Proizvodnja lipaze iz Thermomyces lanuginosus u cilju razvoja održivog procesa enzimske sinteze biodizela

Tadić, Toma

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:109:410691

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Toma Tadić

PROIZVODNJA LIPAZE IZ *Thermomyces lanuginosus* U CILJU RAZVOJA ODRŽIVOG PROCESA ENZIMSKE SINTEZE BIODIZELA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, lipanj, 2019.

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

Diplomski sveučilišni studij procesnog inženjerstva

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Nastavni predmet: Kemijski i biokemijski reaktori
Tema rada je prihvaćena na VI. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2017./2018.
Mentor: izv. prof. dr. sc. *Marina Tišma*
Pomoć pri izradi: dr. sc. *Anita Šalić* (Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu)

PROIZVODNJA LIPAZE IZ *Thermomyces lanuginosus* U CILJU RAZVOJA ODRŽIVOG PROCESA ENZIMSKE SINTEZE BIODIZELA

Toma Tadić, 460-DI

Sažetak:

Enzimski kataliziranom transesterifikacijom biljnih ulja uz prisustvo alkohola (metanola) proizvodi se biodizel visoke čistoće pri blažim procesnim uvjetima (pH, temperatura), za razliku od kemijski katalizirane transesterifikacije koja je energetski zahtjevnija jer se odvija na višim temperatura uz mogućnost nastajanje neželjnih produkata koje je potrebno ukloniti. U ovome radu istraživan je proces proizvodnje enzima lipaza tijekom uzgoja gljive *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na trima različitim supstratima, pogači buče, konoplje i lana, s ciljem daljnje primjene lipaze u sintezi biodizela iz suncokretovog ulja i metanola. Svakodnevno su mjerene volumna i specifična aktivnost lipaze tijekom 9 dana fermentacije. Najveća volumna i specifična aktivnost lipaze postignuta je u pokusu u kojem je korištena pogača konoplje kao supstrat (*V.A.* = 41,3 U cm^{-3}, *S.A.* = 68,2 U mg^{-1}). Postupkom isoljavanja s amonijevim sulfatom, volumna i specifična aktivnost enzima lipaza povećana je za deset puta. Udio metilnih estera nastalih transesterifikacijom u konačnom produktu primjenom komercijalnog enzima lipaza kao katalizatora iznosila je 95,2 %, a primjenom vlastito proizvedenog nepročišćenog enzima lipaza 11,5 %.

Ključne riječi: biodizel, lipaza, *Thermomyces lanuginosus,* enzimski katalizirana transesterifikacija, pogača buče, konoplje i lana

Rad sadrži: 54 stranica
20 slika
2 tablice
28 literaturnih referenci
7 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: 10. lipanj 2019.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of process engineering
Subdepartment of thermodynamic and reaction engineering
Franje Kuhaca 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program process engineering

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food technology
Course title: Chemical and biochemical reactors
Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. 6 in academic year 2017/2018.
Mentor: *Marina Tišma, PhD, associate prof.*
Technical asistance dr. sc. *Anita Šalić* (Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb)

PRODUCTION OF LIPASE FROM *Thermomyces lanuginosus* IN AIM OF SUSTANIBLE DEVELEPOMENT OF ENZYME SYNTHESIS OF BIODIESEL

Toma Tadic, 460-DI

Summary:

In an enzyme-catalysed transesterification of plant oils in the presence of alcohol (methanol), biodiesel of high purity under mild conditions of pH and temperature can be produced, in comparison with chemically catalysed transesterification. In the chemically catalysed transesterification, the process conditions are more extreme because of the higher temperature with possibilities of development undesired products which have to be separated. In this work, the production of a lipase from *Thermomyces lanuginosus* was investigated under solid state conditions using three different substrates, cakes obtained after production of pumpkin, hemp and flax oils, with the aim to apply the produced lipase in the production of biodiesel from sunflower oil and methanol. Volume and specific activities of the enzyme were measured daily during nine days of fermentation. The highest volume and specific activities were obtained in the experiment when hemp oil cake was used as a substrate (*V.A.* = 41.3 U cm^{-3}, *S.A.* = 68.2 U mg^{-1}). Ten folds higher lipase activites were reached after the subsequent salting-out process with ammonium sulphate. The amount of methyl esters in the final product obtained by application of commercial lipase as catalyst was 95.2%, while in the experiment performed with crude enzyme it was 11.4%.

Key words: lipase, *Thermomyces lanuginosus*, enzyme catalysed transesterification, pumpkin, hemp and flax oil cake

Thesis contains: 54 pages
20 figures
2 table
28 references
7 sumplements

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: June 10, 2019.

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

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

Veliku zahvalnost dugujem svojoj dragoj i cijenjenoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Tišmi koja mi je omogućila svu potrebnu opremu za rad, pomogla svojim savjetima, odvajala svoje vrijeme te bila uvijek pristupačna i strpljivo odgovarala na sve moje upite.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Sandri Budžaki za sve dodatne savjete i usmjeravanja tijekom izrade ovoga rada.

Zahvaljujem se i doc. dr. sc. Aniti Šalić za svu pomoć pri izvedbi eksperimentalnog dijela rada i za sve sate provedene u laboratoriju.

Hvala svim mojim dragim prijateljima i kolegama koji su uvijek bili uz mene i ispunili moj studentski život.

Hvala mojoj djevojci koja me motivirala i bila uz mene tijekom cijelog ovog razdoblja.

Veliko hvala mojoj obitelji, posebno mojoj majci koja je uvijek bila uz mene i bez koje sve ovo ne bi bilo moguće.

Veliko hvala svima!

Sadržaj

1. UVOD 1

2. TEORIJSKI DIO 3

2.1. Biodizel 4

2.2. Lipaze 6

2.3. Proizvodnja enzima u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima 7

2.4. Proizvodnja lipaze tijekom uzgoja filamentoznih gljiva u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima 12

3. EKSPERIMENTALNI DIO 15

3.1.Zadatak 16

3.2. Mikroorganizam i supstrati 16

3.2.1. Mikroorganizam 16

3.2.2. Supstrati 17

3.3. Popis kemikalija i opreme 18

3.3.1. Kemikalije 18

3.3.2. Katalizatori 18

3.3.3. Inkubator 19

3.3.4. Centrifuga 20

3.3.5. Spektofotometar 21

3.3.6. Plinski kromatograf 22

3.3.7. Bioreaktori 22

3.4. Metode 24

3.4.1. Proizvodnja enzima lipaza uzgojem gljive *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima 24

3.5. Pročišćavanje lipaze 25

3.7.Proizvodnja biodizela s komercijalnom lipazom i vlastito proizvedenom lipazom u kotlastom reaktoru 27

3.8. Analitičke metode 28

3.8.1. Određivanje volumne i specifične aktivnosti enzima lipaza 28

3.8.2. Mjerenje koncentracije proteina 30
3.8.3. Analiza biodizela 31
3.8.3.1. Određivanje koncentarcije metilnih estera masnih kiselina i glicerola 31
3.8.3. 2. Određivanje kinematičke i dinamičke viskoznosti biodizela te gustoće biodizela 31

4. REZULTATI I RASPRAVA 33

4.1. Uzgoj *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači lana s ciljem proizvodnje enzima lipaza 34
4.2. Uzgoj *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači buče s ciljem proizvodnje enzima lipaza 36
4.3. Uzgoj *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači konoplje s ciljem proizvodnje enzima lipaza 39
4.4. Pročišćavanje lipaze.....41
4.5. Karakterizacija enzima ekstrakta lipaza.....43
4.6. Enzimska sinteza biodizela 45

5. ZAKLJUČCI 47

6. LITERATURA 49

7. PRILOZI..... 53

Popis oznaka, kratica i simbola

d	promjer kivete (cm)
T	temperatura (°C)
t	vrijeme (min)
V.A.	volumna aktivnost enzima (U cm^{-3})
S.A.	specifična aktivnost enzima (U mg^{-1})
V_{uk}	ukupni volumen reakcijske smjese (cm^3)
V_{uzorak}	volumen uzorka dodanog u test (cm^3)
L	duljina kolone (m)
I.D.	unutarnji promjer ili *eng. Inner diameter* (mm)
d	debljina stijenke kolone (µm)

A_{GP}	apsorbancija glavne probe
A_{KE}	apsorbancija kontrole ekstrakta
A_{KRS}	apsorbancija kontrole raspada supstrata
D_f	faktor razrjeđenja
PMSF	fenilmetilsulfonil florid
PMMA	polimetil metaktrilat

ε	molarni apsorpcijski koeficijent (cm^3 μmol^{-1} cm^{-1})

1. UVOD

Alternativna goriva imaju velik potencijal za upotrebu kao zamjena za fosilna goriva, a mogu se dobiti iz različitih krutih i tekućih bioloških izvora. Biodizel je organsko, neotrovno i biorazgradivo gorivo koje se može proizvesti potupcima transesterifikacije biljnih ulja, životinjskih masti, otpadnog ulja ili ulja algi. U usporedbi s dizelom, ekološki je prihvatljivije gorivo zbog manje emisije ugljikovog dioksida, niže koncentracije nastalog sumporovog dioksida koja ovisi o koncentraciji sumpora u početnoj sirovini te zbog smanjena emisije drugih štetnih plinova kao što su ugljikov monoksid i čađ. Zbog mogućnosti miješanja u različitim omjerima s dizelom, biodizel je jedno od popularnijih alternativnih goriva.

Postupkom transesterifikacije, biodizel se može proizvoditi na dva načina, kemijski i enzimski kataliziranim postupkom. U industriji se koristi kemijska sinteza biodizela primjenom lužina ili kiselina kao katalizatora tijekom koje nastaju različiti nusprodukti kao što su sapuni zbog čega je potrebna dodatna obrada biodizela pa se smanjuje ekonomičnost samoga procesa. Za razliku od kemijske sinteze, enzimski kataliziranim postupkom ne nastaju sapuni, a sinteza biodizela provodi se pri nižim temperaturama (od 30 °C do 40 °C) tijekom koje i slobodne masne kiseline prelaze u metilne estere. Enzim koji se koristi kao biokatalizator za proizvodnju biodizela je lipaza. Jedan od potencijalnih mikroorganizama za proizvodnju lipaza u visokom prinosu je gljiva *Thermomyces lanuginosus*.

Cilj ovog rada bio je: *a)* proizvesti enzim lipazu uzgojem gljive *Thermomyces lanuginosus* na otpadu iz industrije ulja, tj. na pogačama konoplje, buče i lana u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima; *b)* odabrati supstrat na kojem je uzgojem *Thermomyces lanuginosus,* proizvedena lipaza najveće volumne i specifične aktivnosti, validirati proces proizvodnje lipaze uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na odabranom supstratu te djelomično pročistiti enzim*; c) t*estirati mogućnost primjene proizvedenog enzima u procesu proizvodnje biodizela i rezultate usporediti s rezultatima pokusa provedenog s komercijalnim enzimom.

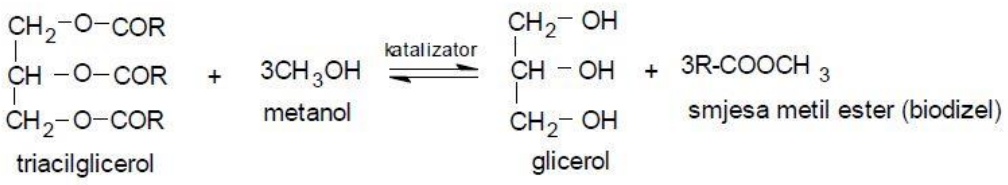
2. TEORIJSKI DIO

2.1. Biodizel

Biodizel je tekuće organsko, neotrovno i biorazgradivo gorivo koje je po kemijskom sastavu monoalkilni ester nižih alkohola i dugolančanih masnih kiselina, a dobiven je biološkom ili kemijskom razgradnjom sirovina koje sadrže visok udio ulja ili masti. Jedan od potencijalnih izvora ulja ili masti su otpadna ulja i pogače nastale tijekom proizvodnje ulja (Bhuiya et al., 2014). Važno je naglasiti kako se izgaranjem biodizela oslobađa manja količina CO_2 (0,916 kg CO_2 ekv/ kg), nego izgaranjem fosilnih goriva (4,01 kg CO_2 ekv/ kg), tj. ne nastaju nove količine CO_2, već se u atmosferu vraća onaj CO_2 koji je biljka iskoristila za proces fotosinteze (Predojević, 2010). Osim smanjene količine oslobođenog CO_2, druge su karakteristike biodizela nezapaljivost, biorazgradivost, visoka točka vrelišta (iznad 120 °C), smanjeni udio oslobođenog sumpora (koncentracija sumpora ovisi o količini sumporovih spojeva u početnoj sirovini) i aromatskih spojeva te mogućnost korištenja u dizelskim motorima bez ikakve modifikacije, ali i miješanje u različitim omjerima s dizelskim gorivom. Sve navedeno biodizel u usporedbi s dizelom čini ekološki prihvatljivijim (Bajaj et al., 2010). Manja radna snaga motora i veća potrošnja kisika, lošija fizikalna svojstva na niskim temperaturama zbog relativno visoke viskoznosti, lošija termička i oksidacijska stabilnost zbog prisustva nezasićenih veza te sposobnost otapanja naslaga s rezervoara i cijevi jedni su od osnovnih nedostataka biodizela.

Biodizel se može proizvoditi mikroemulzifikacijom, toplinskim krekingom (pirolizom) i transesterifikacijom. Transesterifikacija triacilglicerolima iz biljnih ulja i životinjske masti najčešći je postupak proizvodnje biodizela koji može biti kataliziran kiselinom, lužinom ili enzimom lipazom (Hassan et al., 2013).

Transesterifikacija (alkoholiza) je reverzibilna reakcija **(Slika 2.1.)** u kojoj alkohol reagira s triacilglicerolima biljnih ulja, životinjske masti ili otpadnih ulja, pri čemu su produkti alkilni esteri masnih kiselina (biodizel) i glicerol (Predojević, 2010). S obzirom na to da je reakcija reverzibilna, provodi se u prisustvu katalizatora koji ubrzavaju reakciju transesterifikacije i prinos željenog produkta (biodizela) te u većoj količini primarnih alkohola kako bi reakcija išla u smjeru nastanka produkta. Za postupak transesterifikacije koriste se primarni alkoholi, i to najčešće metanol zbog povoljnih fizikalno-kemijskih svojstava, polaranosti, brzine reagiranja s trigliceridima te niske cijene (Predojević, 2010).



Slika 2.1. Reakcija transesterifikacije

Industrijska sinteza biodizela provodi se postupkom transesterifikacije katalizirane lužinama (najčešće NaOH ili KOH) ili kiselinama (najčešće H_2SO_4). Hidroksidi imaju puno veću katalitičku aktivnost u usporedbi s kiselinama, zbog čega u procesu omogućavaju veću brzinu reakcije transesterifikacije, a i jeftiniji su u odnosu na kiseline (Predojević, 2010). Međutim, da bi se postigli visoki prinosi, početna sirovina mora sadržavati određeni udio slobodnih masnih kiselina i vode jer njihovo prisustvo utječe na sporedne reakcije, saponifikaciju i hidrolizu, zbog kojih u konačnici dolazi do smanjenja prinosa biodizela. Preporuča se da kiselinski broj sirovine bude manji od 1 mg KOH/g te da sadržaj vode bude manji od 0,3 %. Transesterifikacija se provodi u tri stupnja u kojoj reagira 1 mol triglicerida i 3 mola alkohola (Hassan et al., 2013; Bhuiya et al., 2014).

Iako je biodizel okolišno prihvatljiviji nego što je dizel, sama cijena proizvodnje prilično je visoka, što utječe na nedovoljnu komercijalizaciju proizvodnje. Zbog toga se teži korištenju različitih nusprodukata proizvodnje kao što su otpadna ulja iz kojih bi se postupkom transesterifikacije i primjenom različitih katalizatora proizvodio biodizel (Predojević, 2010). U postupku kemijske sinteze biodizela postupkom transesterifikacije koriste se izrazito velike količine lužina ili kiselina kao katalizatori, zbog čega je potrebno provesti dodatnu obradu u svrhu uklanjanja katalizatora, čime se poskupljuje sam postupak proizvodnje. Kako bi se pronašao ekonomski prihvatljiviji postupak kataliziranja transesterifikacije različitih ulja i masti primjenom enzima kao katalizatora, sve se više provode različita istraživanja u području proizvodnje enzima lipaze (Bhuiya et al., 2014).

Enzimski katalizirana sinteza biodizela, unatoč prednostima, još uvijek nije komercijalizirana zbog visoke cijene komercijalnog enzima lipaze. Prednosti enzimske katalize u odnosu na kemijsku su: mogućnost potpune konverzije slobodnih masnih kiselina u metilne estere masnih kiselina i glicerol (Bajaj et al., 2010), nenastajanje sapuna tijekom

procesa pa je olakšan postupak izdvanja glicerola te provedba reakcija pri nižim temperaturama (od 25 °C do 45 °C) (Tišma i sur., 2015).

Za razliku od kemijske sinteze biodizela, kod enzimske sinteze biodizela trigliceridi se prvo prevode u slobodne masne kiseline, a onda iz slobodnih masnih kiselina pomoću metanola nastaju metilni esteri masnih kiselina i glicerol bez nusprodukta (Gog et al., 2012).

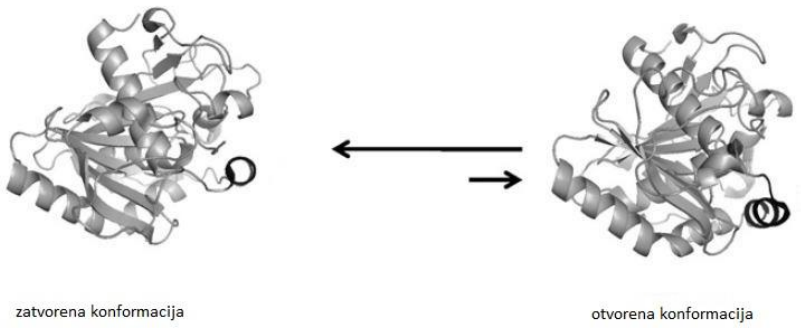
Na uspješnost enzimski katalizirane sinteze biodizela utječu odabir enzima, vrsta alkohola, sadržaj vode u uljima, molarni odnos ulja i alkohola te temperatura.

Nedostatci enzimski katalizirane transesterifikacije uglavnom se odnose na relativno visoku cijena proizvodnje enzima te inhibiciju enzima metanolom zbog čega se istražuju jeftiniji načini proizvodnje lipaze, a jedan od njih je uzgoj različitih gljiva u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (otpadu i nusproduktima iz prehrambene i poljoprivredne industrije), pri čemu mikroorganizam luči različite produkte i lipazu u hranjivu podlogu (Ranganathan et al., 2008).

2.2. Lipaze

Lipaze (triacilglicerolester hidrolaze EC 3.1.1.3.) kataliziraju hidrolizu karboksilne esterske veze u molekulama triglicerola, pri čemu dolazi do cijepanja na slobodne masne kiseline, diacilglicerole, monoacilglicerole i glicerol. Osim kataliziranja hidrolize karboksilne esterske veze, lipaze mogu katalizirati reakciju između hidroksilne grupe alkohola i karboksilne grupe karboksilnih kiselina – esterifikaciju (Casas-Godoy et al., 2018; Ognjanović i sur., 2010). Lipaze mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobnog podrijetla. Lipaze mikrobnog podrijetla većinom su ekstracelularni enzimi i imaju najveći biotehnološki značaj, mogućnost genetičke manipulacije proizvodnog mikroorganizma te mogućnost uzgoja mikroorganizama na različitim hranjivim podlogama pri blagim uvjetima temperature i pH (Cavalcanti et al., 2009). Zbog relativno niske cijene i pristupačnosti, mikroorganizmi koji se najčešće koriste za proizvodnju enzima lipaze su bakterije, kvasci i gljive, kao *npr Candida rugosa, Rhizopus oryzae, Burkholderia cepacia, Aspergillus niger, Thermomyces lanuginosus* i *Rhizomucor miehei*.

Selektivnost je jedna od važnih osobina lipaza i na njoj se temelji njihova primjena. Pravilnim izborom enzima moguće je usmjereno odvijanje reakcija i dobivanje željenog produkta. Lipaze pokazuju specifičnost u odnosu na ester te specifičnost u odnosu na masne kiseline, kao i stehiometrijsku specifičnost. Također, lipaze su aktivne na granicama faza ulje-voda, zbog čega imaju specifičan mehanizam djelovanja. Molekula lipaze postavlja se u položaj otvorene konformacije pri kojoj je aktivni centar dostupan molekulama supstrata i gdje se omogućuje stvaranje kompleksa enzim-supstrat (**Slika 2.2.**) (Fernandez-Lafuente, 2010; Singh et al., 2003).



Slika 2.2. Promjena konformacije lipaze *Thermomyces lanuginosus* na granicama faza ulje-voda (Fernandez-Lafuente, 2010)

Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* protein je molekulske mase 31 700 g mol^{-1}, sastavljen od 269 aminokiselina. Sferičnog je oblika s katalitičkim mjestom sastavljenim od serina, histidina i asparaginske kiseline unutar hidrofobnog dijela enzima koji je pokriven slojem koji se sastoji od 85 do 93 aminokiseline. Lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*, zbog svoje visoke aktivnosti i stabilnosti, našla je široku primjenu u dvofaznim sustavima voda-organsko otapalo (Fernandez-Lafuente, 2010; Geoffry et al., 2018).

2.3. Proizvodnja enzima u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (eng. *Solid-state fermentation)* način je uzgoja mikroorganizama na vlažnim čvrstim materijalima koji mogu biti supstrat za rast mikroorganizama. Rast mikroorganizma može se odvijati na površini, između te u samoj unutrašnjosti supstrata. Prostor između supstrata ispunjen je plinovitom i kapljevitom fazom koja može biti u obliku tankog filma na površini ili u obliku

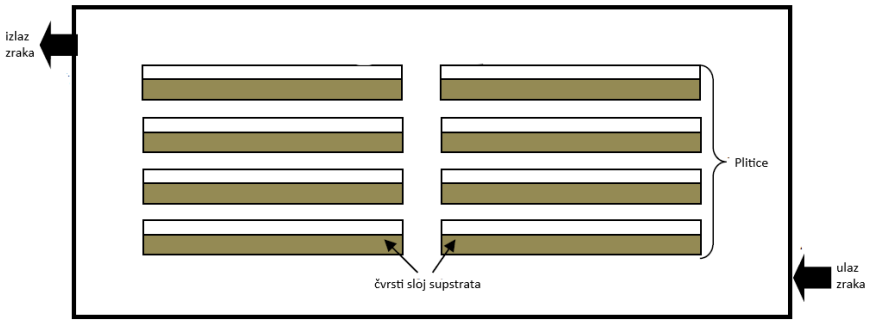
kapljica između supstrata. Veći dio kapljevite faze u sustavu apsorbiran je u čvrstom materijalu, pri čemu se održava aktivitet vode koji osigurava pravilan rast i metabolizam radnog mikroorganizma (Mitchell et al., 2006; Abdul Manan, 2014). Mehanička svojstva nosača trebala bi izdržati kompresiju prilikom miješanja u procesu fermentacije pa to zahtijeva granulirane ili vlaknaste čestice koje se teže razgrađuju ili lijepe jedna za drugu. Uzgojem mikroorganizama na čvrstim nosačima većina se mikroorganizama uzgaja u aerobnim uvjetima. Česti materijali koji se koriste kao supstrat u postupcima uzgoja mikroorganizama na čvrstim nosačima različiti su nusprodukti pojedinih poljoprivrednih, prehrambenih i ostalih industrija, izrazito bogati dušikom i ugljikom koje mikroorganizmi iskorištavaju kao izvor hrane (Mitchell et al., 2006).

Za uspješan uzgoj mikroorganizama u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima važno je uzeti u obzir nekoliko čimbenika: sastav podloge, veličinu čestica supstrata, odabir radnog mikroorganizma, optimalne procesne uvjete temperature i pH, vlažnost supstrata, koncentraciju inokuluma, itd. Veličina čestica ima važnu ulogu jer manje čestice imaju veću dostupnu površinu za rast mikroorganizma, međutim, izrazito male čestice mogu dovesti do aglomeracije supstrata, a zatim i do otežanog prijenosa kisika (Tišma i sur., 2014). Najčešći mikroorganizmi koji se uzgajaju u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima filamentozne su gljive kao što su gljive bijelog truljenja (Tišma i sur., 2014; 2015).

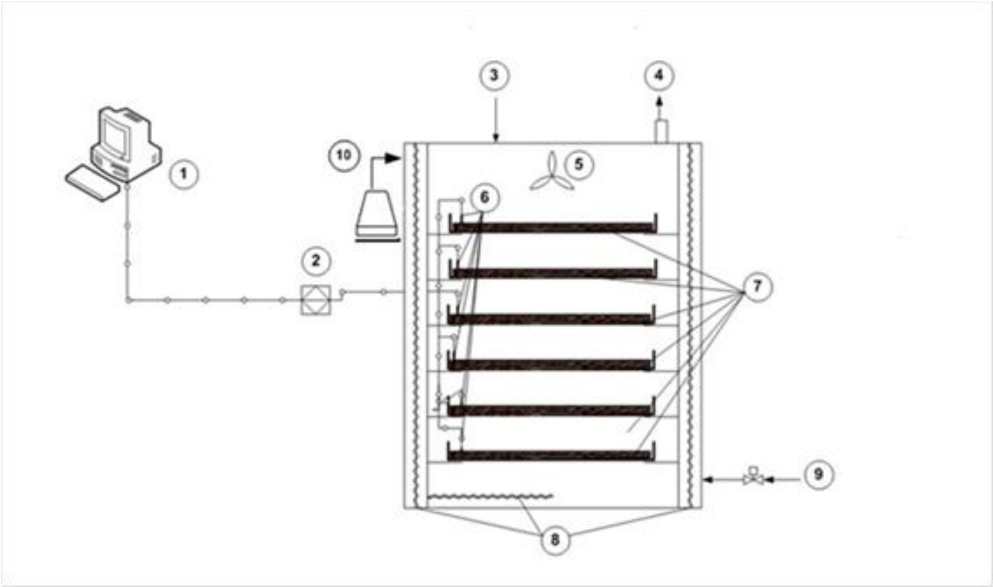
Bioreaktori koji se koriste za fermentaciju na čvrstim nosačima mogu se podijeliti na bioreaktore s pliticama, bioreaktore s nasutim slojem, bioreaktore s horizontalnim bubnjem i bioreaktore s fluidizirajućim slojem (Mitchell et al., 2006). Uloga bioreaktora je, između ostalog, osigurati odvijanje fermentacije u kontroliranim uvjetima u svrhu sprječavanja kontaminacije supstrata nepoželjnim mikroorganizmima iz okoline. Tijekom postupka uzgoja mikroorganizama na čvrstim supstratima u bioreaktorima, s ciljem održavanja optimalnih uvjeta za rast mikroorganizma i sintezu željenog produkta, prate se ključni parametri, a to su temperatura sloja supstrata i aktivitet vode. Najveći problem za razvoj matematičkog modela procesa predstavljaju heterogenost sustava i otežano odvajanje biomase sa supstrata, tj. nemogućnost mjerenja koncentracije biomase (Mitchell et al., 2006; Krishna, 2005).

Bioreaktor s pliticama (**Slika 2.3. a i b**) najjednostavniji je tip bioreaktora, a može biti izrađen od drveta ili metala. Predstavlja komoru u kojoj zrak pri kontroliranoj temperaturi i vlažnosti kruži oko plitica koje mogu biti perforiranog dna s ciljem bolje raspodjele topline.

Plitice su najčešće smještene jedna iznad druge s dovoljnim razmakom između za strujanje zraka (Mitchell et al., 2006; Bellon-Maurel et al., 2003; Abdul Manan, 2014). Supstrat se nanosi na plitice u tankome sloju debljine između 5 i 15 cm, a željena temperatura postiže se upuhivanjem toplog zraka među pliticama. Bioreaktori s pliticama često se primjenjuju u svim mjerilima, od laboratorijskih, pilot do industrijskih postrojenja. Nedostatci bioreaktora s pliticama su potreba za velikim prostorom (u slučaju velikog broja plitica), puno manualnog rada te teško primjenjivanje u procesima koji zahtijevaju visoku sterilnost. Međutim, odlikuju se jednostavnom izvedbom i niskim investicijskim troškovima. Uvećanje mjerila ovog tipa bioreaktora postiže se povećanjem broja i površine plitica, ali ne i visinom plitica jer korištenjem dubljih plitica može doći do pregrijavanja biomase (Mitchell et al., 2006; Bellon-Maurel et al., 2003).

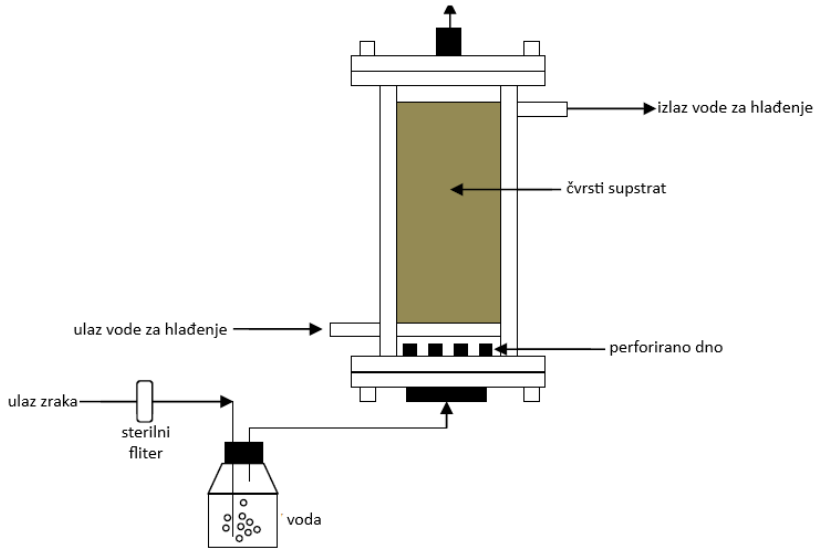


Slika 2.3. a) Shematski prikaz bioreaktora s pliticama (Rodríguez Couto, Sanromán, 2006)



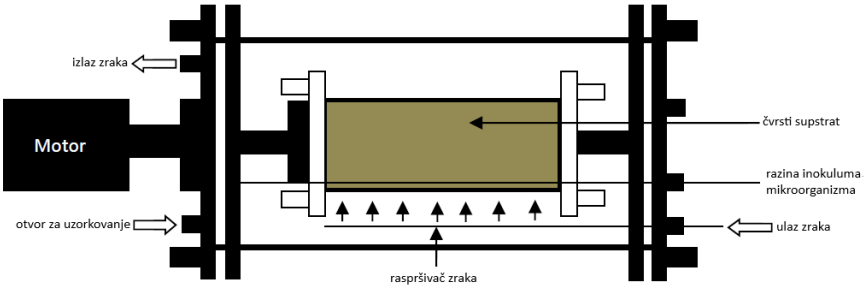
Slika 2.3. b) Shematski prikaz bioreaktora s pliticama (1-računalo, 2-PLC sustav, 3-ulaz zraka, 4-odvodni ventil, 5-ventilator, 6-temperaturne sonde, 7-plitice, 8-grijači, 9-voda za hlađenje, 10- ovlaživač) (Tišma et al, 2015)

Bioreaktor s nasutim slojem (**Slika 2.4.**) sustav je koji se sastoji od kolone s perforiranom bazom kroz koju se provodi aeracija bez miješanja supstrata. Kolona bioreaktora može biti vertikalno ili horizontalno postavljena, ovisno o dostupnom prostoru (Mitchell et al., 2006; Abdul Manan, 2014). Postoje dva osnovna dizajna fiksnoga dijela bioreaktora, pri čemu tradicionalna izdvedba ima samo vodeni plašt, dok *Zymotis-ov* tip fiksnog sloja sadrži jos dodatne ploče za prijenos topline koje su paralelne sa strujanjem zraka. Uklanjanje topline kroz bočnu stijenku može smanjiti aksijalne temperaturne gradijente koji nastaju tijekom prijenosa topline kroz kolonu bioreaktora te na taj način smanjiti ispravanje i potrebu za dodavanjem vode. *Zymotisova* izvedba bioreaktora ima prednost u odnosu na klasičnu izvedbu zbog dodatnih ploča unutar bioreaktora, i to samo u sustavima u kojima se supstrat ne miješa. Neke od prednosti ovih vrsta bioreaktora su manji zahtjevi za prostorom i radnom snagom, bolje upravljanje i kontrola procesa, mogućnost primjene za mikroorganizme na čiji proces rasta negativno utječe miješanje (npr. oštećenje micelija). Otežano punjenje bioreaktora, začepljivanje bioreaktora supstratom te pad tlaka tijekom viših protoka jedni su od nedostataka navedenih vrsta bioreaktora. Važno je napomenuti i kako se bioreaktori s nasutim slojem najčešće koriste za proizvodnju enzima i antibiotika (Mitchell et al., 2006).



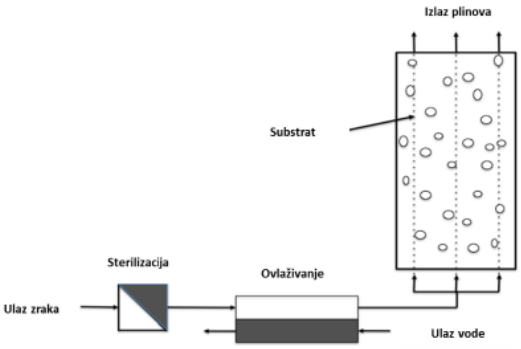
Slika 2.4. Shematski prikaz bioreaktora s nasutim slojem (Rodríguez Couto, Sanromán, 2006)

Bioreaktor s horizontalnim bubunjem (**Slika 2.5.**) sastoji se od horizontalnog cilindra i sustava za miješanje. Zrak se ne upuhuje prisilno kroz sloj, nego primjenom miješanja, tj. okretanjem horizontalnog bubnja provodi se aeriranje i ujedno se osigurava veća kontaktna površina između stijenke bioreaktora i čvrstog nosača (Mitchell et al., 2006). Okretanje horizontalnog sloja može biti kontinuirano ili povremeno, što ovisi o visini sloja čvrstog nosača i brzini rotacije bubnja. Blago i uniformno miješanje najveća je prednost tih vrsta bioreaktora. Nedostatci bioreaktora s horizontalnim bubnjem su oštećenje micelija gljiva u slučaju snažnijeg miješanja, aglomeracija čestica tijekom vremena, otežana kontrola prijenosa tvari i topline unutar sloja supstrata te usporen rast mikroorganizma zbog trenja među česticama. Primjena bioreaktora s horizontalnim bubnjem u proizvodnji je celulaze, pigmenata te proizvodnji biogoriva iz celuloznih materijala (Bellon-Maurel et al., 2003).



Slika 2.5. Shematski prikaz bioreaktora s nasutim slojem (Rodríguez Couto, Sanromán, 2006)

Bioreaktor s fluidizirajućim slojem (**Slika 2.6.**) sastoji se od vertikalne kolone s perforiranim dnom kroz koji zrak prolazi dovoljnom brzinom, zbog čega čestice supstrata dovodi u fluidizirajuće stanje. Visina kolone mora biti dovoljno velika da omogući raspršivanje čvrstog nosača, prilikom čega čvrste čestice i plinovi djeluju kao tekućine. Bioreaktor s fluidizirajućim slojem može sadržavati mješač na dnu kolone koji razbija aglomerirane čestice koje se mogu pojaviti na dnu kolone (Abdul Manan, 2014). Voda koja isparava tijekom fermentacije može ujedno i hladiti biomasu. Učinkovito odvođenje topline, dobra aeracija, ujednačena raspodjela vlage, jednostavna kontrola aglomeracije, jednolika temperatura u slojevima supstrata, jednostavno upravljanje te veća učinkovitost zbog veće kontaktne površine katalizatora i tekuće faze prednosti su te vrste bioreaktora. Što se tiče nedostataka, odnose se na mogućnost aglomeracije čestica u slučaju kada je supstrat ljepljiv i ako su čestice supstrata različite veličine pa može doći do toga da određena količina fluidizira, a druga ne. Kada je riječ o upotrebi, bitno je navesti i da se bioreaktori s fluidizirajućim slojem koriste u obradi otpadnih voda i proizvodnji etanola (Mitchell et al., 2006; Abdul Manan, 2014).



Slika 2.6. Shema bioreaktora s fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem (Tišma i sur., 2014)

2.4. Proizvodnja lipaze tijekom uzgoja filamentoznih gljiva u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

Uzgoj filamentoznih gljiva na čvrstim nosačima u svrhu proizvodnje enzima lipaza provodi se primjenom različitih nusprodukata proizvodnje hladno prešanog ulja kao supstrata jer sadrže visoki udio ugljika i dušika te manji udio masti. Pogače lana, konoplje i buče zbog svoje visoke nutritivne vrijednosti i idealnih omjera pojedinih komponenata mogu

biti dobri supstrati za uzgoj gljiva s ciljem proizvodnje lipaze (Egorova et al., 2016). Također, važno je naglasiti da lipaze dobivene uzgojem na čvrstim supstratima imaju bolju termičku stabilnost za razliku od lipaza koje su uzgojene submerznim uzgojem.

Uzgoj na čvrstim nosačima provodi se pri niskim udjelima slobodne vode, što je izrazito stresno za pojedine gljive, a istodobno zbog otežane kontrole fizikalno-kemijskih parametara stvara poteškoće tijekom prevođenja iz laboratorijskog mjerila u industrijsko mjerilo. Filamentozne gljive imaju dobru toleranciju na nisku vlažnost i visoki osmotski tlak, što ih čini pogodnim za biokonverziju čvrstih supstrata tijekom uzgoja u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima (Yaakob et al., 2013). S obzirom na to da se kao supstrati koriste nusprodukti, to je jedan od načina ekoloških (smanjenje količina otpada) i ekonomski prihvatljivih procesa (smanjenje cijene proizvodnje lipaze).

Pogača konoplje izrazito je bogata proteinima (od 30 % do 50 %) i vlaknima, sadrži od 73 % do 77 % celuloze, od 7 % do 9 % hemiceluloze te od 2 % do 6 % lignina, što ju čini izrazito povoljnom sirovinom za proizvodnju peleta u svrhu grijanja kućanstva. Također, pogača konoplje često se koristi kao supstrat za uzgoj *Thermomyces lanuginosus* u svrhu sinteze enzima lipaza (House et al., 2010; Schluttenhofer et., 2017).

Sastav bučine pogače može varirati ovisno o primjenjenom procesu i procesnim uvjetima proizvodnje ulja, ali prosječno sadrži 12 % ulja i izrazito je bogata vlaknima i proteina. Proteini bučine pogače u svojoj strukturi sadrže veliki udio triptofana (1,54 g/16 g N), a mali udio lizina i izoleucina. Buča sadrži velik udio masnih kiselina, većinom oleinsku (50,4 %) i linoleinsku kiselinu (29,9 %), zbog čega se koristi kao sustrat u procesima proizvodnje lipaza, proteaza, te glutaminaza (Zdunczyk et al., 1999; Peričin et al., 2008).

Pogača lana izrazito je bogata omega-3 masnim kiselinama i ligninom te smjesom različitih polisaharida sastavljenom od ksiloze, glukoze, galaktoze, arabinoze, ramnoze, fukoze i galakturonske kiseline. Zbog toga se pogača lana često koristi u ljudskoj prehrani, a to ju ujedno čini i dobrom podlogom uzgoj mikroorganizama poput *Thermomyces lanuginosus* te u proizvodnji amilaza, proteaza i lipaza (Gutiérrez et al., 2010).

Aspergillus niger i *Rhizomucor miehei* korištene su u proizvodnji lipaze na pogači Jatrophinog ulja, ostatku nakon proizvodnje hladno prešanog nejestivog Jatrophinog ulja.

Pogača Jatrophe zaostala nakon proizvodnje hladno prešanog ulja, iz koje su postupkom odmašćivanja uklonjene masti, sadržavala je 44,9±0,4 % proteina, 22,3±0,9 % ugljikohidrata, 13,7 % vode i 6,1±0,2 % pepela (Ilmi et al., 2017). Prije postupka nacjepljivanja filamentoznih gljiva provedena je hidroliza s natrijevim hidroksidom kako bi se povećala iskoristivost pojedinih komponenata smanjivanjem stupnja polimerizacije, nakon čega se koncentracija reduciranih šećera povećala s 66,7 % na 70,9 %, a koncentracija topivih proteina s 8,6 % na 70,9 %. Hidroliza je provedena u trajanju od 45 min zbog mogućnosti nastanka produkata Maillardovih reakcija. Dodavanje glukoze i maltodekstrina u svrhu povećanja koncentracije ugljika dovelo je do inhibicije enzima lipaze, stoga je zaključeno da je potrebna daljnja optimizacija procesa primjenom različitih izvora ugljika u svrhu sprječavanja kataboličke represije te povećanje prinosa lipaze, kao i optimizacija koncentracije inokuluma (Ilmi et al., 2017).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.Zadatak

Zadatak ovog diplomskog rada bio je proizvesti enzim lipazu iz gljive *Thermomyces lanuginosus* na otpadu industrijske proizvodnje hladno prešanog ulja od buče, lana i konoplje, pročistiti enzim te provesti pokus enzimske sinteze biodizela s komercijalnim i vlastito proizvedenim enzimom.

3.2. Mikroorganizam i supstrati

3.2.1. Mikroorganizam

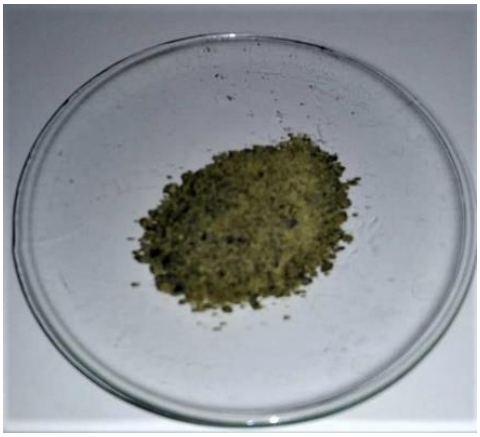
Za proizvodnju enzima lipaze korištena je čista kultura gljive *Thermomyces lanuginosus* koja je dobivena iz Instituta Leibniz DSMZ - Njemačka zbirka mikroorganizama i kultura stanica GmbH, Njemačka. Kultura je čuvana pri 4 °C na prethodno pripremljenom krumpirovom agaru, a precjepljivanje je provođeno svaka 2 tjedna u sterilnim uvjetima.

Slika 3.1. *Thermomyces lanuginosus*

3.2.2. Supstrati

U procesu proizvodnje enzima lipaze korišten je otpad iz proizvodnje hladno prešanog ulja iz lana (**Slika 3.2.**), buče (**Slika 3.3.**) i konoplje s „Obiteljskog poljoprivrednog gospodarstva Lazić“ (Vraneševci, Hrvatska).

Slika 3.2. Pogača lana



Slika 3.3. Pogača buče

3.3. Popis kemikalija i opreme

3.3.1. Kemikalije

Krumpirov agar (Biolife, Milano, Italija), natrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4), natrijev dihidrogenfosfat (NaH_2PO_4), fosfatna kiselina (H_3PO_4; T.T.T. d.o.o., Sv. Nedjelja, Hrvatska), natrijev hidroksid (NaOH), Bradford reagens (BioRad, Njemačka), Tris baza ($C_4H_{11}NO_3$; Acros organics, SAD), klorovodična kiselina (HCl; Carlo Erba reagents, Rodano, Italija), arapska guma (Acros Organics, SAD), *p*-nitrofenil palmitat ($C_{22}H_{35}NO_4$; Alfa Aesar, Njemačka), 2-propanol (C_3H_8O; Alkaloid, AD, Skopje, Makedonija), kloroform ($CHCl_3$; Carlo Erba, Francuska), izoamilni alkohol ($C_5H_{12}O$; Kemika, Zagreb, Hrvatska), fenilmetilsulfonil florid ($C_7H_7FO_2S$; Sigma-Aldrich, Njemačka), amonijev sulfat ($(NH_4)_2SO_4$; Acros Organics, SAD) natrijev klorid (NaCl), metanol (CH_3OH; J.T. Baker, SAD), heptan (C_7H_{16}; J.T. Baker, SAD).

3.3.2. Katalizatori

Komercijalni enzim lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L; SIGMA ALDRICH, Njemačka), sirovi ekstrakt enzima lipaze proizveden nakon uzgoja gljive *Thermomyces lanuginosus* na pogači konoplje, buče i lana proizveden prema metodi opisanoj u poglavlju 3.4.1.

3.3.3. Inkubator

Za uzgoj *Thermomyces lanuginosus* na prethodno steriliziranom i pripremljenom supstratu s ciljem proizvodnje enzima lipaze korišten je inkubator (Binder, Tuttlingen, Njemačka) (**Slika 3.4.**).

Slika 3.4. Inkubator

3.3.4. Centrifuga

Nakon uzorkovanja uzoraka tijekom procesa uzgoja *Thermomyces lanuginosus* na otpadu iz industrije ulja, s ciljem pripreme tekućinskog ostatka koji sadrži ekstracelularni enzim lipazu, uzorci su centrifugirani u centrifugi s hlađenjem (Hermle Z 326 K, Njemačka) (**Slika 3.5.**) tijekom 10 minuta na 15 000 g pri +4 °C.

Slika 3.5. Centrifuga

3.3.5. Spektofotometar

Za mjerenje aktivnosti enzima lipaza i za mjerenje koncentracije proteina korišten je spektrofotometar (Shimadzu UV-1280, Kyoto, Japan) (**Slika 3.6.**)

Slika 3.6. Spektofotometar

3.3.6. Plinski kromatograf

Za mjerenje udjela estera masnih kiselina i glicerola korišten je plinski kromatograf (Shimadzu GC-2014 s FID detektorom, Kyoto-Japan) (**Slika 3.7.)**

Slika 3.7. Sustav za plinsku kromatografiju

3.3.7. Bioreaktori

Proces sinteze biodizela s komercijalnim i vlastito proizvedenim nepročišćenim enzimom lipaza proveden je u bioreaktoru volumena 400 cm^3 (**Slika 3.8.**), a sinteza biodizela s vlastito proizvedenim pročišćenim enzimom lipaza provedena je u bioreaktoru volumena 15 cm^3 (**Slika 3.9.**). Sustav je bio opremljen magnetskom miješalicom i vodenom kupelji kojom se cirkulacijom vode unutar duple stjenke rekatora održavala jednolika temperatura reakcijske smjese na 40 °C.

Slika 3.8. Reaktor (V = 400 cm^3)

Slika 3.9. Reaktor (V = 15 cm^3)

3.4. Metode

3.4.1. Proizvodnja enzima lipaza uzgojem gljive *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima

U laboratorijske staklenke izvagano je 50 g supstrata te je dodana voda u volumenu potrebno, za postizanje optimalnog udjela vode, koji je za pogaču lana iznosilo 62 cm^3, pogaču konoplje 63,05 cm^3 te pogaču buču 59,45 cm^3. 10 cm^3 vode je posebno sterilizirano u staklenim epruvetama za potrebe pripreme suspenzije inokuluma kulture *Thermomyces lanuginosus*. Nakon dodavanja vode, laboratorijske staklenke s pogačama i staklene epruvete s 10 cm^3 destilirane vode, sterilizirane su pri 121°C tijekom 20 minuta, pri tlaku od 1 do 2 bara nakon čega su ohlađene pri temperaturi od 25 °C tijekom 24 h.

Inokulacija mikroorganizma *Thermomyces lanuginosus* provedena je s pet micelijskih plagova promjera 6 mm koje su prethodno izrezane pomoću bušača čepova. Plagovi su suspendirani u prethodno steriliziranim staklenim epruvetama s 10 cm^3 destilirane vode pri sterilnim uvjetima (**Slika 3.10.**) te su dodani u laboratorijske staklenke s prethodno steriliziranom pogačom, također sterilnom tehnikom rada.

Slika 3.10. Suspendirani diskovi *Thermomyces lanuginosus*

Staklenke su poklopljene papirnatim ručnikom te propisno označene i stavljene u inkubator na 45 °C pri brzini strujanja zraka od 20 m s^{-1} za pokuse u kojima su korištene pogače lana i buče te 10 m s^{-1} za pokus s pogačom konoplje. Inkubacija je trajala devet dana

tijekom kojih su svaka 24 sata uzimani uzorci (2 uzorka iz svake teglice) u sterilnim uvjetima. Pokusi su provedeni u dvije paralelne probe.

Za pripremu ekstrakta enzima, izvagano je po 1 g uzorka u plastične kivete od 15 cm^3 i dodano 5 cm^3 0,1 M fosfatnog pufera pH = 7,0 te je provedena hladna ekstrakcija. Ekstrakcija je trajala 30 minuta pri +4 °C, a uzorci su miješani 30 s svakih 5 min na vibrirajućuj mješalici. Nakon ekstrakcije uzorci su centrifugirani pri 15 000 g/10 min/+4 °C te profilitrirani preko nabranog filter papira i skladišteni u zamrzivaču na -18 °C.

3.5. Pročišćavanje lipaze

Taloženje s amonijevim sulfatom prvi je stupanj pročišćavanja lipaze, gdje se dodatkom određene koncentracije amonijevog sulfata u otopinu proteina željena lipaza počinje taložiti. Prije samog postupka taloženja dodano je 0,0174 g 1 mM fenilmetilsulfonil florida (PMSF) kako bi se spriječila potencijalna degradacija proteina proteazama, nakon čega je provedeno taloženje u posudi s ledom na magnetnoj miješalici (**Slika 3.11.**). U otopinu proteina (100 cm^3) polako i u obrocima dodavan je amonijev sulfat u koncentracijama od 70 %, u odnosu na koncentraciju zasićenja koja iznosi 514,72 g dm^{-3}. Nakon toga je dobivena suspenzija centrifugirana 20 minuta na 14 000 okr min^{-1} i +4 ˚C. Potom je mjerena koncentracija proteina te aktivnost enzima u supernatantu i talogu. Na kraju postupka talog je otopljen u natrij fosfatnom puferu (4,5 cm^3, pH = 8,0) u kojem je prethodno otopljen 1 mM fenilmetilsulfonil florid (PMSF) te je provedena dijaliza 24 h s 3 izmjene pufera.

Slika 3.11. Ekstrakt enzima na magnetnoj miješalici tijekom postupka pročišćavanja lipaza

Prije primjene kromatografije isključenja po veličini na gelu Superdex 200 (**Slika 3.12.**), uzorak je profiltriran na filteru (0,45 µm) kako bi se spriječila svaka mogućnost potencijalnog začepljenja kolone te da se u daljnjim postupcima pročišćavanja koriste talozi koji su prethodno dobiveni u procesu isoljavanja.

Najprije je proveden postupak pročišćavanja uzoraka na gelu Superdex 200 na koloni visine 20 cm pri protoku eluenta od 0,5 cm^3 min^{-1}, gdje je kao eluent korišten 50 mM natrij fosfatni pufer (pH = 8,0) koji sadrži 0,15 M NaCl. Na vrh kolone stavljeno je 0,5 cm^3 uzorka proteina, a na izlazu iz kolone skupljane su frakcije volumena 500 µL. U uzorcima je mjerena koncentracija proteina, specifična i volumna aktivnost enzima lipaze. Kromatografijom isključenja po veličini na gelu očekuju se dva pika, prilikom čega se u prvom redu nalaze proteini, a u drugom soli.

Slika 3.12. Kolona za kromatografiju s pumpom

3.7.Proizvodnja biodizela s komercijalnom lipazom i vlastito proizvedenom lipazom u kotlastom reaktoru

Prilikom proizvodnje biodizela s komercijalnom lipazom u kotlastom reaktoru (V = 400 cm^3) (**Slika 3.8.**) pripremljena je reakcijska smjesa (V_r = 199 cm^3), sljedećeg sastava: suncokretovo ulje, m_{ulja} = 163,63 g, metanol, m_{metOH} = 20,35 g (omjer ulja i metanola = 1 : 3,4) i enzim lipaza Lipolase 100 L, m_{lipaze} = 16,36 g (koji je prethodno razrijeđen u 0,1 M natrij-natrij fosfatnom puferu pH 7,0 u volumnom omjeru 1 : 10). Reakcija je započeta nakon temperiranja na 40 °C i podešavanjem optimalnog broja okretaja (300 rpm) kako bi se metanol raspršio u što sitnije kapljice unutar mase ulja, nakon čega je dodan enzim lipaza. Sinteza biodizela trajala je 46,5 h, prilikom čega je uzorkovanje tijekom prvog dana provedbe provedeno na početku, nakon pola sata te svakih sljedećih sat vremena, dok su drugi dan uzorci uzorkovani svaka dva sata, pri čemu se pazilo da ukupna količina uzorka koja se izuzima iz reaktora tijekom trajanja reakcije bude manja od 25 % ukupnog volumena početne

reakcijske smjese. Dobiveni uzorci odmah nakon uzorkovanja analizirani su na plinskom kromatografu, a nakon provedene sinteze glicerol je razdvojen od biodizela u lijevku za odjeljivanje.

Isti postupak proveden je u sintezi biodizela s vlastito proizvedenim nepročišćenim enzimom lipaza, dok je u proizvodnji biodizela s vlastito proizvedenim pročišćenim enzimom lipaza taj postupak proveden u kotlastom reaktoru volumena 15 cm^3.

3.8. Analitičke metode

3.8.1. Određivanje volumne i specifične aktivnosti enzima lipaza

Aktivnost enzima lipaza određivana je testom fiksnog vremena koristeći *p*-nitrofenil palmitat kao supstrat i arapsku gumu kao emulgator. Test je proveden u 56,58 mM Tris-HCl puferu, pH 8,0.

Nakon što su pripremljene otopina supstrata i otopina za kontrolu ekstrakta, u četiri plastične epruvete dodano je 3,9 cm^3 otopine supstrata od kojih su prve tri epruvete činile glavnu probu, četvrta epruveta predstavljala je kontrolu raspada samoga supstrata bez dodatka enzima lipaza, a u petu epruvetu dodana je otopina za kontrolu ekstrakta koja daje vrijednost apsorbance samog ekstrakta.

Napunjene epruvete predinkubirane su na 40 °C tijekom 5 minuta. Nakon toga svakih 30 sekundi dodavano je po 100 µL ekstrakta enzima lipaza u prethodno pripremljene tri glavne probe i u petu epruvetu s otopinom za kontrolu ekstrakta, dok je u četvrtu epruvetu s otopinom supstrata doda no 100 µL 0,1 M fosfatnog pufera (pH = 7,0), promiješano na vibrirajućoj mješalici 15 sekundi te stavljeno na inkubaciju pri 40 °C.

Nakon dodavanja ekstrakta enzima lipaza praćena je brzina i intezitet žutog obojenja glavnih proba (**Slika 3.13.**). Kada je postignuto izrazito žuto obojenje, dodano je 1,5 cm^3 marmurne otopine svakih 30 sekundi, nakon čega je vorteksirano 15 sekundi kako bi se zaustavila daljnja razgradnja supstrata uz pomoć enzima lipaze. Treba naglasiti kako intezitet obojenja ne smije biti izrazito velik da vrijednost izmjerene apsorbance pri 410 nm ne bi

izašla iz baždarnog pravca. U konačnici, sve su epruvete centrifugirane pri 15 000 g tijekom 10 minuta, nakon čega je otpipetirano 1,6 cm^3 gornjeg žutog sloja u PMMA kivete te je na spektofotometru izmjerna vrijednost apsorbance pri 410 nm. Na osnovi vrijednosti apsorbanci prema **jednadžbi (1)** izračunata je volumna aktivnost enzima:

$$V.A. = \frac{(A_{GP,410\,nm} - A_{KRS,410\,nm} - A_{KE,410\,nm}) \cdot D_f \cdot V_{uk}}{t \cdot V_{uzorak} \cdot d \cdot \varepsilon} \left(\frac{U}{cm^3}\right) \quad (1)$$

gdje je *V.A.* - volumna aktivnost lipaze (U cm^{-3})

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

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

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

D_f - faktor razrjeđenja

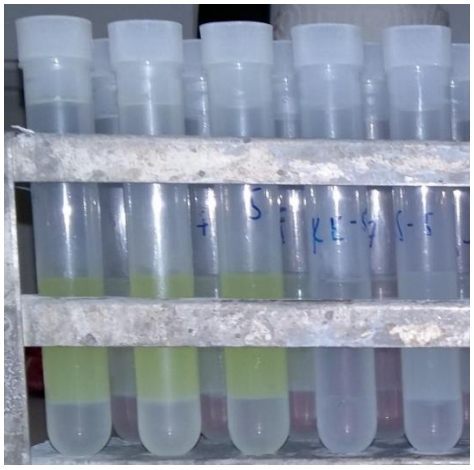
V_{uk} - ukupni volumen reakcijske smjese (cm^3)

t - vrijeme trajanja reakcije

V_{uzorak} - volumen uzorka dodanog u test (cm^3)

d - promjer kivete (cm)

ε - molarni koeficijent *p*-nitrofenola (0,29866 cm^3 μmol^{-1} cm^{-1})



Slika 3.13. Dobiveno obojenje tijekom mjerenja volumne aktivnosti enzima lipaza

Specifična aktivnost enzima lipaza izračunata je prema **jednadžbi (2)**

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_E}\left(\frac{U}{mg}\right) \quad (2)$$

gdje je *S. A.* - specifična aktivnost enzima (U mg^{-1})

V. A.- volumna aktivnost lipaze (Ucm^{-3})

γ_E - masena koncentracija enzima (mg cm^{-3})

3.8.2. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određivana je spektrofotomerijski pri valnoj duljini od 595 nm i temperaturi od 25 °C, tj. Bradfordičinim testom. U 100 µL uzorka dodavano je 2 cm^3 prethodno razrijeđenog Bradfordovog reagensa u destiliranoj vodi u omjeru 1: 4 te je inkubirano na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Nakon 5 minuta mjerena je apsorbancija nastalog plavog obojenja (**Slika 3.14.**) te je na osnovu baždarnog pravca (Prilog 1) izračunata koncentracija proteina u uzorku. Ovaj postupak određivanja koncentracije proteina korišten je tijekom proizvodnje enzima lipaza uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pogačama lana, konoplje i buče.

Tijekom sinteze biodizela s komercijalnom lipazom za određivanje koncentracije proteina u 800 µL uzorka dodano jr 200 µL Bradfordovog reagensa te inkubirano na sobnoj temperaturi tijekom 5 minuta. Nakon tog postupka mjerena je apsorbancija, a iz baždarnog pravca izračunata je koncentracija proteina u uzorku.

Slika 3.14. Plavo obojenje tijekom određivanja koncentracije proteina

3.8.3. Analiza biodizela

3.8.3.1. Određivanje koncentarcije metilnih estera masnih kiselina i glicerola

Koncentracija metilnih estera masnih kiselina i glicerola u biodizelu određivana je plinskom kromatografijom (Shimadzu GC-2014 s FID detektorom, Kyoto-Japan) pri 240 °C na Zebron ZB-Wax (*L* = 30 m, *I.D.* = 0,53 mm, *d* = 1,00 µm) koloni i helijem (*p* = 22,4 kPa) kao pokretnom fazom. Prije analize uzorci su razrijeđeni u heptanu na koncentracije koje bi bile u području baždarnog pravca te profiltrirani (nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filteri, veličina pora: 0,45 µm, promjer filtera: 25 mm). Vrijeme zadržavanja za palmitinsku kiselinu iznosilo je 5,60 min, za stearinsku kiselinu 8,04 min, za oleinsku kiselinu 8,38 min, a za linolnu kiselinu 9,06 min. Koncentracija metilnih estera masnih kiselina izračunata je iz pripadajućeg baždarnog pravca (Prilozi 2, 3, 4, 5, i 6).

Koncetracija glicerola također je određivana plinskom kromatografijom (Shimadzu GC-2014 s FID detektorom, Kyoto-Japan) pri 240 °C na Zebron ZB-Wax (*L* = 30 m, *I.D.* = 0,53 mm, *d* = 1,00 µm) koloni i helijem (*p* = 22,4 kPa) kao pokretnom fazom. Prije analize primjenom plinskoj kromatografiji, 100 µL uzorka razrijeđeno je u etanolu te profiltrirano (nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filteri, veličina pora: 0,45 µm, promjer filtera: 25 mm). Vrijeme zadržavanja za glicerol iznosilo je 6,69 min. Koncentracija glicerola u uzorku izračunata je iz baždarnog pravca (Prilog 7).

3.8.3. 2. Određivanje kinematičke i dinamičke viskoznosti biodizela te gustoće biodizela

Nakon 24-satnog odležavanja biodizela u lijevku za odjeljivanje, odvojen je gornji sloj koji predstavlja biodizel te je određena njegova gustoća i kinematička viskoznost.

Gustoća biodizela određena je uz pomoć piknometra poznatog volumena. Prije početka mjerenja izvagana je masa suhog i praznog piknometra, nakon čega je piknometar napunjen uzorkom biodizela i ponovno izvagan. Iz razlike praznog i punog piknometra izračunata je masa biodizela, a dijeljenjem s volumenom piknometra dobivena je gustoća biodizela. Mjerenja su napravljena u tri paralelne probe pri temperaturama od 20 °C i 40 °C.

Masa i gustoća biodizela izračunate su prema **jednadžbi (3) i jednadžbi (4):**

$$m_{biodizel} = m_{puni\ piknometar} - m_{prazni\ piknometar}\ (g) \tag{3}$$

$$\rho_{biodizel} = \frac{m_{biodizel}}{V_{piknometar}} \left(\frac{g}{cm^3}\right) \tag{4}$$

Primjenom Ostwaldovog viskozimetra izmjereno je vrijeme protjecanja uzorka od gornje oznake na viskozimetru do donje oznake te je na osnovu dobivenih vrijednosti iz **jednadžbe (5)** izračunata dinamička viskoznost biodizela. Mjerenja su napravjlena u tri paralelne probepri 20 °C i 40 °C.

$$\eta_{biodizel} = \eta_{H_2O} \cdot \frac{\rho_{biodizel} \cdot t_{biodizel}}{\rho_{H_2O} \cdot t_{H_2O}}\ (mPas) \tag{5}$$

gdje je η – viskoznost (mPas)

ρ – gustoća (g cm^{-3})

t – vrijeme (s)

Kinematička viskoznost dobivena je dijeljenjem dinamičke viskoznosti biodizela s prethodno izračunatom gustoćom biodizela prema **jednadžbi (6).**

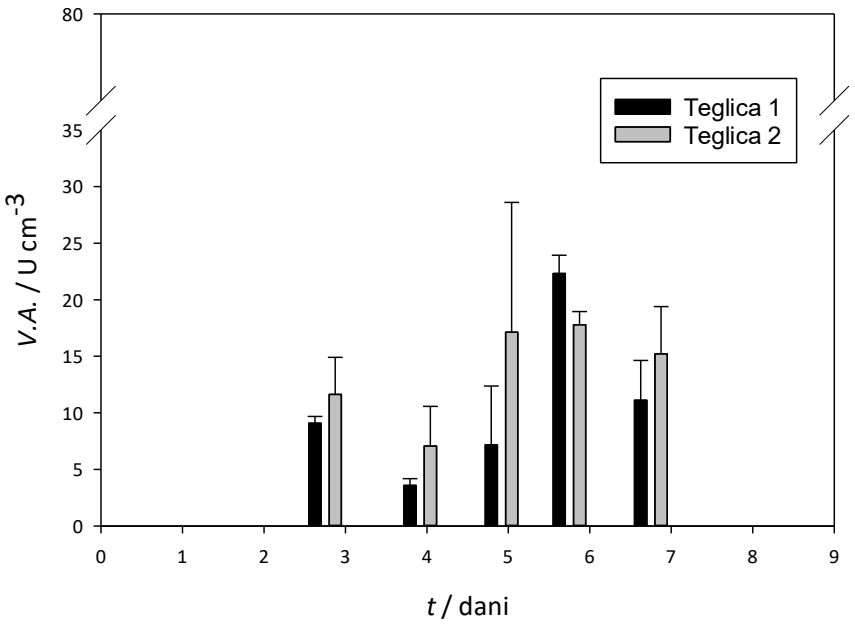
$$\nu = \frac{\eta_{biodizela}}{\rho_{biodizela}} \left(\frac{mm^2}{sw}\right) \tag{6}$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

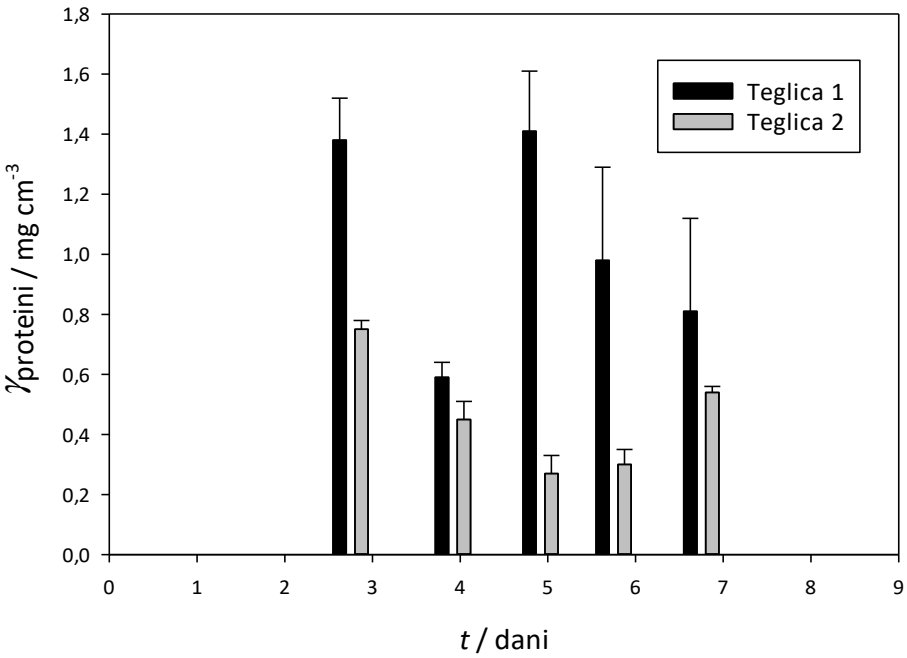
4.1. Uzgoj *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači lana s ciljem proizvodnje enzima lipaza

Proizvodnja enzima lipaza iz gljive *Thermomyces lanuginosus* provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači lana. Pogača lana je nusprodukt nastao tijekom proizvodnje hladno prešanog lanenog ulja. Pokus je trajao sedam dana. Nakon trećeg dana uzgoja, svaka 24 h uzimani su uzorci iz teglica te su primjenom hladne ekstrakcije, centrifugiranja i filtriranja dobiveni ekstrakti iz kojih je određivana aktivnost enzima prema ranije opisanoj metodi (poglavlje 3. Eksperimentalni dio).

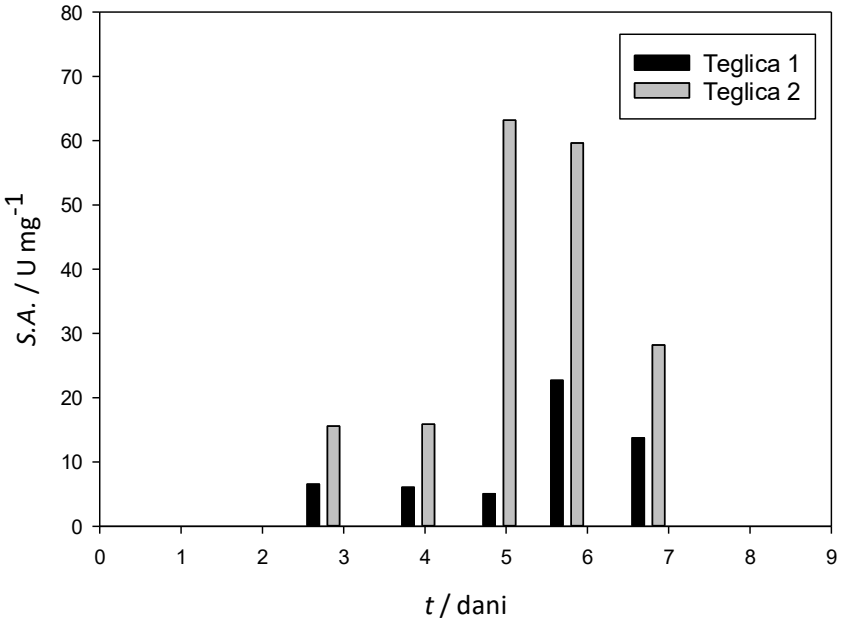
Grafički su prikazani rezultati ovisnosti volumne aktivnosti lipaza (**Slika 4.1.**), koncentracije ekstraktibilnih proteina (**Slika 4.2.**) i specifične aktivnosti lipaza (**Slika 4.3.**) o vremenu uzgoja *Thermomyces lanuginosus* na pogači lana. Provedena su dva paralelna pokusa. Uzorci su uzorkovani iz svake teglice, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za svaku teglicu posebno.



Slika 4.1. Ovisnost volumne aktivnosti lipaze o vremenu trajanja fermentacije tijekom uzgoja *Thermomyces lanuginosus* na pogači lana (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ = 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm)



Slika 4.2. Ovisnost koncentracije proteina o vremenu trajanja fermentacije (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ = 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm)



Slika 4.3. Ovisnost specifične aktivnosti lipaze o vremenu trajanja fermentacije (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ = 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm)

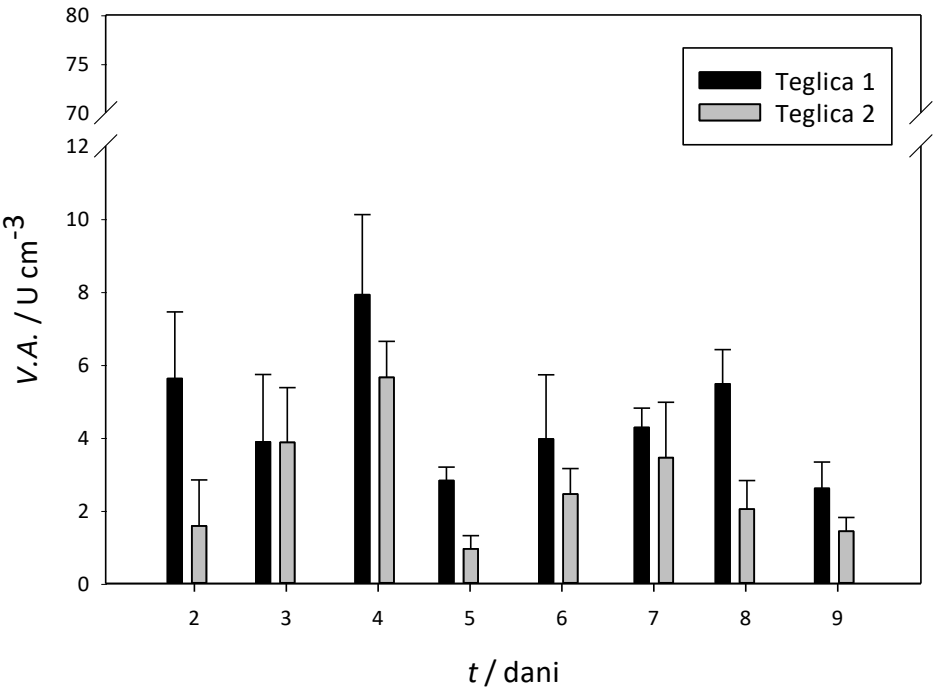
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da postoje značajne razlike u mjerenjima između dviju teglica, što je posljedica heterogenosti sustava, odnosno porasta micelija oko plagova na supstratu, koagulacije supstrata, nemogućnosti prodiranja dovoljne koncentracije kisika u unutrašnjost supstrata, itd. Vizualnim zapažanjem vidljiv je porast micelija već nakon drugog dana uzgoja.

Iz prikazanih rezultata na slici 4.1. vidljivo je da je najveća volumna aktivnost enzima postignuta nakon šestog dana uzgoja u prvoj teglici i iznosila je *V.A.*= 22,32 ± 1,62 u cm^{-3}. Iz prikazanih rezultata na slici 4.2. vidljivo je da je najveća koncentracija proteina izmjerena tijekom trećeg dana uzgoja u prvoj teglici i iznosila je $\gamma_{ek.proteina}$ = 1,41 ± 0,2 mg cm^{-3}. Najveća specifična aktivnost postignuta tijekom petog dana uzgoja u drugoj teglici i iznosila je *S.A.*= 63,19 U mg^{-1} (**Slika 4.3.**).

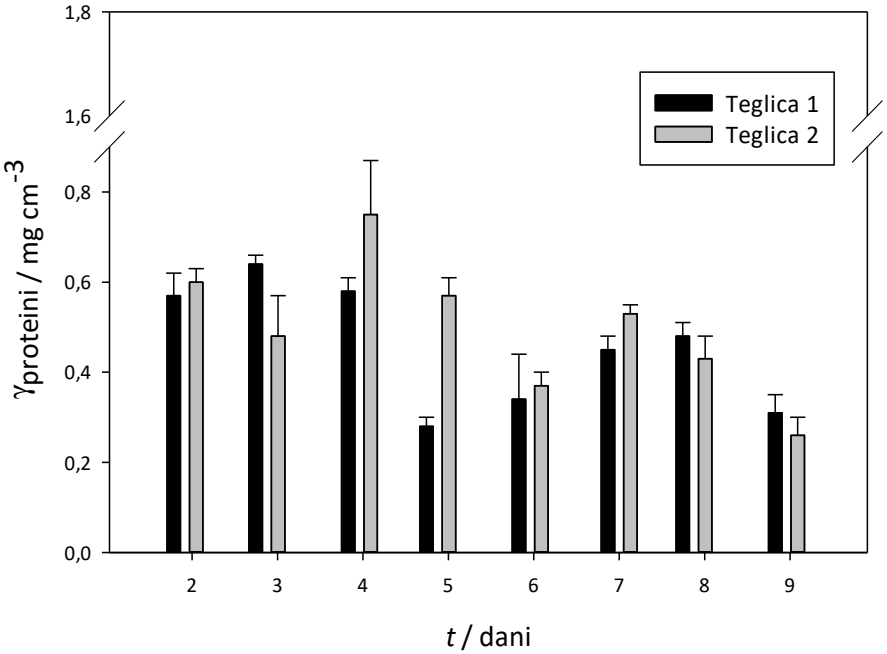
4.2. Uzgoj *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači buče s ciljem proizvodnje enzima lipaza

Proizvodnja enzima lipaza iz gljive *Thermomyces lanuginosus* provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači buče. Pogača buče je nusprodukt nastao tijekom proizvodnje hladno prešanog bučinog ulja. Pokus je trajao devet dana. Nakon prvoga dana uzgoja, svaka 24 h uzimani su uzorci iz teglica te su primjenom hladne ekstrakcije, centrifugiranja i filtriranja dobiveni ekstrakti iz kojih je određivana aktivnost enzima prema ranije opisanoj metodi (poglavlje 3. Eksperimentalni dio).

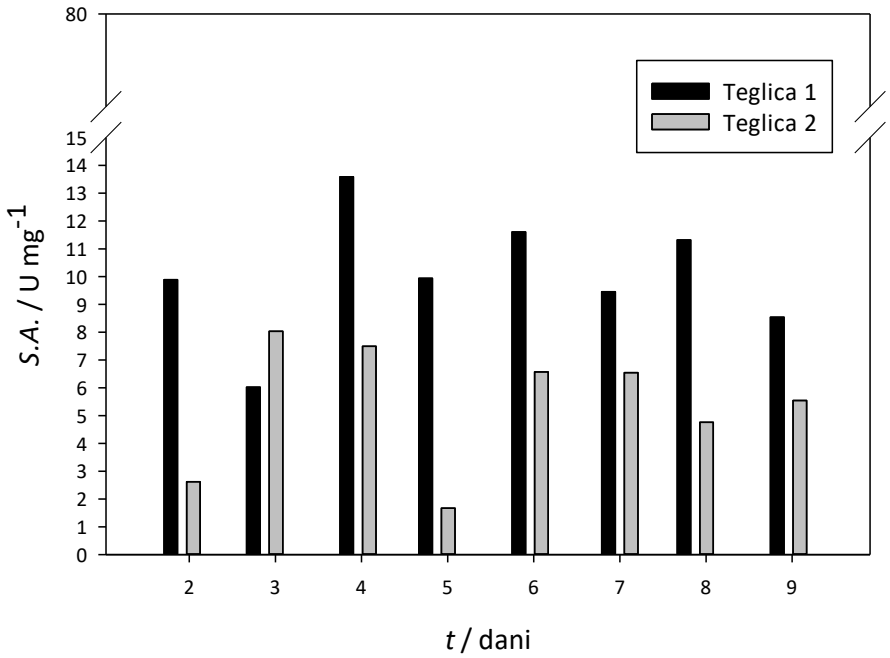
Grafički su prikazani rezultati ovisnosti volumne aktivnosti lipaze (**Slika 4.4.**), koncentracije ekstraktibilnih proteina (**Slika 4.5.**) i specifične aktivnosti lipaze (**Slika 4.6.**) o vremenu uzgoja *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče. Provedena su dva paralelna pokusa. Uzorci su uzorkovani iz svake teglice, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za svaku teglicu posebno.



Slika 4.4. Ovisnost volumne aktivnosti lipaze o vremenu trajanja fermentacije (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ = 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm)



Slika 4.5. Ovisnost koncentracije proteina o vremenu trajanja (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ = 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm)



Slika 4.6. Ovisnost specifične aktivnosti lipaze o vremenu trajanja fermentacije (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ = 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm)

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da, kao i u prethodnom pokusu, postoje značajne razlike u mjerenjima između dviju teglica. Vizualnim zapažanjem vidljiv je porast micelija na supstratu koji okružuje plagove već nakon drugog dana uzgoja.

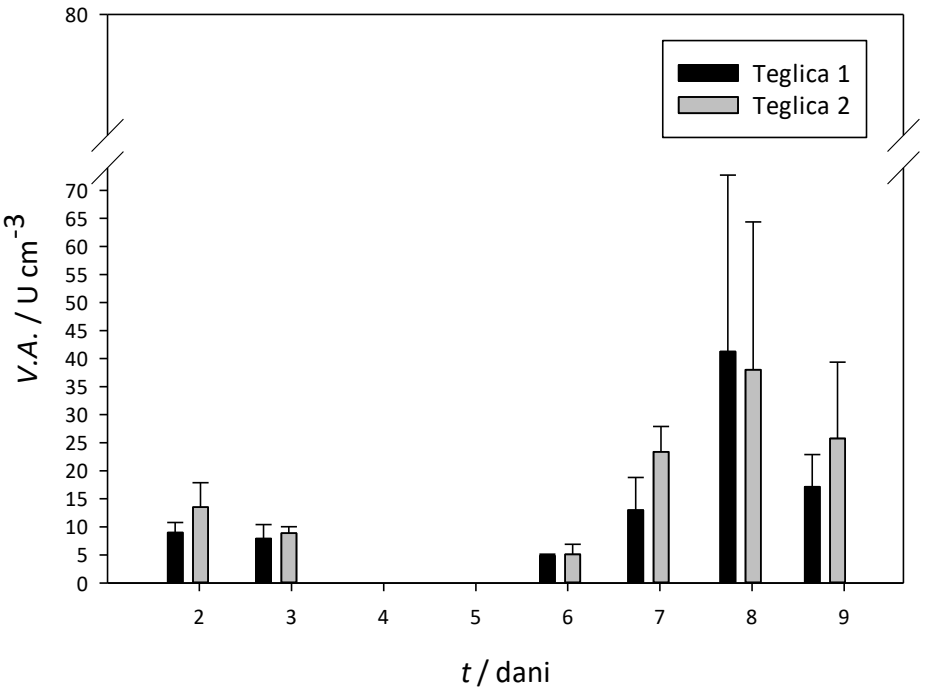
Iz prikazanih rezultata na slici 4.4. vidljivo je da je najveća volumna aktivnost enzima postignuta nakon četvrtog dana uzgoja u prvoj teglici i iznosila je *V.A.*= 7,92 ± 2,2 U cm^{-3}. Iz prikazanih rezultata na slici 4.5., vidljivo je da je najveća koncentracija proteina izmjerena tijekom četvrtog dana uzgoja u drugoj teglici i iznosila je $\gamma_{ek.proteina}$ = 0,75 ± 0,12 mg cm^{-3}.

Najveća specifična aktivnost postignuta nakon četvrtog dana uzgoja u prvoj teglici i iznosila je *S.A.* = 13,59 U mg^{-1} (**Slika 4.6.**).

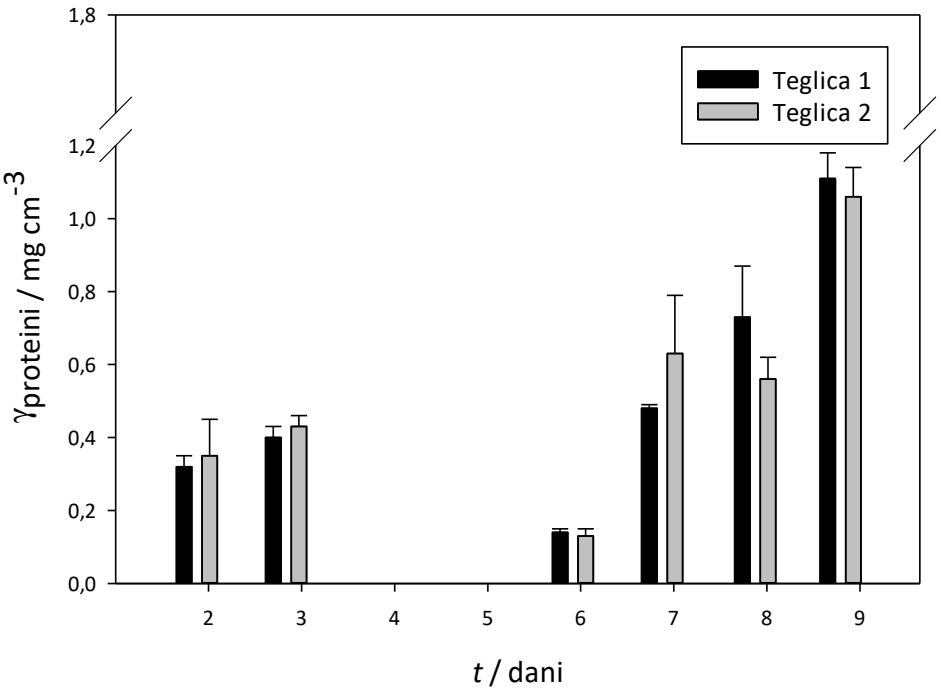
4.3. Uzgoj *Thermomyces lanuginosus* u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači konoplje s ciljem proizvodnje enzima lipaza

Proizvodnja enzima lipaze iz gljive *Thermomyces lanuginosus* provedena je u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači konoplje. Pogača konoplje je nusprodukt nastao tijekom proizvodnje hladno prešanog konopljinog ulja. Pokus je trajao devet dana. Nakon prvog dana uzgoja, svaka 24 h, osim četvrtog i petog dana, uzimani su uzorci iz teglica te su primjenom hladne ekstrakcije, centrifugiranja i filtriranja dobiveni ekstrakti iz kojih je određivana aktivnost enzima prema ranije opisanoj metodi (poglavlje 3. Eksperimentalni dio).

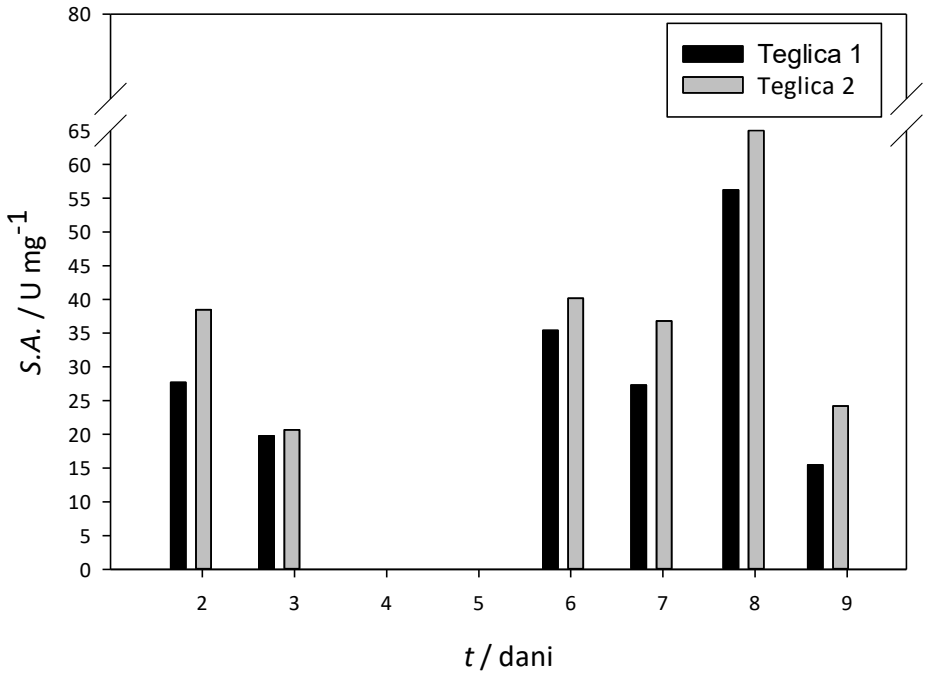
Grafički su prikazani rezultati ovisnosti volumne aktivnosti lipaze (**Slika 4.7.**), koncentracije ekstraktibilnih proteina (**Slika 4.8.)** i specifične aktivnosti lipaze (**Slika 4.9.**) o vremenu uzgoja *Thermomyces lanuginosus* na pogači konoplje. Provedena su dva paralelna pokusa. Uzorci su uzorkovani iz svake teglice, a rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija za svaku teglicu posebno.



Slika 4.7. Ovisnost volumne aktivnosti lipaze o vremenu trajanja (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ= 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm)



Slika 4.8. Ovisnost koncentracije proteina o vremenu trajanja fermentacije (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ = 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm)



Slika 4.9. Ovisnost specifične aktivnosti lipaze o vremenu trajanja fermentacije (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ = 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm)

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da postoje značajne razlike u mjerenjima između dviju teglica, što je posljedica heterogenosti sustava, a porast micelija na supstratu koji okružuje plagove uočen je nakon drugog dana uzgoja. Iz prikazanih rezultata na slici 4.8. vidljivo je da je najveća koncentracija proteina izmjerena nakon devetog dana uzgoja u prvoj teglici i iznosila je $\gamma_{ek.proteina}$ = 1,11 ± 0,07 mg cm^{-3}.

Iz prikazanih rezultata na slici 4.7. vidljivo je da je najveća specifična aktivnost enzima lipaze postignuta nakon osmog dana uzgoja u drugoj teglici i iznosila je *S.A.*= 68,18 U mg^{-1} (**Slika 4.9.**).

Usporedbom rezultata istraživanja provedenih uzgojem gljive *Thermomyces lanuginosus* na trima različitim pogačama, može se zaključiti da *Thermomyces lanuginosus* raste na sve tri vrste pogača, ali da je pogača konoplje u svrhu proizvodnje lipaze, najbolji supstrat za uzgoj *Thermomyces lanuginosus*.

4.4. Pročišćavanje lipaze

Pročišćavanje ekstrakta enzima lipaze iz gljive *Thermomyces lanuginosus* provedeno je u tri stupnja kako je opisano u poglavlju 3.5.

U frakcijama koje su skupljane tijekom pročišćavanja kromatografijom izmjerene su izrazito niske koncentracije proteina i volumne aktivnosti jer je došlo do začepljenja gel kolone Superdex 200.

Tablica 1. Promjena volumne i specifične aktivnosti enzima lipaza tijekom pročišćavanja

Korak pročišćavanja	**Volumen (cm^3)**	**Ukupna aktivnost (U)**	**Ukupna masa proteina (mg)**	**Volumna aktivnost (U cm^{-3})**	**Koncentracija proteina (mg cm^{-3})**	**Specifična aktivnost (U mg^{-1})**
Supernatant	90,00	6218,87	1586,19	69,10	17,62	3,92
Precipitacija s $(NH_4)_2SO_4$ (0-70%)	3,00	2018,43	59,22	672,81	19,74	34,09
Dijaliza	2,70	1815,31	54,91	672,34	20,34	33,06
Filtracija	2,50	1039,64	48,60	415,86	19,44	21,39

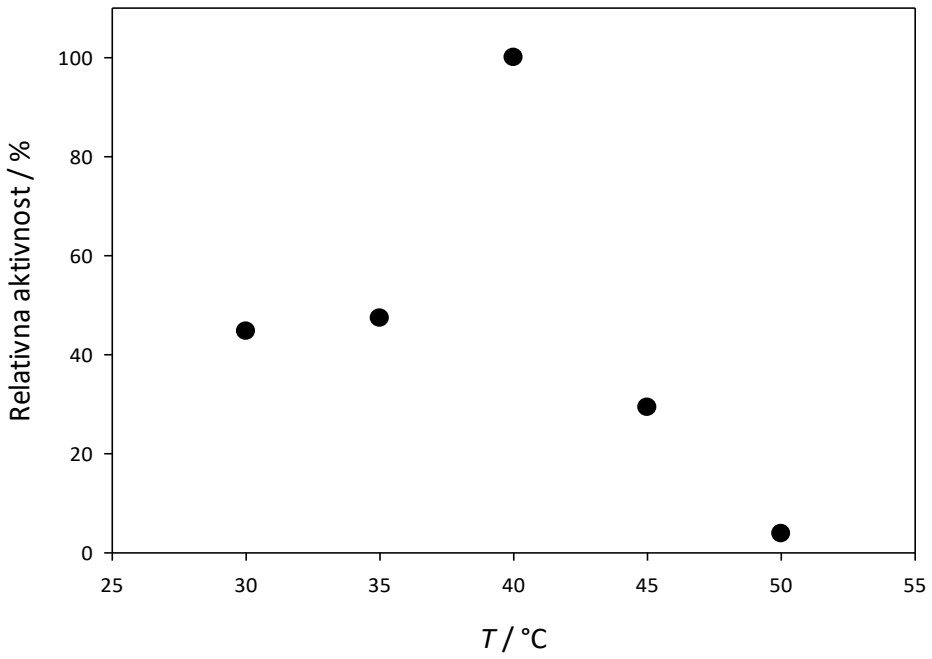
Iz **Tablice 1**. vidljivo je da je postupkom isoljavanja uz pomoć amonijevog sulfata postignuto povećanje volumne i specifične aktivnosti za deset puta (*V.A.* = 672,81 U cm^{-3}, *S.A.*= 34,09 U mg^{-1}). Nakon postupka dijalize radi uklanjanja soli u uzorku, zanemarivo se smanjila volumna i specifična aktivnosti, ali nakon filtracije dijaliziranog uzroka, koristeći nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filter (pora: 0,25 µm, promjer: 25 mm), došlo je do znaajno smanjenja volumne i specifične aktivnosti enzima (*V.A* .= 415,86 U cm^{-3}, *S.A.*= 33,06 U mg^{-1}). U frakcijama koje su skupljane tijekom kromatografije izmjerene su izrazito niske koncentracije proteina i volumne aktivnosti jer je došlo do začepljenja gel kolone Superdex 200 te je zaključeno da je u sljedećim istraživanjima potrebno koristiti kolone Sephadex G-50 i Sephadex G-100.

4.5. Karakterizacija enzima ekstrakta lipaza

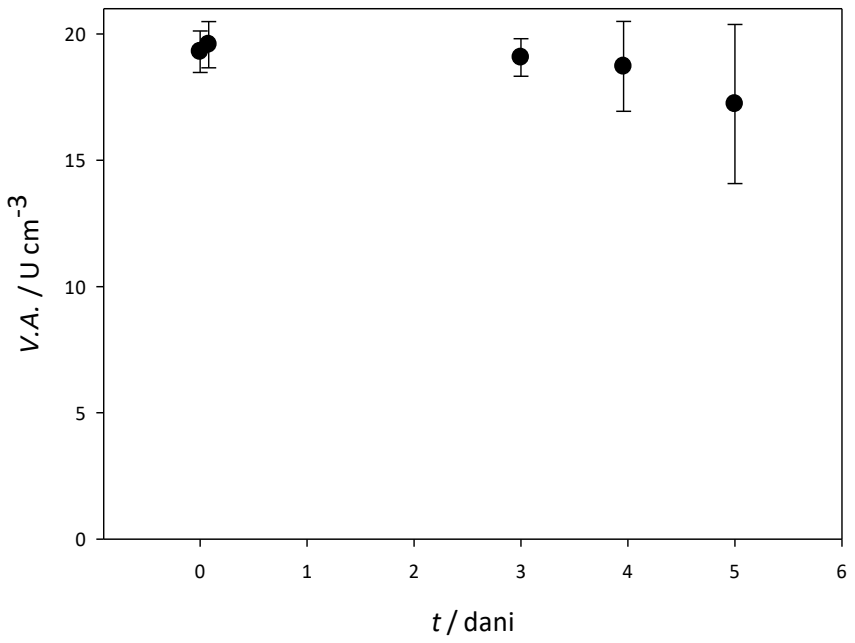
U ovom poglavlju prikazani su rezultati istraživanja stabilnosti proizvedenog ekstrakta enzima lipaza tijekom skladištenja pri temperaturama +25 °C i +4 °C te rezultati određivanja optimalne temperature za aktivnost enzima. Za potrebe ovih istraživanja korištena je lipaza proizvedena uzgojem *Thermomyces lanuginosus* na pogači konoplje.

Nakon proizvodnje enzima lipaza iz gljive *Thermomyces lanuginosus* pri uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima na pogači konoplje tijekom sedam dana (procesni uvjeti: T = 40 °C, ϕ = 60 %, $m_{supstrata}$ = 50 g, 5 micelijskih plagova, ø = 6 mm) provedena je hladna ekstrakcija enzima, nakon čega su uzorci skladišteni pri temperaturama +25 °C i +4 °C radi ispitivanja stabilnosti enzima tijekom vremena.

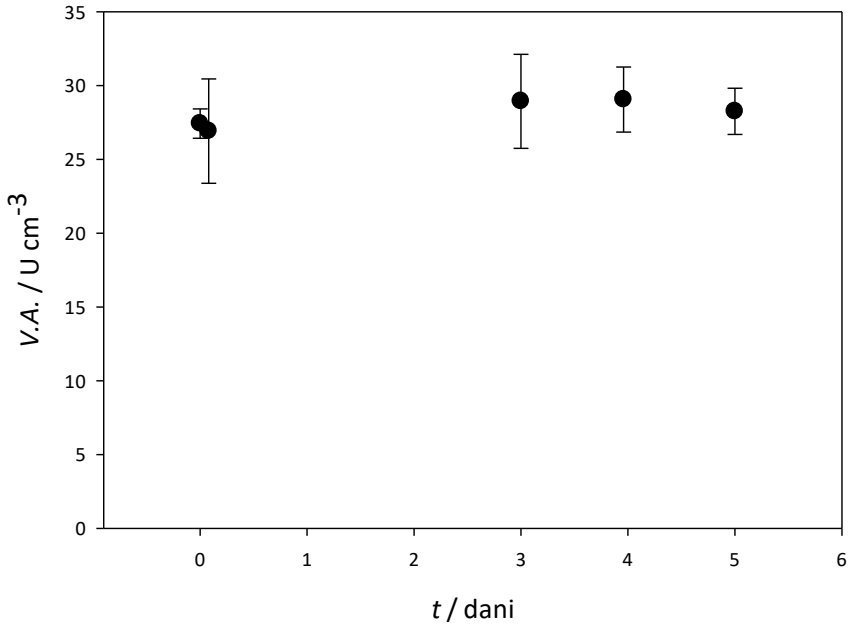
Određivanje optimalne temperature za postizanje maksimalne volumne aktivnosti provedeno je u 0,1 M fosfatnom puferu (pH = 7,5) pri temperaturama od 30 °C ,35 °C, 40 °C, 45 °C i 50 °C prikazano je na **Slici 4.10**. određivanje stabilnosti enzima tijekom skladištenja pri +25 °C i +4 °C prikazano je na **Slikama 4.11.** i **4.12.**



Slika 4.10. Ovisnost aktivnosti enzima lipaze o temperaturi (0,1 M fosfatni pufer, pH = 7,5)



Slika 4.11. Volumna aktivnost enzima tijekom pet dana skladištenja pri *T* = +4 °C (0,1 M fosfatni pufer pH = 7,0)



Slika 4.12. Volumna aktivnost enzima tijekom pet dana skladištenja pri *T* = +25 °C (0,1 M fosfatni pufer, pH = 7,0)

Na osnovi rezultata (**Slika 4.10.**) može se zaključiti da je temperatura od +40 °C optimalna za postizanje optimalne volumne aktivnosti enzima. Iz prikazanih rezultata (**Slika 4.11. i Slika 4.12.**) može se zaključiti da je enzim stabilan tijekom skladištenja pri temperaturama +25 °C i +4 °C tijekom pet dana.

4.6. Enzimska sinteza biodizela

Enzimska sinteza biodizela provedena je s komercijalnom lipazom i s proizvedenim ekstraktom lipaze (pročišćenim i nepročišćenim) prema eksperimentalnom planu opisanom u poglavlju 3.4.

Nakon sinteze biodizela provedeno je razdjeljivanje reakcijske smjese u lijevku za odjeljivanje pri čemu je u gornjoj fazi dobivena smjesa metilnih estera masnih kiselina (biodizel), a u donjoj fazi glicerol, enzim i voda. Nakon razdvajanja glicerola od biodizela provedena je analiza sadržaja metilnih estera masnih kiselina, gustoće i viskoznosti proizvedenog biodizela (**Tablica 2**.)

Tablica 2. Svojstva sintetiziranih biodizela pri korištenju komercijalnog i biološki dobivenog enzima lipaza

Sastav proizvedenog biodizela	**Lipaza**		
	komercijalna	nepročišćena	pročišćena
Udio metilnih estera masnih kiselina %	95,2	11,54	3,06
Palmitinska kiselina / %	7,06	8,46	8,63
Stearinska kiselina / %	2,87	2,86	2,82
Oleinska kiselina / %	31,84	31,51	33,47
Linolna kiselina / %	58,23	57,16	55,07
Gustoća (20 °C), g cm^{-3}	0,880	0,992	0,915
Kinematička viskoznost (40 °C), mm^2 s^{-1}	4,68	19,74	18,12

Iz **Tablice 2.** vidljivo je da je izrazito niski udio metilnih estera masnih kiselina suncokretovog ulja u biodizelu postignut u pokusima u kojima je korišten nepročišćeni (11,54 %) i pročišćeni enzim (3,06 %), u odnosu na udio metilnih estera masnih kiselina suncokretovog ulja u biodizelu koji je dobiven s komercijalnom lipazom (95,2 %).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Od svih testiranih pogača (pogača konoplje, buče i lana) najbolji rezultati u pogledu produkcije lipaze postignuti su upotrebom pogače konoplje kao supstrata za uzgoj *Thermomyces lanuginosus* s ciljem proizvodnje lipaze.

Uzgojem gljive *Thermomyces lanuginosus* na pogači konoplje u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima tijekom devet dana, najveće aktivnosti (*V.A.*= 41,3 U cm^{-3}; *S.A.*= 68,2 U mg^{-1}) postignute su nakon osmog dana uzgoja.

Uzgojem gljive *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima tijekom devet dana, najveće aktivnosti (*V.A.*= 7,9 U cm^{-3}; *S.A.*= 13,6 U mg^{-1}) postignute su nakon šestog dana uzgoja.

Uzgojem gljive *Thermomyces lanuginosus* na pogači lana u uvjetima fermentacije na čvrstim nosačima tijekom devet dana, najveće aktivnosti (*V.A.*= 7,9 U cm^{-3}; *S.A.*= 13,6 U mg^{-1}) postignute su nakon četvrtog dana uzgoja.

Istraživanja utjecaja temperature na aktivnost proizvedenog enzima pokazala su da je optimalna temperatura za aktivnost lipaze 40 °C.

Dokazano je da je proizvedeni enzim stabilan tijekom skladištenja u razdoblju od pet dana pri temperaturama od +25 °C i +4°C.

Postupkom isoljavanja primjenom 1mM PMSF i amonijevog sulfata, postignuto je povećanje volumne i specifične aktivnosti s *V.A.* = 69,1 U cm^{-3} i *S.A.*= 3,2 U mg^{-1} na *V.A.* = 672,8 U cm^{-3}, *S.A.*= 34,1 U mg^{-1}.

U šaržnom pokusu sinteze biodizela iz suncokretovog ulja i metanola, kataliziranom komercijalnim enzimom lipaza tijekom dva dana, proizveden je biodizel koji je sadržavao 95,2 % metil estera masnih kiselina.

U šaržnom pokusu sinteze biodizela iz suncokretovog ulja i metanola, kataliziranom s vlastito proizvedenim nepročišćenim enzimom lipaza, udio metilnih estera masnih kiselina u dobivenom biodizelu bio je 11,5 %, a u pokusu s pročišćenim enzimom, udio metilnih estera masnih kiselina bio je 3,1 %.

6. LITERATURA

Abdul M M, Webb C: Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering* 4: 511-532, 2014.

Durand A: Bioreactor designs for solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 13: 113–125, 2003.

Bajaj A, Lohan P, Jha P N, Mehrotra R: Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62: 9–14, 2010.

Bellon-Maurel V, Orliac O, Christen P: Sensors and measurements in solid state fermentation: A review. *Process Biochemistry* 38: 881–896, 2003.

Bhuiya M M K, Rasul M G, Khan M M K, Ashwath N, Azad A K, Hazrat M A: Second generation biodiesel: Potential alternative to-edible oil-derived biodiesel. *Energy Procedia* 61:1969–1972, 2014.

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.

Casas-Godoy L, Gasteazoro F, Duquesne S, Bordes F, Marty A, Sandoval G: Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols. *Methods in Molecular Biology* 1835*:* 3-38, 2018.

Cavalcanti E D C, Gutarra M L E, Sant'Anna G L, Freire D M G, Castilho L R: Lipase Production by Solid-State Fermentation. *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* 5(2): 105–116, 2009.

Egorova E Y, Bochkarev M S, Poznyakovskiy V M, Reznichenko I Y: Reasons for the Ways of Using Oilcakes in Food Industry. *Foods and Raw materials* 4(1): 4–12, 2016.

Fernandez-Lafuente R: Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62(3–4): 197–212, 2010.

Geoffry K, Achur R N: Screening and production of lipase from fungal organisms. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 14: 241–253, 2018.

Gog A, Roman M, Toşa M, Paizs C, Irimie F D: Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. *Renewable Energy* 39: 10–16, 2012.

Gutiérrez C, Rubilar M, Jara C, Verdugo M, Sineiro J, Shene C: Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *Journal of soli science and plant nutrition* 10(4): 454-463, 2010.

Hassan M H, Kalam M A: An overview of biofuel as a renewable energy source: Development and challenges. *Procedia Engineering* 56: 39–53, 2013.

House J D, Neufeld J, Leson G: Evaluating the quality of protein from hemp seed (Cannabis sativa L.) products through the use of the protein digestibility-corrected amino acid score method. *Journal of agricultural and food chemistry* 58: 11801–11807, 2010.

Ilmi M, Hidayat C, Hastuti P, Heeres H J, van der Maarel M J E C: Utilisation of Jatropha press cake as substrate in biomass and lipase production from Aspergillus niger 65I6 and Rhizomucor miehei CBS 360.62. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 9: 103–107, 2017.

Krishna C: Solid-state fermentation systems - An overview. *Critical Reviews in Biotechnology* 25: 1–30, 2005.

Mitchell D A, Krieger N, Berovič M: *Solid-state fermentation bioreactors, Fundamentals of design and operation*. Springer, Berlin Heidelberg, 2006.

Ognjanović N D, Petrović S D, Bezbradica D I, Knežević-Jugović Z D: Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela. *Hemijska Industrija*, 64: 1–8, 2010.

Peričin D, Madarev-Popović S, Radulovi-Popović L, Škrinjar M: Evaluate of pumpkin oil cake as substrate for the cellulase production by Penicillium roqueforti in solid state fermentation. *Romanian Biotechnological Letters* 13: 3815-3820, 2008.

Predojević Z: *Goriva iz biomase bioetanol i biodizel*. SP PRINT, Novi Sad, 2010.

Planinić M, Zelić Br, Čubel I, Bucić-Kojić A, Tišma M: Corn forage biological pretreatment by Trametes versicolor in a tray bioreactor. *Waste management & research* 34: 802-809, 2016.

Ranganathan S V, Narasimhan S L, Muthukumar K: An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology* 99: 3975–3981, 2008.

Schluttenhofer C, Yuan L: Challenges towards Revitalizing Hemp: A Multifaceted Crop. *Trends in Plant Science* 22: 917-929, 2017.

Singh S, Madlala A M, Prior B A: Thermomyces lanuginosus: Properties of strains and their hemicellulases. *FEMS Microbiology Reviews* 27: 3–16, 2003.

Tišma M, Velić N, Zelić B : From waste to value-added products – solid-state fermentation by white-rot fungi. U *Biotechnology (Multi-Volume Set),* str. 223 – 256. Studium Press LLC, New Delhi, 2014.

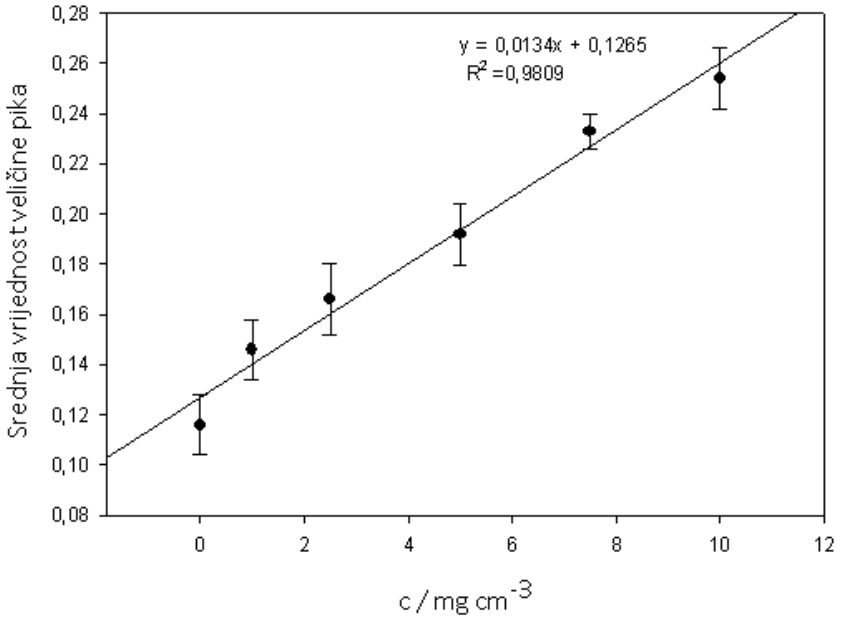
Zdunczyk Z, Minakowski D, Frejnagel S, Flis M: Comparative study of the chemical composition and nutritional value of pumpkin seed cake, soybean meal and casein. *Nahrung – Food* 43: 392–395, 1999.

Yaakob Z, Mohammad M, Alherbawi M, Alam Z, Sopian K: Overview of the production of biodiesel from Waste cooking oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 18: 184–193, 2013.

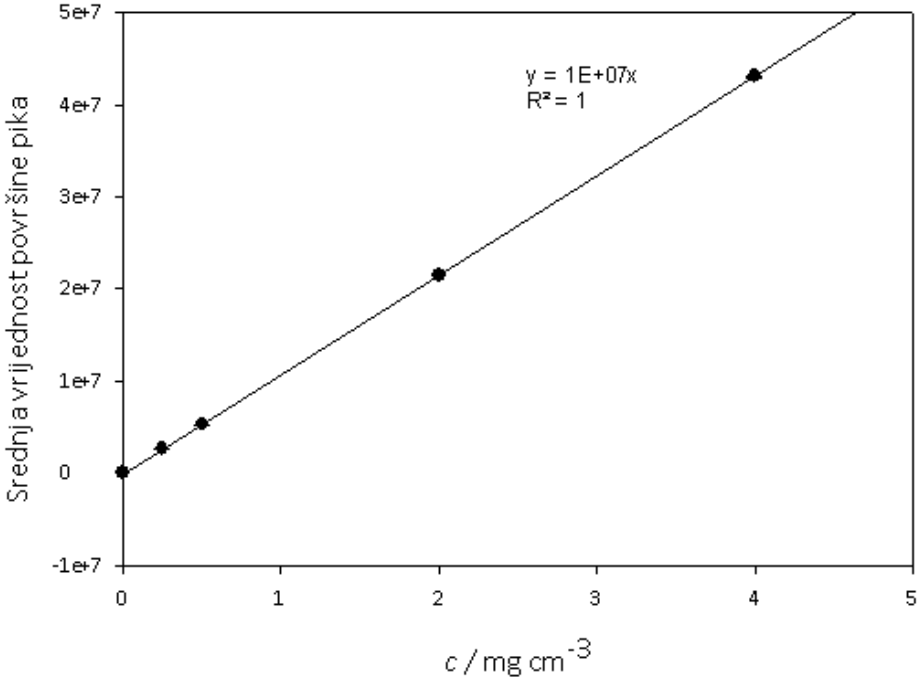
Yücel Y: Optimization of immobilization conditions of Thermomyces lanuginosus lipase on olive pomace powder using response surface methodology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 1: 39–44, 2012.

7. PRILOZI

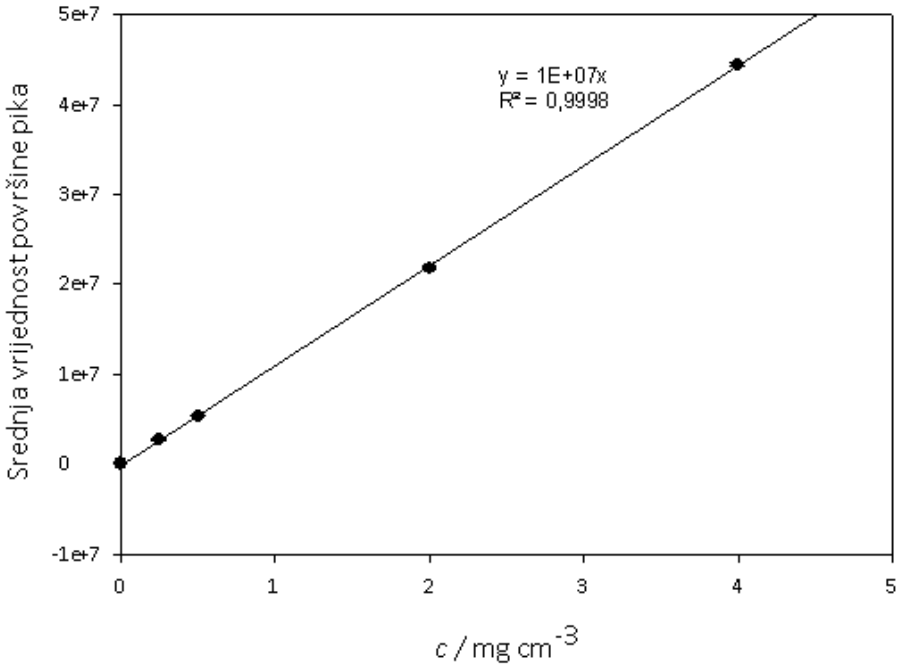
Prilog 1 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina



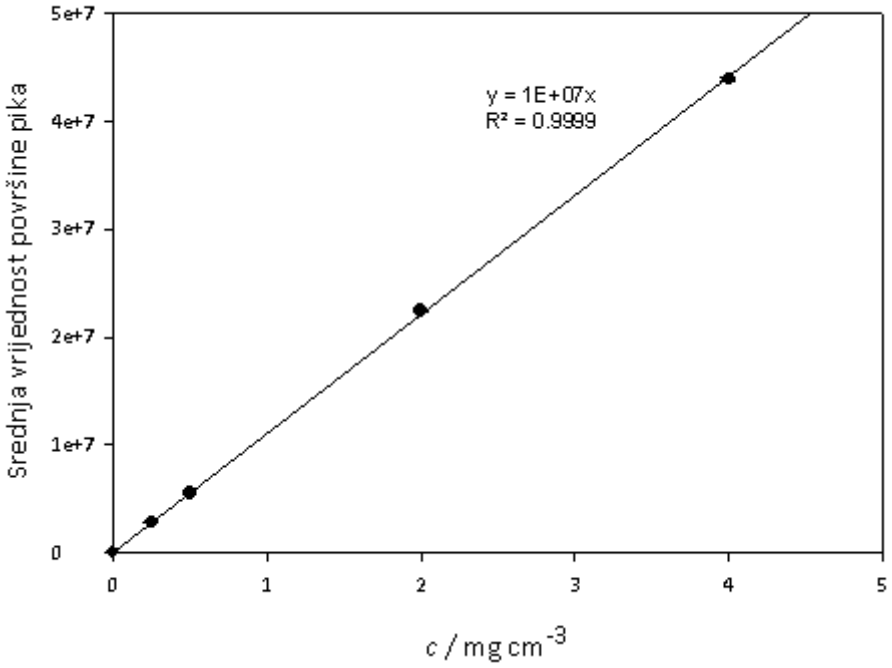
Prilog 2 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije palmitinske kiseline



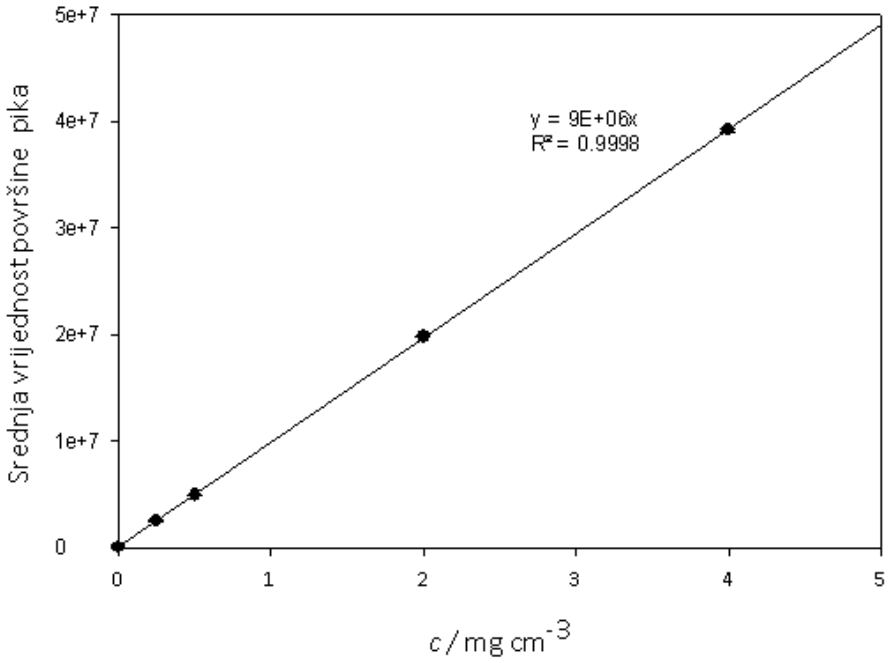
Prilog 3 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije stearinske kiseline



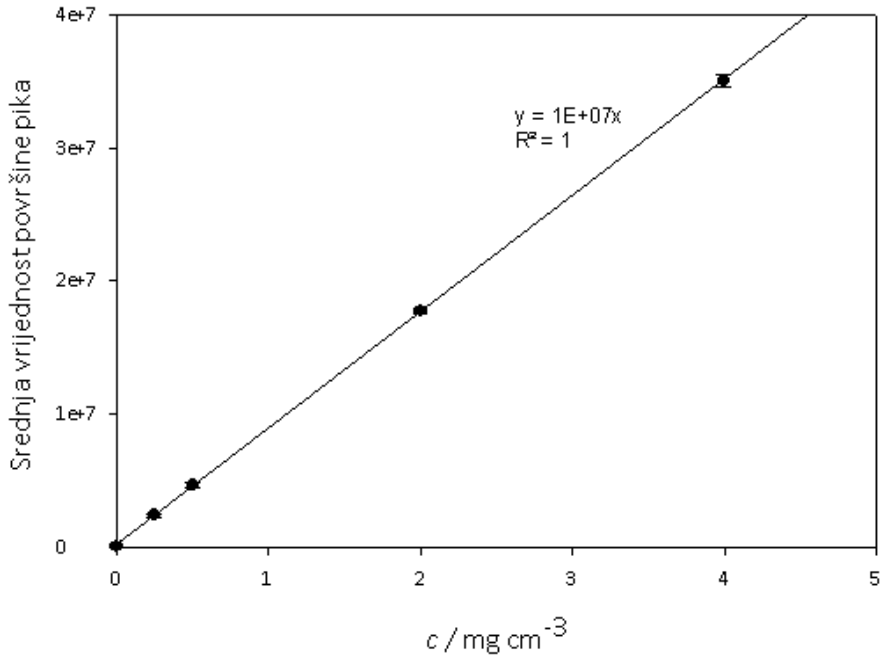
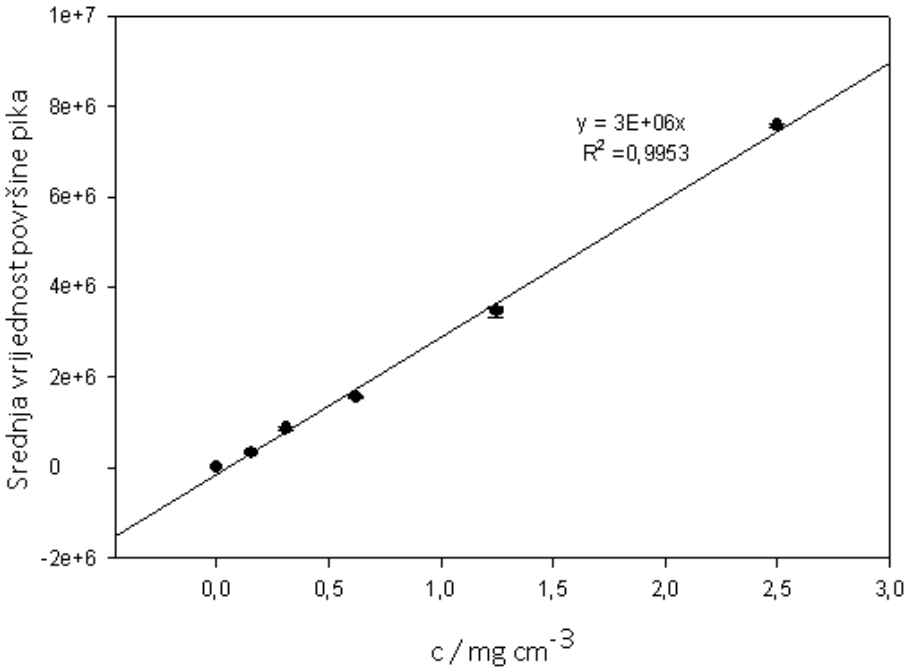
Prilog 4 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije oleinske kiseline



Prilog 5 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije linolne kiseline



Prilog 6 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije linoleinske kiseline



Prilog 7 Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola