijagrama. Sadržaj u eppendorfici je zatim dobro promiješan na vortex mješalici te je profiltriran na filteru za šprice (nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filteri, pora : 0,45 µm, promjer : 25 mm) u drugu eppendorficu iz koje je sadržaj raspodijeljen u tri vijalice koje su zatim analizirane na GC-u.

Za izradu baždarnog dijagrama korišten je standard metilnih estera masnih kiselina F.A.M.E. mix GLC - 10 koji se sastoji od metilnih estera pet masnih kiselina: linolne, linoleinske, oleinske, palmitinske i stearinske kiseline, i metil heptadekanoata (C_{17}). Standard F.A.M.E mix GLC- 10 otopljen je u 5 mL *n*-heptana (99%) pri čemu je dobivena koncentracija svakog pojedinog metilnog estera u otopini 4 mg/mL. 2,5 mL tako pripremljene otopine razrijeđeno je sa 2,5 mL *n*-heptana na koncentraciju 2 mg/mL, a na isti način pripremljene su i koncentracije od 1 mg/mL, 0,5 mg/mL i 0,25 mg/mL te su analizirane na plinskom kromatografu. Po 0,5 mL od svake koncentracije prebačeno je u posebne eppendorfice gdje je zatim dodano po 6,8 mL internog standarda metil heptadekanoata (C_{17}) pripremljenog od 400 mg metil heptadekanoata i 400 mL *n*-heptana. Pripremljeni uzorci su također analizirani

na plinskom kromatografu. Na temelju dobivenih vrijednosti površine pika kromatograma pojedinog metilnog estera masnih kiselina i njihovih poznatih koncentracija, napravljeni su baždarni dijagrami (za svaki metilni ester posebno) na kojima se na apscisi nalaze vrijednost koncentracija, a na ordinati srednje vrijednosti površine pikova (**Prilozi 2-11**).

3.3.7. Određivanje udjela glicerola u biodizelu

Udio glicerola u sintetiziranom biodizelu određen je na plinskom kromatografu (GC-2014 s FID detektorom, kolona: Zebron ZB-WAX (*L* = 30 m, *I.D*. = 0,53 mm, *d* = 1,00 µm), plin nosioc: helij, *p* = 22,4 kPa;) uz etanol kao otapalo. U eppendorficu je mikropipetom odmjereno 1800 µL etanola i 200 µL biodizela (razrjeđenje 10x), odnosno 1980 µL etanola i 20 µL biodizela (razrjeđenje 100x) kako bi dobivene vrijednosti bile u rasponu baždarnog dijagrama. Sadržaj u eppendorfici je zatim dobro promiješan na vortex mješalici te je profiltriran na filteru za šprice (nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filteri, pora:0,45µm, promjer:25mm) u drugu eppendorficu iz koje je sadržaj raspodijeljen u tri vijalice koje su zatim analizirane na GC-u.
Baždarni dijagram za glicerol napravljen je tako da je izvagano 12,5 mg glicerola i otopljeno u 5 mL etanola, pri čemu je koncentracija dobivene otopine iznosila 2,5 mg/mL. Iz dobivene otopine pola volumena je razrijeđeno etanolom dovolumena5 mL pri čemu je dobivena duplo manja koncentracija glicerola, 1,25 mg/mL. Na isti način su dobivene koncentracije glicerola od 0,625 mg/mL, 0,3125 mg/mL i 0,15625 mg/mL. Tako pripremljene otopine analizirane su na GC-u te je na temelju dobivenih vrijednosti površine pika kromatograma napravljen baždarni dijagram na kojemu se na apscisi nalaze koncentracija otopine glicerola, a na ordinati srednje vrijednosti površine pikova (**Prilog 12**).

3.3.8. Određivanje gustoće i viskoznosti biodizela

Za potrebe određivanja gustoće i viskoznosti biodizela, gustoća i viskoznost vode pri 20 °C i pri 40 °C očitani su iz termodinamičkih tablica (Ražnjević, 1975.)

Gustoća biodizela

Gustoća biodizela određena je mjernim instrumentom za mjerenje gustoće, piknometrom volumena 50 mL. Potpuno suhi i prazan piknometar izvagan je na analitičkoj vagi.. Nakon toga napunjen je uzorkom biodizela i ponovno izvagan. Masa uzorka biodizela izračunata je

prema jednadžbi (5), a zatim gustoća prema jednadžbi (6). Mjerenja su provedena pri 20 °C i pri 40 °C.

$$m_{biodizel} = m_{puni\ piknometar} - m_{prezni\ piknometar}[g] \quad (5)$$

$$\rho_{biodizel} = \frac{m_{biodizel}}{V_{piknometar}}\left[\frac{kg}{m3}\right] \quad (6)$$

gdje ρ [kg/m^3] predstavlja gustoću.

Viskoznost biodizela

Viskoznost biodizela određena je Ostwaldovim viskozimetrom. Ostwaldov viskozimetar napunjen je uzorkom i pomoću štoperice mjereno je vrijeme protjecanja dijela uzorka kroz naznačeni volumen na samom mjernom instrumentu. Posebno su obavljena mjerenja pri 20 °C i pri 40 °C za vodu, svježe jestivo suncokretovo ulje „Tena“ i za sintetizirane uzorke biodizela iz kotlastog reaktora. Dinamička viskoznost biodizela izračunata je iz jednadžbe (7):

$$\eta_{biodizel} = \eta_{H_2O} \cdot \frac{\rho_{biodizel} \cdot t_{biodizel}}{\rho_{H_2O} \cdot t_{H_2O}}[mPas] \quad (7)$$

gdje se η [mPas], ρ [kg/m^3] i t[s] odnose na viskoznost, gustoću i vrijeme. Dinamička viskoznost izražena je kao kinematička [mm^2/s] koja predstavlja omjer dinamičke viskoznosti i gustoće biodizela.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. KONCENTRACIJA PROTEINA

4.1.1. Komercijalna lipaza (Lipolase 100L)

Koncentracija proteina u uzorku komercijalne lipaze (Lipolase 100L) porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* iznosila je 22,06 ± 0,87 mg/mL.

4.1.2. Nepročišćena lipaza

Koncentracija proteina u uzorku nepročišćene lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* s pogače konoplje iznosila je 0,35mg/mL.

4.2. AKTIVNOST LIPAZE

4.2.1. Komercijalna lipaza (Lipolase 100L)

Volumna aktivnost komercijalne lipaze (Lipolase 100L) porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* iznosila je 852 809,21 ± 48 874,51 U/mL, a specifična aktivnost 38 457,47 ± 2368,67 U/mg.

4.2.2. Nepročišćena lipaza

Volumna aktivnost nepročišćene lipaze porijeklom iz *Thermomyces* lanuginosus iznosila je 40,418 U/mL prije sinteze biodizela u šaržnom reaktoru i 25,410 U/mL prije sinteze biodizela u mikroreaktoru. Specifična aktivnost je iznosila 115,48 U/mg prije sinteze biodizela u šaržnom reaktoru i 72,60 U/mg prije sinteze biodizela u mikroreaktoru. Lipaza koja je korištena u šaržnoj sintezi biodizela je lipaza neposredno nakon proizvodnje na pogači konoplje dok je lipaza koja je korištena u sintezi biodizela u mikroreaktoru stajala 20 dana u zamrzivaču na -18 °C pri čemu je došlo do smanjena aktivnosti.

4.3. UDIO SLOBODNIH MASNIH KISELINA

4.3.1. Svježe jestivo suncokretovo ulje i otpadno jestivo ulje iz restorana

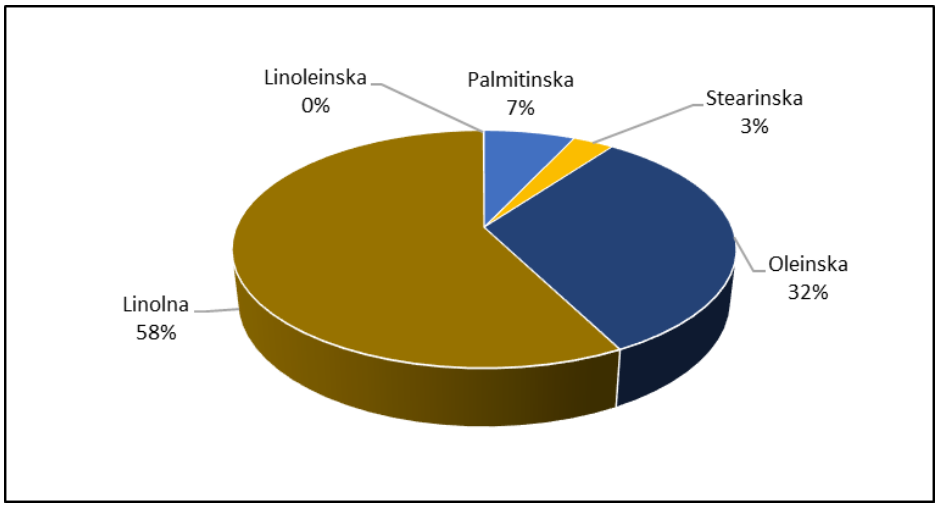
Za sintezu biodizela u šaržnom reaktoru i mikroreaktoru korišteno je svježe jestivo suncokretovo ulje i jestivo otpadno ulje nakon procesa pripreme hrane iz restorana.

Titracijski je određen udio slobodnih masnih kiselina (SMK) u svježem jestivom suncokretovom ulju od 0,18%, izražen kao postotak oleinske kiseline što je ispod maksimalno

dozvoljenog udjela slobodnih masnih kiselina prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (NN 41/2012). Maksimalno dozvoljeni udio SMK u jestivom suncokretovom ulje je 0,30% izraženih kao oleinska kiselina.

U otpadnom jestivom ulju iz restorana određen je udio SMK od 0,29% izražen kao oleinska kiselina.

Na **Slici 10** prikazan je udio svake pojedine masne kiseline u sastavu svježeg jestivog suncokretovog ulja određen plinskom kromatografijom. Dobivene vrijednosti su u skladu s vrijednostima koje propisuje spomenuti pravilnik.



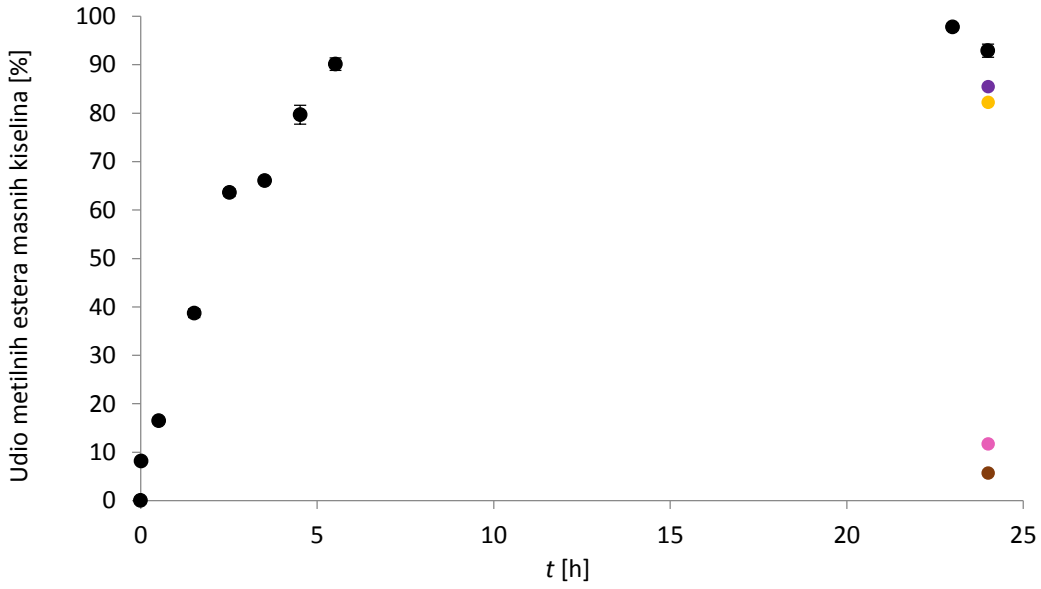
Slika 30 Prikaz udjela pojedinih masnih kiselina u sastavu jestivog svježeg suncokretovog ulja

4.4. UDIO METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA U BIODIZELU

Tablica 5 prikazuje udjele i sastav metilnih estera masnih kiselina u svakom od uzoraka biodizela sintetiziranih u kotlastom reaktoru sa komercijalnom lipazom. Vidljivo je da je najveći udio metilnih estera masnih kiselina 97,82% izmjeren u uzorku biodizela broj 1, dobivenog nakon sinteze s komercijalnom lipazom iz *Thermomyces lanuginosus* pri T = 40 °C u pokusu u kojem je korišteno svježe jestivo suncokretovo ulje i enzim pripremljen u 0,1 mol/L natrij-natrij fosfatnom puferu pH 7 (enzim:pufer = 1:10).

Tablica 5 Udio i sastav metilnih estera masnih kiselina u biodizelu sintetiziranom u kotlastom reaktoru sa komercijalnom lipazom

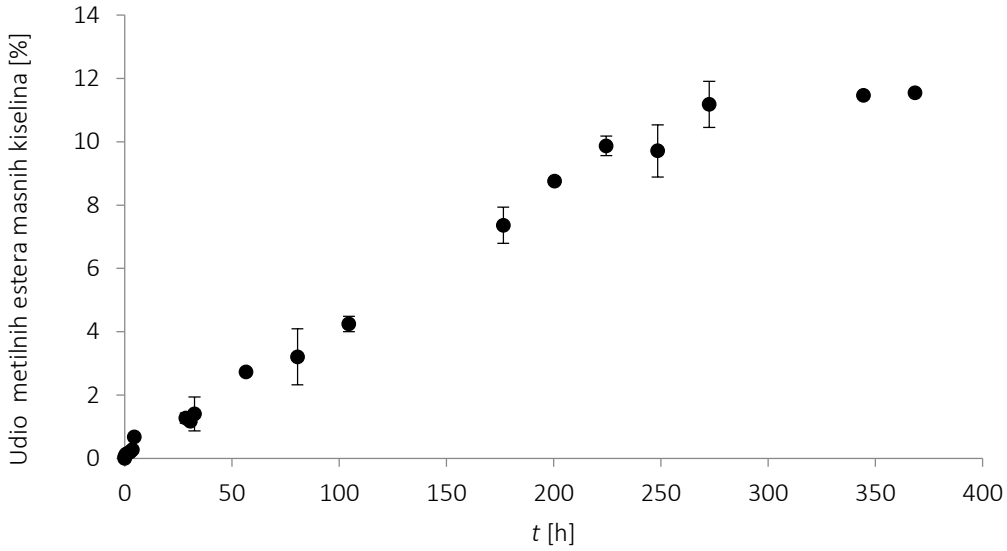
Broj uzorka biodizela	1	2	3	4	5
Udio metilnih estera masnih kiselina [%]	97,82	5,67	85,45	82,22	11,71
Metil esteri palmitinske kiseline[%]	7,00	42,32	7,13	7,98	11,72
Metil esteri stearinske kiseline [%]	2,88	3,48	2,65	3,07	4,43
Metil esteri oleinske kiseline [%]	31,91	29,43	32,58	32,22	31,81
Metil esteri linolne kiseline [%]	58,20	58,16	57,65	56,72	56,72



Slika 11 Udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu sintetiziranom u kotlastom reaktoru sa komercijalnom lipazom (uzorak biodizela broj ● 1;●2; ● 3; ●4; ● 5) u ovisnosti o vremenu trajanja sinteze

Slika 11 prikazuje udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu sintetiziranom u kotlastom reaktoru sa komercijalnom lipazom pri čemu je najveći udio metilnih estera masnih kiselina

određen u uzorku biodizela sintetiziranog iz svježeg jestivog ulja s komercijalnom lipazom u fosfatnom puferu nakon 24 satne sinteze.

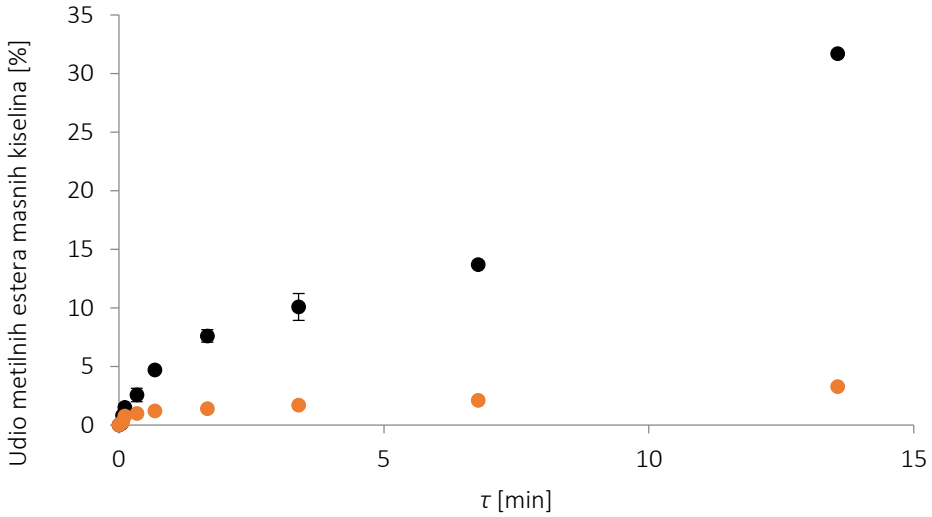


Slika 12 Udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu tijekom sinteze u kotlastom reaktoru sa nepročišćenim enzimom lipaze s pogače konoplje u ovisnosti o vremenu trajanja sinteze

Slika 12 prikazuje udjele metilnih estera masnih kiselina tijekom sinteze biodizela u šaržnom reaktoru s nepročišćenom lipazom. Iz slike je vidljivo da je nakon 368,5 h sinteze postignut udio metilnih estera masnih kiselina 11,54%.

Usporedbom provedenih sinteza može se zaključiti da je jedino u uzorku biodizela broj dobiven udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu propisan prema normi HRN:EN 14214 (**Tablica 1**) sukladno kojoj udio treba biti ≥ 96,5%,i iznosi 97,82%. U biodizelu sintetiziranom s nepročišćenom lipazom u kotlastom reaktoru udio metilnih estera masnih kiselina nakon 368,5 h iznosio je 11,54% što je bilo očekivano s obzirom na značajno nižu aktivnost nepročišćene lipaze u odnosu na komercijalnu.

Slika 13 prikazuje udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu tijekom sinteze u mikroreaktorskom sustavu. Vidljivo je da je, uz maksimalno postignuto vrijeme zadržavanja od 13,56 min, s komercijalnom lipazom dobiven udio metilnih estera masnih kiselina 31,70%, a s nepročišćenom lipazom 3,29%.



Slika 13 Udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu tijekom sinteze u mikroreaktoru (●komercijalna lipaza; ●nepročišćena lipaza) u ovisnosti o vremenu zadržavanje

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je u mikroreaktorskom sustavu za kraće vrijeme postignut veći udio metilnih estera masnih kiselina u sintetiziranom biodizelu (τ = 13,56 min, udio metilnih estera masnih kiselina = 31,70%) u odnosu na kotlasti reaktor (t = 90 min, udio metilnih estera masnih kiselina = 38,69%). Iz prethodno navedenog može se zaključiti da mikroreaktorski sustav ispitan u okviru ovoga rada značajno intenzivira reakciju transesterifikacije, tj. sintezu biodizela i može se uspješno primjenjivati u sintezi biodizela.

4.5. UDIO GLICEROLA U BIODIZELU

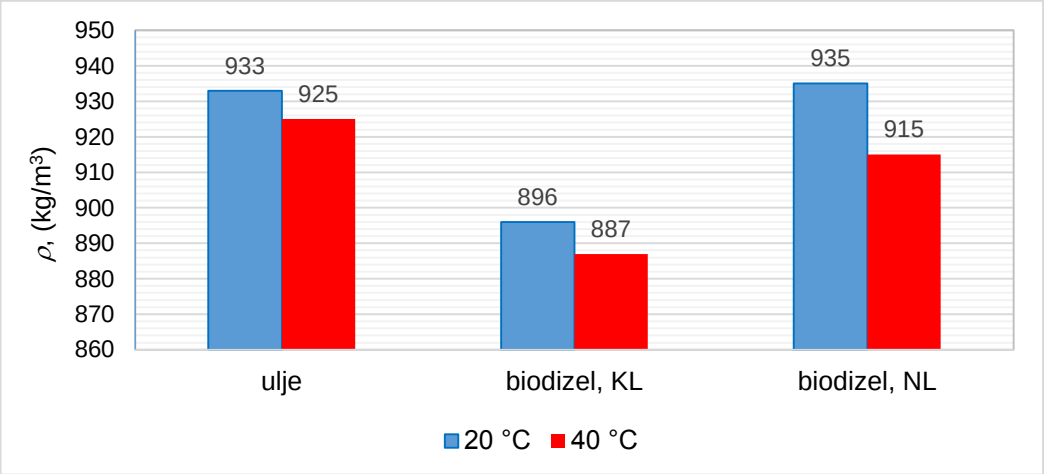
Neposredno nakon završetka sinteze biodizela u kotlastom reaktoru sa komercijalnom lipazom, na plinskom kromatografu je određen udio glicerola u biodizelu koji je iznosio 36,6011 mg/mL, a nakon separacije glicerola u lijevku za odjeljivanje udio glicerola se smanjio na 3,3062 mg/mL.

Kod sinteze biodizela u kotlastom reaktoru sa nepročišćenom lipazom, neposredno nakon završetka sinteze, udio glicerola u biodizelu iznosio je 7,6889 mg/mL, a nakon separacije udio se smanjio na 0,1658 mg/mL.

Na nižu konverziju triacilglicerola u metilne estere masnih kiselina u kotlastom reaktoru osim određivanja udjela istih može ukazivati i niža vrijednost udjela glicerola u biodizelu neposredno nakon sinteze, kao nusprodukta reakcije transesterifikacije. Iz navedenog može

se zaključiti kako aktivnost nepročišćene lipaze nije bila dovoljna za postizanje optimalnog udjela metilnih estera u biodizelu propisanog normom HRN:EN 14214 (**Tablica 1**).

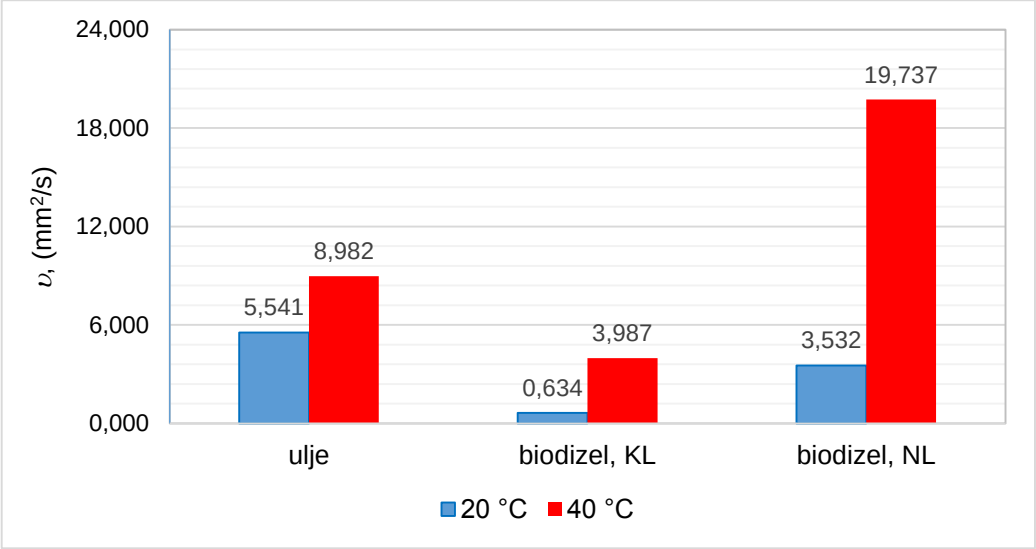
4.6. GUSTOĆA BIODIZELA



Slika 14 Gustoća svježeg jestivog ulja i biodizela sintetiziranog s komercijalnom lipazom (KL) i nepročišćenom lipazom (NL) pri 20 °C i 40 °C

Na **Slici 14** prikazani su rezultati određivanja gustoće uzoraka svježeg jestivog ulja i uzoraka biodizela sintetiziranog komercijalnom lipazom (KL) i nepročišćenom lipazom (NL). Iz rezultata je vidljivo da je gustoća biodizela sintetiziranog sa nepročišćenom lipazom približno jednaka gustoći ulja pri danoj temperaturi što je očekivano s obzirom na mali udio metilnih estera masnih kiselina u tom uzorku biodizela. Tekuća ulja i masti bi se mogli koristiti kao gorivo u dizelskim motorima no to bi zahtijevalo veće tehničke preinake motora s unutarnjim izgaranjem kakve danas poznajemo. Transesterifikacijom ulja i masti dobivena smjesa (biodizel) ima vrlo slična fizikalno-kemijska svojstva fosilnom dizelu koja se kao takva može koristiti u postojećim dizelskim motorima bez dodatnih tehničkih preinaka. Porastom udjela metilnih estera masnih kiselina smanjuje se gustoća biodizela što je vidljivo i iz eksperimentalnih rezultata (**Slika 14**). Prema važećem pravilniku HRN:EN 14214 (**Tablica 1**) vrijednost za gustoća biodizela određena je rasponom od 860 do 900 kg/m^{3}na temperaturi od 15 °C.

4.7. VISKOZNOST BIODIZELA



Slika 15 Kinematička viskoznost svježeg jestivog ulja i biodizela sintetiziranog s komercijalnom lipazom (KL) i nepročišćenom lipazom (NL) pri 20 °C i 40 °C

Slika 15 prikazuje vrijednosti kinematičke viskoznosti svježeg jestivog ulja, biodizela sintetiziranog u kotlastom reaktoru s komercijalnom i nepročišćenom lipazom. Dobiveni rezultati, kod sinteze sa komercijalnom lipazom, se slažu sa podacima za kinematičku viskoznost biodizela pri 40 °C koja prema HRN:EN 14214 (**Tablica 1**) treba biti u rasponu 3,50 – 5,00 mm^2/s.

5. ZAKLJUČCI

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

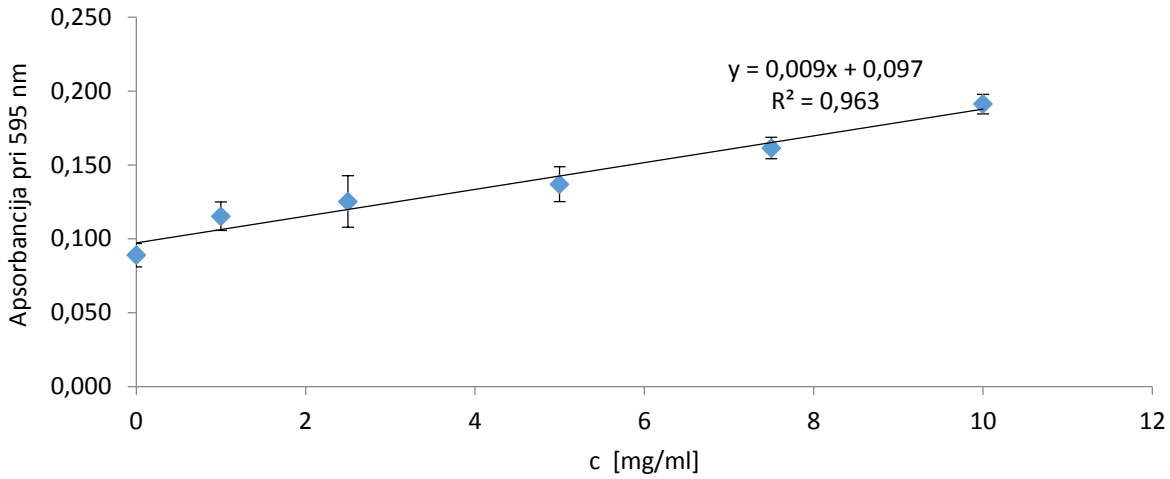
1. Koncentracija proteina, volumna i specifična aktivnost komercijalne lipaze korištene za sintezu biodizela je veća u odnosu na koncentraciju proteina, volumnu i specifičnu aktivnost nepročišćenog ekstrakta lipaze proizvedene fermentacijom na pogači konoplje.
2. Udio slobodnih masnih kiselina je veći kod otpadnog jestivog ulja iz restorana u odnosu na svježe jestivo suncokretovo ulje koja su korištena za sintezu biodizela.
3. Najveći udio metilnih estera masnih kiselina od 97,82%postignut je sintezom biodizela u kotlastom reaktoru iz jestivog suncokretovog ulja uz komercijalnu lipazu kao katalizator nakon 24 sata.
4. U mikroreaktorskom sustavu za kraće vrijeme postignut je veći udio metilnih estera masnih kiselina u sintetiziranom biodizelu (τ = 13,56 min, udio metilnih estera masnih kiselina = 31,70%) u odnosu na kotlasti reaktor (t = 90 min, udio metilnih estera masnih kiselina = 38,69%) što znači da mikroreaktori značajno intenziviraju proces sinteze biodizela.
5. Gustoća i viskoznost biodizela sintetiziranog s komercijalnom lipazom odgovaraju kvalitativnim zahtjevima norme HRN:EN 14214.
6. Gustoća i viskoznost biodizela sintetiziranog s nepročišćenom lipazom ne odgovaraju kvalitativnim zahtjevima norme HRN:EN 14214, već su približno jednaka dobivenim vrijednostima gustoće i viskoznosti polazne sirovine.

6. LITERATURA

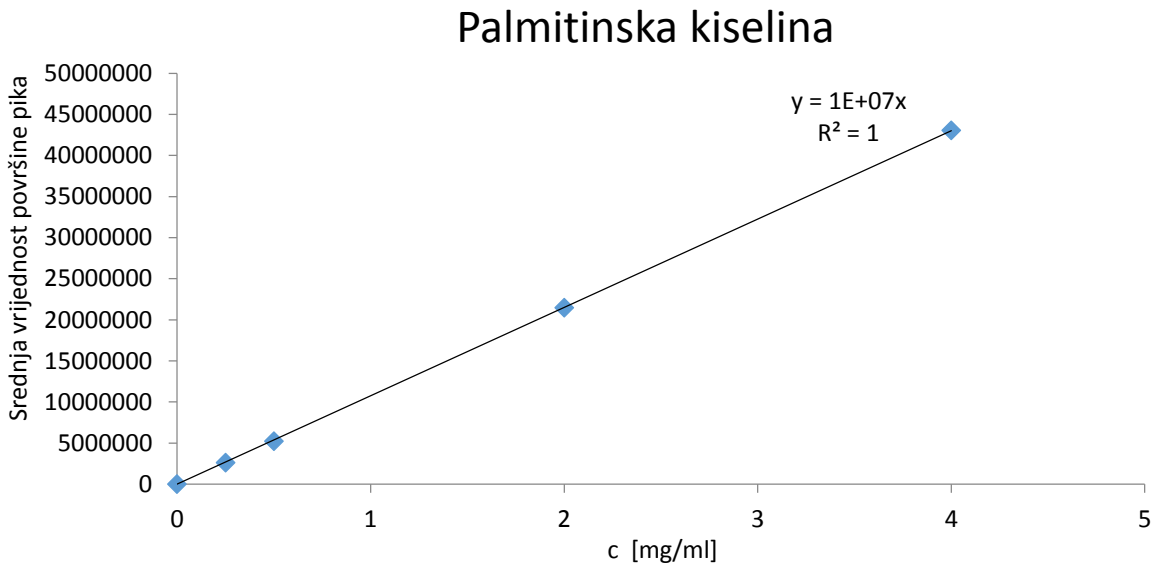
1. Predojević Z: *Goriva iz biomase bioetanol i biodizel*. SP PRINT, Novi Sad, 2010.
2. Gomzi Z: *Kemijski reaktori.* Hinus, Zagreb, 1998.
3. Tišma M: Shema kotlastog reaktora, Interna predavanja: Kemijski i biokemijski reaktori, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, 2016.
4. Palacios D, Busto M, Ortega N: Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aques media. *LWT-Food Science and Technology* 55:536-542, 2014.
5. Turcu MC: *Lipase-catalyzed approaches towards secondary alcohols: Intermediates for Enantio purgedrugs*.Turun Yliopisto, University of Turku, 2010.
6. Oliveira, Felisbela, Souza, Carlos E, Peclat, Veronica R.O.L., Salgado, Jose Manuel, Ribeiro, Bernardo D, Coelho, Maria A.Z., Venancio, Armando, Belo, Isabel: OptimizationoflipaseproductionbyAspergillusibericusfromoilcakesandits application in esterification reactions. *Food and Bioproducts Processing* Vol 102., 2017.
7. Lam MK, Lee KT, Mohamed AR: Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances*28:500-518, 2010.
8. Leung DYC, Wu X, Leung MKH: A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. *Applied Energy* 87:1083-1095, 2010.
9. Budžaki S, Šalić A, Zelić B, Tišma M: Enzyme-catalysed Biodisel Production from Edible and Waste Cooking Oils. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 29 (3) 329-333, 2015.
10. Budžaki S, Miljić G, Tišma M, Sundaram S, Hessel V: Is there a future for enzymatic biodiesel industrial production in microreactors?. *Applied Energy* 201:124-134, 2017.
11. Šalić A, Tušek A, Kurtanjek Ž, Zelić B: Mikroreaktori. *Kemija u industriji* 59 (5) 227-248, 2010.
12. Sinčić D: Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela. I. Biogoriva, svojstva biodizela i nove proizvodne tehnologije. *Kemija u industriji* 63 (1-2) 19-31, 2014.
13. Ražnjević K: *Termodinamičke tablice*. Školska knjiga, Zagreb, str.71 – 72, 1975.

7. PRILOZI

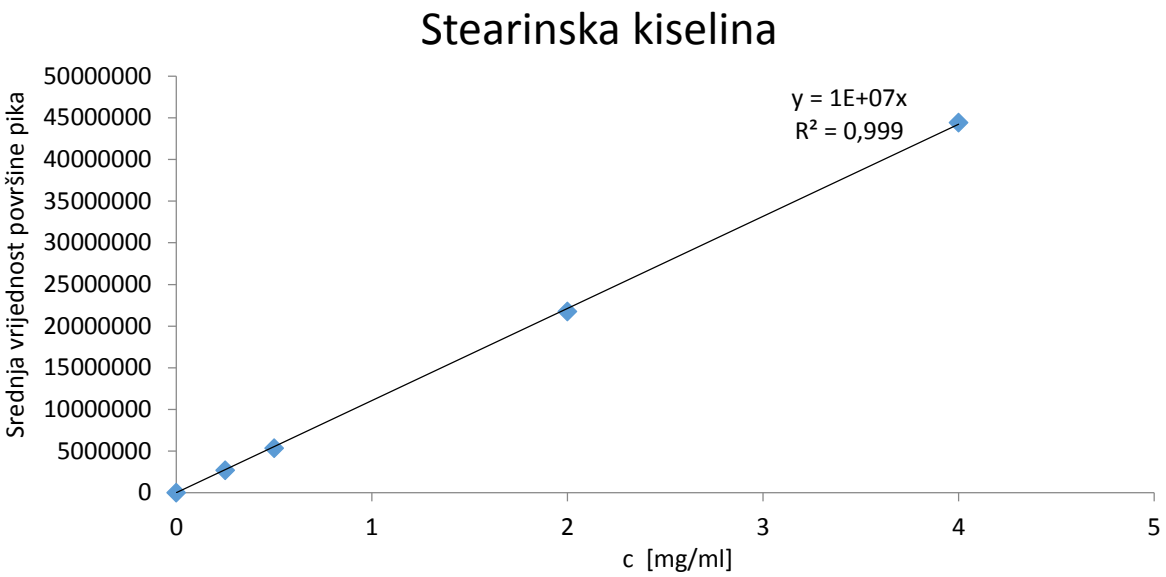
Prilog 1 Baždarni dijagram za proteine



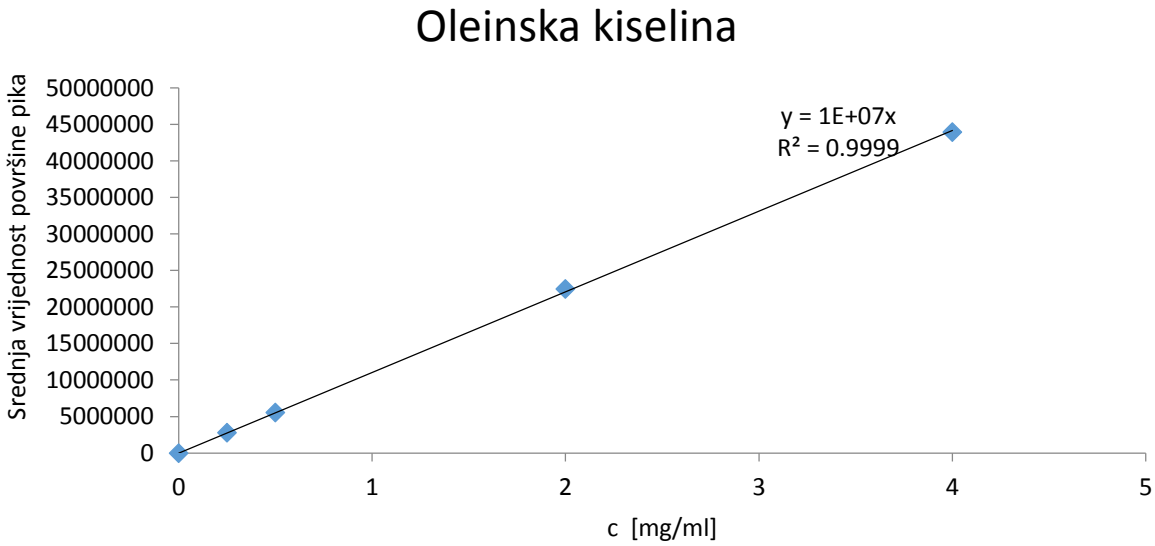
Prilog 2 Baždarni dijagram za metil estere palmitinske kiseline (bez internog standarda)



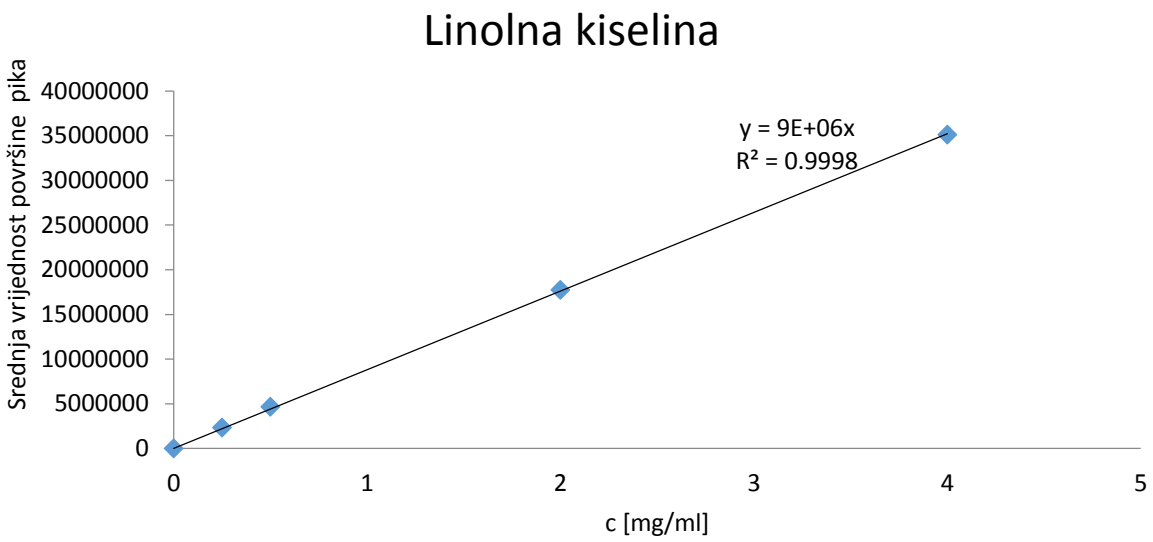
Prilog 3 Baždarni dijagram za metil estere stearinske kiseline (bez internog standarda)



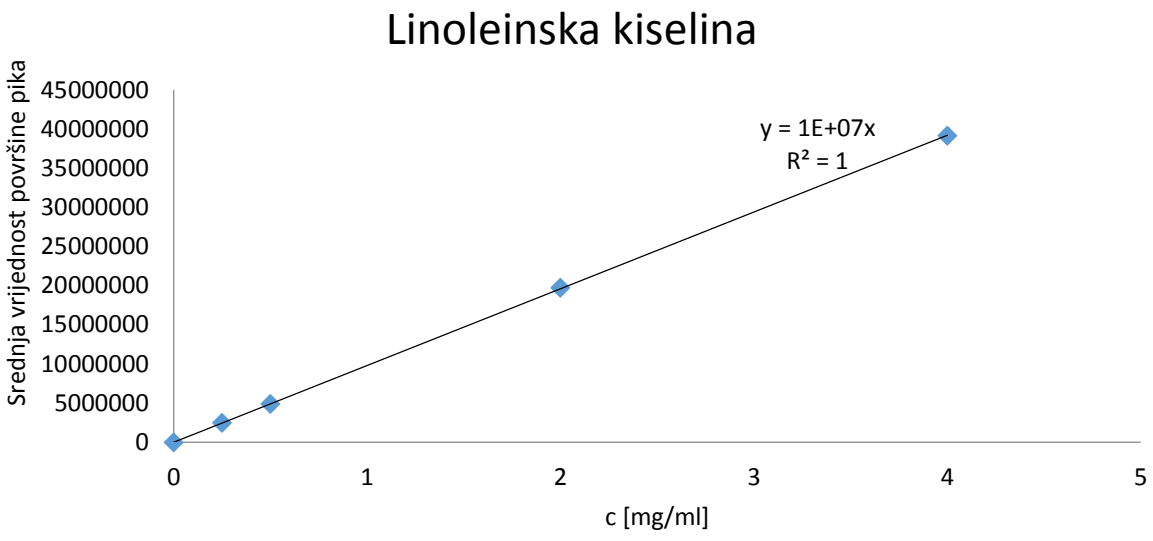
Prilog 4 Baždarni dijagram za metil estere oleinske kiseline (bez internog standarda)



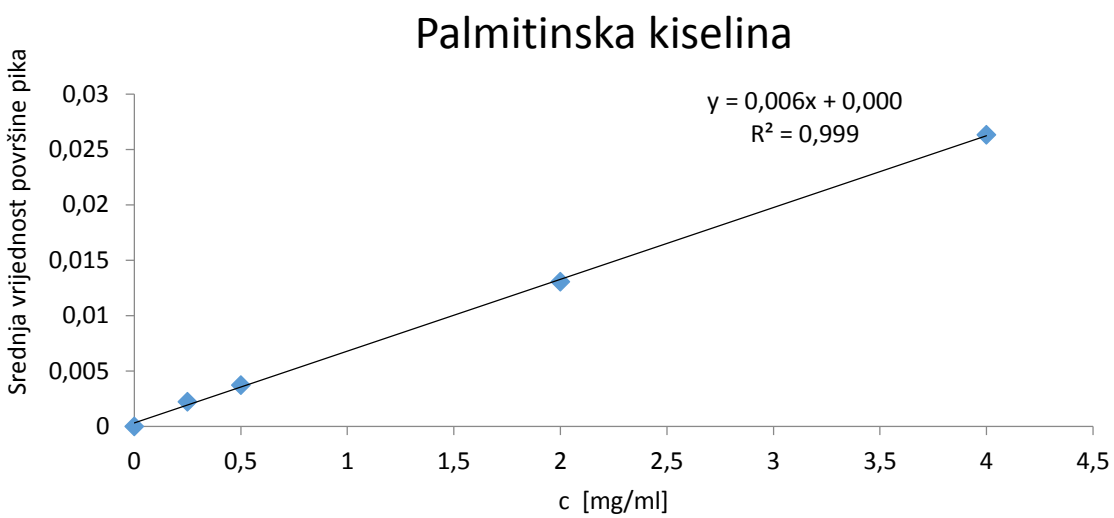
Prilog 5 Baždarni dijagram za metil estere linolne kiseline (bez internog standarda)



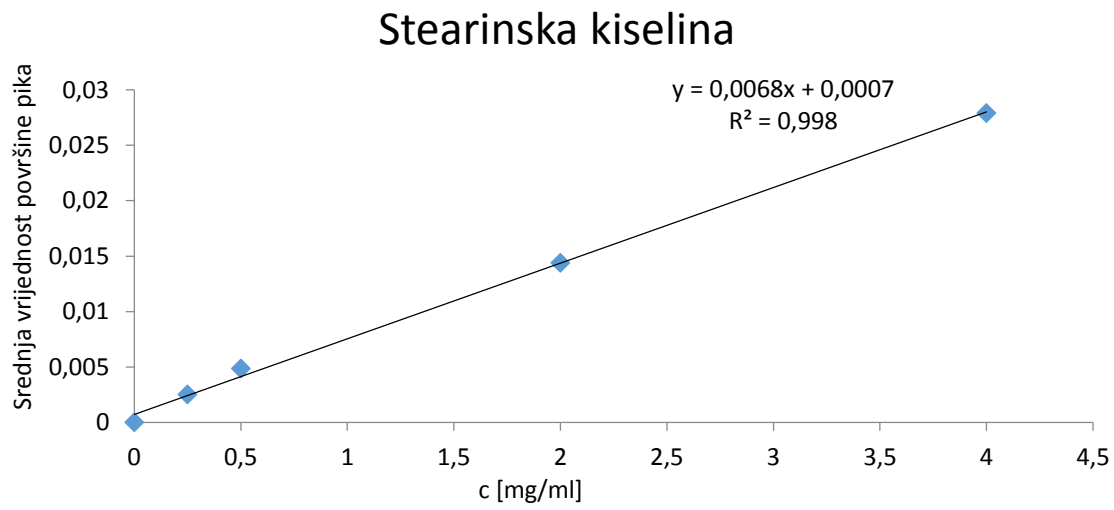
Prilog 6 Baždarni dijagram za metil estere linoleinske kiseline (bez internog standarda)



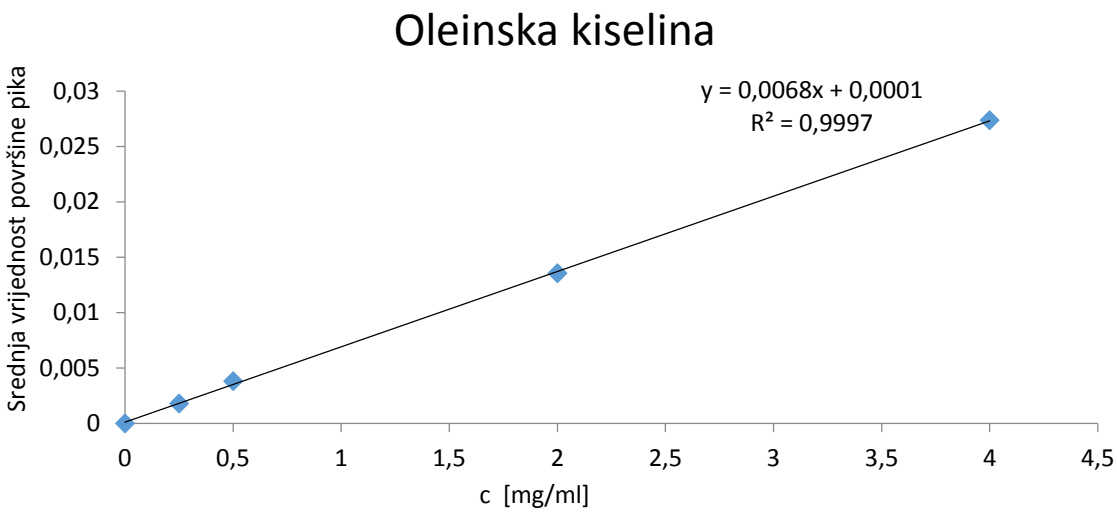
Prilog 7 Baždarni dijagram za metil estere palmitinske kiseline (sa internim standardom)



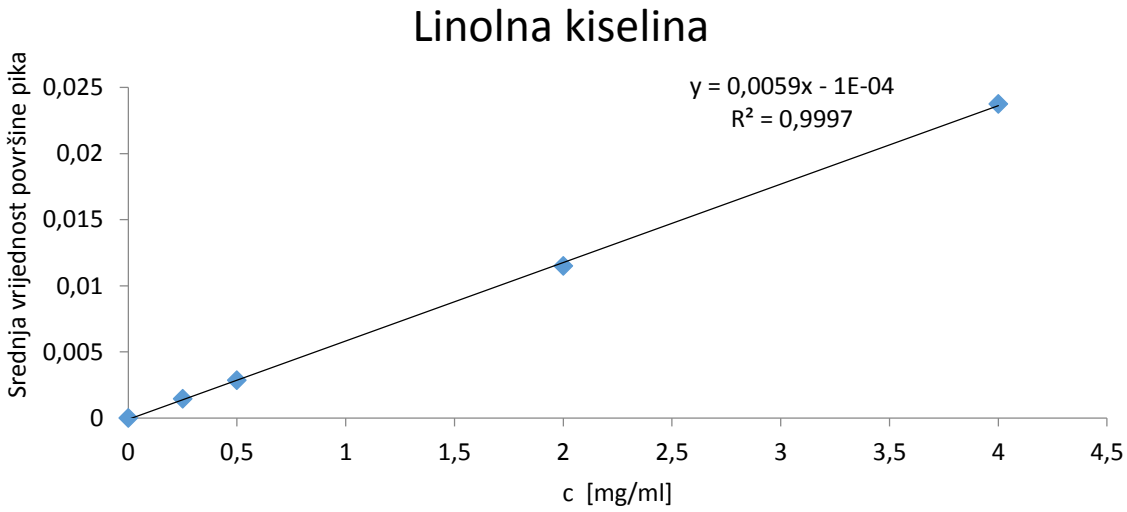
Prilog 8 Baždarni dijagram za metil estere stearinske kiseline (sa internim standardom)



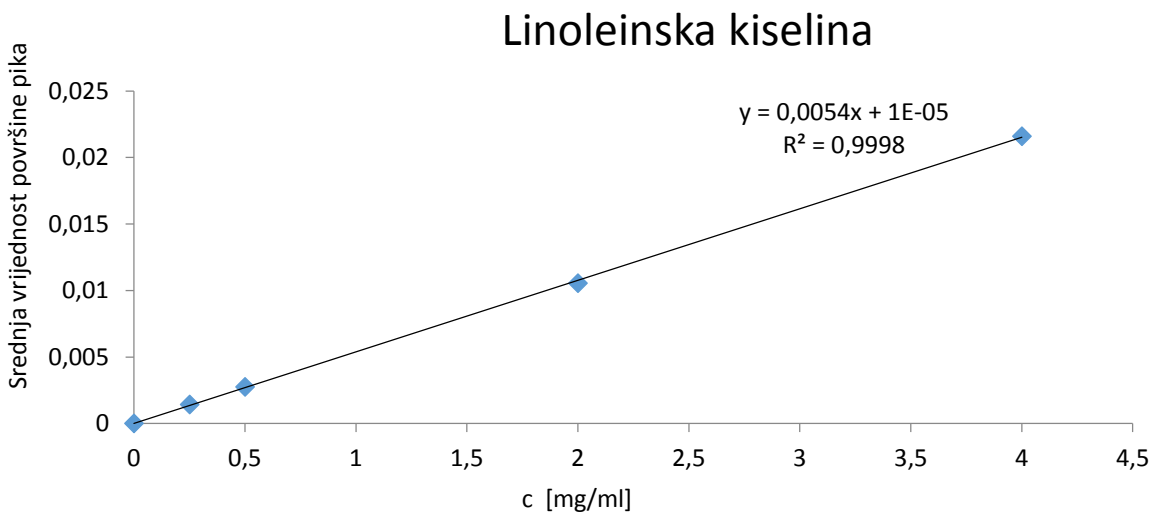
Prilog 9 Baždarni dijagram za metil estere oleinske kiseline (sa internim standardom)



Prilog 10 Baždarni dijagram za metil estere linolne kiseline (sa internim standardom)



Prilog 11 Baždarni dijagram za metil estere linoleinske kiseline (sa internim standardom)



Prilog 12 Baždarni dijagram za glicerol

