

Imobilizacija enzima na mezoporozni SiO₂ pripremljen sol-gel postupkom

Giacobi, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:782449>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

ANTONIA GIACOBİ

Imobilizacija enzima na mezoporozni SiO_2 pripremljen sol-gel
postupkom

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Jelena Macan

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Jelena Macan

Prof. dr. sc. Aleksandra Sander

Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Zagreb, lipanj 2015.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Jeleni Macan, na savjetima i pomoći prilikom izrade ovoga rada.

Zahvaljujem se dipl. ing. Klaudiji Paljar koja mi je pomogla u eksperimentalnom dijelu izrade rada, a isto tako svojim savjetima, znanjem i nesebičnom zalaganju bila poticaj i podrška. Velika hvala i na omogućavanju novog pogleda na porastične uzorke sa skrivenim vrlo sitnim porama.

Zahvaljujem se dr. sc. Želimiru Jelčiću, djelatniku Plive na EDS analizama.

Na kraju se želim posebno zahvaliti Ozrenu Martinelliu koji je i u najtežim trenucima bio uz mene i uvijek mi bio velika podrška.

Isto tako zahvaljujem se svojim roditeljima i bratu na svemu sto su mi pružili .

Sažetak

Mezoporozni SiO_2 se zbog svoje velike površine koristi kao nosač za imobilizaciju katalizatora, preciznije enzima, lipaze i celulaze. Lipaza se koristi kao katalizator u procesu proizvodnje biodizela, dok se celulaza koristi kao katalizator u procesu proizvodnje bioetanola. Glavni problem kod korištenja enzima je njihova cijena, pa je imobilizacijom omogućeno njihovo ponovno korištenje i smanjenje cijene proizvodnje.

Za dobivanje mezoporoznog SiO_2 korišten je sol-gel postupak. Kao prekursor korišten je tetraetoksisilan, dok su kao predlošci za dobivanje porozne strukture korišteni želatina, surfaktant heksadeciltrimetilamonijev bromid i polimer poli(etilen-glikol)-*block*-poli(propilen-glikol)-*block*-poli(etilen-glikol).

Dobiveni uzorci ispitani su infracrvenom spektroskopskom analizom s Fourierovim transformacijama (FTIR), pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), energijski razlučujućom rendgenskom spektrometrijom (EDS) i termogravimetrijskom analizom (TGA).

Priprema uzoraka s manjom količinom otapala pokazala se uspješnijom ako se koristi surfaktantni predložak, dok želatini i Pluronicu P123 više odgovara veća količina otapala i kiseliji uvjeti.

Prema intenzitetu vrpce na FTIR spektru, lipaza se uspješnije imobilizira od celulaze što potvrđuje i TGA analiza s masenim udjelom imobilizirane lipaze (34 %) i celulaze (30 %). Slične vrijednosti dobivaju se i EDS analizom.

Ključne riječi: celulaza, lipaza, mezoporozni SiO_2 , sol-gel postupak

Summary

Enzyme immobilization on mesoporous silica synthesized by sol-gel method

Mesoporous silica with high surface area is used as a support for catalyst, or more precisely enzyme immobilization. In this work enzymes used were lipase and cellulase. Lipase is used for biodiesel production and cellulase is used for bioethanol production. The main problem for the production is high enzyme cost. This is solved by immobilization which allows enzyme re-use and decreases the cost of biodiesel and bioethanol production.

Sol-gel method was used to prepare the mesoporous silica. Tetraethoxysilane was used as a precursor and gelatine, hexadecyltrimethylammonium bromide and poly(ethylene glycol)-*block*-poly(propylene glycol)-*block*-poly(ethylene glycol) were used as templates.

Obtained samples were analyzed with Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) and thermogravimetric analysis (TGA).

Sample preparation with a small amount of solvent is effective when using surfactant as template, while for gelatin and Pluronic P123 a larger quantity of solvent and acidic conditions are preferred.

According to the intensity of FTIR bands, lipase is immobilized more effectively than cellulase, as confirmed by TGA determination of weight of immobilized lipase (34%) and cellulase (30%). Similar values are obtained by EDS analysis.

Keywords: cellulase, lipase, mesoporous silica, sol-gel method

SADRŽAJ

SAŽETAK

SUMMARY

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Mezoporozni SiO ₂	4
2.2. Predlošci	6
2.2.1. Želatina.....	6
2.2.2. Surfactanti	7
2.2.3. Poli(etilen-glikol)- <i>block</i> -poli(propilen-glikol)- <i>block</i> -poli(etilen-glikol) kopolimer	8
2.3. Sol-gel postupak	9
2.4. Biogoriva	12
2.4.1. Biodizel	12
2.4.1.1. Proizvodnja biodizela kataliziranom transesterifikacijom	14
2.4.1.2. Ostali postupci proizvodnje biodizela	17
2.4.2. Bioetanol	18
2.4.2.1. Proizvodnja bioetanola hidrolizom lignocelulozne biomase.....	19
2.5. Enzimi	20
2.5.1. Lipaza	20
2.5.1.1. Imobilizacija i ponovna upotreba enzima	20
2.5.1.2. Mehanizam i kinetika reakcije transesterifikacije katalizirane lipazom	21
2.5.2. Celulaza	22
3. EKSPERIMENTALNI DIO	24
3.1. Korištene kemikalije.....	25
3.2. Instrumentalne metode	25
3.3. Opis rada.....	26
3.3.1. Priprava mezoporoznog SiO ₂	26
3.3.2. Imobilizacija enzima	27
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. SEM analiza.....	29
4.2. EDS analiza	32
4.3. FTIR analiza	35
4.4. TGA analiza.....	38
5. ZAKLJUČAK.....	40
6. LITERATURA	42

1. UVOD

Mezoporozni materijali sve više dobivaju na važnosti zbog svojstava poput poroznosti i kemijske stabilnosti koja omogućuju njihovu primjenu za katalizu, adsorpciju, senzore, kontrolirano otpuštanje lijekova, ali i kao predloške ili nosače za druge materijale. Stoga se mezoporozni SiO_2 može koristiti za imobilizaciju enzima. Enzimi se fizikalno adsorbiraju (fizisorbiraju) na površinu nosača, što minimalno mijenja samu površinu i vrlo malo utječe na aktivnost enzima [1]. Imobilizacijom enzima povećava se njihova stabilnost i omogućava višekratna upotreba, što smanjuje troškove te otvara mogućnosti korištenja enzima poput lipaze i celulaze u proizvodnji biogoriva.

Lipaza služi za hidrolizu lipida, dok celulaza razgrađuje celulozu. Njihovom imobilizacijom na mezoporoznom SiO_2 snizila bi se cijena proizvodnje biogoriva i postigla bolja ekonomska isplativost.

Za sintezu mezoporoznog SiO_2 koristi se sol-gel postupak. Kao prekursor najčešće se koristi tetraetoksisilan (TEOS), dok se kao predlošci za dobivanje porozne strukture mogu koristiti prirodni i sintetski polimeri, surfaktanti ili površinski neaktivne tvari poput glukoze. Prednost prirodnih polimera poput želatine je netoksičnost i biorazgradivost.

2. OPĆI DIO

2.1. Mezoporozni SiO₂

U posljednjih nekoliko desetljeća sve je veće zanimanje za sintezu mezoporoznih materijala (MPM) zbog njihovih pora u obliku tunela, morfoloških svojstava, velike površine i volumena pora. Kao predlošci za sintezu mezoporoznog materijala koriste se površinski aktivne tvari, raznovrsni organski spojevi, oksidi metala (Cr₂O₃, NiO) te prirodni polimeri. Jedan od glavnih problema kod sinteze mezoporoznih materijala je uklanjanje predloška koje može uzrokovati zagađenje okoliša. Kako bi se to izbjeglo, koriste se prirodni polimerni predlošci koji ne zagađuju okoliš, lako su dostupni, nisu otrovni i mogu se prirodno razgraditi [1]. Primjena takvih predložaka također ima vrlo važnu ulogu u medicini, osobito kod biosenzora [2].

Mezoporozni materijali su amorfne tj. parakristalične strukture koje pokazuju pravilnu strukturu na vrlo malom području. Korištenjem različitih predložaka želi se dobiti pravilno uređene i jednolike pore koje omogućuju različitu primjenu dobivenog MPM. Mijenjanjem reakcijskih uvjeta, količine prekursora, otapala i predloška mogu se korigirati dimenzije pora. Za primjenu MPM osim distribucije i veličine pora važna je i njihova međusobna povezanost.

Velika površina mezoporoznog SiO₂ omogućuje vezanje drugih spojeva na brojna aktivna mjesta u mreži poroznog materijala. Uz to veliki volumen pora olakšava difuziju plina, što utječe na adsorpcijsku ravnotežu [3]. Veličina pora kreće se od 2 do 50 nm.

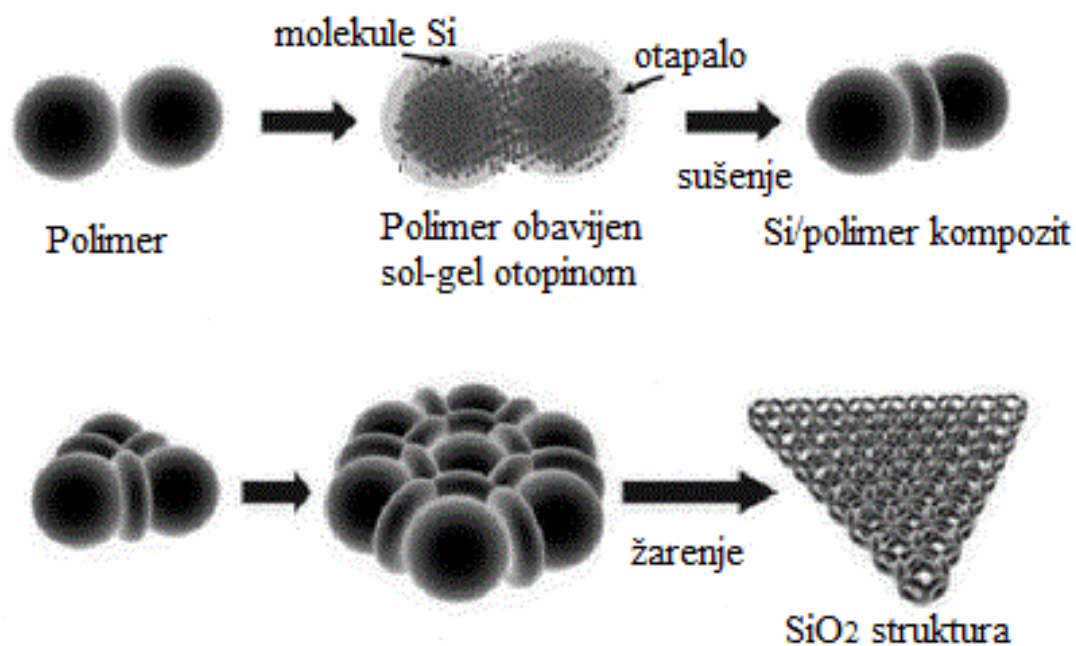
Prvi mezoporozni materijal dobiven je pomoću ionskog surfaktanta, kvaternog amonijevog iona (R₄N⁺). Formiranje mezoporozne strukture se temelji na elektrostatskim interakcijama između negativno nabijenog Si u otopini i pozitivno nabijenog surfaktanta [4].

Najčešći tipovi mezoporoznih materijala su MCM-41 (*MobilCrystalline Materials*) i SBA-15 (*Santa Barbara Amorphous*). Ovi materijali imaju heksagonalno uređenu strukturu pora i dobiveni su u različitim uvjetima sinteze uz različite predloške. Za pripremu MCM-41 materijala mogu se slijediti dva mehanizma: putem kondenzacije i umrežavanja anorganskog prekursora s postojećom fazom heksagonalnih liotropnih tekućih kristala ili sa složenom dvodimenzionalnom heksagonalnom strukturom molekula surfaktanata, dok se za sintezu SBA materijala koristi triblok-kopolimer poput Pluronica P123 [4]. Mezoporozni materijali M41S (*Mesoporous silica materials* tvrtke *Mobil Corporation*) i FSM (*Folded Sheet mesoporous Material*) također su heksagonalno uređene mezoporozne strukture silicija,

dobivene korištenjem površinski aktivnih tvari kao predložaka za stvaranje pora. Imaju dobro uređen sustav pora i kanala, a veličina pora se kreće oko 3 nm [2]. Veličina pora se može povećati ili smanjiti promjenom duljine lanca surfaktanta ili dodavanjem organskih molekula koje se smještaju unutar micela.

Koloidni kristali, s trodimenzionalnom uređenom strukturom monodisperznih čestica, također se koriste kao predlošci za dobivanje MPM. Priprava se odvija u tri koraka. Prvo se popunjavaju praznine oko monodisperznih sfera prekursorima različitih materijala poput keramike, metala, poluvodiča, monomera. U drugom koraku prekursor kondenzira i nastaje čvrsti okvir oko sfera. Na kraju se sfere uklanjaju žarenjem ili ekstrakcijom. Formiranje MPM većim dijelom je određeno van der Waalsovima interakcijama, kvašenjem površine predloška, popunjavanjem praznina između sfera i smanjivanjem volumena prekursora tijekom očvršćivanja. Metoda s koloidnim kristalima se može koristiti u kombinaciji s sol-gel postupkom, otopinama soli, nanokristalnim i drugim prekursorima za dobivanje trodimenzionalnih anorganskih struktura [4].

Kao predlošci za dobivanje pora sve se više koriste polimeri, koji daju jednoliku raspodjelu pora koje mogu biti različitih veličina. Tijekom sol-gel postupka polimer se ugrađuje u matricu metalnog oksida otapanjem u prikladnom otapalu. Kako molekula polimera služi kao predložak, veličina dobivenih pora ovisi o molekulskoj masi korištenog polimera. U ovakvom sustavu može se očekivati određena žilavost zbog kovalentnih veza unutar polimera. Konačni porozni materijal se dobiva uklanjanjem polimera žarenjem [5]. Tokom uklanjanja polimera mora se odrediti optimalna temperatura žarenja kako bi se polimer uklonio, a da pri tome ne bi došlo do urušavanja SiO_2 strukture.



Slika 1. Sinteza MPM koristeći polimerni predložak

2.2. Predlošci

2.2.1. Želatina

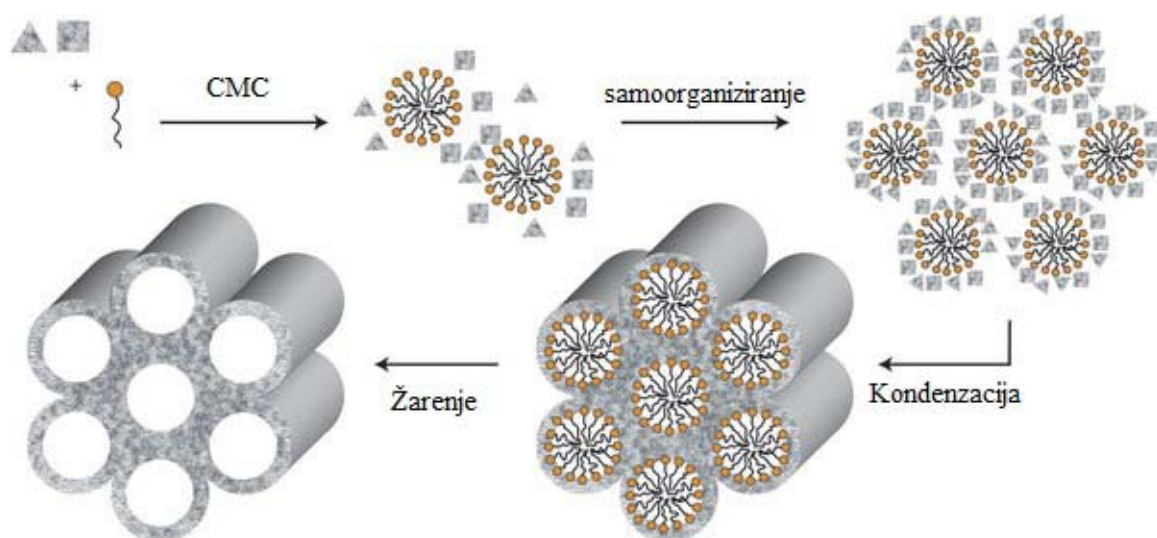
Želatina je proziran, bezbojan prehrambeni sastojak bez okusa, polipeptid velike molekulske mase koji se dobiva kuhanjem iz kolagena, glavnog strukturnog proteina životinjskih koža, vezivnoga tkiva ili kosti. Gotovo da nema okusa, a koristi se u prehrambenoj industriji, medicini i znanosti [6]. Sadrži mnoge N-H funkcionalne skupine koje reagiraju sa silanolnim skupinama Si-OH na površini silicijevih vrsta pomoću vodikovih veza. pH otopine može utjecati na koncentraciju amino skupina unutra molekula želatine, čime se mijenja intenzitet vodikovih veza i stupanj aglomeracije želatine. Sva ova svojstva utječu na veličinu pora MPM koji se pripremaju uz želatinu kao predložak. Uz to želatina je biokompatibilna, površinski aktivna, biorazgradiva i nije toksična [1].

Jedan od većih utjecaja na veličinu pora, tj. aglomeraciju želatine ima pH otopine. Pri niskom pH koncentracija amino skupina se povećava zbog elektostatičkog djelovanja vodikovih iona s amino dijelom molekule želatine i događa se kontinuirano elektostatsko odbijanje između molekula želatine. Elektrostatska odbijanja su jača od van der Waalsovih sila i vodikovih veza između molekula želatine. Zbog toga dolazi do razdvajanja molekula predloška. Pri visokom pH stanje je obratno. Elektrostatska odbijanja se smanjuju, preslaba su da suzbijaju van der Waalsove sile i vodikove veze. Zbog toga se molekule želatine povezuju i volumen predloška se povećava [1]. Zbog navedenih razloga tijekom pripreme uzoraka korištene su različite koncentracije klorovodične kiseline.

2.2.2. Surfaktanti

Surfaktanti (površinski aktivne tvari) jesu organski spojevi koji otopljeni u vodi smanjuju sile koje nastoje što više smanjiti međufaznu površinu. Amfifilne su molekule (sadrže i hidrofobni i hidrofilni dio), zbog čega djeluju kao premoštenja između polarnih i nepolarnih molekula i tako znatno povećavaju topljivost nepolarnih molekula. Polarni/ionski krajevi surfaktanata preferirano međudjeluju s polarnim molekulama, dok nepolarni krajevi preferirano međudjeluju s nepolarnim molekulama. Prvenstveno se primjenjuju kao sredstva za kvašenje, deterdženti, sredstva za formiranje filma, disperzanti i emulgatori [7]. U ovom radu korišteni surfaktant je heksadeciltrimetilamonijev bromid.

Surfaktanti se mogu samoorganizirati u micelnu strukturu. Kada dosegnu određenu koncentraciju – kritičnu micelarnu koncentraciju (CMC, iz engl. *critical micelle concentration*) dolazi do spontanog formiranja micela, tj. do samoorganiziranja. Nastaje kaotično gibanje molekula otapala koje se više ne slažu u složene filmove oko svake molekule surfaktanta, već samo oko novonastalih micela. Kod pripreme mezoporoznih materijala, oko micela se okupljaju anorganski prekursori, koji zatim kondenziraju i formiraju anorganski dio mezoporoznog SiO₂. Slika 2. prikazuje dostizanje CMC, samoorganiziranje micela te nastajanje mezoporoznog SiO₂.



Slika 2. Proces od surfaktanta do mezoporoznog materijala

Problem surfaktanata je njihova vrlo slaba razgradnja u okolišu, što ne zadovoljava propise. Toksični su za ribe jer zbog svoje površinske aktivnosti snižavaju koncentraciju kisika u vodi.

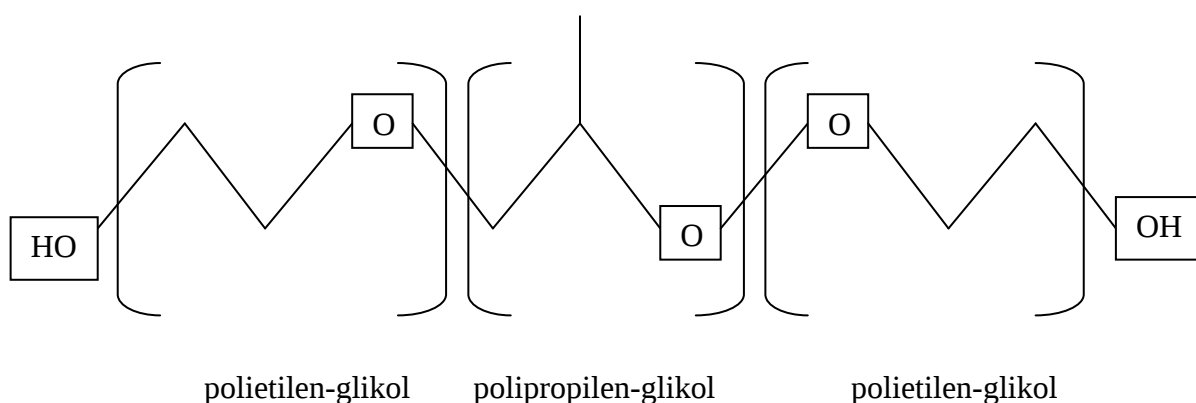
2.2.3. Poli(etilen-glikol)-*block*-poli(propilen-glikol)-*block*-poli(etilen-glikol) kopolimer

Polimeri se sastoje od makromolekula vrlo velikih molekulskih masa, sastavljenih od dijelova koji se ponavljaju (mera) povezanih u dugačke lance [8]. Blok-kopolimeri sastoje se od dvije ili više vrsta mera koji su povezani tako da tvore homogene blokove: A-A-A-A-B-B-B-B-B-B-C-C-C-C

Poli(etilen-glikol)-*block*-poli(propilen-glikol)-*block*-poli(etilen-glikol) sastoji se od dva poli(etilen-glikolska) bloka (PEG) između kojih je blok poli(propilen-glikola) (slika 3). Često se koristi kao predložak za stvaranje mezoporoznog SiO_2 . Netoksičan je, biorazgradiv i relativno jeftin.

Atom kisika etera koji se nalazi u poli(etilen-glikolu) ($-\delta\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$, akceptor vodikove veze) ima veliki afinitet prema silanolnim skupinama silicija ($\text{Si}-\text{OH}$, donator vodikove veze). Zbog toga se polimeri na osnovi poli(etilen-glikola) često koriste kao predlošci za pripremu mikroporoznih SiO_2 sfera, mezoporoznih uzoraka SiO_2 i ugljik/ SiO_2 kompozita [9].

Primjenom sol-gel procesa, s povećanjem temperature povećava se i brzina kondenzacije SiO_2 i hidrofbnost PEG-a, čime raste broj negativno nabijenih siloksanskih skupina koje odbijaju eterske skupine PEG-a i može doći do razdvajanja anorganske mreže od polimera. Pri nižoj temperaturi lanac PEG-a i Si-OH skupine povezani su jakim vodikovom vezom. Zbog tog se međudjelovanja i brze kondenzacije SiO_2 , formira anorganska mreža u kratkom vremenu pa polimerni lanci ostaju uklopljeni u SiO_2 matricu. Zbog smanjivanja volumena matrice i slabljenja veze između SiO_2 i polimera spontano nastaju mezopore [9].



Slika 3. Prikaz molekule poli(etilen-glikol)-*block*-poli(propilen-glikol)-*block*-poli(etilen-glikola)

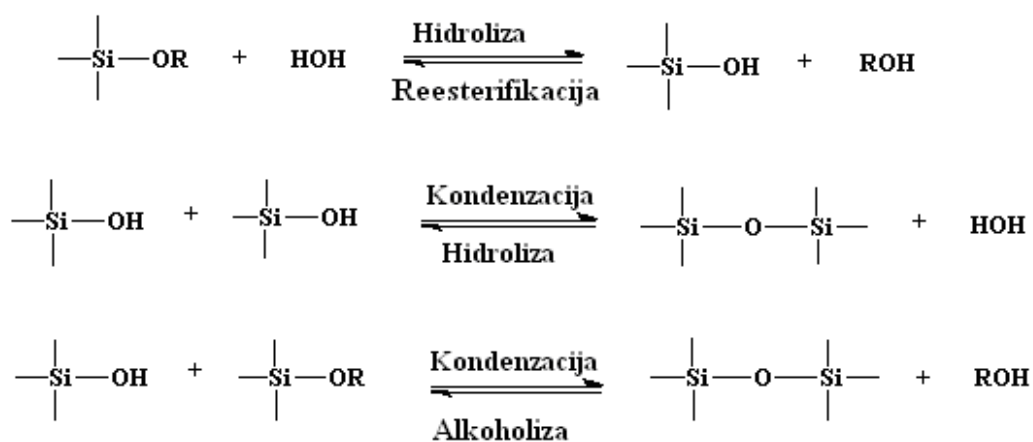
2.3. Sol-gel postupak

Sol-gel postupak je kemijska tehnika koja ima široku primjenu u području znanosti o materijalima i inženjerstvu keramike. Koristi se prvenstveno za proizvodnju homogenih anorganskih metalnih oksida počevši od koloidne otopine (sol), koja djeluje kao prekursor za integriranu mrežu (gel) od diskretnih čestica ili polimernih lanaca [10]. Sol-gel postupkom se pri sobnoj temperaturi mogu proizvesti homogeni anorganski metalni oksidi sa željenim svojstvima tvrdoće, optičke prozirnosti, poroznosti, kemijske i toplinske postojanosti [11].

Sol-gel postupak odvija se u otopini pa je prikladan za sintezu MPM. Proces se vrši na sobnoj temperaturi dok se zagrijavanje koristi samo za brže i učinkovitije otapanje predloška. Radom pri niskoj temperaturi moguć je nadzor mikrostrukture, te dobivamo veliku specifičnu površinu i pore malog promjera. Dodavanje predložaka kao i utjecanje na reakcijske uvjete je jednostavno, pa se regulacijom uvjeta može dobiti različita struktura krajnjeg materijala.

Sol-gel postupak opisuje se trima reakcijama: hidroliza, kondenzacija uz izdvajanje alkohola i kondenzacija uz izdvajanje vode. Kad hidroliza započne, sve tri reakcije teku usporedno do nastanka gela [11]. Prekursori ili polazni materijali za sintezu anorganskih mreža su silicijevi ili metalni alkoksidi, koji lako reagiraju s vodom (hidroliza) i zatim tvore neprekidnu mrežu (kondenzacija), uz kiselinu ili bazu kao katalizator [12].

Kao polazne tvari najčešće se upotrebljavaju silicijevi alkoksidi (alkoksisilani), zbog svoje postojanosti, razmjerno jednostavnog rukovanja i dostupnosti. Općenita formula je $\text{Si}(\text{OR})_4$, gdje je R alifatski lanac, obično $-\text{CH}_3$ (tetrametoksisilan, TMOS) ili $-\text{C}_2\text{H}_5$ (tetraetoksisilan, TEOS). Najčešće se rabi TEOS, $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, čijom hidrolizom i kondenzacijom nastaje SiO_2 mreža.



Slika 4. Prikaz reakcija hidrolize i kondenzacije TEOS-a

Reakcije kondenzacije, rast čestica sola i nastajanje gela odvijaju se u tri stupnja. U prvom stupnju nastaju čestice polimerizacijom monomera, u drugom stupnju čestice rastu, a u trećem dolazi do povezivanja u lance, čime nastaje neprekinuta trodimenzijska mreža i dolazi do stvaranja gela. Kondenzacijom se nastoji dobiti maksimalan broj Si-O-Si veza, tako da se

manji broj terminalnih hidroksilnih skupina. Time nastaju cikličke strukture na koje se vežu monomeri, tvoreći trodimenzijske čestice. Kondenzacija traje dok se ne postigne najkompaktnije stanje, tako da na površini ostaju neizreagirane hidroksilne skupine. Trodimenzijske čestice služe kao klice daljeg rasta [10].

Čimbenici kao što su pH vrijednost, molarni omjer H_2O/Si i katalizatori mogu uzrokovati završetak hidrolize prije nego počinje kondenzacija. Kako broj $Si-O-Si$ veza raste, individualne molekule ugrađuju se u sol. Daljnjom kondenzacijom čestice sola formiraju mrežu i nastaje gel [12]. U trenutku nastanka gela materijal postaje krut. Nastankom gela reakcije se ne prekidaju, već se gel nastavlja granati daljnjim stvaranjem $Si-O-Si$ veza, što se naziva starenjem gela [11].

Nakon faze geliranja slijedi sušenje kod kojeg preostale hlapive tvari (voda, alkohol itd.), pod utjecajem povišene temperature izlaze iz gela (nastaje tzv. kserogel) i mreža se skuplja uz daljnju kondenzaciju [12]. Konačna veličina pora je za $\sim 15 - 30 \%$ manja od početne veličine predloška [4]. Svojstva anorganskih mreža ovise o mnogim čimbenicima koji utječu na brzinu reakcija hidrolize i kondenzacije. To su pH vrijednost, temperatura i vrijeme reakcije koncentracija reagensa, vrsta i koncentracija katalizatora, temperatura i vrijeme starenja, te sušenje [13].

Mehanizam reakcija hidrolize i kondenzacije silicijevog alkoksida ovisan je o pH sredine, jer reakcija hidrolize može biti katalizirana kiselinom ili bazom. Do hidrolize dolazi nukleofilnim napadom kisika iz molekule vode na Si atom, neovisno o pH, što je potvrđeno reakcijom izotopski označene vode (^{18}O) s TEOS-om pri čemu nastaje neoznačeni alkohol i u kiselim i u baznim uvjetima. Iako je hidroliza moguća i bez dodavanja katalizatora, s katalizatorom je puno brža. Najčešće korišteni katalizatori su anorganske kiseline (HCl) i amonijak. Jake kiseline imaju najviše utjecaja na hidrolizu. Kondenzacija se također može izvoditi bez katalizatora, no upotreba katalizatora je vrlo korisna. Koriste se isti katalizatori kao i kod hidrolize [13].

2.4. Biogoriva

Ideja proizvodnje biogoriva nije nova. Francuska kompanija Otto je 1900. na Svjetskoj izložbi u Parizu iskoristila ulje kikirikija za pokretanje malog dizelskog motora [14]. Ideja korištenja biljnih ulja potekla je od tadašnje francuske vlade, sa strateškim ciljem razvoja proizvodnje biodizela u francuskim afričkim kolonijama. U to vrijeme su i druge europske zemlje: Belgija, Italija, Njemačka i Velika Britanija razmatrale slične strategije, što je rezultiralo nizom znanstvenih članaka o mogućnostima korištenja biljnih ulja kao pogonskih goriva. Međutim, ubrzo je gorivo na bazi nafte postalo dostupno u velikim količinama i po višestruko nižim cijenama, što je smanjilo zanimanje za biljna ulja [15]. Usto, ulje je bilo velike viskoznosti i niske postojanosti što je bio dodatni razlog za prestanak daljnje proizvodnje [14]. Naime, visoka viskoznost uzrokuje loše raspršivanje goriva, što kao posljedicu ima nepotpuno izgaranje goriva u cilindrima motora [15].

Osim biodizela kao biogorivo služi i bioetanol, kao zamjena za benzin. Bioetanol je obnovljivo gorivo s trenutno najvećim količinskim potencijalom, a proizvodi se iz biomase ili biorazgradive frakcije otpada. Najvažnije sirovine za proizvodnju bioetanola prve generacije bogate su šećerom ili škrobom: šećerna trska, šećerna repa, kukuruz, pšenica, sirak i krumpir. Zbog ograničene količine šećernih i škrobnih sirovina, proizvodnja bioetanola usmjerena je na lignocelulozne sirovine, odnosno biomasu koja uključuje poljoprivredne i šumarske ostatke, kruti komunalni otpad i određene namjenski uzgojene kulture. Osnovna ugljikohidratna komponenta sirovina za proizvodnju bioetanola druge generacije je celuloza, a sadrže još hemicelulozu i lignin, te manje količine proteina, lipida i pepela. Najveći proizvođači i korisnici bioetanola su Brazil i SAD. U Europskoj uniji to su Španjolska, Poljska, Francuska i Švedska [16].

2.4.1. Biodizel

Zbog smanjenja svjetskih rezervi goriva i sve veće svijesti o zaštiti okoliša, velika je potražnja za alternativnim gorivima. Biodizel, čisto obnovljivo gorivo, smatra se najboljom zamjenom za dizelsko gorivo, pošto se može koristiti u mnogim motorima s kompresijskim paljenjem bez potrebe za ikakvim promjenama na samom motoru.

Iako se danas ne može u potpunosti zamijeniti petrokemijski dobiveno dizelsko gorivo, biodizel ima brojne prednosti: veću učinkovitost paljenja (cetanski broj) i niži udio sumpora i aromata što znači da ima malu emisiju toksičnih plinova. Zbog visokog udjela kisika (oko 10 %) gotovo potpuno izgara u motorima te time ima vrlo malo ispušnih plinova CO, CO₂, SO_x i neizgorenih ugljikovodika te čestica, jedino mu je veća emisija NO_x. Biodizel je biorazgradiv: do 90 % biodizela se može razgraditi unutar 21 dana. Ima visoku točku paljenja na ~150 °C, što ga čini sigurnim za transport [17, 24]

Biodizel se dobiva iz otpadnih lipida (ulja ili masti), najčešće bazno kataliziranom transesterifikacijom. Problem se javlja kad je u sirovini prisutan visoki udio slobodnih masnih kiselina (> 2,5 %) ili vode. Bazni katalizatori reagiraju sa slobodnim masnim kiselinama i tvore sapun, dok voda može hidolizirati trigliceride i time tvoriti dodatne slobodne masne kiseline. Obje reakcije su nepoželjne i smanjuju proizvodnju biodizela, pa se u tim slučajevima sirovina mora podvrgnuti predtretmanu što povećava troškove proizvodnje [17].

Kemijski gledano, biodizel je mješavina metilnih estera dugolančanih masnih kiselina i najčešće se dobiva iz netoksičnog, biološkog izvora poput biljnoga ulja, životinjskih masti pa čak i iz otpadnog kuhinjskog ulja. Budući da je cijena sirovine 60 - 80 % ukupne cijene biodizela, odabir pravih sirovina je izuzetno važan. Iskorištenje i svojstva biodizela iz različitih izvora se razlikuju.

Biljno ulje je vrlo dobra sirovina jer je obnovljiva i može se proizvesti u velikim količinama uz brigu o okolišu. Tu su uključena jestiva i nejestiva ulja. Više od 95 % biodizela proizvodi se iz jestivoga ulja, jer je njihova proizvodnja prisutna u cijelom svijetu. No korištenje jestivoga ulja zbog međusobno konkurentnih tržišta može izazvati rast cijene i jestivom ulju i biodizelu [17]. Od 2011. porasle su cijene namirnica zbog nedovoljno obradivih površina koje su potrebne za usjeve za hranu, ali i za biogorivo. Povrh toga, u nekim zemljama se radi širenja plantaža uništavaju šume, u Maleziji i Indoneziji zapaljane su tisuće km² tropskih šuma zbog plantaža palmi uljarica. Time se oslobađaju velike količine stakleničkih plinova i uništavaju staništa mnogih životinjskih i biljnih vrsta [18]. Stoga se mnogi istraživači okreću nejestivome (otpadnom) ulju koje sadrži veliki postotak toksičnih tvari, nema nikakvu vrijednost, a time se rješava i problem njegovog odlaganja [19].

Životinjske masti sadrže viši udio zasićenih masnih kiselina i na sobnoj temperaturi su u krutom stanju, što može stvarati probleme u proizvodnji. I cijena im je veća od cijene biljnoga ulja, te je njihova primjena u proizvodnji biodizela ograničena.

Otpadno kuhinjsko ulje nije prihvatljivo za ljudsku prehranu, a njegovo korištenje znatno snižava cijenu proizvodnje biodizela. Kvaliteta otpadnog ulja nije uvijek prikladna, jer njegova svojstva ovise o sastavu svježeg ulja kao i načinu na koje je upotrebljavano. Otpadno ulje može sadržavati mnoge neželjene nečistoće, poput vode i slobodnih masnih kiselina, pa zbog većeg broja koraka ili alternativnih pristupa proizvodnja biodizela može poskupjeti tako da ne bude konkurentan cijenom. Višestrukim korištenjem imobiliziranih enzima pojeftinila bi proizvodnja biodizela iz otpadnog ulja.

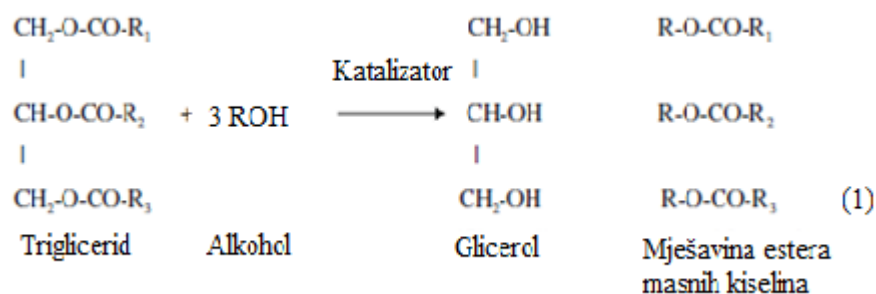
Danas su dostupne brojne metode proizvodnje biodizela, no četiri su primarne:

1. izravno korištenje i miješanje sirovih ulja
2. mikroemulzije
3. toplinsko kreiranje
4. transesterifikacija

Transesterifikacija je najčešće korištena metoda za pretvorbu masti i ulja u biodizel [17]. Njome se smanjuje viskoznost ulja zamjenom glicerola metanolom ili etanolom [14]. Glavni faktori koji utječu na iskorištenje reakcije su količina alkohola, temperatura reakcije i koncentracija katalizatora [17].

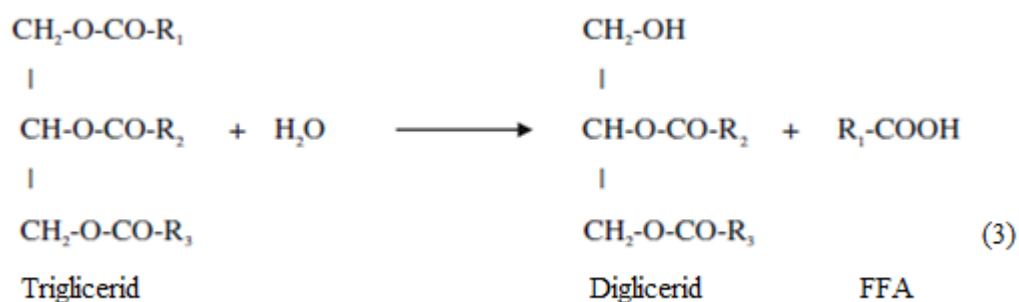
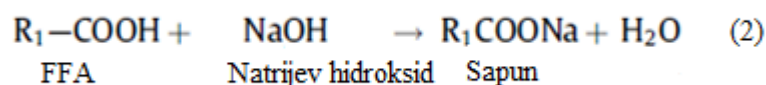
2.4.1.1. Proizvodnja biodizela kataliziranom transesterifikacijom [17]

Biljna ulja i životinjske masnoće su esteri triola glicerola i zasićenih ili nezasićenih monokarboksilnih kiselina (trigliceridi). Uz prisutnost katalizatora reagiraju s alkoholom u reakciji transesterifikacije (jed. 1). Kao nusprodukt transesterifikacije nastaje glicerol, koji se, pročišćen do 99 %, može koristiti u industriji.



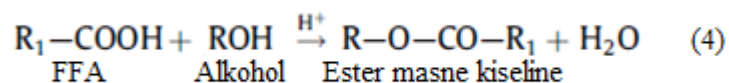
Za transesterifikaciju se mogu koristiti metanol, etanol, propanol, butanol i amilni alkohol. Najčešće se koriste metanol i etanol, a pogotovo metanol zbog svoje niske cijene i dobrih svojstava. Naime, metanol brzo reagira s trigliceridima, a uz to se lužnati katalizator vrlo lako otapa u njemu. Međutim, zbog niskog vrelišta postoji opasnost od eksplozije.

Kada sirovi materijal sadrži veću količinu slobodnih masnih kiselina (FFA) ili vode doći će do reakcija saponifikacije (jed. 2) i hidrolize triglicerida (jed. 3).



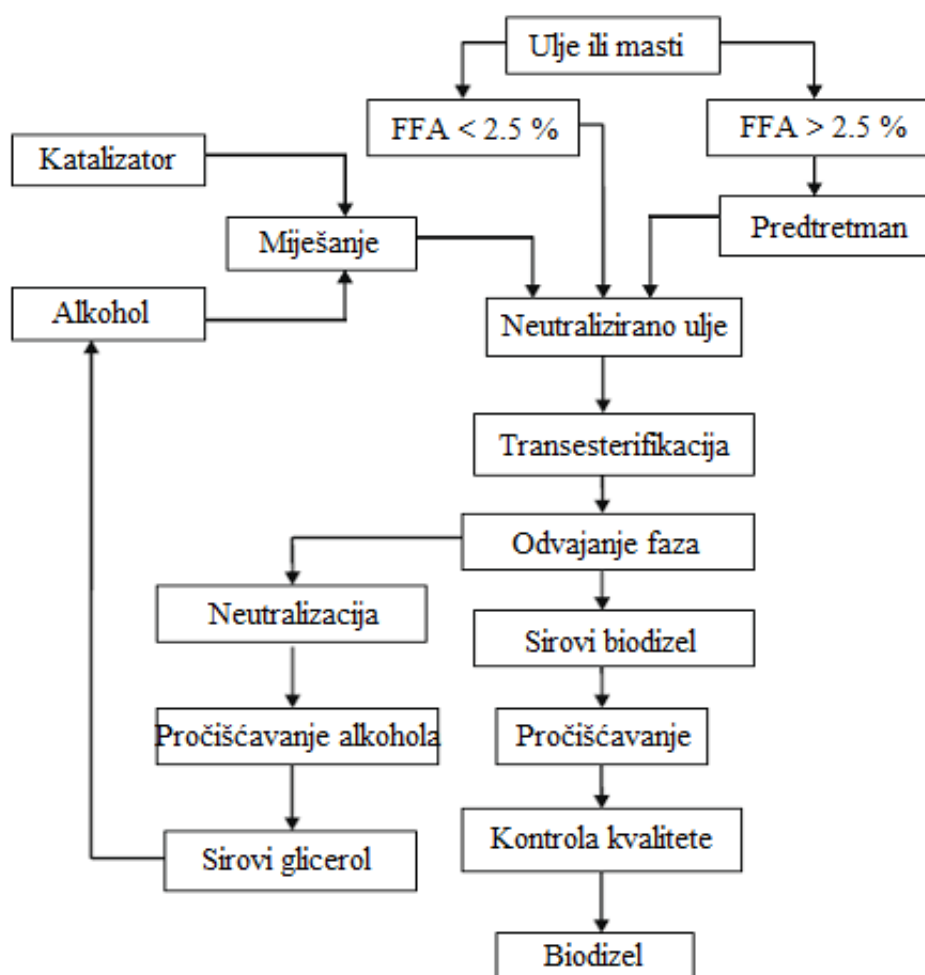
Te reakcije su nepoželjne jer smanjuju iskorištenje biodizela. Zbog toga nakon rafiniranja sirovog materijala, sirovina treba proći određene predtretmane.

Međutim FFA može reagirati s alkoholom tvoreći ester (biodizel) u kiselo kataliziranoj reakciji esterifikacije (jed. 4), koja je jako korisna kad se koriste ulja s visokim udjelom FFA.



Zbog spore reakcije i velikog množinskog omjera metanola i ulja koji je potreban, kiselo katalizirana esterifikacija se ne koristi tako često. Većina biodizela danas se proizvodi bazno kataliziranim procesom.

Proces kataliziran enzimima sve više dobiva na važnosti jer se njime izbjegava saponifikacija i pročišćavanje je lakše, a uz to nema zagađenja okoliša. No u praksi se enzimi manje koriste zbog dužeg vremena reakcije i dosta visoke cijene.



Slika 5. Pojednostavljena shema proizvodnje biodizela [17]

Najbolji predtretman za uklanjanje FFA je kiselo katalizirana esterifikacija (jed. 4), koja slobodne masne kiseline pretvara u biodizel. FFA se esterificiraju metanolom uz kiselinu (najčešće H_2SO_4) kao katalizator. Ako je udio FFA velik, predesterifikacija se mora raditi u nekoliko stupnjeva, između kojih se lijevkom za odjeljivanje uklanja voda nastala tijekom reakcije. Nova metoda je zagrijavanje sirovine s glicerolom do $\sim 200\text{ }^\circ\text{C}$, uz ZnCl_2 kao katalizator da bi nastali mono- i digliceridi. Time se udio FFA toliko smanji da se biodizel može proizvesti tradicionalnom transesterifikacijom. Sva voda koja nastane reakcijom može odmah ispariti, ali reakcija je relativno spora.

Nakon što se predtretmanom uklone FFA, slijedi uklanjanje mirisa sirovine vrelom parom, čime se uklanjaju preostale masne kiseline, aldehidi, nezasićeni ugljikovodici i ketoni koji daju miris i okus ulju. Nakon toga slijedi određivanje udjela FFA titracijom da bi se znalo koliko je NaOH potrebno za neutralizaciju.

Kad su katalizator, alkohol i ulje pomiješani u reaktoru dolazi do transesterifikacije. S obzirom da je glicerol puno gušći od biodizela, potpuno se odijeli slijevanjem na dno reaktora. Razdvajanje se može odvijati u reaktoru, u posebnoj posudi za separaciju, ili biti potaknuto centrifugiranjem. I biodizel i glicerol su zagađeni neizreagiranim katalizatorom, alkoholom, uljem i eventualnim sapunom, zbog čega se moraju pročistiti prije upotrebe.

Sirovi biodizel prvo se neutralizira kiselinom kako bi reagirao preostali katalizator i sapun i nastale u vodi topljive soli i FFA. Zatim se neizreagirani alkohol uklanja destilacijom, dok se pranjem uklanjaju ostatci katalizatora, sapuna, soli, alkohola i FFA. Kako se za proizvodnju biodizela enzimskom transesterifikacijom ne koristi klasični katalizator, pročišćavanje dobivenog biodizela nije potrebno jer je on zadovoljavajuće kvalitete [19].

2.4.1.2. Ostali postupci proizvodnje biodizela

Izravno korištenje i miješanje sirovih ulja posebno je pogodno za nerafinirana, sirova i reciklirana ulja s čak do 50 % FFA. Početni troškovi su niži no proces ima dosta nedostataka. Sirovo ulje sadrži veću količinu onečišćenja: vodu, čestice i sluzne tvari, pa se njegovim korištenjem u dizelskim motorima talože neizgoreni dijelovi goriva (na stijenke cilindra, klipa i brizgaljke). Uz to se talog koksira, što uzrokuje nepravilan rad motora i povećanu emisiju štetnih plinova. Visoka viskoznost sirovog ulja ograničava njegovu dugotrajniju upotrebu u dizelskim motorima [20].

Mikroemulzije biljnih ulja i alkohola također nisu pogodne za dugotrajno korištenje u dizelskim motorima. Nedostatci su im nepotpuno sagorijevanje, nastanak ugljičnog taloga i povećanje viskoznosti ulja. Toplinska moć i cetanski broj su manji nego kod dizelskog goriva zbog visokog sadržaja alkohola, a karakteristike goriva su lošije pri niskim temperaturama [19].

Toplinsko krekiranje podrazumijeva razgradnju ugljikovodika pod utjecajem topline bez prisutnosti katalizatora. Razgradnja se odvija preko slobodnih radikala i ovisi o molekularnoj masi i strukturi molekula. Dobivaju se vrjedniji proizvodi iz teških ostataka koji su početna sirovina, nije potrebna upotreba vodika te ne nastaje loživo ulje. Glavni nedostatak je nepoželjni nastanak koksa [21].

2.4.2. Bioetanol

Bioetanol se dobiva fermentacijom sirovina koje sadrže jednostavne šećere ili makromolekule ugljikohidrata. Sirovine bogate šećerima najpogodnije su za proizvodnju etanola, budući da jednostavni šećeri mogu izravno fermentirati u etanol. Makromolekule ugljikohidrata (škrob, celuloza) prvo treba razložiti na jednostavne šećere saharifikacijom (škrob) ili hidrolizom (celuloza) [22].

Budućnost proizvodnje bioetanola je u lignoceluloznim sirovinama, biljnoj biomasi koja se sastoji od ugljikohidratnih polimera celuloze i hemiceluloze i aromatskog polimera lignina. Npr. stabljika kukuruza je obilan i održiv izvor goriva: izgrađena je od ~70 % celuloze i hemiceluloze i ~20 % lignina. Celuloza i hemiceluloza mogu se preraditi u etanol, a lignin se može iskoristiti kao kruto gorivo za proizvodnju toplinske i električne energije. Proizvodnja bioetanola iz lignocelulozne biomase još nije komercijalno konkurentna te je potreban daljnji tehnološki napredak. Postrojenja moraju biti fleksibilna kako bi se omogućila proizvodnja bioetanola iz različitih lignoceluloznih sirovina [16].

Alternativni postupak proizvodnje bioetanola iz lignoceluloznih sirovina je BTL postupak (engl. *biomass-to-liquid*), u kojem se čvrsta biomasa u rasplinjaču pod visokim tlakom i visokom temperaturom prevodi u sintetski plin. Plin se može dalje preraditi u sintetsko tekuće biogorivo. BTL ima potencijal za proizvodnju velike količine bioetanola, jer je paleta

mogućih sirovina jako velika i mogu se upotrijebiti svi dijelovi biljke. Tako se iz jedne tone drveta može dobiti do 300 L biogoriva [16].

Bioetanol se može koristiti u motorima s unutarnjim izgaranjem kao zamjena za benzin. Ima bolje sagorijevanje od benzina, smanjuje količinu stakleničkih plinova, obnovljiv je izvor energije. Kao dodatak u benzinu zamjenjuje aditive za povišenje oktanskog broja, koji zagađuju zrak i podzemne vode. Do 5 % bioetanola se može dodati benzinu bez ikakvih prilagodba motora. Sljedeći korak primjene bioetanola je povećanje njegovog udjela u benzinu do 10 %. Povećanjem udjela etanola dolazi se do granice gdje se koriste bivalentna vozila. U Europi se bioetanol može općenito koristiti u vozilima u promijenjenom obliku (ETBE, etil-*tert*-butil-eter) koji se bez problema može miješati do 15 % u mineralno gorivo [16].

Prednost bioetanola jest što se njegova svojstva mogu prilagoditi zahtjevima izgaranja motora. Time bi se mogle realizirati povoljne vrijednosti emisija, koje druga biogoriva jedva postižu. S BTL gorivom bi se bez preinaka na motorima moglo postići smanjenje štetnih tvari za više od 20 %. BTL se kod današnjih motora može bez problema koristiti kao mješavina ili u čistom obliku [16].

2.4.2.1. Proizvodnja bioetanola hidrolizom lignocelulozne biomase

Proizvodnja bioetanola iz lignocelulozne biomase uključuje predtretman biomase, hidrolizu celuloze i hemiceluloze te fermentaciju jednostavnih šećera, od čega je predtretman najsloženiji. Zbog složene strukture sirovine, predtretman treba poboljšati njezinu razgradnju, ukloniti lignin, djelomično ili potpuno hidrolizirati hemicelulozu te smanjenjiti kristalnost celuloze. Stoga se predtretman lignoceluloze sastoji od fizikalnih (mehaničko usitnjavanje i piroliza), kemijskih (ozonoliza, kiselinska i lužnata hidroliza), fizikalno-kemijskih (autohidroliza) i bioloških postupaka. S obzirom da postoji izravna veza između razgradnje celuloze i prisutnosti lignina i hemiceluloze, glavni cilj predtretmana je njihovo uklanjanje. Razgradnjom hemiceluloze dobivaju se jednostavni šećeri, što povećava iskorištenje dobivanja bioetanola. Predtretmanima se također poboljšava efikasnost hidrolize, izbjegava razgradnja ili gubitak ugljikohidrata te izbjegava zaostajanje proizvoda koji inhibiraju daljnje procese hidrolize i fermentacije [23].

2.5. Enzimi

2.5.1. Lipaza

Lipaza je važan enzim koji služi za pretvorbu lipida u prirodi. Nalazi se u biljkama, životinjama i mikroorganizmima te igra ključnu ulogu u metabolizmu ulja i masnoća [24]. Uključena je u razgradnju (a time i mobilnost) lipida unutar stanica organizma, kao i prijenos lipida iz jednog organizma u drugi. Klasificira se kao hidrolaza (enzim koji katalizira hidrolizu određenog supstrata). Aktivna je i za vrijeme hidrolize i za vrijeme sinteze [14].

Lipaza se zbog svoje dobre katalitičke aktivnosti i stabilnosti u vodenom i nevodenom mediju [19] koristi za proizvodnju biodizela, s iskorištenjem oko 92 % [14]. Korištenjem lipaze umjesto anorganskih katalizatora dobiva se visoko iskorištenje i ispušta manje toksičnih tvari u okoliš. Mnogi istraživači nastoje savladati ograničenja u korištenju enzima za proizvodnju biodizela: visoku cijenu, nisko iskorištenje, dugo vrijeme reakcije, potrebu za organskim otapalom i vodom u reakcijskoj mješavini [14]. Upotreba organskih otapala smanjuje aktivnost enzima kroz višestruko korištenje, a usto su toksična, zapaljiva i moraju se odjeliti od gotovog proizvoda [19].

Zbog svoje specifičnosti i selektivnosti lipaza se može uspješno koristiti za mnoge primjene u organskoj sintezi. Najpoželjnije karakteristike lipaze su mogućnost iskorištenja svih tri-, di- i monoglicerida kao i slobodnih masnih kiselina u procesu transesterifikacije, niska inhibicija proizvoda, visoka aktivnost i iskorištenje u nevodenom mediju, nisko vrijeme reakcije, mogućnost višekratne imobilizacije, otpornost na alkohol i temperaturu [25].

2.5.1.1. Imobilizacija i ponovna upotreba enzima

Topljiva lipaza se lako priprema i troškovi pripreme su niski, no zbog deaktivacije može se koristiti samo jedanput. Zbog toga se počinju koristiti metode imobilizacije koje omogućuju bolju toplinsku stabilnost, ponovno korištenje, veću toplinsku i kemijsku stabilnost i kraće vrijeme reakcije [25]. Imobilizacija također omogućuje lakše rukovanje, izdvajanje i recikliranje enzima što smanjuje cijenu proizvodnje. Vrijeme poluraspada imobilizirane lipaze jest 135 sati pri 70 °C u smjesi palminog stearina, ulja iz palminoga zrna i suncokretovog ulja.

U slučaju imobilizacije enzima u nevodenom mediju dobiva se još bolja stabilnost [14]. Proces proizvodnje biodizela imobiliziranom lipazom daje glicerol dobre kvalitete, nema otpadnih voda, pročišćavanje dobivenog biodizela i glicerola je nepotrebno, a njihovo razdvajanje je jednostavno [19].

Lipaza se za proizvodnju biodizela može imobilizirati putem adsorpcije, ućahurivanjem, vezanjem kovalentnom vezom, umreživanjem ili uklapanjem (eng. *entrapment*).

Adsorpcija je vezanje lipaze na površinu nosača slabim silama kao što su van der Waalsove sile, hidrofobne interakcije ili disperzijske sile. Odvija se u blagim uvjetima uz minimalni gubitak aktivnosti enzima i relativno je jeftina i jednostavna. Nosač se može lako obnoviti za ponovno korištenje. Stoga je to najčešće primjenjivana metoda za imobilizaciju enzima, pogotovo u komercijalne svrhe zbog niske cijene i dobre aktivnosti. Ovakvom imobilizacijom enzima dobiveno je iskorištenje biodizela iz biljnog ili otpadnog kuhinjskog ulja veće od 80 % [26].

Aktivnost se smanjuje ponavljanim recikliranjem imobiliziranih enzima, najvjerojatnije zbog desorpcije, interakcije s reaktantom ili inhibicijskog djelovanja produkata. Međutim zabilježena je konverzija estera od 95 % kroz 50 ciklusa (100 dana). Učinkovitost recikliranog enzima ovisi o otapalu kojim se enzim pere nakon korištenja i o acilnom akceptoru (alkohol ili kratkolančani ester) koji je korišten u reakciji. Mogućnost ponovne upotrebe se smanjuje ako se koriste alkoholi koji imaju kratke linearne lance, poput metanola ili etanola. Korištenje propan-2-ola održava aktivnost lipaze i do 12 ciklusa. Drugi acilni akceptori poput metilnog acetata daju iskorištenje od 92 % bez gubljenja lipaze kroz konstantno korištenje tokom 100 ciklusa. Visoku aktivnost enzima moguće je postići pranjem s nepolarnim otapalima poput *n*-heksana [14].

2.5.1.2. Mehanizam i kinetika reakcije transesterifikacije katalizirane lipazom

Kod reakcije transesterifikacije prvo dolazi do hidrolize esterske veze i nastajanja masne kiseline, koja zatim esterifikacijom daje alkilni ester.

Transesterifikacija triglicerida pomoću lipaze uz pomoć metanola provodi se u tri koraka, slično kao u slučaju bazno ili kiselo katalizirane reakcije. U prvom koraku trigliceridi prelaze

u digliceride, u drugom digliceridi u monogliceride i konačno monogliceridi u glicerol. U svakom koraku nastaje metilni ester masne kiseline. Reakcija se izvodi po ping-pong mehanizmu gdje dva reaktanta daju dva produkta. Za razmatranje kinetike reakcije potrebno je znati kakvu lipazu imamo, način imobilizacije lipaze, koje je otapalo korišteno, utjecaj temperature, koncentraciju reaktanata i koeficijent prijenosa tvari [24].

Aktivna strana lipaze sadrži aminokiselinu koja ima važnu katalitičku ulogu, dajući aceptorski proton. Enzim se aktivira kad se promjenom konformacija otkrije aktivni centar na molekuli, što se događa na granici faza ulje-voda. Stoga je potrebna mala količina vode kako bi lipaza zadržala svoju aktivnu konformaciju te se ujedno spriječila inaktivacija lipaze alkoholom. Optimalni množinski udio vode je kompromis između sprječavanja hidrolize i povećanja enzimske aktivnosti. Pri većem udjelu alkohola smanjuje se iskorištenje transesterifikacije jer alkohol narušava stabilizirajući sloj vode oko lipaze, čime se smanjuje njezina aktivnost. Optimalni množinski omjer alkohola i ulja je 3:1, i održava se postupnim dodavanjem alkohola [19].

Proizvodnja biodizela enzimskom transesterifikacijom mora se izvoditi pri nižoj temperaturi da ne bi došlo do gubitka aktivnosti enzima. Optimalna temperatura za proizvodnju biodizela je 30 – 55 °C. Blagim povišenjem temperature do 40 °C dolazi do povećanja iskorištenja, no daljnje povećanje do 55 °C smanjuje stabilnost enzima [25].

2.5.2. Celulaza [27]

Celulaza je enzim koji hidrolizira β -1,4 veze u celuloznim lancima, rastavljajući ih na monosaharide. Proizvode ju gljivice, bakterije, praživotinje, biljke i životinje. Sve se više koristi u različitim industrijskim granama: u tekstilnoj industriji, industriji papira, industriji hrane te kao dodatak u deterdžentima i za poboljšanje probavljivost životinje masti. Posebna se pažnja posvećuje njezinoj primjeni za proizvodnju bioetanola.

Sve veća zabrinutost oko trošenja sirove nafte i emisije stakleničkih plinova velika je motivacija za proizvodnju bioetanola iz lignoceluloze postupkom enzimske hidrolize lignoceluloznog materijala. Celuloza je obilan izvor obnovljive energije. Proizvodnja bioproizvoda i bioenergije iz jeftine i obnovljive celuloze korisna je za gospodarstvo, okoliš, ali i nacionalnu energetska sigurnost.

Celulaza se može proizvoditi fermentacijom u krutom stanju i fermentacijom pod vodom. Gotovo cjelokupna komercijalna proizvodnja zasniva se na fermentaciji pod vodom zbog velike produktivnosti od 100 g čiste celulaze po litri. Procjenjuje se da je cijena proizvodnje celulaze 10 – 40 \$ po kilogramu suhoga proteina.

Celulaza se ubraja u važne industrijske enzime, a njezina potrošnja može samo rasti. Primjerice, ako se u Sjedinjenim Američkim Državama usvoji prijedlog proizvodnje 45 milijardi galona bioetanola godišnje do 2030., uz pretpostavku da celulaza za jedan galon košta 0,20 \$, takav projekt će godišnje koštati 9 milijarde \$ samo za celulazu. Očito je da će trgovina celulozom nadmašiti sve ostale enzime, s obzirom da je potrošnja enzima 2013. godine vrijedila 2 milijarde \$.

Cijena celulaze najveća je prepreka za komercijalnu proizvodnju bioetanola iz biomase, jer je potrebna velika količina enzima: 100 g celulaze za jedan galon (3,785 L) bioetanola. Kako bi se smanjila količina potrebne celulaze uz povećanje produktivnosti, predloženo je integriranje procesa proizvodnje celulaze, hidrolize celuloze i fermentacije bioetanola u jedan korak.

Kako bi isplativost bila još veća radi se na inženjerski poboljšanim celuloznim enzimima s boljom katalitičkom učinkovitosti i toplinskom stabilnosti, kako bi ih se moglo reciklirati. Za što veću iskoristivost celulaze u budućnosti potrebno je što bolje razumjeti mehanizam hidrolize celuloze kao i vezu između strukture molekule, funkcija i svojstva supstrata. Dodatno poboljšanje predtretmana/frakcioniranja biomase moguće je npr. poboljšanjem reaktivnosti supstrata kako bi se smanjila upotreba celulaze te recikliranjem skupe celulaze adsorpcijom, koristeći slobodnu ili desorbiranu celulazu. Integrirana bioobrada mikroorganizmima bi pojednostavila cijeli proces proizvodnje i povećala produktivnost.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Korištene kemikalije

- tetraetoksisilan (TEOS), $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$, $M = 208,33 \text{ g/mol}$, čistoća 98 %, Fluka, Njemačka
- kloridna kiselina, HCl , $M = 36,46 \text{ g/mol}$, 36,5 %, Kemika, $\rho = 1,18 \text{ kg/L}$
- deionizirana voda, H_2O , $M = 18 \text{ g/mol}$
- heksadeciltrimetilamonijev bromid, > 98 %, SigmaAldrich, Kina
- poli(etilen-glikol)-*block*-poli(propilen-glikol)-*block*-poli(etilen-glikol) P123, Pluronic, $M = 5800,0 \text{ g/mol}$, Aldrich Chemical Company, SAD
- želatina, Dolcela, Podravka
- Dulbeccov fosfatni pufer (Dullbecco's phosphate – buffered saline solution, PBS), $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH = 7,4; vlastita priprava
- lipaza svinjske gušterače, SigmaAldrich, Japan
- celulaza gljivice *Aspergillus niger*, SigmaAldrich, SAD

3.2. Instrumentalne metode

- infracrvena spektroskopijska analiza s Fourierovom transformacijom i MIR-ATR detektorom, FTIR, Bruker VERTEX 70; uvjeti snimanja: 16 spektara, raspon: $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, rezolucija 2 cm^{-1}
- pretražni elektronski mikroskop, SEM – TESCAN VEGA 3 SBH Easy Probe, uzorak je prethodno naparen zlatom i paladijem
- pretražni elektronski mikroskop, SEM – Jeol JSM 5800, EDS, uzorak je prethodno naparen zlatom
- termogravimetrijska analiza (TGA), Netzsch STA 409, uzorci su zagrijavani do $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ brzinom $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ u atmosferi sintetskog zraka

3.3. Opis rada

3.3.1. Priprava mezoporoznog SiO₂

U Erlenmeyerovoj tikvici izvagan je određeni predložak i dodana mu je voda kao otapalo. Uzorak je miješan na magnetskoj miješalici dok se predložak nije otopio.

U drugoj Erlenmeyerovoj tikvici provedena je hidroliza TEOS-a s HCl (0,33 mol/dm³) kao katalizatorom uz neprestano miješanje dok se sustav nije homogenizirao. Količina TEOS-a određena je kako bi se dobio maseni omjer predložak/SiO₂ = 1/1.

Kad je otapanje odnosno homogenizacija završena, obje su otopine pomiješane i ostavljene na magnetskoj miješalici 24 sata. Zatim je smjesa izlivena u kalup i ostavljena na sobnoj temperaturi kako bi otapalo isparilo. Tako osušen uzorak žari se na 650 °C kako bi se korišteni predložak uklonio. Na kraju se uzorak usitnjava u tarioniku.

Kod uzoraka D i E priprema se odvijala u jednoj Erlenmeyerovoj tikvici. Dodan je predložak, kiselina (2 mol/dm³ HCl) i voda, a TEOS je dodan nakon što se predložak otopio. Daljnji postupak je isti.

Tablica 1. Količina kemikalija korištenih u pripravi pojedinih uzoraka

Uzorak	$m(\text{TEOS}) / \text{g}$	Predložak	$m(\text{predložak}) / \text{g}$	$V(\text{voda}) / \text{mL}$	$V(\text{HCl, aq}) / \text{mL}$
A1	3,540	želatina	1,004	10	5
A2	3,543	surfaktant	1,009	10	5
A3	3,540	P123	1,010	10	5
B1	3,550	želatina	1,000	10	5
B2	3,545	surfaktant	1,000	10	5
B3	3,547	P123	1,000	10	5
C3	7,000	P123	1,002	40	10
D1	3,545	želatina	1,003	40	10*
D2	3,539	surfaktant	0,999	40	10*
D3	3,550	P123	1,002	40	10*
E1	3,554	želatina	1,008	40	10*
E2	3,543	surfaktant	1,000	40	10*
E3	3,540	P123	1,003	40	10*

* 2 mol/dm³HCl; gdje nije označeno dodana je 0,33 mol/dm³ HCl

Pripremljeni uzorci analizirani su FTIR-om, SEM-om s EDS analizom i TG analizom.

3.3.2. Imobilizacija enzima

Na 40 mg mezoporoznog SiO_2 dodano je 20 mL fosfatnog pufera. Suspenzija je tretirana ultrazvučno 10 minuta radi razbijanja aglomerata čestica i homogenizacije. Nakon toga suspenziji je dodano 40 mg enzima i uzorak postavljen na tresilicu na 150 o/min pri 25 °C 24 h. Na uzorcima A i E adsorbirana je lipaza, dok je na uzorcima B i D adsorbirana celulaza. Nakon toga uzorak je centrifugiran 10 min kako bi se SiO_2 s imobiliziranim enzimom izdvojio iz otopine. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, uzorci su karakterizirani FTIR, TGA i EDS analizom kako bi se potvrdila uspješna imobilizacija enzima na porozni nosač.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. SEM analiza

Morfologija i oblik uzoraka promatrani su pretražnim elektronskim mikroskopom. Bilo je poteškoća s dobivanjem većih povećanja uslijed nabijanja uzorka. Naime, zbog svoje poroznosti ni naparivanjem nisu postali dovoljno vodljivi za nesmetan rad.

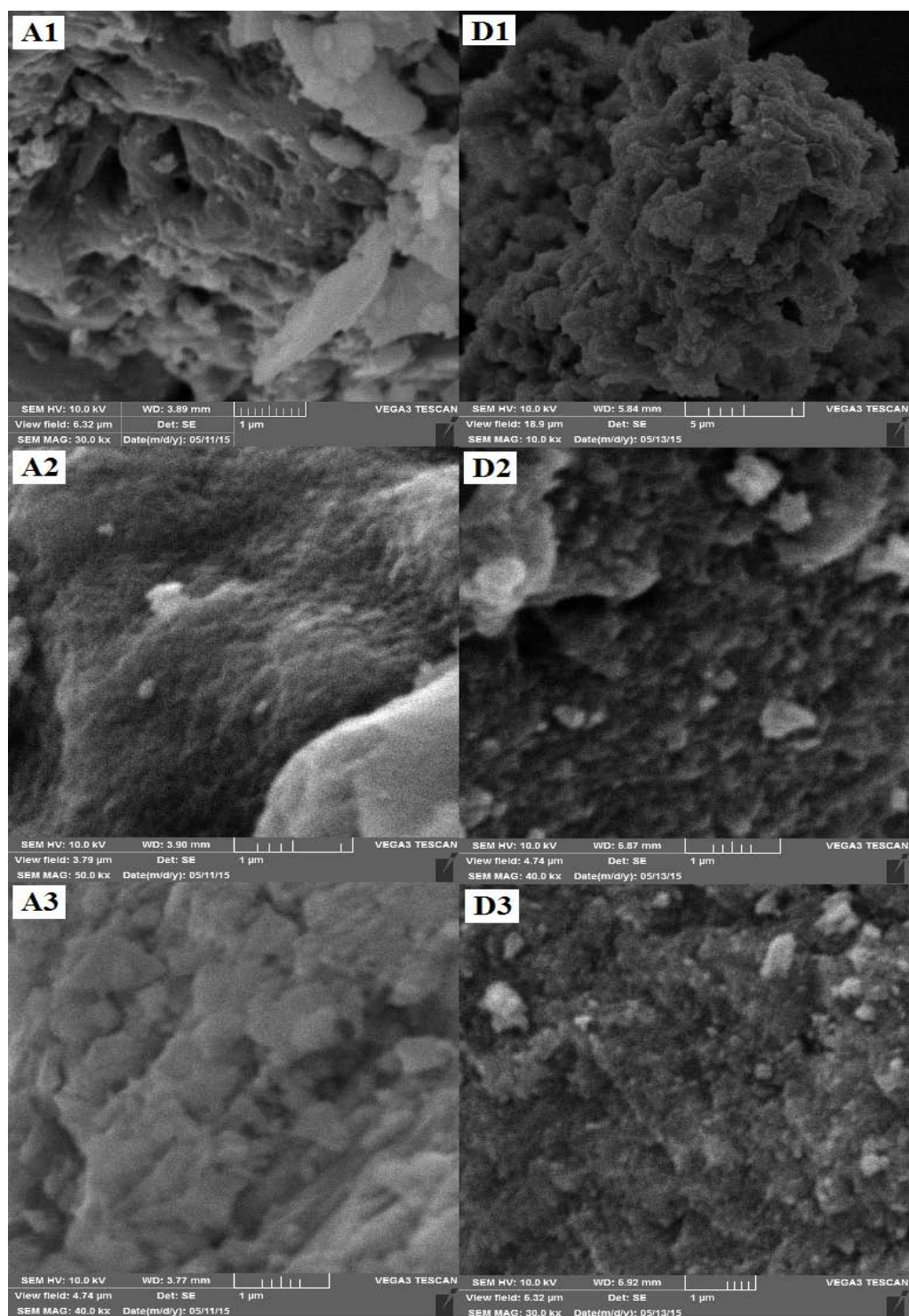
Uzorci su pripremljeni s tri različite metode (tablica 1). Metodom s manjom koncentracijom kiseline dobiveni su uzorci A i B, dok je za D i E korištena kiselina veće koncentracije te veća količina otapala. Na SEM mikrografima na slici 6, za usporedbu su prikazani uzorci A i D kao predstavnici uvjeta pripreme, a odabrane su slike na kojima je postignuto najveće povećanje. Uzorak C je pripremljen sa većom količinom otapala i dvostrukom količinom TEOS-a te je prikazan na slici 7.

Iako želatina pokazuje određenu površinsku aktivnost, ona je manje izražena nego kod ostalih korištenih predložaka. Uzorak A1 pokazuje nehomogenu raspodjelu pora te prisutnost pora različitih veličina, uključujući i makropore, dok kod uzorka D1 nema naznaka poroznosti, bar ne na ovom povećanju. U kiselom mediju, H^+ ioni stvaraju elektrostatske veze s amino skupinama želatine, što uzrokuje međusobno odbijanje molekula želatine i stvaranje manjih predložaka. Veća količina otapala također će utjecati na udaljenost među molekulama, što više otapala ima, molekule će biti udaljenije. Kako je D1 pripremljen u sustavu sa većom koncentracijom kiseline i s većom količinom otapala, moguće da su nastale pore premale da bi se vidjele pri ovom povećanju. Zbog nevodljivosti uzorka nije bilo moguće izoštriti sliku na većem povećanju.

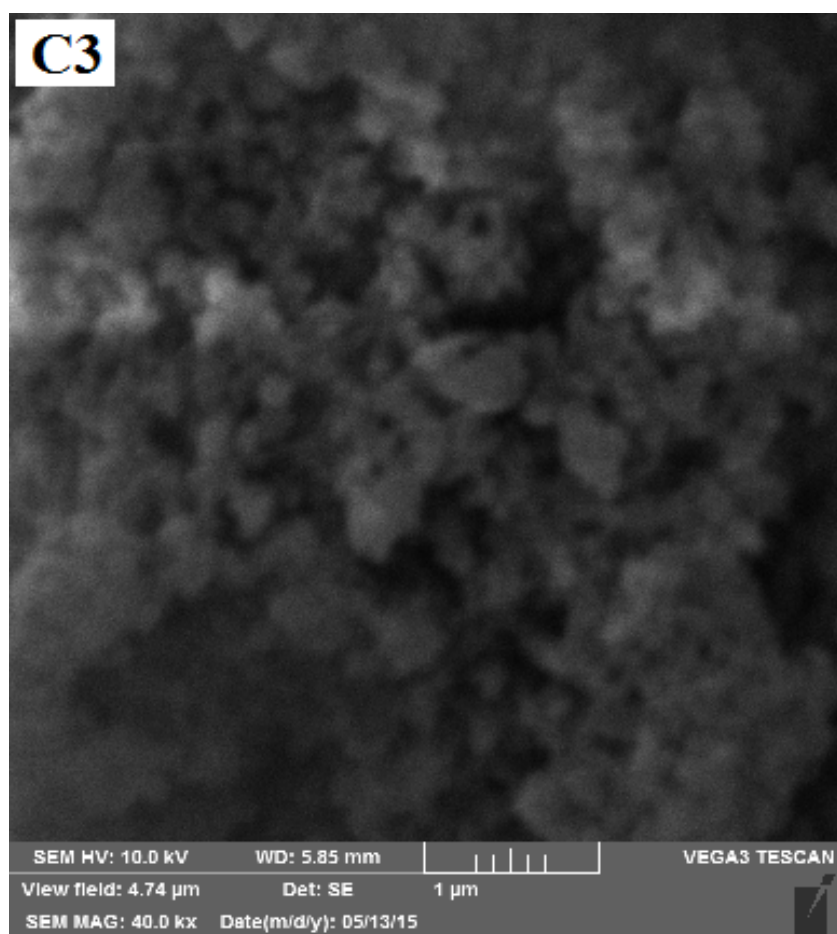
Korištenjem surfaktanta kao predložka dobiva se porozna struktura koja je izraženija kod materijala pripremljenog s manje otapala (uzorak A2). Molekule surfaktanta u vodi stvaraju micelle oko kojih se formira anorganska mreža. Nakon uklanjanja surfaktanta, uzorak ostaje porozan. Razrjeđenjem otopine dolazi do smanjenja koncentracije surfaktanta, što uzrokuje razdvajanje molekula koje će stvarati puno manje pore koje nisu vidljive na ovom povećanju (uzorak D2).

Pluronic P123 omogućava dobivanje poroznih materijala uz korištenje većih količina otapala. Kod manjeg razrjeđenja dolazi do aglomeracije polimernih molekula, zbog čega ili nastaju prevelike pore ili dolazi do razdvajanja polimera od SiO_2 mreže tokom kondenzacije

(uzorak A3). Dodatkom više otapala, dolazi do razdvajanja polimernih lanaca te stvaranja predloška pogodnog za nastajanje mezopora kondenzacijom SiO_2 (uzorak D3).



Slika 6. SEM mikrografi uzoraka A i D pripremljenih uz različite predloške (1 = želatina, 2 = surfaktant, 3 = Pluronic P123)



Slika 7. SEM mikrograf uzoraka C3

Na slici 7. prikazan je SEM mikrograf uzorka C pripremljenog uz predložak Pluronic P123 i prikazan na povećanju od 40 000 puta. Dobiven je porozni materijal, ali su vidljive pore veće od očekivanih. Kako se nije pokazao boljim od ostalih uzoraka pripremljenih s Pluronic P123 predloškom, s njime se nije dalje radilo.

4.2. EDS analiza

Elementarnom analizom uzorka provjerilo se je li adsorpcija enzima na mezoporozni SiO_2 bila uspješna. U tablici 2. dani su rezultati EDS analize odabranih uzoraka (po jedan za svaki enzim i za svaku metodu pripreve), kao srednje vrijednosti 6 mjerenja. Preciznost mjerenja je bila veća od očekivane točnosti EDS metode na nepoliranim uzorcima ($\pm 5\%$), pa nije dan raspon vrijednosti.

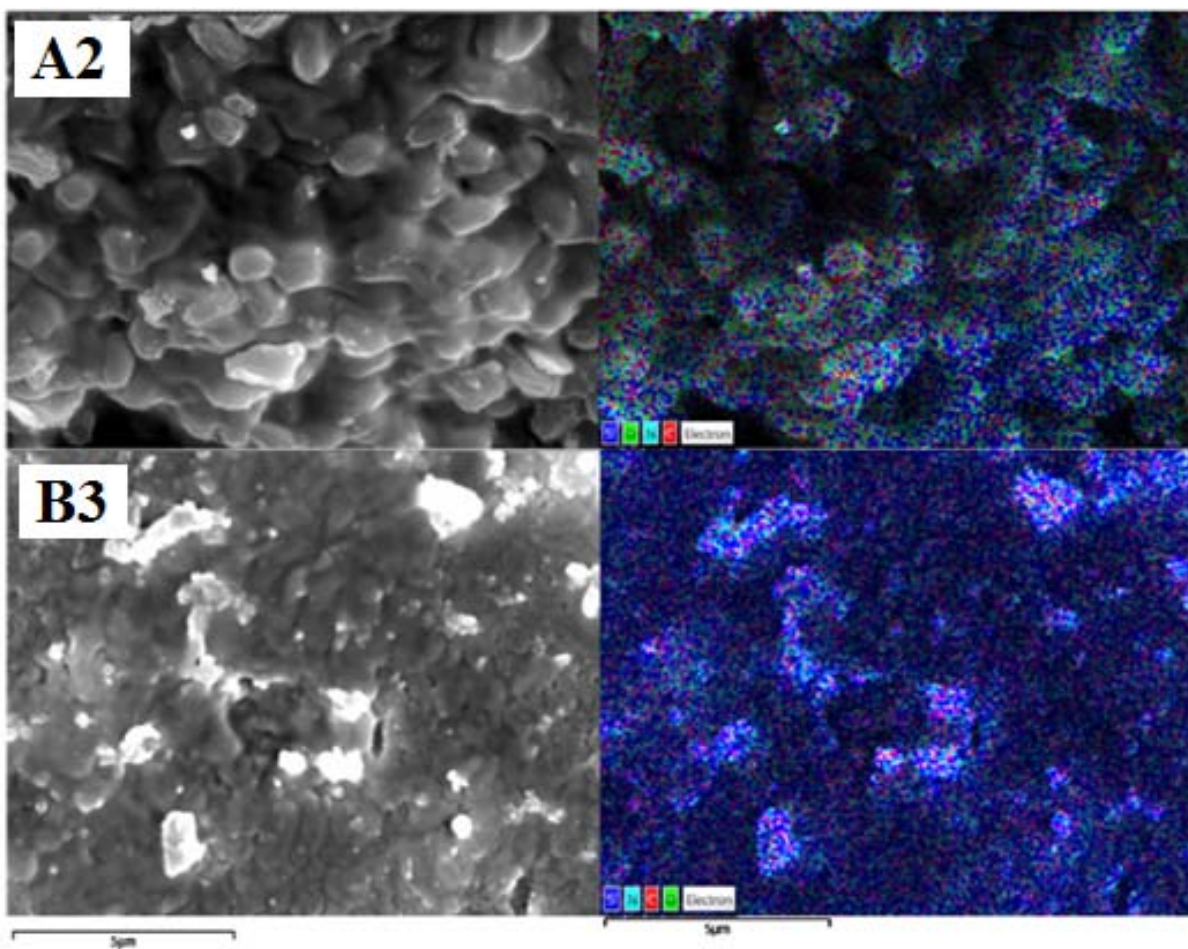
Tablica 2. Maseni udio pojedinih elemenata određen EDS analizom

	A2	B3	D1	E1
C	-	44 %	38 %	30 %
O	16 %	21 %	42 %	40 %
Si	19 %	29 %	13 %	14 %
N	1 %	2 %	-	3 %
C/Si	-	1,5	2,9	2,1

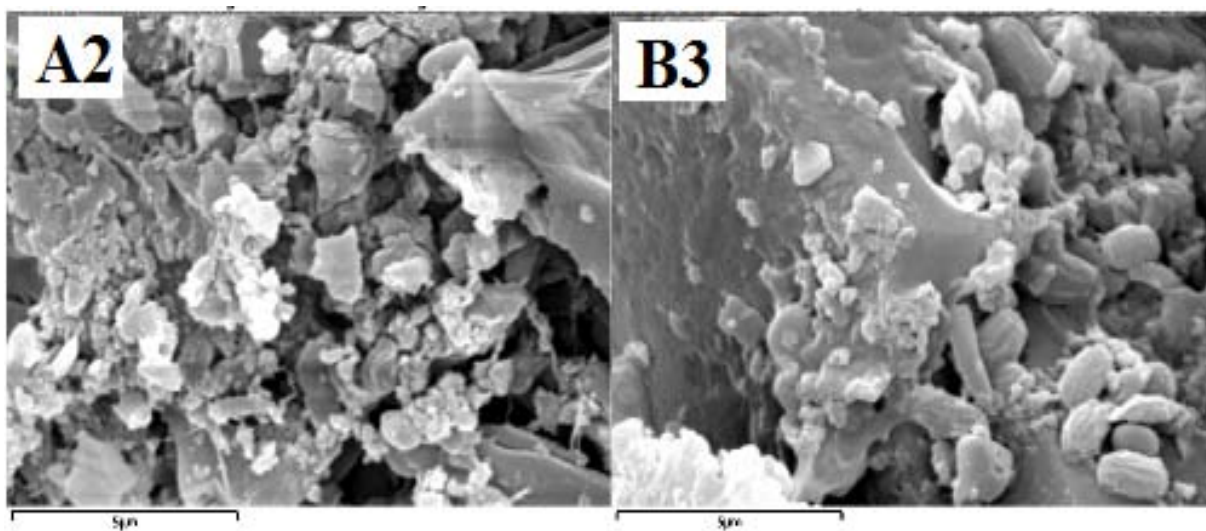
Razliku do 100 % čine udjeli elemenata koji su zaostali iz otopine PBS-a te elementi korišteni za naparivanje uzoraka za analizu.

Uzorak A2 je nakon centrifugiranja ispran 3 puta deioniziranom vodom, dok ostali uzorci nisu. Ispiranjem je došlo do otpuštanja vezanog enzima, što se vidi iz potpunog nestanka ugljika i smanjenog udjela dušika. Na slici 11. gdje je prikazana distribucija kemijskih elemenata na površini uzorka, vidi se da je kod uzorka A2 ipak zaostao dio ugljika, odnosno enzima.

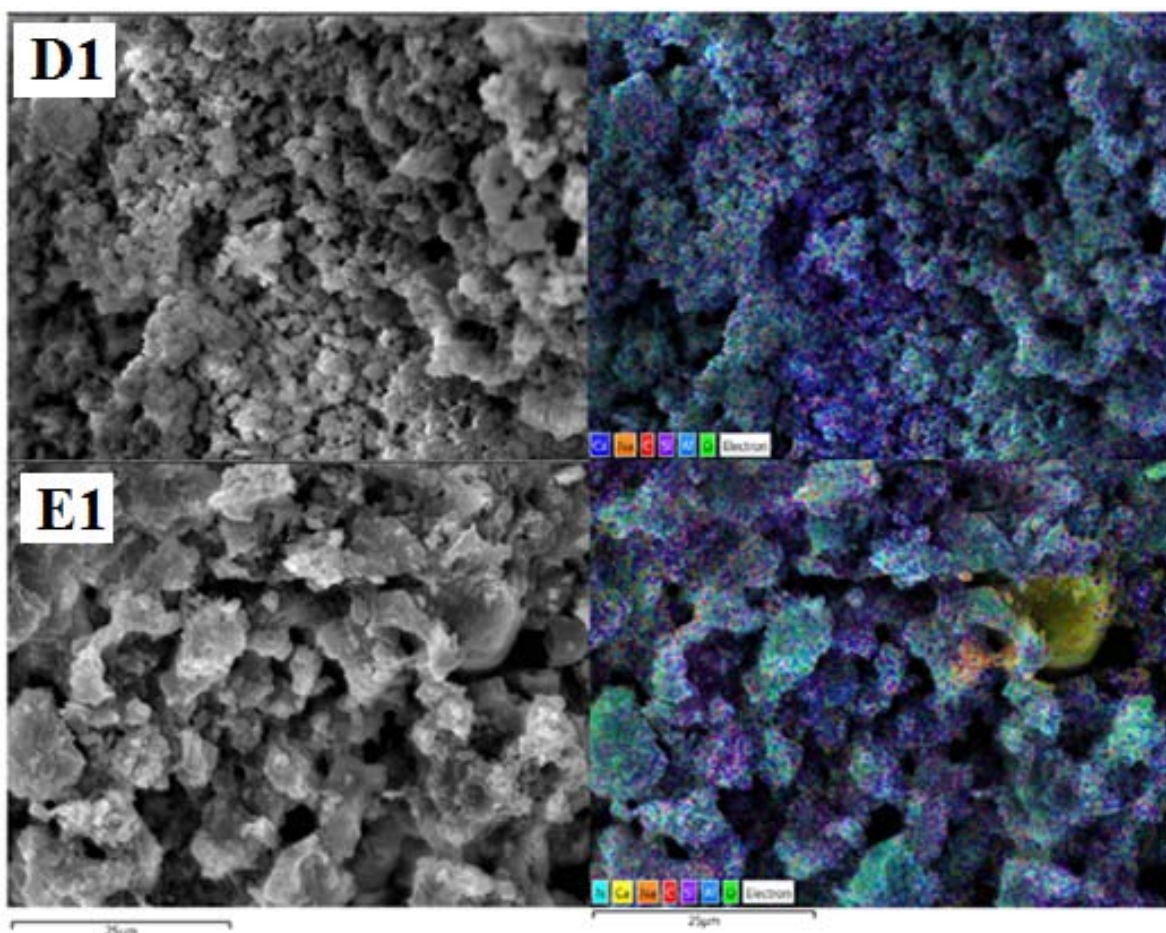
Ostali uzorci imaju veliki udio ugljika. Gledajući omjer udjela C i Si, najviše enzima se vezalo na površinu uzorka D1, zatim E1 i konačno B3. Iz toga se može zaključiti da je metoda u jednom koraku s više otapala i višom koncentracijom kiseline (serija D i E) prikladnija za adsorpciju enzima. S druge strane, EDS ne može odrediti koliko je uspješno enzim adsorbiran u unutrašnjosti pora.



Slika 11. Distribucija kemijskih elemenata na površini uzoraka A2 i B3 određena EDS analizom, povećanje 10 000 x



Slika 12. SEM mikrografi uzoraka A2 i B3 bez enzima pri povećanju 10 000 x

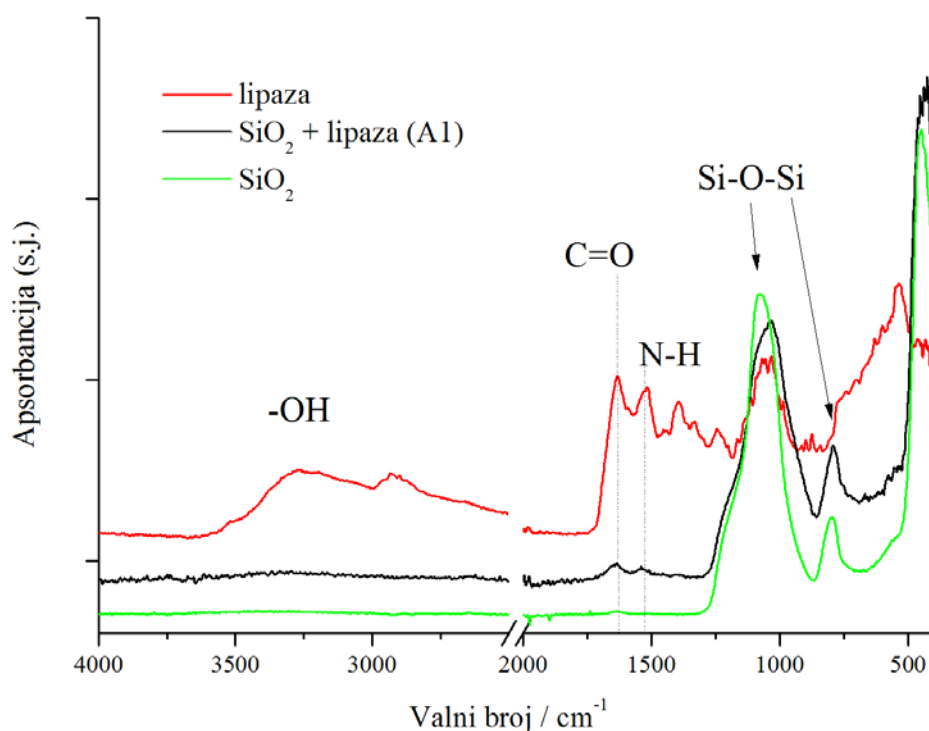


Slika 13. Distribucija kemijskih elemenata na površini uzoraka D1 i E1 određena EDS analizom, povećanje 2000 x

Površina uzoraka je glatka odnosno vidi se sloj prevučen preko površine SiO_2 što se vidi kada se usporede slika 11. i 12., a to ukazuje na uspješno vezanje enzima. Na EDS slikama 11. i 13. može se vidjeti ravnomjerna raspoređenost analiziranih elemenata na površini uzoraka. Prisutnost ugljika i dušika na svim uzorcima ukazuje da su oba enzima uspješno adsorbirana na površinu SiO_2 . Ostali elementi prisutni na površini (kalcij, natrij) zaostali su iz fosfatnog pufera koji je korišten kao medij prilikom imobilizacije enzima. Zbog veće koncentracije kiseline korištene prilikom pripreme uzoraka D i E, za vrijeme starenja gela u aluminijskom lončiću došlo je do otapanja manjih količina aluminija.

4.3. FTIR analiza

Kako bi smo potvrdili adsorpciju enzima, provedena je FTIR analiza koja je nedvojbeno pokazala da na uzorcima imamo imobilizirane enzime. Prema literaturi, vrpce karakteristične za enzime nalaze se na 1636 cm^{-1} i 1540 cm^{-1} i odnose se redom na C=O vezu te na N-H vezu. Karakteristične vrpce za Si-O-Si vezu se nalaze na 1098 , 800 i 470 cm^{-1} [1, 28].

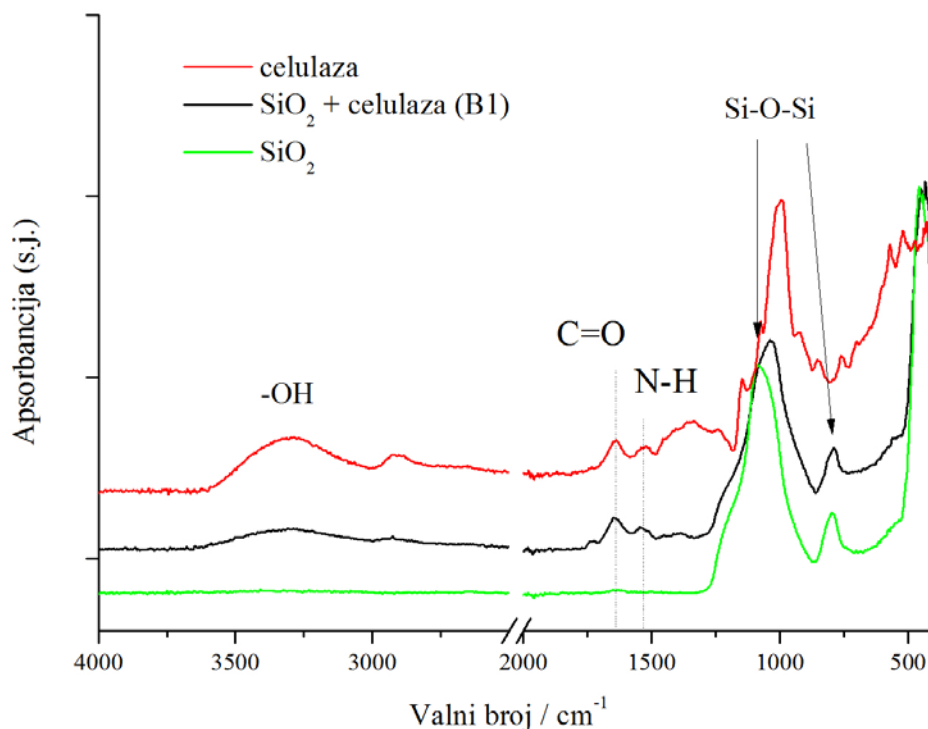


Slika 14. FTIR spektar lipaze u usporedbi s imobiliziranom lipazom i SiO_2

FTIR analiza potvrđuje uspješno vezanje lipaze za površinu SiO_2 (slika 14). Na spektrima se može vidjeti vrpca karakteristična za rastezanje C=O veze na 1633 cm^{-1} te ona karakteristična za vibracije savijanja N-H veze na 1540 cm^{-1} . Pojava ovih vrpci nakon tretmana u PBS-u ukazuje na primjenjivost ovog jednostavnog postupka za imobilizaciju enzima. Spektri snimljeni za uzorke nakon dodatka celuloze (slika 15.) pokazuju iste karakteristične vrpce za enzime, uz minimalni pomak (C=O na 1637 cm^{-1} , N-H na 1544 cm^{-1}).

Uspoređujući spektre za čisti SiO_2 i čistu lipazu, odnosno celulazu, može se primijetiti preklapanje vrpce koja nastane kondenzacijom i stvaranjem SiO_2 mreže ($\sim 1100\text{ cm}^{-1}$) sa vrpicama karakterističnim za organske lance (CH_2 skupine). Ipak, vidi se razlika između čistog

SiO₂ i onog sa vezanim enzimom jer dolazi do blagog pomaka na vrijednost valnog broja između čistih komponenata.



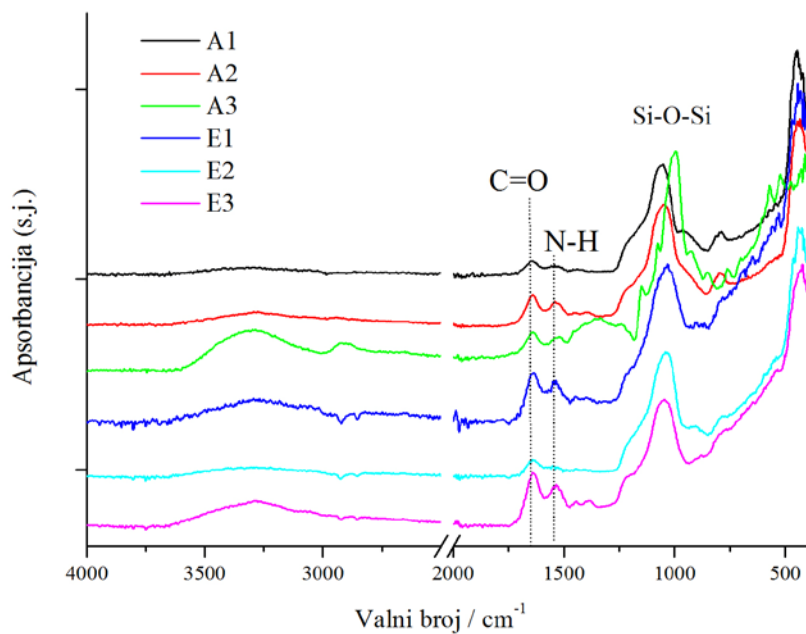
Slika 15. FTIR spektar celuloze u usporedbi s imobiliziranom celulozom i SiO₂

Na slikama 16. i 17. prikazani su spektri svih uzoraka s imobiliziranim enzimima. Na svim uzorcima se mogu vidjeti karakteristične vrpce, što znači da je imobilizacija uspješna bez obzira na način sinteze SiO₂ i korištenog predloška za dobivanje pora. Prema intenzitetu vrpce, možemo primijetiti da se lipaza uspješnije imobilizira od celuloze.

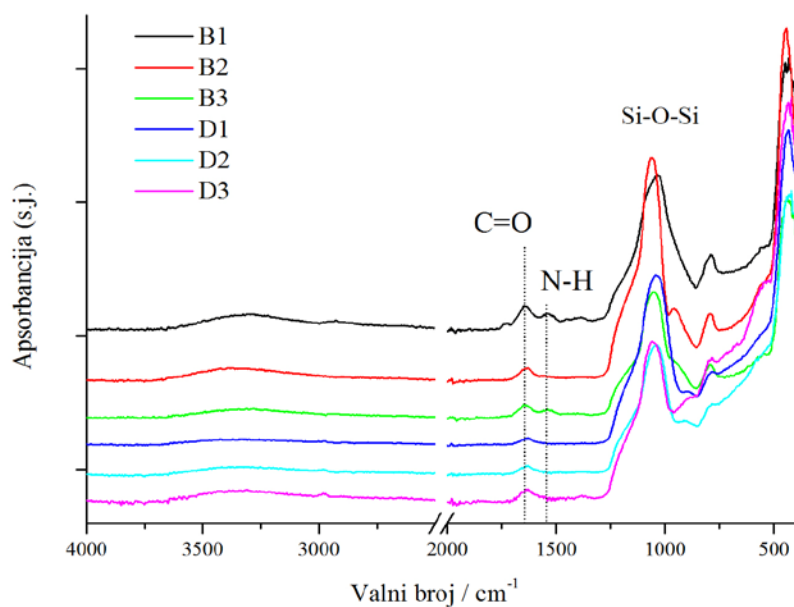
Kod svih uzoraka na slikama 16. i 17. može se primijetiti vrpca na 3000 – 3500 cm⁻¹, što je karakteristično za -OH skupine te se može pretpostaviti da enzimi vežu na sebe vlagu, što je izraženije kod lipaze nego celuloze.

Veći intenziteti vrpce N-H i C=O ukazuju na prisutnost većeg udjela enzima, što ukazuje na veću ukupnu površinu, odnosno veću poroznost te nastajanje pora pogodnih za imobilizaciju enzima. Priprema uzoraka s manjom količinom otapala pokazala se uspješnijom za

surfaktantni predložak, dok želatini i Pluronicu P123 više odgovara veća količina otapala i kiseliji uvjeti, što se poklapa sa SEM analizom.

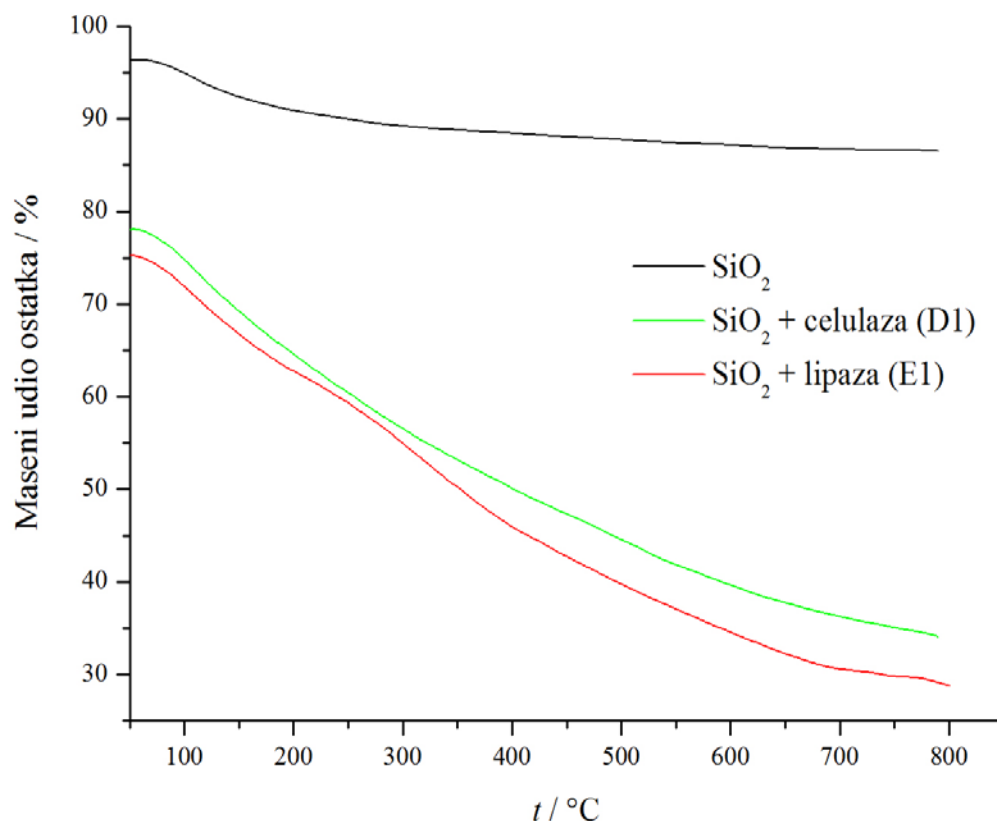


Slika 16. FTIR spektri imobilizirane lipaze



Slika 17. FTIR spektri imobilizirane celulaze

4.4. TGA analiza



Slika 18. TGA krivulja SiO₂ uzoraka D1 i E1 i uzorka bez enzima

Rezultati termogravimetrijske analize pripremljenih uzoraka nakon imobilizacije enzima uspoređeni su sa čistim mezoporoznim SiO₂. Za TGA su odabrani uzorci D1 i E1 jer su pripremljeni istom metodom, uz želatinu kao predložak. TGA krivulje ne počinju od 100 %, pošto je prije početka mjerenja instrument stabiliziran na 40 °C 20 min, pri čemu je došlo do djelomičnog sušenja uzorka te odgovarajućeg pada mase. Kod svih uzoraka, gubitak mase do 100 °C pripisuje se izlasku adsorbirane vode, odnosno vlage. Može se vidjeti da uzorci D1 i E1 sadrže znatno više vlage, vjerojatno dodatno adsorbirane na enzime prilikom njihove imobilizacije. Nakon tog početnog pada, masa uzorka čistog SiO₂ ostaje gotovo konstantna do kraja mjerenja te maseni udio ostatka dostiže vrijednost od 86 %. Kod uzoraka na koje su vezani enzimi pad se nastavlja i na višim temperaturama zbog izgaranja enzima. Maseni udio ostatka ovih uzoraka iznosi 34 % za uzorak D1 i 29 % za uzorak E1. Uz pretpostavku da sva

voda izađe iz uzorka do 200 °C, može se izračunati udio vezanih enzima: 30 % celulaze i 34 % lipaze.

Kao i FTIR rezultati, TGA pokazuje nešto veći udio vezane lipaze nego celulaze. Osim toga, kod uzorka E1 veći je početni pad mase zbog gubitka vlage, što se poklapa sa FTIR spektrima koji za uzorke s lipazom pokazuju veće intenzitete pri valnom broju $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$, što je karakteristično područje za $-\text{OH}$ skupine. Udjeli izračunati iz TGA rezultat slični su udjelima dobivenima EDS analizom.

5. ZAKLJUČAK

- ✓ Različiti predlošci utječu na strukturu krajnjeg mezoporoznog materijala. Iako je želatina najbolji predložak zbog svoje netoksičnosti i biorazgradivosti, dobiva se nehomogena distribucija pora različitih promjera. Kod veće količine otapala ostavlja se mogućnost prisutnosti jako sitnih pora.
- ✓ Korištenjem surfaktanta porozna struktura je bolje vidljiva kod materijala dobivenog s manje otapala.
- ✓ Predlošku Pluronic P123 više pogoduje veća količina otapala za dobivanje porozne strukture materijala.
- ✓ Korištenjem većeg udjela TEOS-a ne utječe se na poroznost dobivenog materijala.
- ✓ Adsorpcija enzima ravnomjerna na površini SiO_2 nosača bez obzira na način pripreme.
- ✓ Ispitivanjem na FTIR-u pokazano je da su se korišteni enzimi vezali na površinu SiO_2 nosača. Dobivaju se karakteristične vrpce za istezanje C=O i N-H veze.
- ✓ Lipaza se uspješnije imobilizira od celulaze što se vidi po intenzitetu vrpce na FTIR spektru, a potvrđeno je EDS i TGA analizom.
- ✓ TGA analizom uočava se gubitak mase kojim se potvrđuje prisutnost enzima na uzorcima. Iz masenog udjela ostatka izračunat je udio imobiliziranih enzima koji za lipazu iznosi 34 %, dok je za celulazu 30 %.
- ✓ Sol-gel metoda u jednom koraku s više otapala i višom koncentracijom kiseline (serija D i E) prikladnija je za adsorpciju enzima što je pokazano EDS analizom gdje se vidi veći omjer C/Si.
- ✓ Prijedlog za daljnja istraživanja jest ispitati poroznost uzoraka adsorpcijsko-desorpcijskom analizom te ispitati aktivnost enzima nakon imobilizacije te stabilnost adsorpcije i uvjete ispiranja enzima s nosača.

6. LITERATURA

- [1] X. Wang, G. Zhou, H. Zhang, S. Du, Y. Xu, C. Wang, Immobilization and catalytic activity of lipase on mesoporous silica prepared from biocompatible gelatin organic template; *Journal of Non-Crystalline Solids*, 357 (2011) 3027–3032
- [2] G. Kickelbick (ur.), *Hybrid Materials: Synthesis characterization and applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2007.
- [3] H. Setyawan, R. Balgis, Mesoporous silicas prepared from sodium silicate using gelatin templating; *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering* 7 (2012) 448–454
- [4] V.V. Gulians, M.A. Carreon, Y.S. Lin, Ordered mesoporous and macroporous inorganic films and membranes; *Journal of Membrane Science* 235 (2004) 53–72
- [5] J. Jiu, K. Kurumada, M. Tanigaki, Preparation of nanoporous silica using copolymer template; *Materials Chemistry and Physics* 78 (2002) 177–183
- [6] Želatina; <http://en.wikipedia.org/wiki/Gelatin>
- [7] Površine i međupovršine, koloidni sustavi; skripta za kolegij Formulacijsko inženjerstvo, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
- [8] Polimeri; skripta za kolegij Polimerno inženjerstvo, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu
- [9] C.-H. Hsu, H.-P. Lin, C.-Y. Tang, C.-Y. Lin, Synthesis of mesoporous silicas with different pore sizes using PEO polymers via hydrothermal treatment: A direct template for mesoporous carbon; *Materials Chemistry and Physics* 100 (2006) 112–116
- [10] J. Macan, Organsko-anorganski hibridi dobiveni sol-gel procesom: kinetika očvršćivanja i svojstva; Magistarski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2002.
- [11] J. Macan, Sol-gel postupak za pripravu hibridnih materijala; *Kemija u Industriji* 14 (2008) 355-361.
- [12] T. Filetin, Primjena nanomaterijala u tehnici; Bilten br. 1, Razred za tehničke znanosti HAZU, 2003, 29-52, http://titan.fsb.hr/~tfiletin/en/data/_uploaded/clanci/HAZUnano1.pdf

- [13] K. Mauritz, Sol-gel chemistry and technology;
<http://www.ncu.edu.tw/~stchiang/ch848/related/set1/The%20Sol-gel%20Gateway%20%20Educational%20materials.files/solgel.htm>
- [14] A. Bajaj, P. Lohan, P. N. Jha, R. Mehrotra, Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview; *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62 (2010) 9–14
- [15] N. Mustapić, Intenzifikacija procesa proizvodnje biodizela pomoću kavitacije; Doktorska disertacija, Tehnički fakultet Sveučilišta u Rijeci, 2012.
- [16] T. Krička, F. Tomić, N. Voća, Ž. Jukić, V. Janušić, A. Matin, Proizvodnja obnovljivih izvora energije u EU; *Zbornik radova znanstvenoga skupa Poljoprivreda i šumarstvo kao proizvođači obnovljivih izvora energije*, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti, Zagreb 2007, 11–17
- [17] D. Y. C. Leung, X. Wu, M. K. H. Leung, A review on biodiesel production using catalyzed transesterification; *Applied Energy* 87 (2010) 1083–1095
- [18] J. Beck, Biogorivo šteti okolišu i povećava glad na svijetu; <http://www.dw.de/biogorivo-%C5%A1teti-okoli%C5%A1u-i-pove%C4%87ava-glad-na-svijetu/a-14880835>
- [19] O. Stamenković, Kinetika bazno-katalizovane metanolize suncokretovog ulja na niskim temperaturama; Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet u Leskovcu Sveučilišta u Nišu, 2008.
- [20] D. Kiš, T. Jurić, R. Emert, I. Plaščak, Alternativno gorivo – biodizel; *Poljoprivreda* 12 (2006) 41-46
- [21] Z. Janović, Naftni i petrokemijski procesi i proizvodi; Hrvatsko društvo za goriva i maziva, 2. izdanje, Zagreb, 2011.
- [22] Bioetanol; <http://hr.wikipedia.org/wiki/Bioetanol>
- [23] Celulozni etanol; http://hr.wikipedia.org/wiki/Celulozni_etanol
- [24] A. Guldhe, B. Singh, T. Mutanda, K. Permaul, F. Bux, Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches; *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 41 (2015) 1447–1464

- [25] A. Gog, M. Roman, M. Tos, C. Paizs, F. D. Irimie, Biodiesel production using enzymatic transesterification: Current state and perspectives; *Renewable Energy* 39 (2012) 10-16
- [26] T. Tan, J. Lu, K. Nie, L. Deng, F. Wang, Biodiesel production with immobilized lipase: A review; *Biotechnology Advances* 28 (2010) 628–634
- [27] X.-Z. Zhang, Y.-H. P. Zhang, Cellulases characteristics, sources, production and applications u: S.-T. Yang, H. A. El-Enshasy, N. Thongchul (ur.), *Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production off fuels, chemicals, and polymers*; 1st edition, John Wiley & Sons, Hoboken NJ, 2013, 131–142
- [28] R. E. Abraham, L. Verma, C. J. Barrow, M. Puri, Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass; *Biotechnology for Biofuels* 7 (2014) 90 (12 str.)

Životopis

Rođena 31.05.1990. u Pakracu gdje sam završila osnovnu školu i gimnaziju u Srednjoj školi Pakrac. Prisustvovala brojnim županijskim natjecanjima iz matematike, fizike, kemije i geografije. U 1., 2. i 4. razredu srednje škole osvojila prvo mjesto na Županijskom natjecanju iz matematike te ujedno prisustvovala Državnom natjecanju iz matematike.

2009. godine upisala preddiplomski Sveučilišni studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Preddiplomski Sveučilišni studij završila s pohvalom cum laude.

Stručnu praksu odradila na drugoj godini fakulteta u Studencu, Podravka u Lipiku.

2013. godine upisala diplomski Sveučilišni studij Kemijsko procesno inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu.

2014. godine na prvoj godini diplomskog studija dobila Rektorovu nagradu za rad Uvećanje sušionika s fluidiziranim slojem. Sudjelovala na XV. Ružičkinim danima s radom Kinetika sušenja katalizatora u sušioniku s fluidiziranim slojem.

1. travnja 2015. godine zaposlila se u Plivi kao tehničar u laboratoriju/polutehnici u odjelu Pretformulacija.