

Sinteza biodizela pomoću imobilizirane lipaze iz *Thermomyces lanuginosus*

Lucić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:109:683729>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**

REPOZITORIJ

PTF

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

Martina Lucić

**SINTEZA BIODIZELA POMOĆU IMOBILIZIRANE LIPAZE IZ
*THERMOMYCES LANUGINOSUS***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, listopad, 2015

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, 31 000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Nastavni predmet: Energija i okoliš

Tema rada je prihvaćena na XII. Sjednici Odbora za završne i diplomske ispite Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 23. rujna 2015.

Mentor: Doc. dr. sc. *Sandra Budžaki*

SINTEZA BIODIZELA POMOĆU IMOBILIZIRANE LIPAZE IZ *THERMOMYCES LANUGINOSUS*

Martina Lucić, 246/DI

Sažetak:

Cilj rada bio je imobilizirati lipazu iz *Thermomyces lanuginosus* na nosaču Eupergit CM i provesti sintezu biodizela pomoću imobilizirane lipaze u kotlastom reaktoru iz jestivog svježeg i otpadnog ulja. Proces imobilizacije koji je proveden na 24, 48, 72 i 96 h u dva pufera različite molarnosti (0,01 M i 0,1 M) najbolje je rezultate pokazao nakon imobilizacije na 72 h u 0,1 M fosfatnom puferu. Rezultati nakon provedene sinteze biodizela iz jestivog svježeg i otpadnog ulja s imobiliziranom lipazom nisu bili zadovoljavajući. Da bi sinteza biodizela pomoću imobilizirane lipaze dala željene rezultate (FAME > 96 %) potrebno je povećati masu imobiliziranog enzima koji se dodaje u reakcijsku smjesu s 735 mg na 1327,39 mg.

Ključne riječi: biodizel, jestivo svježe ulja, jestivo otpadno ulje, imobilizacija, lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*

Rad sadrži: Stranica: 41

Slika: 12

Tablica: 4

Literaturnih referenci: 32

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|--|---------------|
| 1. Doc. dr. sc. <i>Marina Tišma</i> | predsjednik |
| 2. Doc. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i> | član – mentor |
| 3. Izv. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | član |
| 4. Doc. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 30. Listopada 2015

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josipa Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of thermodynamics nad reaction engineering
Franje Kuhača 20, HR – 31000 Osijek, Croatia

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Biotechnology

Course title: Energy and Environment

Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food technology Osijek at its session no. XII. held on September 23rd, 2015.

Mentor: Sandra Budžaki, PhD, assistant prof.

SYNTESIS OF BIODIESEL BY IMMOBILIZED LIPASE FROM THERMOMYCES

Martina Lucić, 246/DI

Summary:

The aim of this study was to immobilize lipase from *Thermomyces lanuginosus* on the carrier Eupergit CM and perform synthesis by immobilised lipase in batch reactor from fresh edible and waste edible oil. Process of immobilisation was performed during 24, 48, 72 and 96 h in two buffer of different molarity. The best results show immobilisation during 72 h in 0.1 M buffer (the most residual enzyme after immobilisation). The amount of produced biodiesel from fresh edible and waste edible oil was unsatisfactory. Therefore, increase in immobilized enzyme mass from 735 mg to 1327.39 mg is required for achieving desired results (FAME > 96 %) for biodiesel synthesis.

Key words: biodiesel, fresh edible oil, waste edible oil, immobilization, lipase from *Thermomyces lanuginosus*

Thesis contains: Pages: 41

Figures: 12

Tables: 4

References: 32

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: October 30, 2015

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

Na ovom mjestu htjela bih izraziti nekoliko riječi zahvale ljudima koji su mi omogućili da danas budem gdje jesam, te onima koji su mi pomogli prilikom izrade diplomskog rada.

Najprije se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Sandri Budžaki koja mi je omogućila izradu diplomskog rada pod njenim vodstvom. Hvala vam na posvećenom vremenu i znanju.

Hvala mojoj obitelji koja mi je bila podrška tijekom cijelog mog studiranja, hvala im na strpljivosti i neizmjernoj ljubavi.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio.....	3
2.1. Biodizel.....	4
2.1.1. Sirovine u proizvodnji biodizela.....	5
2.1.2. Katalizatori u proizvodnji biodizela	7
2.2. Lipaze	10
2.2.1. Imobilizacija lipaze.....	12
3.1. Cilj rada	17
3.2. Materijali.....	17
3.2.1. Priprema otopine.....	17
3.2.2. Aparatura	18
3.3. Metode	20
3.3.1. Metoda imobilizacije lipaze iz <i>Thermomyces lanuginosus</i>	20
3.3.2. Određivanje koncentracije proteina.....	20
3.4. Sinteza biodizela pomoću imobilizirane lipaze iz <i>Thermomyces lanuginosus</i>	22
4.1. Rezultati određivanja koncentracije proteina pomoću Bradfordičine metode	25
4.2. Rezultati određivanja mase imobilizirane lipaze na Eupergitu CM.....	26
4.3. Rezultati nastalih metil estera masnih kiselina	30
5. Zaključak	32
6. Literatura	34
7. Prilozi	41

Popis oznaka, kratica i simbola

m	masa (mg)
T	temperatura (°C)
PBS	(Phosphate buffer saline) fosfatni pufer
BSA	(Bovine serum albumin) goveđi serumski albumin
n	broj okretala miješala (o/min)
FAME	(Fatty Acid Methyl Ester) metil esteri masnih kiselina
m_{IM}	masa imobilizirane lipaze (mg)
t	vrijeme (h)
C	sadržaj metil estera masnih kiselina (%)
m_i	masa lipaze korištena za imobilizaciju (mg)
m_f	masa enzima u filtratu (mg)
γ	koncentracija (mg/mL)
V_f	volumen filtrata (mL)

1. Uvod

Sve veće demografsko i industrijsko širenje dovodi do veće potrošnje i potražnje za energijom na svjetskom nivou. Ograničenost resursa fosilnih goriva mogli bi dovesti do energentske krize što uvelike pokreće istraživanja usmjerena ka alternativnim izvorima energije koji bi djelomično ili u potpunosti mogla zamijeniti fosilna goriva. Alternativna goriva moraju biti ekonomski konkurentna, lako dostupna, ekološki prihvatljiva i moraju biti bazirana na obnovljivim sirovinama. Alternativna goriva mogu se dobiti iz krutih, tekućih ili plinovitih bioloških izvora. Jedno od alternativnih vrsta goriva je i biodizel. Biodizel je tekuće gorivo dobiveno iz obnovljivog izvora energije tj. biljnih ulja, životinjskih masti, otpadnog ulja iz prehrambene industrije ili algi. Ovakva vrsta goriva je ekološki prihvatljiva jer proizvodi 60% manje emisije ugljikovog dioksida, ne sadrži sumpor niti metale koju su glavni onečišćivači zraka u slučaju fosilnih dizelskih goriva dobivenih iz nafte.

Proizvodnja biodizela se najčešće provodi transesterifikacijom u kojoj sudjeluju trigliceridi i metanol uz prisutnost katalizatora, kemijskog ili enzimskog, pri čemu nastala smjesa metil estera viših masnih kiselina se definira kao biodizel, uz izdvajanje sporednog produkta kemijskih reakcija glicerola. Kemijski postupak transesterifikacije najčešće se primjenjuje u industrijskoj proizvodnji (kalijeva i natrijeva lužina) dok je enzimski postupak još uvijek na znanstveno-istraživačkom nivou.

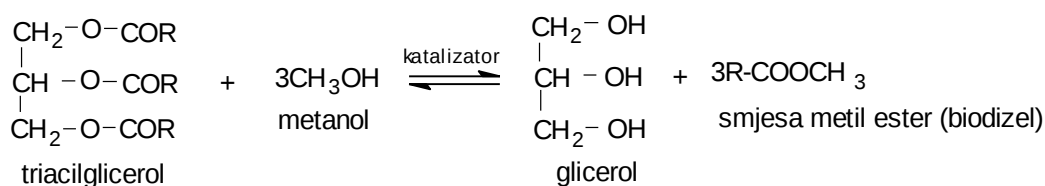
Enzimi koji se koriste kao katalizatori transesterifikacije su lipaze. Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* korištena je u ovom radu kao katalizator transesterifikacije jestivog svježeg i otpadnog ulja. Postupak sinteze biodizela proveden je u kotlastom reaktoru (šaržno), jednostupanjskom reakcijom transesterifikacije jestivog svježeg i otpadnog ulja s metanolom i imobiliziranom lipazom pri temperaturi od 40 °C. Dobiveni rezultati uspoređeni su s literaturnim podacima. Eksperimenti su provedeni na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek u laboratoriju za procesno inženjerstvo.

2. Teorijski dio

2.1. Biodizel

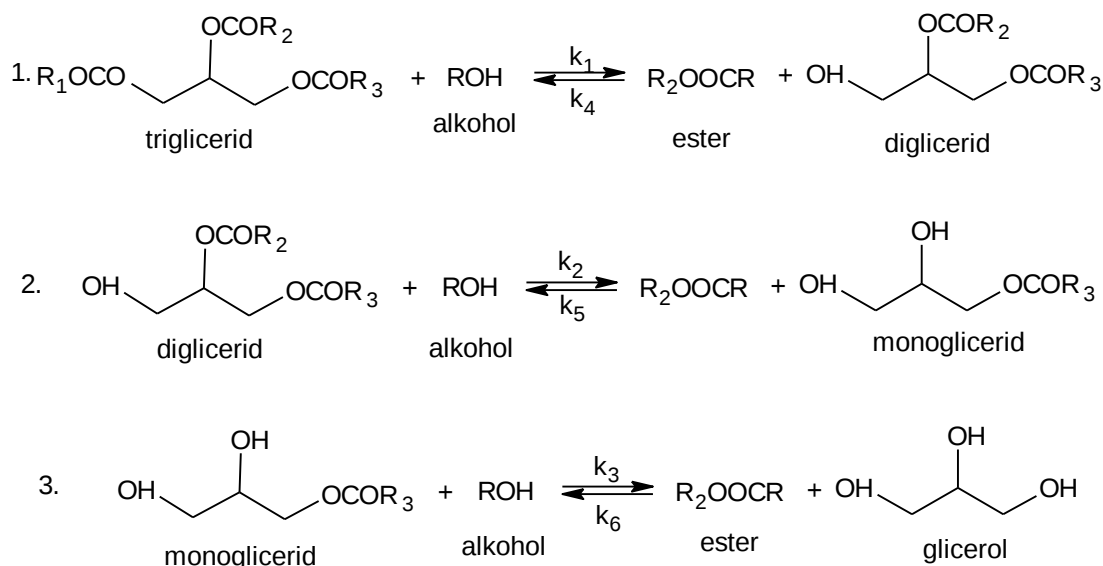
Biodizel je po kemijskom sastavu monoalkilni ester nižih alkohola i dugolančanih masnih kiselina nastao iz ulja ili masti biljnog ili životinjskog podrijetla. Biodizel je privukao pozornost kao ne toksičan (jer u svom sastavu ne sadrži spojeve sumpora pa tijekom sagorijevanja ne dolazi do stvaranja sumporov (IV) oksida), biorazgradljiv, obnovljivi izvor energije sa značajno nižim sadržajem ispušnih emisija kao što su CO, CO₂ i SO_x. (Sinčić, 2014). Velika prednost biodizela je korištenje u dizelskim motorima bez ikakvih modifikacija pri čemu se može miješati u bilo kojem omjeru i sa dizelskim (fosilnim) gorivima. (Tan i sur., 2010.; Narwal i sur., 2012.; Christopher i sur., 2014.; Sinčić, 2014.). Dakle biodizel se smatra „prijateljem“ okoliša i pokazuje veliki potencijal kao alternativno gorivo (Tan i sur., 2010.). Biodizel se može proizvoditi postupcima pirolize, mikroemulzifikacije i transesterifikacije. (Ljupković, 2014.; Stojanović, 2013.; Glišić, 2009.; Ognjanović i sur., 2009.).

Transesterifikacija (alkoholiza) je najčešći postupak provođenja sinteze biodizela (Slika 1). Transesterifikacija podrazumijeva reakciju biljnih ulja ili životinjske masti (trigliceridi) s alkoholom (metanol, etanol ili butanol) sa ili bez prisustva katalizatora pri čemu nastaju metilni esteri masnih kiselina i sporedni produkt glicerol (Christopher i sur., 2014.; Narwal i sur., 2012.).



Slika 1. Reakcija transesterifikacije

Odvija se u tri uzastopne povratne reakcije (Slika 2), u kojima se molekula triglicerida ubrzano pretvara u diglicerid, monoglicerid i glicerol. U svakom koraku reagira po jedan mol alkohola i jedan mol estera.



Slika 2. Tri uzastopne reverzibilne reakcije alkoholize (R je mala alkilna grupa, R_1 , R_2 i R_3 su lanci masnih kiselina, a k_1 , k_2 , k_3 , k_4 , k_5 i k_6 su kemijski ili enzimski katalizatori)

Za transesterifikaciju koriste se primarni i sekundarni monohidroksilni alkoholi s najviše 8 ugljikovih atoma u lancu. Zbog niske cijene i visoke reaktivnosti najveću primjenu imaju metanol, etanol i butanol. Metanol zbog svojih dobri fizikalnih i kemijskih osobina, niske cijene koštanja te lakog izdvajanja iz smjese nastalih produkata najčešće se koristi od svih navedenih alkohola. Reakcija metanolize je povratna, odvija se uz suvišak metanola kako bi se njena ravnoteža pomaknula u smjeru nastajanja smjese estera viših masnih kiselina. Brzina reakcije i prinos metil estera viših masnih kiselina ovisi o kvaliteti triacilglicerola, vrsti katalizatora i primjenjenim reakcijskim uvjetima (Ljupković, 2014.; Sinčić, 2014.; Glišić, 2014.).

2.1.1. Sirovine u proizvodnji biodizela

Izbor sirovine za dobivanje biodizela ovisi o specifičnim uvjetima i prilikama u svakoj zemlji (klima, ekonomski razvoj, zastupljenost pojedinih poljoprivrednih kultura, i dr.). (Tan i sur., 2010.; Ljupković, 2014.; Narwal i sur., 2012; Pandey i sur., 2011.).

Sirovine mogu biti jestiva, nejestiva i otpadna ulja - ulja dobivena iz uljane repice, suncokreta, palme, soje, jatrofi ulje, ulje od kikirikija i dr. (Tan i sur., 2010.; Narwal i sur.,

2012.). Biodizel dobiven iz jestivih biljnih ulja spada u biogoriva prve generacije. Biljna ulja i životinjske masti sastoje se od triglicerida koji se po svojoj molekularnoj strukturi sastoje od 3 mola masnih kiselina i 1 mola glicerola međudobno povezani esterskom vezom. Masne kiseline mogu se podijeliti na zasićene (ne sadrže dvostruku vezu) i nezasićene (sadrže dvostruku vezu i nemaju maksimalni broj vodikovih atoma). Biljna ulja imaju od 10 do 20 puta veću viskoznost od suvremenih fosilnih goriva te zbog toga uzrokuju loše rasprskavanje goriva i kao posljedica toga je nepotpuno izgaranje (Sinčić, 2015; Glišić, 2009.).

Repičino ulje je najznačajnija sirovina za proizvodnju biodizela zbog visokog sadržaja ulja (42 – 46 %) i bjelančevina (preko 20 %) (Ljupković, 2014.; Christopher i sur., 2014.; Narwal i sur., 2012.; Tan i sur., 2010.).

Suncokretovo ulje je druga sirovina po učestalosti za proizvodnju biodizela u Europi (Španjolska, Italija i Grčka) (Ljupković, 2014.; Christopher i sur., 2014.; Narwal i sur., 2012.; Tan i sur., 2010.).

Sojino ulje je glavna sirovina za proizvodnju biodizela u Sjedinjenim Američkim Državama (Ljupković, 2014.; Tan i sur., 2010.).

Palmino ulje je najvažnija sirovina za proizvodnju biogoriva u jugoistočnoj Aziji. Glavna prednost joj je velik prinos i umjerena cijena u odnosu na druga jestiva biljna ulja (Ljupković 2014.; Tan i sur., 2010.).

Jatrofa je biljka za koju se smatra da će biti sirovina budućnosti u proizvodnji biodizela. Ne koristi se u prehrambene svrhe (ni ljudske ni životinjske) kao ni ulje dobiveno iz njenih sjemenki, ne zahtjeva gnojidbu, otporna je na različite klimatske uvjete i ne zahtjeva preveliku količinu vode (Ljupković, 2014.; Tan i sur., 2010.).

Životinjske masti i riblja ulja su nusporizvodi prehrambene i prerađivačke industrije. Njihova glavna prednost je niža cijena u odnosu na jestiva biljna ulja. Imaju visoku razinu zasićenja koja ih čini odličnim gorivom zbog visoke ogrijevne vrijednosti i cetanskog broja. Nedostaci su im promjene svojstava tijekom niskih temperatura pa ih se koristi kao dodatne sirovine za proizvodnju biodizela (Narwal i sur., 2012.; Tan i sur., 2010.; Ljupković, 2014.).

Otpadna jestiva ulja su svaka vrsta ulja koja nastaju u industriji, obrtu, zdravstvenoj djelatnosti, javnoj upravi, obavljanjem ugostiteljske i turističke djelatnosti (Bradarić i sur., 2011). Otpadna jestiva ulja mogu predstavljati problem za okoliš ako se pravilno ne zbrinjavaju. Otpadna jestiva ulja tretiraju se kombinacijom mehaničkog čišćenja vodom i kemijskom obradom. Prženje hrane odvija se na temperaturi od 160 – 200 °C, gdje se jedan dio ulja apsorbira u proizvodu koji se prži, a drugi dio proizvoda se raspada, odvaja i zaostaje u ulju. U samom ulju događaju se fizikalne i kemijske promjene koje mogu biti različite kod različitih vrsta ulja, a ovisi o njihovom sastavu i uvjetima prženja te temperaturi. Tijekom prženja odvijaju se tri tipa reakcija: termolitičke, oksidacijske i hidrolitičke koje izazivaju niz promjena kao što je nastanak hlapljivih tvari, porast viskoznosti, polarnosti i sadržaju slobodnih masnih kiselina, promjene boje i smanjenja jednog broja, smanjene površinske napetosti ulja za prženje. Svježa jestiva ulja i masti zadovoljavaju kriterije niske kiselosti i nižeg sadržaja vode koji su potrebni za učinkovitu provedbu reakcija transesterifikacije tijekom proizvodnje biodizela za razliku od otpadnih jestivih ulja koja su manje idealna sirovina. Otpadna jestiva ulja se klasificiraju kao neopasni otpad, skupljaju se i zbrinjavaju od strane ovlaštenih osoba. Prvi korak zbrinjavanja otpadnih jestivih ulja je odvajanje krutog od tekućeg dijela, svaki dio se posebno obrađuje. Tekući dio obično je bolje kvalitete i manje kiselosti. Biodizel se može proizvesti iz otpadnog jestivog ulja koje zaostaje nakon industrijske pripreme hrane. No da bi se otpadno jestivo ulje koristilo u procesu sinteze biodizela mora prethodno proći odgovarajuću pripremu. Otpadno jestivo ulje se prije uporabe za proizvodnju biodizela mora prvo profiltrirati. Otpadna jestiva ulja se koriste još zbog svoje niske cijene i ekonomske prednosti u odnosu na cijenu svježeg jestivog ulja (Brdarić i sur., 2011; Budžaki i sur., 2014.).

U posljednje vrijeme sve se više pažnje posvećuje proizvodnji biodizela iz mikroalgi. Razlog tome je što proizvodnja algi ne utječe na proizvodnju hrane tj. ne zauzima plodno tlo kao što je to slučaj bilo kod jestivih ili nejestivih ulja. Također prinos biodizela je veći kod mikroalgi nego kod proizvodnje iz biljnih ulja kao sirovine. Proces proizvodnje biodizela iz ulja algi još uvijek nije ekonomski i tehnički opravdan (Narwal i sur., 2012.; Ljupković, 2014.).

2.1.2. Katalizatori u proizvodnji biodizela

Reakcija transesterifikacije može biti katalizirana lužinama, kiselinama ili enzimima.

Transesterifikacija uz lužine kao katalizatore

Lužnata kataliza se najčešće primjenjuje u industrijskoj proizvodnji zbog velike aktivnosti lužnatih katalizatora. Zbog svoje veće aktivnosti, imaju prednost i zbog toga što su manje korozivni u odnosu na kisele katalizatore te zbog toga ne zahtjevaju skupu aparaturu. Najčešće korišteni su natrijev hidroksid (NaOH) i kalijev hidroksid (KOH). Razlog njihove primjene je niska cijena, laka dostupnost, mogućnost postizanja konverzije u kratkom vremenu te već spomenuta manja korozivnost u odnosu na kisele katalizatore.

Lužnate katalizatore se ne koriste u proizvodnji ukoliko sirovina sadrži više od 2 % masnih kiselina ili ako se u reakcijskoj smjesi nalazi voda, tada dolazi do poteškoća s uklanjanjem glicerola iz biodizela i prekomjernog nastanka sapuna, posebno sapuna zasićenim masnim kiselinama koje se pri sobnoj temperaturi nalaze u krutom stanju i mogu dovesti do geliranja nakon čega je teško obnoviti biodizel. Da bi se izbjeglo stvaranje sapuna, potrebno je koristiti biljno ulje sa niskim sadržajem slobodnih masnih kiselina kao polaznu sirovinu (Christopher i sur., 2014.).

Proizvodnja biodizela uz primjenu lužnatih homogenih katalizatora odvija se na temperaturi 45 – 80 °C, uz molarni odnos alkohola i ulja 6:1 (Christopher i sur., 2014, Ljupković, 2014).

Prednosti heterogenih lužnatih katalizatora (primjena oksido zemnoalkalijskih metala smanjuje utrošak energije do 50 %) (Miladinović MR., 2010). Slični su homogenim, razlika je jedino u tome što je brzina kemijske reakcije nešto sporija, ali je znatno brža od kiselokataliziranih reakcija. Osim toga prednost heterogenih katalizatora je u tome što ih je jednostavnije izvući iz reakcijske smjese i ponovno upotrijebiti. (Narwal i sur., 2012.; Christopher i sur., 2014.; Stamenković i sur., 2005.; Racar, 2014; Sinčić, 2014.).

Transesterifikacija uz kiseline kao katalizatore

Kod kiselo kataliziranih procesa odvija se reakcija esterifikacije između slobodnih masnih kiselina i nižih alkohola. Kiselo katalizirana transesterifikacija ima prednost u odnosu na lužnatu jer se u jednom procesu mogu prevoditi i slobodne masne kiseline i trigliceridi do metil estera masnih kiselina, dok za lužnate katalizirane procese je potrebna prethodna dodatna obrada. Zbog svojih brojnih nedostataka (visoka korozivna priroda) kiseli katalizatori nisu zaživjeli u značajnijoj daljnoj primjeni (Narwal i sur., 2012.; Ljupković, 2014.; Stamenković i sur., 2005.; Christopher i sur., 2014.; Sinčić, 2014.).

Transesterifikacija uz enzime kao katalizatore

Zbog velikog poskupljenja procesa uslijed velike količine otpadnih voda koje nastaju u procesu te otežanom uklanjanju glicerola kod proizvodnje biodizela korištenjem lužina i / ili kiselina kao katalizatora, dolazi do sve većeg interesa za primjenom enzima kao katalizatora u procesu sinteze biodizela transesterifikacijom. Enzimi koji se koriste kao biokatalizatori spadaju u skupinu lipaza. Enzimski katalizirana transesterifikacija ima drukčiji reakcijski put od kisele i lužnate katalizirane transesterifikacije. Kod enzimske transesterifikacije gliceridi se prvo prevode u slobodne masne kiseline, a onda iz slobodnih masnih kiselina pomoću metanola se dobiju metil esteri masnih kiselina i glicerol bez nusprodukata. Zbog toga su enzimski katalizirani procesi pogodniji za ulja lošije kvalitete koja sadrže više od 2% slobodnih masnih kiselina. Prednosti enzimske proizvodnje su blagi reakcijski uvjeti (temperature od 30 °C do 60 °C) uz izdvajanje glicerola bez dodatnog pročišćavanja. Primjenom enzima kao katalizatora u reakcijama transesterifikacije ne nastaju sapuni kao sporedni produkti. Dobiveni dizel je visokokvalitetan. Zbog primjene lipaza nema potrebe za ispiranjem proizvoda u završnoj fazi sinteze biodizela i prečišćavanjem pa se time smanjuje količina otpadne vode koja izlazi iz procesa. Pored svih prednosti koje nudi enzimska proizvodnja biodizela još uvijek nije konkuretna kemijskoj proizvodnji. Osnovni nedostaci su visoke cijene enzima, mala aktivnost, osjetljivost enzima na povišene koncentracije alkohola i enzimska inhibicija reaktantima i produktima (Christopher i sur., 2014.; Ljupković, 2014.; Narwal i sur., 2012.; Ognjanović i sur., 2009.).

2.2. Lipaze

Lipaze (triacilglicerolester hidrolaze EC 3.1.1.3.) su enzimi koji mogu sudjelovati u reakcijama hidrolize i esterifikacije. Zahvaljujući mogućnosti da mogu katalizirati i proces hidrolize i esterifikacije, koriste se i u reakcijama tranesterifikacije. Mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobiološkog podrijetla. Prema literaturi lipaze dobivene iz kvasaca i plijesni kao što su *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderis cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* i *Rhizomucor miehei* se najviše koriste u sintezi biodizela zbog pristupačnih cijena i postignutih rezultata tijekom sinteze biodizela (Matte i sur., 2013.; Ognjenović i sur., 2009.).

Selektivnost je osobina lipaze na kojoj se zasniva njezina praktična primjena. Pravim izborom lipaze možemo usmjeriti odvijanje reakcije i dobivanje čistog proizvoda velikog prinosa.

Lipaze imaju nekoliko vrsta specifičnosti: specifičnost u odnosu na ester, specifičnost položaja, specifičnost u odnosu na masne kiseline i stehiometrijsku specifičnost.

Specifičnost u odnosu na ester podrazumijeva različitu brzinu hidrolize tri-, di-, monoacilglicerola, estera kolosterola, metil- i drugih estera. U ovisnosti o tipu veze koju hidroliziraju (primarnu ili sekundarnu vezu) u molekuli triacilglicerola, lipaze dijelimo na specifično položajne i nespecifično položajne.

Specifično položajne lipaze djeluju samo na primarnu estersku vezu u molekuli triacilglicerola i u tu grupu pripadaju lipaze iz *Mucor miehei*, *Mucor javanicu*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus arrhizus* i druge, dok nespecifično položajne lipaze hidroliziraju primarnu i sekundarnu vezu u molekuli triacilglicerola približno istom brzinom, a u tu grupu spadaju lipaze iz *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Geotrichum candidum* i druge.

Za sintezu estera od velikog značenja je specifičnost lipaza u kojoj dužina lanca masnih kiselina utječe na brzinu reakcije. Fizikalno stanje masti utječe na brzinu hidrolize. Triacilgliceroli koji se sastoje od nižih nezasićenih ili viših nezasićenih masnih kiselina u tekućem stanju, a triacilgliceroli viših zasićenih masnih kiselina su na uobičajenim temperaturama ispitivanja (30°C-40°C) u čvrstom stanju. Prema podrijetlu (biljne, životinjske i mikrobne) lipaze pokazuju različitu specifičnost prema masnim kiselinama. Većina mikrobnih lipaza pokazuju maksimalnu aktivnost pri pH vrijednosti između 5,6 i 8,5 i na temperaturi od

30°C do 40°C. Životinjske i biljne lipaze su termostabilnije od mikrobnih. Termostabilnost lipaza ovisi o sadržaju vode u sustavu. Optimalna temperatura za mikrobnje lipaze su u rasponu od 30°C do 40°C, dok kod životinjskih i biljnih lipaza temperatura može biti i do 100°C (Matte i sur., 2013.; Ognjanović i sur., 2009.; Iso i sur., 2001.).

Razvojem suvremenih fizikalno-kemijskih metoda određena je struktura većine lipaza i struktura aktivnog centra samog enzima. Primarna struktura lipaze određena je sekvencioniranjem samog proteina ili pripadajućeg gena. Broj aminokiselina u molekuli lipaze varira u širokom opsegu, između 270 i 640. Istraživanja pokazuju da se aktivni centar enzima nalazi u unutrašnjosti molekule i da je zaklonjen peptidnim lancem. Aktivni centar većine lipaza sadrži ostatke triju aminokiselina: serina, asparagina ili glutamina i histidina. Kataliza lipaze se odvija u dva koraka. U prvom koraku hidroksilna skupina serina napada karboksilnu grupu supstrata i formira acilo-enzimski kompleks uslijed čega se oslobađa molekula alkohola. U drugom koraku uslijed napada nukleofilne grupe dolazi do hidrolize kompleksa. U vodenim otopinama nukleofilna grupa je hidroksilna grupa iz molekule vode, pa kao produkt nastaje masna kiselina. Reakcijski sustav za djelovanje lipaza je dvofazni sustav koji se sastoji iz supstrata netopljivog u vodi i vode. Lipaze imaju specifičan mehanizam djelovanja jer su aktivne na granicama faza ulje-voda. Molekula lipaze se tada postavlja u položaj otvorene konformacije pri kojoj je aktivni centar dostupan molekulama supstrata i gdje se omogućava stvaranje kompleksa enzim-supstrat (Ognjanović i sur., 2009.; Matte i sur., 2013.).

Prednosti primjene lipaza kao katalizatora su blagi reakcijski uvjeti uz manji utrošak energije i dobivanje visokokvalitetnog proizvoda s većim prinosom kao i to da su prihvatljivije za okoliš. Proizvodi dobivenim enzimskim putem su čistiji s manje primjesa što je važno u kasnijim fazama pročišćavanja posebno u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Lipaze se mogu koristiti kao katalizatori u industrijskim procesima ili kao sastojci dobivenin proizvoda. Razvijene grane industrije u kojima lipaze imaju zapaženu ulogu su industrija masti i ulja, prehrambena industrija (modificiranje arome pojedinih namirnica), kožarska industrija (odmašćivanje kože), kozmetička industrija i mliječna industrija (hidroliza mliječne masti) (Ognjanović i sur., 2009.; Iso i sur., 2001.).

2.2.1. Imobilizacija lipaze

Imobilizacija lipaze predstavlja proces kojim se enzim fizički ili kemijski veže u određenom prostoru pri čemu više ili manje zadržava svoju katalitičku aktivnost. Imobilizacija podrazumijeva svako ograničenje slobodnog kretanja molekula enzima unutar prostora (Matte i sur., 2014; Hanefeld i sur., 2008; Brena i sur., 2006; Iso i sur., 2001.).

Enzim koji se fizički ili kemijski veže ili je vezan u određenom prostoru ne gubi svoju katalitičku sposobnost, već se samo prevodi iz topljivog oblika u vodi u netopljivi oblik. Imobilizacijom enzima dolazi do promjene njegove aktivnosti zbog utjecaja površine nosača, prisustva supstrata i ostalih komponenata u sustavu (inhibitora, aktivatora, vodikovih iona). Prednosti imobilizacije enzima predstavljaju višestruka upotreba biokatalizatora, smanjene cijene procesa, veća stabilnost biokatalizatora u tijeku katalitičkog procesa i tokom skladištenja (enzim je uglavnom otporniji na utjecaje temperature i pH i može se duže skladištiti, a da pritome zadrži veći dio svoje aktivnosti) i olakšana izolacija produkta. Biokatalizator se može ukloniti u bilo kojem trenutku i na taj način zaustaviti reakciju što olakšava kontrolu procesa. Po završenoj reakciji imobilizirani enzim se lakše izdvaja iz reakcijske smjese (filtracijom ili centrifugiranjem) čime se u potpunosti može izbjeći kontaminacija proizvoda. Za dobro provođenje postupka imobilizacije enzima potrebno je odabrati pogodan nosač, uvjete imobilizacije (pH, temperatura) i sam enzim (izvor, priroda i čistoća). Na odabir metode utječe katalitička priroda (produktivnost, prinos, stabilnost i selektivnost) tako i nekatalitička potreba procesa (separacija, kontrola procesa) (Brena i sur., 2006; Narwal i sur., 2012; Hanefeld i sur., 2008; Blažević, 2013.).

Metode ili tehnike imobilizacije enzima uključuju pričvršćivanje enzima na krutu podlogu (spajanje s nosačem adsorpcijom ili kovalentno) ili međusobno povezivanje molekula enzima (unakrsno povezivanje samih enzima ili unakrsno povezivanje enzima s nosačem). Enzimi se u reakcijskom sustavu mogu izdvojiti u posebna područja gdje zadržavaju svoju katalitičku aktivnost (uklapanje u čvrsti matriks u gel ili polimer, ili u odjeljke membrane: šupljikava vlakna ili membranske reaktore) pri čemu imobilizacijom enzima homogeni katalitički sustavi prelaze u heterogene katalitičke sustave. Ovisno o imobilizacijskoj tehnici dolazi do značajnih promjena svojstava enzima kao što su stabilnost, selektivnos, pH, temperatura pri čemu te promjene mogu biti pozitivne ili negativne i teško predvidive (Nigam i sur., 2014.; Tan i sur., 2010.; Blažević, 2013.; Brena i sur., 2006.; Hanefeld i sur., 2008.).

Imobilizacija enzima pričvršćivanje na krutu podlogu

Pričvršćivanje enzima na krutu podlogu može biti *adsorpcijom* i *kovaletnim vezanjem*. Kako bi imobilizacija enzima bila uspješna potrebno je odabrati nosače odgovarajućih svojstava koja mogu biti kemijska (hidrofilost/hidrofobnost ovisno o vrsti enzima, bubrenje te kemijske i mikrobiološka stabilnost), morfološka (promjer i raspodjela veličine čestica, oblik čestica, veličina pora i specifična površina), mehanička svojstva (otpornost na hidrodinamički stres, elastičnost) kao i niska cijena koštanja te netoksičnost (Blažević, 2013; Iso i sur., 2001; Jesionowski i sur., 2014.).

Adsorpcija enzima na makroskopske nosače najstarija je i najjednostavnija metoda imobilizacije. Interakcije koje sudjeluju u adsorpciji su Van der Waalove sile, ionske i vodikove veze. Prednosti imobilizacije enzima adsorpcijom su: niska cijena i jednostavnost postupka imobilizacije i brzina, proces se provodi u blagim reakcijskim uvjetima, veze su ireverzibilne te omogućuju regeneraciju nosača sa svježim enzimom te očuvanje enzimске aktivnosti. Nedostatci se očituju u otežanoj standardizaciji postupka, desorpcije enzima s nosača što uzrokuje kontaminacije produkta enzimom (Nigam i sur., 2014; Henefeld i sur., 2008; Brena i sur., 2006; Blažević, 2013.). Većina enzima se adsorbira na materijale s polarnom površinom dok se lipaze zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava bolje adsorbiraju na liofilne nosače. Ionski izmjenjivači se također koriste pri pričvršćivanju enzima na krutu podlogu adsorpcijom.

Kovaletnim vezanjem na makroskopski nosač stvara se stabilan oblik koji potpuno sprječava gubitak enzima. Prednosti ovakvog načina imobilizacije je postignuta stabilnost enzima, nema ispiranja enzima i s obzirom na mjesto vezanja enzima na nosač stvaraju se povoljniji uvjeti za prijenos tvari. Glavni nedostatak ovakvog tipa imobilizacije je što vezani enzim može izgubiti čak i do 20% svoje aktivnosti u odnosu na slobodnu formu. Imobilizacija enzima kovaletnim vezanjem na nosač dovodi do mijenjanja njegovih fizikalnih i kemijskih svojstava zbog stvaranja kovaletnih veza između enzima i nosača, što dovodi do stvaranja kemijskih veza na nepoželjnim mjestima kod enzima i može dovesti do inaktivacije enzima (Nigam i sur., 2014; Brena i sur., 2006; Henefeld i sur., 2008; Blažević, 2013.).

Imobilizacija enzima unakrsnim povezivanjem

Imobilizacija enzima međusobnim povezivanjem može se ostvariti na dva načina: međusobno povezivanje samo molekula enzima i međusobno povezivanje molekula enzima preko inaktivnih *filler* proteina (npr. albumin).

Imobilizacija enzima unakrsnim povezivanjem ili umrežavanjem je imobiliziranje enzima bez nosača, što uključuje udruživanje stanica mikroorganizama ili enzima blizu jedane drugoj kako bi se formirala trodimenzionalna struktura. To se postiže kemijskim ili fizikalnim metodama. U kemijske metode spada stvaranje kovaletne veze između stanica pomoću biofunktionalnih skupina ili multifunkcionalnih reagensa. U otopinu se često dodaje želatina ili albumin kako bi se osigurala dovoljna blizina dvaju molekula (prikriivanja aktivnog mjesta na molekulama enzima što dovodi do smanjene aktivnosti) i pospješilo povezivanje. U fizikalne metode spada flokulacija, a u flokulante se ubrajaju poliamini, polistiren sulfonati i dr. Metoda imobilizacije umrežavanja rijetko se koristi zbog loših mehaničkih svojstava imobiliziranog enzima te se češće koristi u kombinaciji s drugim metodama imobilizacije. Nastala želatinozna masa se ne može koristiti u reaktorima s nasutim slojem (Nigam i sur., 2014; Brena i sur., 2006; Hanefeld i sur., 2008; Blažević, 2013.).

Imobilizacija enzima uklapanjem unutar gela

Kod imobilizacije enzima uklopljenog u gel ne dolazi do kemijskih niti fizikalnih veza između enzima i nosača, već se enzim uklapa u strukturu gela. Enzim nije čvrsto vezan za nosač te ne dolazi do promjene konformacije. Pore gela omogućuju kretanje i služe kao svojevrsna matrica. Poroznost gela se kontrolira kako bi spriječilo tzv. curenje enzima iz gela, a istovremeno pore omogućavaju kretanje supstrata i produkta kroz strukturu gela. Stvaranje gela inicira se promjenom temperature ili ionskog okruženja u sustavu (npr. agar gel, koji se koristi kao biološki matriks, nastaje hlađenjem zagrijane vodene otopine).

Prednosti imobilizacije uklapanja enzima u gel su jednostavnost izvedbe, cijena i brzina, a nedostatci otpor prijenosa tvari tijekom difuzije (problem difuzije supstrata do enzima) i enzimi nisu vezani pa mogu curiti iz gela (Nigam i sur., 2014; Brena i sur., 2006; Hanefeld., 2008; Blažević, 2013.). Pore gela su relativno velikih dimenzija u odnosu na neke enzime pa se

metoda imobilizacije više koristi za imobilizaciju cijelih stanica (Nigam i sur., 2014; Brena i sur., 2006; Hanefeld i sur., 2008; Blažević, 2013.).

Imobilizacija enzima uklapanjem unutar membranskih odjeljaka

Imobilizacija enzima uklapanjem unutar membranskih odjeljaka je proces u kojem se enzim stavlja unutar sferične polupropusne kapsule ili polupropusne membrane. Slično je metodi imobilizacije uklapanjem u gel, zbog toga što su enzimi slobodni ali ipak ograničeni kretanjem u prostoru. Kapsula sadrži tekuću jezgru unutar koje plivaju enzimi ili cijele stanice. Struktura membrane spriječava izlaz enzima iz kapsule ali omogućava ulaz i izlaz supstrata i produkta (Hanefeld i sur., 2008; Blažević, 2013.).

Prednost metode se očituje kroz pripremu enzima za provedbu više enzimskih reakcija pri čemu nema kemijskih modifikacija kao i mogućnost kontinuiranog vođenja procesa na temelju nesmetane difuzije supstrata i produkata kroz membranu (Hanefeld i sur., 2008; Blažević, 2013.).

Izbor metoda imobilizacije, kao i materijala koji će se koristiti kao nosač, ovisi o karakteristikama koje su važne i željene u industrijskom postupku u kojem će se imobilizirani enzim koristiti kao katalizator.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Cilj rada

Zadatak je bio provesti imobilizaciju lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* na nosaču Eupergit CM, i sintezu biodizela pomoću imobilizirane lipaze u kotlastom reaktoru iz jestivog svježeg i otpadnog ulja.

3.2. Materijali

Tijekom rada korišteni su sljedeći materijali:

- suncokretovo ulje (Uljara, Čepin, Hrvatska)
- suncokretovo jestivo otpadno ulje (restoran Osijek)
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- enzim lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* (tzv. polazna otopina lipaze) (Sigma Aldrich, SAD)
- Eupergit CM (Sigma Aldrich, SAD)
- 0.2 M 2-merkaptetanol (Sigma Aldrich, SAD)
- Whatman filter papir, GF 6, veličina pora 1-3 μm , promjera 70 mm (Sigma Aldrich, SAD)
- fosfatni pufer (PBS, 0,01 M i 0,1 M, pH 7,4, Sigma Aldrich, SAD)
- Büchnerov lijevak
- Bradford reagens (BioRad, Njemačka)
- BSA standardni protein 1 mg/mL (Sigma Aldrich, SAD)
-

3.2.1. Priprema otopine

Priprema otopine fosfatnog pufera (PBS) 0,1 i 0,01 M

Gotovi pufer je kvantitativno prenešen u odmjernu tikvicu od 1 L i 100 mL, otopljen u destiliranoj vodi i nedopunjen do oznake čime je pripremljen pufer 0,01 M i 0,1 M pH 7,4.

Priprava otopine 0,2 M 2-merkaptetanola

Priprava 2-merkaptetanola rađena je u digestoru. U odmjerenu tikvicu od 100 mL je odpipetirano 1,4 mL otopine 2-merkaptetanola i nadopunjeno sa puferom (0,01 M i 0,1M PBS) do oznake.

3.2.2. Aparatura

Za određivanje sadržaja metil estera viših masnih kiselina korišten je plinski kromatograf (GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japan) prikazan na slici 3.



Slika 3. Plinski kromatograf

Za određivanje koncentracije proteina u polaznoj otopini enzima i filtratima nakon imobilizacije enzima korišten je spektrofotometar (Spectronic Unicam, Helios γ, Njemačka) prikazan na slici 4.



Slika 4. Spektrofotometar

Za inkubaciju tijekom imobilizacije lipaze na nosač Eupergit CM korištena je orbitalna zračna tresilica (Enviromental Shaker – Incubator, ES-20, Biosan).



Slika 5. Orbitalna zračna tresilica

3.3. Metode

3.3.1. Metoda imobilizacije lipaze iz *Thermomyces lanuginosus*

U četiri čaše od 25 mL je odvagano 500 mg Eupergita CM na koji je dodano 2,5 mL otopine prethodno pripremljene lipaze. Otopina lipaze za imobilizaciju pripremljena je od 1 mL polazne otopine lipaze i 2 mL pufera. Korišteni su puferi fosfatni puferi pH 7,4 molarnosti 0,01 i 0,1. Čaše su zatim prekrivene parafilmom i stavljene u orbitalnu zračnu tresilicu na inkubaciju na + 25 °C. Inkubacija je trajala 24, 48, 72 i 96 h. Nakon inkubacije sadržaj čaša je profiltriran vakuum filtracijom preko Whatman filter papira na Büchnerovom lijevku. Nosač sa enzimom koji je zaostao na filter papiru je ispran 2 puta sa po 5 mL odgovarajućeg pufera (0,01 M i/ili 0,1 M). Filtratima nakon filtracije je izmjeren volumen te je spektroskopskom metodom određana koncentracija proteina u njima. Eupergit CM sa filter papira na kojem je imobilizirana lipaza prebačen je u odgovarajuće čaše, dodano je 10 mL 0,2 M otopine 2-merkaptetanola u odgovarajućem puferu (0,01 M i/ili 0,1 M) nakon čega su čaše zatvorene s parafilmom i stavljene na inkubaciju 4 h na + 4 °C. Nakon što je prošlo 4 sata sadržaj čaša je profiltriran na vakuum filtraciji preko Whatman filter papira na Büchnerovom lijevku i ispran sa 10 – 20 mL odgovarajućeg pufera. Imobilizirani enzim nakon filtracije prebačen je u epruvete, koje su potom prekrivene parafilmom i čuvane u odgovarajućem puferu u hladnjaku do daljnje uporabe.

3.3.2. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina (lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*) u polaznoj otopini enzima i u filtratu nakon imobilizacije određena je standardnom Bradfordičinom metodom (Sigma Aldrich, Catalog Number B6916.).

Baždarni dijagram određen je pripremom različitih masenih koncentracija goveđeg serumskog albumina kao standarda.

Određivanje koncentracije početne otopine lipaze u 0,01 M i 0,1 M PBS-u:

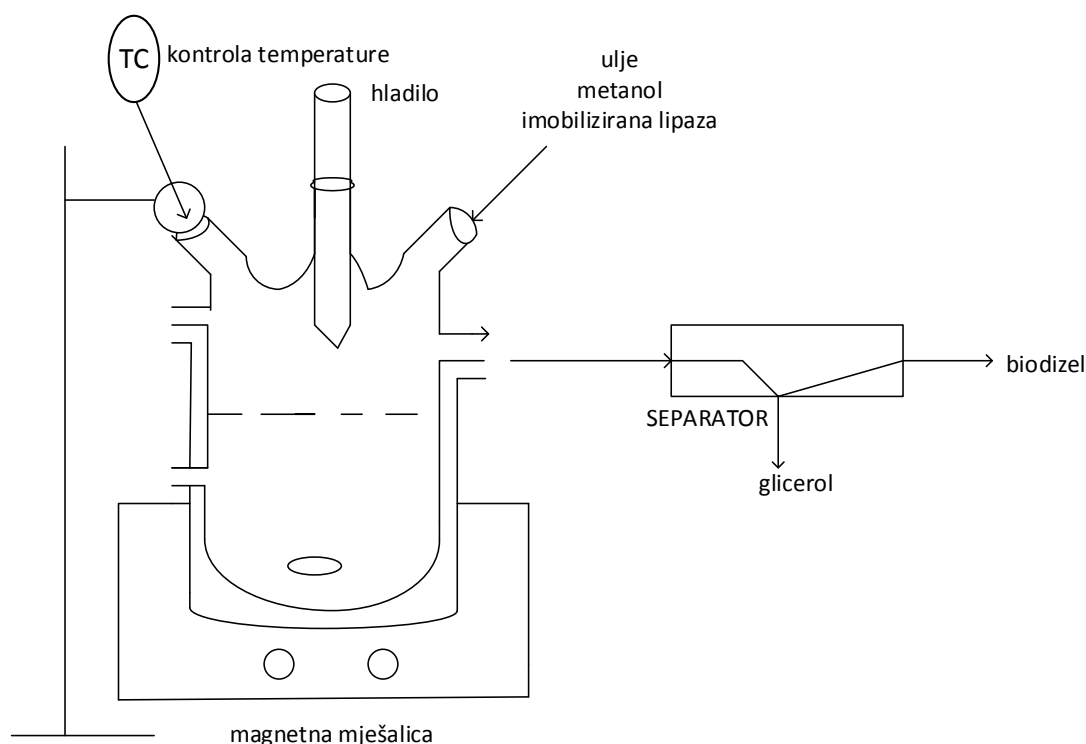
Kako bi se odredila koncentracija početne otopine lipaze Bradfordičinom metodom bilo je potrebo napraviti razrijeđenje polazne lipaze. Nakon odgovarajućeg razrijeđenja (faktor razrijeđenja 64) u kivetu je dodano 2 mL Bradfordičinog reagensa i nakon 5 min je izmjerena apsorbancija. Postupak mjerenja napravljen je u tri ponavljanja za svaki pufer (0,1 M i 0,01 M).

Određivanje koncentracije lipaze u filtratima nakon imobilizacije enzima:

Postupak je isti kao i kod određivanja koncentracija polazne otopine lipaze. Nakon odgovarajućeg razrijeđenja (faktor razrijeđenja 4) u kivetu je dodano 2 mL Bradfordičinog reagensa i nakon 5 min je izmjerena apsorbancija. Postupak mjerenja napravljen je za svaki pufer (0,1 M i 0,01 M) u tri ponavljanja.

3.4. Sinteza biodizela pomoću imobilizirane lipaze iz *Thermomyces lanuginosus*

Sinteza biodizela transesterifikacijom iz svježeg i otpadnog jestivog ulja s metanolom provedena je u kotlastom reaktoru (prikaz aparature na slici 6) uz imobiliziranu lipazu iz *Thermomyces lanuginosus* kao biokatalizator. Provedena su dva pokusa: transesterifikacija jestivog svježeg ulja i transesterifikacija otpadnog jestivog ulja.



Slika 6. Shematski prikaz aparature za provedene enzimске sinteze biodizela

Sinteza biodizela iz jestivog svježeg i otpadnog ulja

Reakcija sinteze biodizela iz jestivog svježeg ulja provedena je s nosačem na kojem se zadržala najveća količina lipaze tijekom postupka imobilizacije (72 h). Imobilizirana lipaza dodana je u reakcijsku smjesu koja se sastojala od prethodno homogenizirane suspenzije ulja i metanola (ulje : metanol = 1 : 3,4). Metanol se u dnosu na ulje u reakcijskoj smjesi nalazi u suvišku. Reakcijska smjesa se sastojala od 100 g svježeg jestivog ulja, 12,34 g metanola i 735 mg Eupergita CM s imobiliziranom lipazom. Provedena su dva pokusa pri istim

temperaturturnim uvjetima ($T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$). Sinteza je provedena na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ u trajanju od 96 h uz konstatno miješanje ($n = 600\text{ o/min}$) pri čemu su uzorci uzimani svakih 12 h. Uzorci su filtrirani na filteru za špricu promjera pora $0,45\text{ }\mu\text{m}$ i čuvani do daljnjih analiza na temperaturi od $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon završetka pokusa, glicerol je odvojen od smjese nastalih metil estera masnih kiselina (biodizela) na lijevku za odijeljivanje.

Sinteza biodizela iz otpadnog jestivog ulja provedena je na isti način kao i s svježim jestivim uljem.

Određivanje sadržaja estera

Sadržaj estera analiziran je na plinskom kromatografu Shimadzu GC-2014 (Kyoto, Japan) opremljenim s plameno ionizacijskim detektorom (FID) i autosampler-om. Korišten je helij kao plin nositelj, te Zebron ZB-wax ($30\text{ m} \times 0,53\text{ mm} \times 1,00\text{ }\mu\text{m}$) kolona. Kao inertni standard korišten je metil heptadekanot, C17:0 (Sigma Aldrich, SAD).

Metoda se sastojala od održavanja temperature na $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ jednu minutu zatim zagrijavanja na $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ brzinom od $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Ukupno vrijeme trajanja analize je 20 min. Identifikacija pikova napravljena je pomoću standarda F.A.M.E mix GLC – 10.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Rezultati određivanja koncentracije proteina pomoću Bradfordiće metode

Određivanja koncentracije proteina pomoću Bradfordiće metode provedena je na dvoznačnom spektrofotometru Helios γ u pri 595 nm.

U radu je korišten BSA (standardni protein) koncentracije 1 mg/mL, fosfatni pufer različite molarnosti (0,1 i 0,01 M) jednake pH vrijednosti od 7,4 i 2 mL Bradfordičinog reagensa. Rezultati određivanja koncentracije polazne otopine lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* i koncentracije proteina u filtratima nakon imobilizacije na nosaču Eupergit CM su prikazani u tablicama (Tablica 1. i 2.).

Tablica 1. Koncentracija proteina u polaznoj otopini lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* s obzirom na korišteni fosfatni pufer

Fosfatni pufer (PBS)	γ , (mg/mL)
0,01M	19,847
0,1 M	19,907

Vrijednosti koncentracije proteina u prolaznoj otopini lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* su jednake bez obzira na molarnost pufera koji je korišten tijekom određivanja.

Tablica 2. Koncentracija proteina u filtratima nakon imobilizacije lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* na Eupergit CM

	PBS (0,01 M)	PBS (0,1 M)
vrijeme imobilizacije (h)	koncentracija proteina (mg/mL)	koncentracija proteina (mg/mL)
24	0,7149	0,536
48	0,9704	0,8035
72	0,6853	0,4198

96	0,3273	0,2794
----	--------	--------

Vrijednost koncentracije proteina u filtratima nakon imobilizacije lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* na Eupergit CM (tablica 2) s obzirom na molarnost pufera koji je korišten tijekom imobilizacije, provedena s 0,1 M puferom je niža u odnosu na koncentraciju proteina u filtratima nakon imobilizacije gdje je imobilizacije provedena s 0,01 M puferom. Dobivene vrijednosti korištene su u izračunu mase lipaze koja se vezala za nosač tijekom imobilizacije.

4.2. Rezultati određivanja mase imobilizirane lipaze na Eupergitu CM

Rezultati mase lipaze zaostale u filtratima nakon imobilizacije na Eupergitu CM prikazani su tablicama (Tablica 3 i 4.). Masa imobilizirane lipaze na nosaču Eupergita CM izračunata je kao razlika mase lipaze dodane na početku imobilizacije u 2,5 mL otopine lipaze na 500 mg Eupergita Cm (d.b.) i mase lipaze u filtratima nakon imobilizacije.

Pomoću koncentracije proteina u polaznoj otopini lipaze izračunata je masa zaostalog enzima na Eupergitu CM nakon imobilizacije pomoću jednažbe (1.).

$$m_f = \gamma \cdot V_f \quad (1)$$

Tablica 3. Masa lipaze u filtratima nakon imobilizacije u 0,01 M PBS-u

Vrijeme imobilizacije (h)	Masa zaostalog enzima na Eupergitu CM (mg)
24	13,513
48	7,9027
72	10,1807
96	13,9206

Tablica 4. Masa lipaze u filtratima nakon imobilizacije u 0,1 M PBS-u

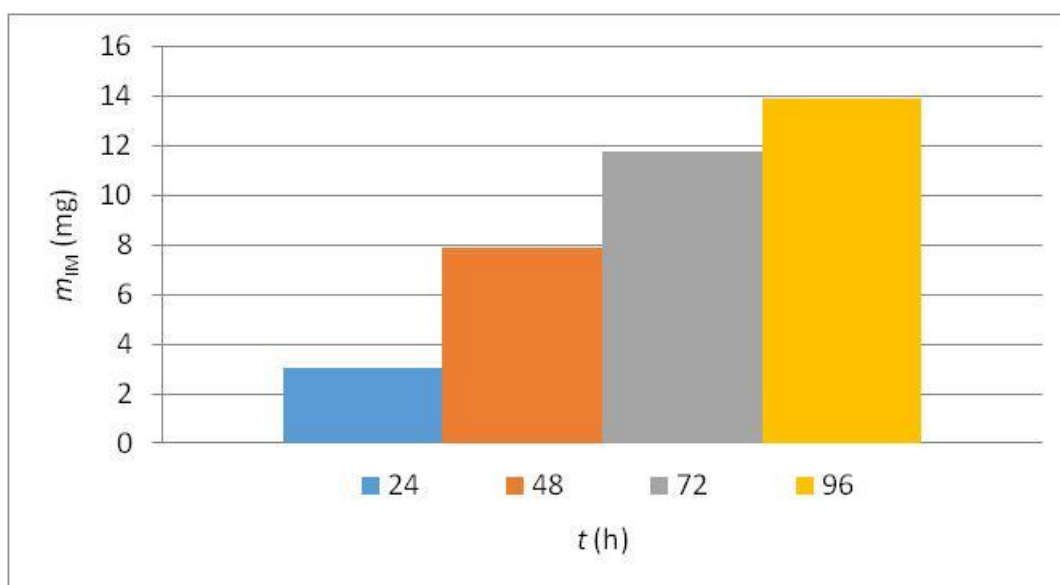
Vrijeme imobilizacije (h)	Masa zaostalog enzima na Eupergitu CM (mg)
---------------------------	--

24	10,3993
48	7,5528
72	3,4425
96	2,6548

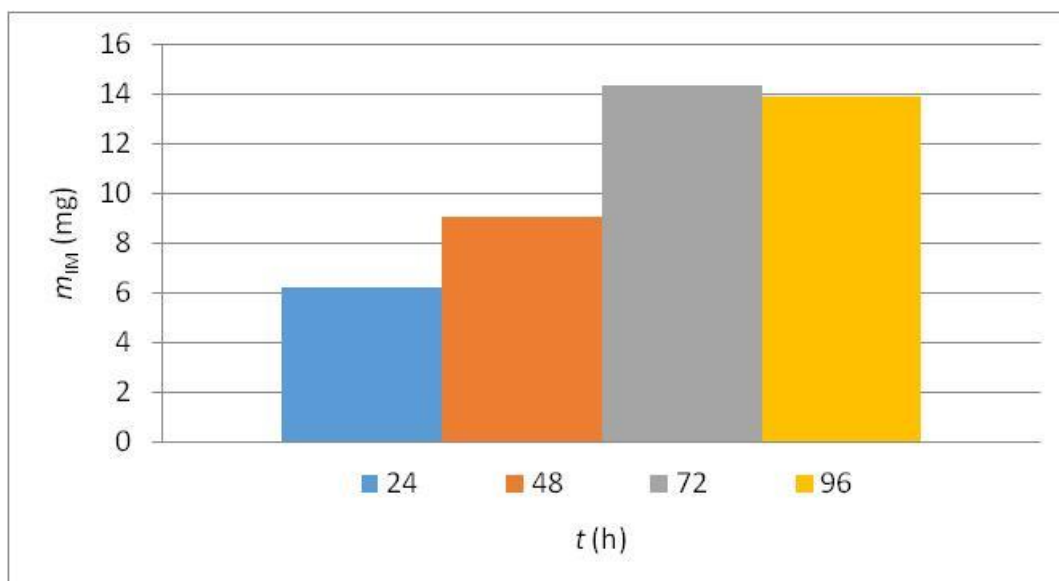
Početna masa enzima (masa enzima u 2,5 mL otopine korištene za imobilizaciju) iznosila je 16,56 mg s obzirom na koncentraciju polazne otopine lipaze čija je vrijednost bila 19,88 mg/mL (Tablica 1.).

Na temelju vrijednosti mase enzima u filtratima preko jednažbe (2) određena je masa zaostalog enzima na nosaču nakon imobilizacije:

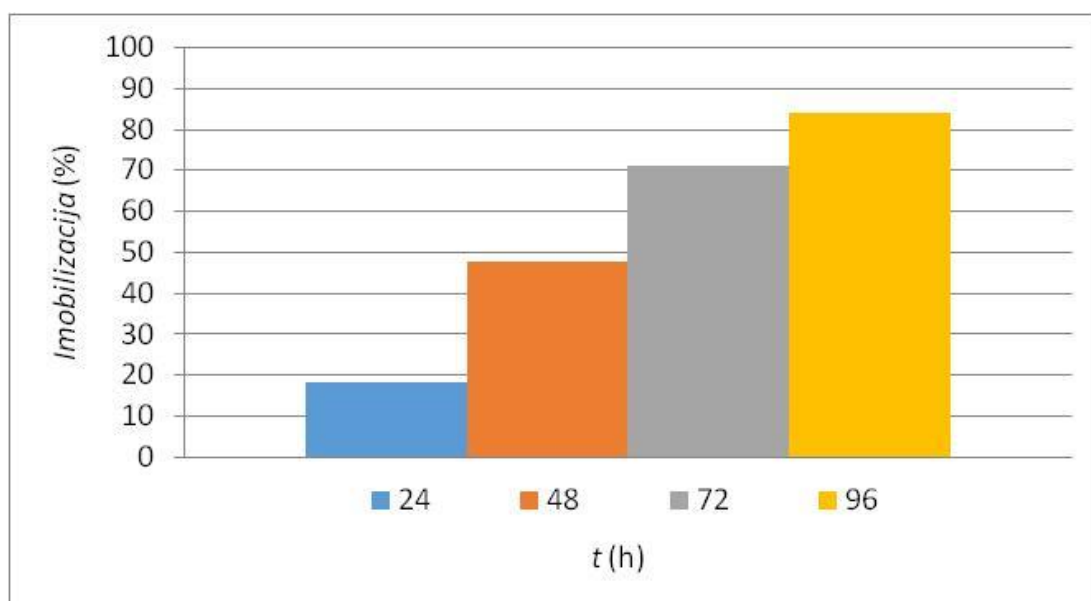
$$m_{IM} = m_i - m_f \quad (2)$$



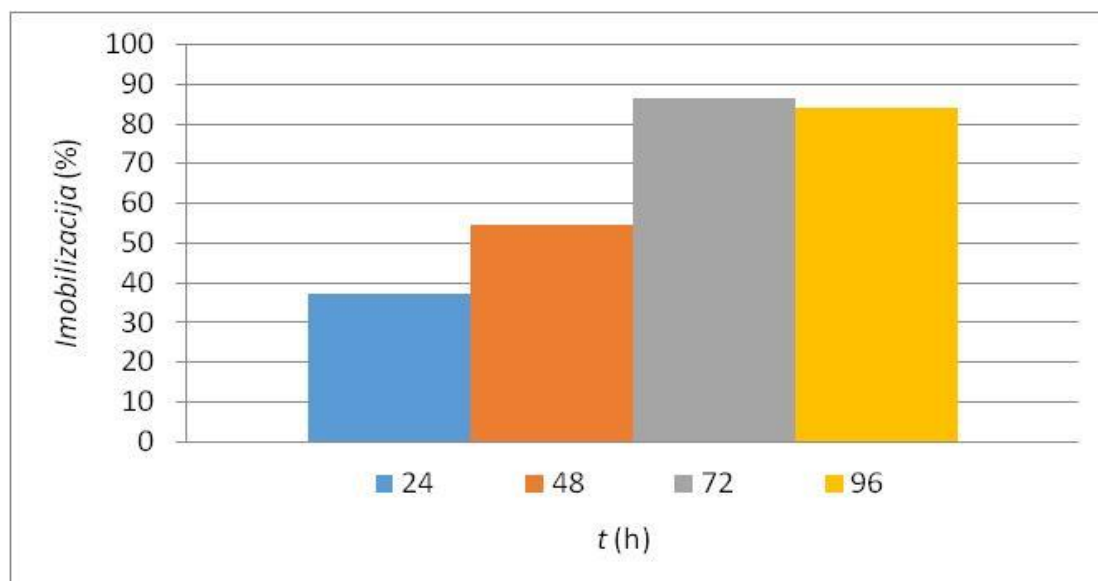
Slika 7. Ovisnost mase lipaze vezane za Eupergit CM o vremenu u 0,01 M fosfatnom puferu.



Slika 8. Ovisnost mase lipaze vezane za Eupergit CM o vremenu u 0,1 M fosfatnom puferu



Slika 9. Uspješnosti imobilizacije u ovisnosti o vremenu unutar 96 h u 0,1 M fosfatnom puferu



Slika 10. Uspješnosti imobilizacije u ovisnosti vremena unutar 96 h u 0,01 M fosfatnom puferu

Iz rezultata (Slike 7., 8., 9. i 10.) vidljivo je kako je imobilizacija provedena s 0,1 M puferom uspješnija od imobilizacije provedene s 0,01 M fosfatnim puferom. Maksimalno vezanje lipaze iz *T. lanuginosus* je postignuto imobilizacijom u 0,1 M puferu. Nakon imobilizacije od 72 h na nosaču je zaostalo 14,33 mg (Slika 8.) ili 86,39 % (Slika 10.). U odnosu na vrijednosti prezentirane u radu Jagodish i sur., 2013. godine postignuta imobilizacija je niža. S obzirom da je u radu imobilizacija rađena u jačem puferu (1M), a iz dobivenih rezultata u ovom radu je vidljiv porast uspješnosti imobilizacije u ovisnosti o jakosti pufera, može se pretpostaviti da bi se porastom jakosti pufera s 0,1 M na 1 M povećala i uspješnost imobilizacije lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* na Eupergitu CM. Ovu pretpostavku potrebno je dodatno istražiti.

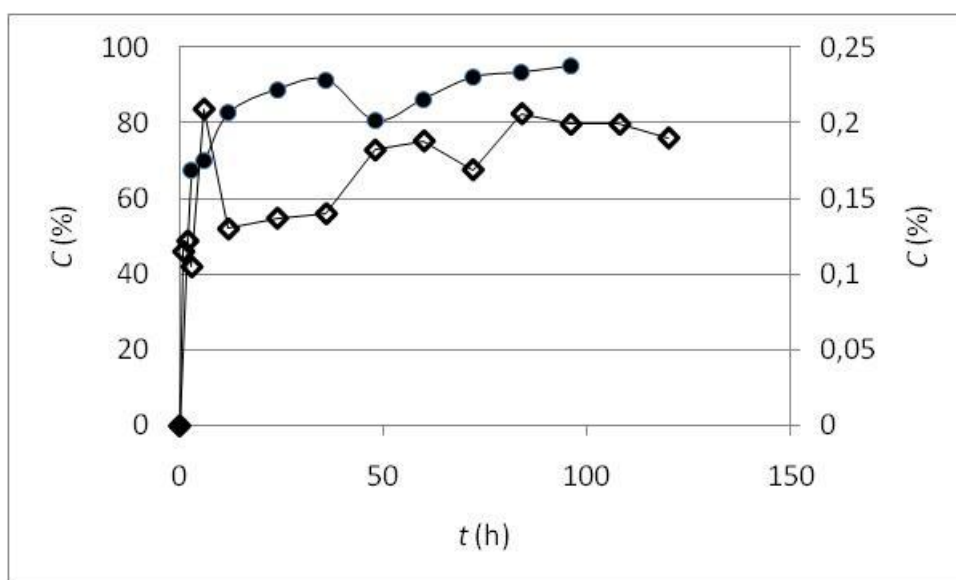
Autori u spomenutom radu upućuju i na skraćenje vremena imobilizacije na 24 h što u konkretnom slučaju znači da bi se porastom jačine pufera na 1M moglo postići kraće vrijeme imobilizacije za postizanje maksimalnog vezanja enzima na nosač s obzirom na rezultate prezentirane na slikama (Slika 7., 8., 9. i 10.) gdje se vidi da je korištenjem 0,1 M pufera u odnosu na 0,01 M pufer došlo do većeg vezanja za 72 h, nego za 96 h.

Masa vezane lipaze nakon imobilizacije u 0,1 M puferu kao i uspješnost imobilizacije lipaze u 0,1 M puferu vrlo malo se razlikuju nakon 72 i 96 h što se može protumačiti kao greška

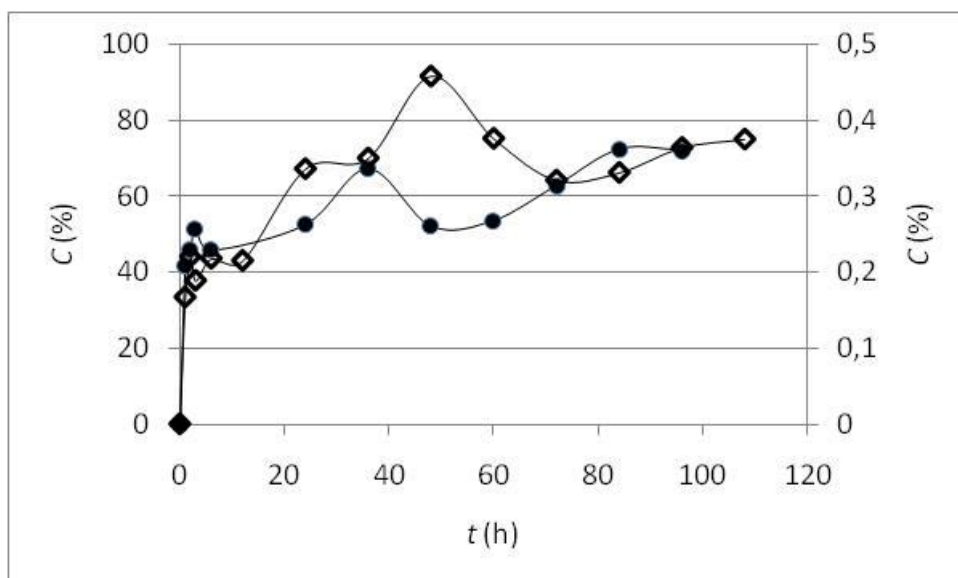
analitičara. Nastavak istraživanja u smjeru povećanja jakosti pufera trebao bi pokazati je li navedena razlika u masi enzima koja se vezala za nosač greška analitičara ili je već na 72 h u puferu 0,1 M postignuta maksimalna količina enzima koja se veže na nosač u danim uvjetima provođenja eksperimenta.

4.3. Rezultati nastalih metil estera masnih kiselina

Količina nastalih metil estera masnih kiselina (C, %) nakon sinteze biodizela transesterifikacijom s imobiliziranom lipazom iz jestivog svježeg i otpadnog ulja prikazani su na slikama 11. i 12. te su uspoređeni s vrijednostima dobivenim nakon sinteze biodizela sa slobodnom lipazom prezentiranih u radu Budžaki i sur., 2015.



Slika 11. Sadržaj metilnih estera masnih kiselina (FAME) nastalih u sintezi sa slobodnim enzimom (●) iz rada Budžaki i sur., 2015. i imobiliziranim enzimom (◊) u ovisnosti o vremenu iz jestivog svježeg ulja



Slika 12. Sadržaj metilnih estera masnih kiselina (FAME) nastalih u sintezi sa slobodnim enzimom (●) iz rada Budžaki i sur., 2015. i imobiliziranim enzimom (◇) u ovisnosti o vremenu iz jestivog otpanog ulja

Sadržaj metil estera masnih kiselina koji je dobiven sa imobiliziranim enzimom kao katalizatorima transesterifikacije je značajno niži tj. zanemariv u odnosu na sadržaj dobiven sa slobodnim enzimom prezentiran u radu Budžaki i sur., 2015.. Razlog je značajno niža koncentracija imobiliziranog enzima u reakcijskoj smjesi u odnosu na koncentraciju slobodnog enzima. S obzirom na to se može pretpostaviti da bi sadržaj FAME bio daleko veći i u skladu s Pravilnikom hrvatskih normi HRN EN 142014:2012 koji su bazirani na Europskim normama EN 142014, ukoliko se doda veća količina imobiliziranog enzima, tj. koncentracija enzima koja je proporcionalna koncentraciji enzima koja je bila dodana u reakcijsku smjesu prilikom sinteze biodizela sa slobodnim enzimom (Prilog 1. i 2.)

Mnogi autori (Mittelbach M, 1990; Wu i sur., 2003; Abigor i sur., 2000; Samukawa i sur., 2000; Antolin i sur., 2002.) su u svojim znanstvenim radovima, kao uspješnost sinteze biodizela objavili rezultate sadržaja FAME ili koverzije više ukoliko je sinteza provedena sa imobiliziranim enzimom u odnosu na sinteze gdje su korišteni slobodni enzimi. Buduća istraživanja treba usmjerit ka sintezi biodizela s većom količinom imobiliziranog enzima dodanog u reakcijsku smjesu.

5. Zaključak

Na osnovu prezentiranih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

Proces imobilizacije proveden je na 24, 48, 72 i 96 h u dva pufera različite molarnosti (0,1M i 0,01 M) kao bi se ispitao utjecaj vremena i koncentracije pufera na proces imobilizacije. Najviše enzima zaostalo je nakon imobilizacije na 72 h u 0,1 M fosfatnom puferu.

Masu imobiliziranog enzima (735 mg) koja je dodana u reakcijsku smjesu da bi dala željene rezultate (sadržaj metil estera masnih kiselina > 96 %) potrebno je povećati na 1327,29 mg.

6. Literatura

1. Abigor RP, Vadia P, Foglia T, Hass M, Jones K, Okefa E, Obibuzor J, Bator M: Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. *Biochem Soc Trans*, 28: 979-981, 2000.
2. Antolin G, Tinaut FV, Briceno Y, Castano V, Perez C & Ramirez AI: Optimisation of biodiesel production by sunflower oil tranesterification. *Bioresour Technol* 83: 111-114, 2002.
3. Aslan Y, Handayani N, Stavila E, Loos K: Covalent Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase onto Eupergit CM. *International of Current Research*, 02: 5225-5228, 2014.
4. Bradarić D, Kralik D, Zlatar V, Kukić S, Uranjek N, Jovičić D, Mihić Đ: Otpadna jestiva ulja iz ugostiteljskih objekata skupine restorana. *Agronomski glasnik* 6/2011
5. Brena BM, Batista-Viera F: Immobilization of Enzymes. *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzyme and cells*, 22: 15-30, 2006.
6. Budžaki S, Šalić A, Zelić B, Tišma M: Enzyme – catalysed Biodiesel Production from Edible and Waste Cooking Oils. *Chem. Biochem. Eng Q*, 29(3): 329-333, 2015.
7. Committee for Standardization Automotive fuels – fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines – requirements and test methods. European Committee for Standardization, Brussels; Standard EN 14214, 2013.
8. Christopher IP, Kumar H, Zambare VP: Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, 119: 497-520, 2014.
9. Denčić I, de Vaan S, Noël T, Meuldijk J, de Croon M, Hessel V: Lipase-Based Biocatalytic Flow Process in a Packed-Bed Microreactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 52: 10951-10960, 2013.
10. Dossat V, Combes D, Marty A: Continuous enzymatic transesterification of high oleic sunflower oil in a packed bed reactor: influence of the glycerol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 25: 194-200, 1999.
11. Findrik Blažević Z: Bioreakcijska tehnika 1. *Interna skripta*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2012.
12. Glišić SB: Katalizovana i nekatalizovana metanoliza trigliceridima: kinetika reakcije i simulacije procesa. *Doktorska disertacija*, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2009.

13. Hanefeld U, Gardossi I, Magner E: Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society Reviews*, 38: 453-468/453, 2009.
14. Iso M, Chen B, Eguchi M, Kudo T, Shrestha S: Production of biodiesel fuel from tryglycerides and alcohol using immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic*, 16: 53-58, 2001.
15. Jesionowski T, Zdarta J, Krojewska B: Enzyme immobilization by adsorption: a review. *Adsorption*, 20: 801-821, 2014.
16. Katchalski – Katzir E, Kraemer DM: Eupergit, a carrier for immobilization of enzymes of inudustrial potential. *Journal od Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10: 157-176, 2000.
17. Ljupković RB: Sinteza biodizela na aktiviranom katalizatoru na bazi CaO: Optimizacija procesnih parametara i efekti korišćenja biodizela. *Doktorska disertacija*, Prirodno matematički fakultet, Odjel za kemiju, Niš, 2014.
18. Matte CR, Bussamar R, Dupont J, Rodrigues RC; Hertz FP, Ayub AZ: Immobilization of Thermomyces lanuginosus Lipase by Differnt Techniques on Immobcad 150 Support: Characterization and Applications. *Springer Science-Business Media New York* 2014.
19. Miladinović MR, Lukić IZ, Stamenković OS, Veljković VB, Skala DU: Heterogena bazno katalizovana metanoliza biljnih ulja: Presek Stanja. *Hem.Industrija*, 64(2): 63-80, 2010.
20. Mittelbach M: Lipase catalyzed alcholysis of sunflower oil. *JAOCs* 67. 168, 1990.
21. Narwal SK, Gupta R: Biodiesel production by tranesterification using immobilized lipase. *Biotechnol Lett*, 35: 479-490, 2013.
22. Ognjanović ND, Petrović SD; Bezbradica DI, Knežević-Jugović ZD: Lipaze kao biokataliaztori u sintezi biodizela. *Hemijska industrija*, 64: 1-8, 2010.
23. Pandey A, Larrache CH, Ricke SC; Dussap CG, Gnansounou E: Alternative feedstocks and conversion processes. *Academic Press*, 2011.
24. Samukawa T, Kaieda M, Matsumoto T, Ban K, Kondo A, Shimada Y, Noda H & Fukuda F: Petreatment of immobilized *Candida Antartica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *J Biosci Bioeng* 90: 180-183, 2000.
25. Sinčić D: Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela. I.Biogoriva, svojstva i osnovne proizvodne tehnologije. *Kemijska industrija*, 63: 19-31, 2014.
26. Stamenković OS, Lazić ML, Veljković VB; Skala DU: Dobivanje biodizela tranesterifikacijom katalizovanom enzimom. *Hemijska industrija*, 59: 49-59, 2005.

27. Sheldon RA, van Peet S: Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chemical Society Reviews*, 42: 6223, 2013.
28. Stojanović M: Upotreba biodizela kao pogonskog goriva u cestovnom prometu. *Pomorski zbornik*, 47-48: 133-149, 2013.
29. Tan T, Lu J, Nie K, Deng L, Wang F: Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, 28: 628-634, 2010.
30. Tibhe JD, Fu H, Noël T, Wang Q, Meuldijk J, Hessel V: Flow synthesis of phenylserine using threonine aldolase immobilized on Eupergit support. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 9: 2168-2179, 2013.
31. Veljković VB: Tehnologija sinteze biodizela: stanje i perspektiva. *Glasnik hemičara, tehnologa i ekologa Republike Srpske*, 48: 15-28, 2008.
32. Wu H, Zong M, Luo Q: Enzymatic conversion of waste oil to biodiesel in a solvent-free-system. *Prepr Pap – Am Chem Soc, Div Fuel Chem* 48(2): 533-534, 2003.

7. Prilozi

Prilog 1. Izračun mase enzima dodanog u reakcijsku smjesu

- a) Za sintezu sa slobodnim enzimom
- b) Za sintezu sa imobiliziranim enzimom

Eksperimentalno određena koncentracija enzima polazne otopine lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* iznosi 19,88 mg/mL

- a) Masa slobodnog enzima u reakcijskoj smjesi

Za sintezu biodizela iz jestivog ulja sa slobodnim enzimom korištena je otopina lipaze koja je pripremljena od 1 dijela polazne otopine enzima i 10 dijelova fosfatnog pufera 7,4. Od te otopine lipaze u reakcijsku smjesu (ulje : metanol = 1 : 3,4) je dodano 40 g ulja ccc 45 ml odnosno 81,315mg/ml

Masa enzima koji je potrebno dodati na 100 g ulja iznosi:

$$\begin{aligned}
 450 \text{ g} &\sim 81,315 \text{ mg lipaze} \\
 100 \text{ g} &\sim x \text{ mg enzima} \\
 x &= \frac{100 \cdot 81,315}{450} \\
 x &= 18,07 \text{ mg enzima}
 \end{aligned}$$

U reakcijsku smjesu za sinteze sa slobodnim enzimom dodano je 18,07 mg lipaze iz *Thermomyces lanuginosus*.

- b) Masa enzima koja je s nosačem unešena u reakcijsku smjesu

Reakcijska smjesa za sintezu biodizela od jestivog ulja sastojala se od ulja i metanola u omjeru (ulje:metanol = 1:3,4). Masa ulja je bila 100 g, masa metanola 12,34 g te je nakon homogenizacije dodano 735 mg Eupergita CM w.b. (izraženo na vlažnu bazu) na koji je imobilizirana lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*.

$$\begin{aligned}
 \frac{500 \text{ mg Eupergita CM (d.b.)}}{1060 \text{ mg Eupergita CM (w.b.)}} &= \frac{x \text{ mg Eupergita CM (d.b.)}}{735 \text{ mg Eupergita CM (w.b.)}} \\
 x \text{ mg Eupergita CM (d.b.)} &= \frac{500 \cdot 735}{1060}
 \end{aligned}$$

$$x \text{ mg Eupergita CM (d.b.)} = 346,69 \text{ mg}$$

S 735 mg Eupergita CM w.b. (izraženog na vlažnu bazu) u reakcijsku smjesu je unešeno 346,69 mg Eupergita CM d.d. (izraženo na suhu bazu) zajedno s 10,01 mg lipaze iz *Thermomyces lanuginosus*.

$$\frac{500 \text{ mg Eupergita CM (d.b.)}}{14,43 \text{ mg enzima}} = \frac{346,69 \text{ mg Eupergita CM (d.b.)}}{x \text{ mg enzima}}$$

$$x \text{ mg enzima} = \frac{346,69 \cdot 14,43}{500}$$

$$x \text{ mg enzima} = 10,01 \text{ mg}$$

Prilog 2. Izračun proporcionalne mase imobiliziranog enzima, koji je potreban dodati u reakcijsku smjesu, s masom slobodnog enzima koji je dodan u reakcijsku smjesu

U reakcijsku smjesu s nosačem (Eupergit CM) unešeno je 10,01 mg vezane lipaze kako bi se u reakcijsku smjesu unijela masa proporcionalne količine enzima kao i u reakcijsku smjesu sa slobodnim enzimom:

$$\frac{500mgEupergitaCMd.b.}{14,43mgenzima} = \frac{xmgEupergitad.b.}{18,07mgenzima}$$

$$xmgEupergitad.b. = \frac{500 \cdot 18,07}{14,43}$$

$$xmgEupergitad.b. = 626,13mg$$

Preračunato na masu Eupergita CM w.b. (izraženog na vlažnu bazu), iznosi:

$$\frac{500mgEupergitaCMd.b.}{1060mgEupergitaCMw.b.} = \frac{626,13mgEupergitad.b.}{xmgEupergitaCMw.b.}$$

$$xmgEupergitaw.b. = \frac{1060 \cdot 626,13}{500}$$

$$xmgEupergitaw.b. = 1327,39mg$$

Da bi se u reakcijsku smjesu imobiliziranim enzimom na nosaču unijela proporcionalna mada lipaze kao u reakcijskoj smjesi sa slobodnim enzimom potrebno je odvagati 1327,39 mg Eupergita CM na koji je imobilizirana lipaza.