

Primjena pirolitičkog ugljika dobivenog pirolizom otpadne mljevene kave kao materijala za izradu bioelektrokatalitičkih elektroda

Rešetar, Egon

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:159:443185>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij
Biotehnologija

Egon Rešetar
6938/BT

**Primjena pirolitičkog ugljika dobivenog
pirolizom otpadne mljevene kave kao
materijala za izradu bioelektrokatalitičkih
elektroda**

ZAVRŠNI RAD

Projekt: Električko nabijanje međupovršina na granici čvrsta faza/vodena otopina
elektrolita (HRZZ projekt br. 6972)

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Damir Iveković

Zagreb, 2017

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za opću i anorganski kemiju i elektroanalizu
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Pirolitička obrada biomase iskorištene kave u svrhu dobivanja poroznog ugljika primjenjenog u bioelektrokatalizi

Egon Rešetar, 0058205224

Sažetak

U radu je istražena primjena otpadne kave zaostale nakon pripreme *espresso* kave, kao sirovine za dobivanje pirolitičkog ugljika (PU) za primjenu u bioelektrokatalizi. PU su pripremljeni pirolizom u inertnoj atmosferi, pri $T=800$ °C, koristeći nemodificiranu otpadnu kavu te otpadnu kavu impregniranu željezovim(II) nitratom kao katalizatorom grafitizacije. Karakterizacija dobivenih PU provedena je elektronskom mikroskopijom i rendgenskom difrakcijom. Na dobivene PU imobilizirana je peroksidaza te su iskorišteni za pripravu bioelektrokatalitičkih elektroda, kojima su istražena svojstva pri redukciji H_2O_2 te je praćena promjena njihove aktivnosti tijekom skladištenja. Pokazano je da su uzorci dobiveni pirolizom nemodificirane otpadne kave građeni od amorfnog ugljika te da nisu prikladni za primjenu u bioelektrokatalizi zbog slabe bioelektrokatalitičke aktivnosti i kratke vremenske stabilnosti. Uzorci dobiveni pirolizom otpadne kave modificirane sa $Fe(NO_3)_2$ sadrže značajan udio grafitnih domena te pokazuju 2–3 puta veću bioelektrokatalitičku aktivnost i vremensku stabilnost, što je pripisano većoj aktivnoj površini PU dobivenih pirolizom u prisutnosti katalizatora.

Ključne riječi: aktivna površina, bioelektrokataliza, grafitizacija, katalizator, piroliza

Rad sadrži:

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Prof.dr.sc. Damir Iveković

Pomoć pri izradi: -

Datum obrane: 30.08.2017

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of chemistry and biochemistry
Laboratory for basic chemistry, analytical chemistry and electroanalysis

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Pyrolysis of used coffee grounds for obtaining porous carbon utilized in bioelectrocatalysis

Egon Rešetar, 0058205224

Abstract:

In this work, the applicability of spent coffee grounds as a starting material for production of pyrolytic carbon (PC) for application in bioelectrocatalysis was investigated. PC samples were prepared by pyrolysis of non-modified spent coffee grounds and coffee grounds impregnated with iron(II) nitrate as graphitization catalyst at 850 °C, under inert atmosphere. Characterization of the obtained PC samples was conducted by electron microscopy and X-ray diffraction. The obtained PC samples were employed as a substrate for peroxidase immobilization and subsequently utilized for construction of bioelectrocatalytic electrodes. Bioelectrocatalytic activity and storage stability of obtained electrodes were monitored during 7-days period. It was shown that PC samples produced from non-modified spent coffee grounds are composed predominately of amorphous carbon and are not well suited for bioelectrocatalysis due to their low bioelectrocatalytic activity and short storage stability. Samples obtained from iron(II) nitrate-impregnated coffee grounds exhibited a significant amount of graphite domains in their structure and showed 2,5–3 times greater bioelectrocatalytic activity and storage stability, which can be attributed to their larger active surface area.

Keywords: active surface, bioelectrocatalysis, graphitisation, catalyst, pyrolysis

Thesis contains:

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Associate Professor Ph.D. Damir Iveković

Technical support and assistance: -

Defence date: 30th August, 2017.

Sadržaj

1.Uvod	1
2.Teorijski dio	2
2.1. Kemijski sastav otpadne kave	2
2.2. Otpadna kava kao sirovina	2
2.3. Piroliza biomase	3
2.3.1. Mehanizam pirolize	4
2.3.2. Katalizirana piroliza	7
2.4. Bioelektrokataliza	10
3. Eksperimentalni dio	13
3.1. Materijali i metode	13
3.1.1. Kemikalije	13
3.1.2. Uzorci	13
3.1.3. Mjerni uređaji	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Priprema pirolitičkog ugljika	14
3.2.2. Priprema bioelektrokatalitičkih elektroda	15
3.2.3. Određivanje bioelektrokatalitičke aktivnosti elektroda	16
4. Rezultati	17
4.1. Morfološka i strukturna karakterizacija uzorka	17
4.2. Bioelektrokataliza	24
5. Rasprava	27
5.1. Morfologija i struktura uzorka	27
5.2. Bioelektrokatalitička svojstva pirolitičkih ugljika s imobiliziranom HRP	29
6. Zaključak.....	31
7. Literatura.....	32

1. Uvod

Polazeći od osnovnog načela održivog razvoja, koje u području energetike pretpostavlja iskorištavanje otpada kao korisne sirovine, u posljednjih desetak godina značajno su intenzivirana istraživanja u području iskorištavanja otpadne biomase i njenog prevođenja u visoko vrijedne proizvode. U tom kontekstu, pored tehnologija koje otpadnu biomasu prevode u biogoriva ili koriste kao sirovinu za dobivanje industrijskih kemikalija, kao perspektivne i s ekonomskog stajališta zanimljive pokazale su se i tehnologije koje otpadnu biomasu pirolizom pri visokoj temperaturi prevode u pirolitički plin ili pirolitički ugljik. Zbog svoje velike specifične površine i dobrih adsorpcijskih svojstava, pirolitički ugljik dobiven pirolizom otpadne biomase pronalazi primjenu kao adsorbens za pročišćavanje tekućina i plinova te kao filtracijsko sredstvo. U najnovije se vrijeme istražuje i primjena poroznog ugljika dobivenog pirolizom otpadne biomase u naprednim izvorima energije, kao što su superkondenzatori ili gorivni članci temeljeni na bioelektrokatalizi (tzv. biogorivni članci). Za te je svrhe nužno pirolizom otpadne biomase dobiti ugljik koji je električno vodljiv te optimirane poroznosti i svojstava površine.

U ovom radu istražena je primjena otpadne mljevene kave, zaostale nakon pripreme *espresso* kave ili pri proizvodnji instant kave, kao sirovine za dobivanje pirolitičkog ugljika za primjenu u bioelektrokatalizi. Odabir otpadne biomase bio je motiviran činjenicom da je količina otpadne kave vrlo velika te da se ona trenutno ne iskorištava kao sirovina, već uglavnom završava na deponijima. Pored toga, otpadna kava jedan je od rijetkih primjera otpadne biomase u obliku praha, što je čini atraktivnom sirovinom za pirolitičku preradu jer je prije pirolize nije potrebno dodatno usitnjavati. Uzorci pirolitičkog ugljika pripremljeni su pirolizom u inertnoj atmosferi dušika, pri temperaturi od 800 °C, koristeći nemodificiranu otpadnu kavu te otpadnu kavu impregniranu željezovim(II) nitratom kao katalizatorom grafitizacije. Morfološka i strukturna karakterizacija dobivenih pirolitičkih ugljika provedena je kombinacijom pretražne i transmisijske elektronske mikroskopije te rendgenske difrakcije. Kako bi se ispitala primjenjivost dobivenih pirolitičkih ugljika u bioelektrokatalizi, na uzorke je fizikalnom adsorpcijom imobilizirana peroksidaza te su oni potom iskorišteni za površinsko modificiranje grafitnih disk-elektroda. Dobivenim elektrodama određena su katalitička svojstva pri elektrokemijskoj redukciji vodikova peroksida te je praćena promjena njihove elektrokatalitičke aktivnosti tijekom tjedan dana skladištenja.

2. Teorijski dio

2.1. Kemijski sastav otpadne kave

Otpadna biomasa zaostala nakon pripreme *espresso* kave ili pri proizvodnje instant-kave sastoji se većinom od polisaharida: hemiceluloze (39,1 %), celuloze (12,4 %) i lignina (23,9 %) [1]. Značajan je udio slobodnih masnih kiselina koje čine 80 % lipofilne frakcije, a lipofilna frakcija čini 13 % mase. Od masnih kiselina najzastupljenije su n-heksadekanska kiselina (C_{16}), 9,12-oktadekanska kiselina ($C_{18:2}$) te oleinska kiselina ($C_{18:1}$). Iskorištena (otpadna) mljevena kava sadrži i proteine, u masenom udjelu od 9,9 do 14 % [2]. Taj je udio veći nego u neiskorištenoj prženoj kavi, u kojoj prosječno iznosi 3,1 % [2]. Razlog tome je činjenica da se tijekom uporabe mljevene kave za pripremu napitaka iz nje ekstrahiraju sastojci topljivi u vodi, dok proteini, koji su većinom netopljivi u vodi, zaostaju u kavi. Od ostalih spojeva valja spomenuti polifenole i tanine koji čine oko 6 % mase otpadne kave [2,3].

2.2. Otpadna kava kao sirovina

Kava je po širini trgovinske razmjene (odn. broju zemalja uključenih u trgovinsku razmjenu) druga najčešće razmjenjivana sirovina u svijetu, odmah nakon nafte, i kao takva predstavlja gotovo neiscrpan izvor otpadne sirovine [2]. Usprkos velikoj količini otpadne kave, do prije nekoliko godina ona nije bila razmatrana kao korisna otpadna sirovina, pa stoga većina otpadne kave još uvijek završava na deponijima [2].

U novije vrijeme započela su istraživanja usmjerena na pronalaženje načina iskorištavanja otpadne kave. Među tim istraživanjima dominiraju ona vezana uz proizvodnju biogoriva i bioulja. Primjerice, pokazano je da se ekstrahiranjem lipida iz otpadne kave i njihovom transesterifikacijom može pripremiti biodizel, dok se čvrsti ostatak zaostao nakon ekstrakcije sporom pirolizom može prevesti u bioulje i pirolitički ugljik visoke specifične površine [4]. Nedavno istraživanje pokazalo je da se pri proizvodnji biodizela iz otpadne mljevene kave stupanj ekstrakcije lipida može izbjeći, tj. da se transesterifikacija lipida može provesti *in situ*, tretiranjem otpadne kave vodenom otopinom sumporne kiseline ($w = 20\%$), optimalno pri 70 °C tijekom 12 sati, uz utrošak 28,9 kg metanola po kilogramu otpadne biomase [5]. Hidrotermalnom likvefakcijom otpadne mljevene kave u vodenom mediju pri 275 °C i tlaku od 2 MPa dobiveno je bioulje, čija je ogrijevna vrijednost od 31,0

MJ/kg bila značajno veća od ogrijevne vrijednosti polazne otpadne biomase (20,2 MJ/kg) [6]. Bioulje je od otpadne kave moguće dobiti i brzom pirolizom pri 650 °C, uz iskorištenje od gotovo 55 % [7]. Pored bioulja, kao produkt pirolize otpadne kave dobiva se i čvrsti produkt koji se pretežito sastoji od čistog ugljika, koji se općenito naziva *pirolitičkim ugljikom*, a u specijalnom slučaju produkta s visokom specifičnom površinom i dobrim adsorpcijskim svojstvima, *aktivnim ugljenom*. Istraživanja su pokazala da pirolitički ugljik dobiven pirolizom otpadne kave u prisutnosti katalizatora kao što je, primjerice, fosforna kiselina, pokazuje dobra adsorpcijska svojstva te se s uspjehom može uporabiti za adsorpciju plinova [8] ili uklanjanje teških metala iz vode i tla [9]. U najnovije vrijeme načinjeni su i pokušaji da se pirolitički ugljik dobiven iz otpadne kave iskoristi i u druge svrhe, primjerice kao elektrodni materijal u superkondenzatorima [10,11,12].

S obzirom da se ovaj rad fokusira na uporabu otpadne kave kao sirovine za dobivanje vodljivih pirolitičkog ugljika, u nastavku teksta detaljnije će biti opisan proces pirolize biomase.

2.3. Piroliza biomase

Piroliza je proces pri kojem se organski materijal (primjerice, otpadna biomasa) pri visokoj temperaturi karbonizira u inertnoj atmosferi (kako bi se spriječila njegova oksidacija kisikom), najčešće atmosferi čistog dušika. Piroliza se može provoditi šaržno, no za industrijske potrebe gotovo redovito se provodi u kontinuiranim pirolitičkim reaktorima, koji su najčešće cijevnog tipa. Radi postizanja što većeg kapaciteta, prilikom procesa pirolize važno je da se organski materijal što brže zagrije na temperaturu pri kojoj nastupa karbonizacija, čime se smanjuje njegovo vrijeme zadržavanja u reaktoru. S obzirom da je biomasa prilično loš vodič topline, kako bi se poboljšao prijenos topline i ujedno olakšalo punjenje pirolitičkog reaktora, biomasu je prije pirolize potrebno usitniti, primjerice ekstruzijom i sjeckanjem ili mljevenjem, ovisno o fizikalnim svojstvima biomase. Takva predobrada povećava složenost tehnološkog procesa te povećava njegove troškove. U tom kontekstu i u usporedbi s drugim vrstama otpadne biomase, otpadna mljevena kava ističe se kao vrlo poželjna sirovina za pirolitičku obradu. Iako je i ona relativno loš vodič topline, već je usitnjena u prah relativno male veličine čestica pa izostaje potreba za njenom dodatnom predobradom prije procesa pirolize.

Usmjeravanje procesa pirolize prema nastajanju željenog produkta (bioulja, plina ili pirolitičkog ugljika) postiže se kontrolom i podešavanjem procesnih parametara kao što su temperatura, brzina zagrijavanja materijala te vrijeme zadržavanja u reaktoru. Prema brzini zagrijavanja uobičajilo se razlikovati tzv. *sporu pirolizu*, koju karakterizira brzina zagrijavanja manja od 10 °C/min, *brzu pirolizu*, kod koje je brzina zagrijavanja između 10 i 200 °C/s, te *flash-pirolizu*, kod koje je brzina zagrijavanja izuzetno velika i iznosi između 10³ i 10⁴ °C/s. Spora piroliza uglavnom se provodi šaržno, uz vrijeme zadržavanja od nekoliko sati do nekoliko dana, dok se brza i flash-piroliza redovito provode u kontinuiranim reaktorima, uz vrlo kratka vremena zadržavanja, od nekoliko sekundi pri brznoj pirolizi, do manje od 500 ms pri flash-pirolizi.

Pri pirolizi otpadne biomase, veća brzina zagrijavanja (brza i flash-piroliza), kao i viša temperatura pirolize, favoriziraju nastajanje bioulja, uz tipična iskorištenja od 50 do 80 %. Na temperaturama nižim od 500 °C i te pri brzinama zagrijavanja od desetak °C/min dominantni produkt pirolize otpadne biomase je čvrsti pirolitički ugljik [13]. Razlog zašto navedeni parametri u tolikoj mjeri utječu na udio pojedinih produkata pirolize leži u činjenici da je otpadna biomasa gotovo uvijek kompleksna smjesa organskih i anorganskih tvari te u činjenici da je mehanizam pirolize vrlo složen i obuhvaća veći broj reakcija i procesa koji se, ovisno o uvjetima pirolize, mogu odvijati usporedo ili slijedno.

2.3.1. Mehanizam pirolize

S obzirom da se pirolitički prerađuje uglavnom lignocelulozna biomasa, koja se pretežito sastoji od lignina, celuloze i hemiceluloze, za taj je tip biomase mehanizam pirolize najviše i proučavan. Od navedene tri komponente termički je najmanje stabilna hemiceluloza, koja se tijekom procesa pirolize termički razgrađuje u području temperatura između 250 i 350 °C. Razgradnja termički stabilnije celuloze započinje pri otprilike 325 °C, a završava najčešće do 400 °C, dok se termički najstabilniji lignin razgrađuje u području temperatura od 300 do 550 °C. Mehanizam razgradnje svake od navedenih komponenata lignocelulozne biomase je kompleksan i obuhvaća sljedeća tri glavna (primarna) procesa:

- 1) pougljenjivanje (engl. *char formation*),
- 2) depolimerizaciju i
- 3) fragmentaciju.

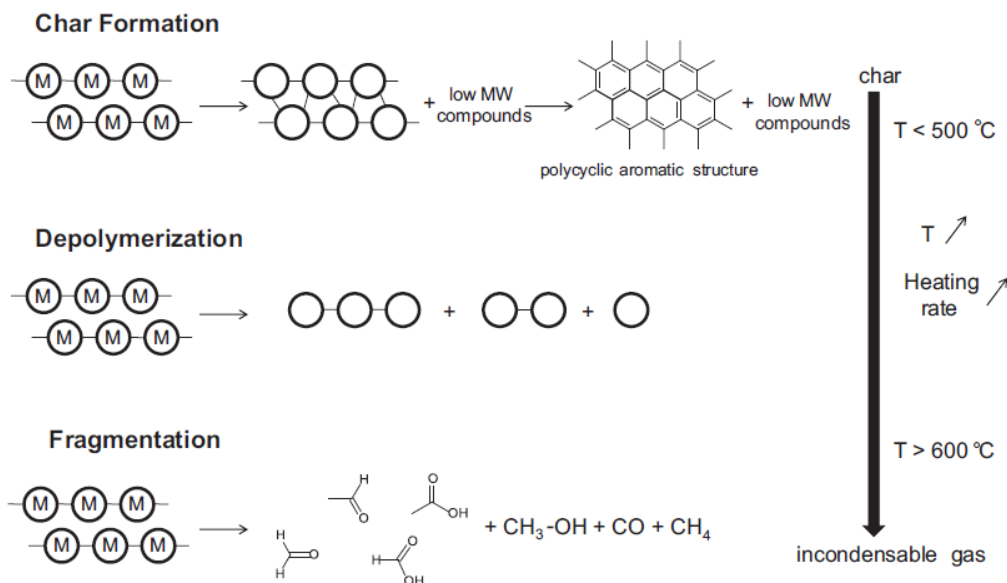
Ovisno o uvjetima pirolize, navedeni se procesi u većoj ili manjoj mjeri odvijaju usporedno.

Pougljenjivanjem biomasa prelazi u čvrsti ostatak koji se sastoji od visoko kondenziranih, policikličkih aromatskih spojeva, nastalih reakcijama pregradnje u kojima primarno nastaju benzenske jezgre koje dalje polimeriziraju u kondenziranije strukture [14]. Proces pougljenjivanja biomase praćen je njenom dehidratacijom i oslobađanjem niskomolekulskih plinovitih produkata (CO, CO₂, CH₄...) [15].

Depolimerizacija biomase obuhvaća pucanje veza između monomernih jedinica polimera od kojih se sastoji biomasa te stabilizacije nastalih fragmenata polimernog lanca njihovim spajanjem u kraći polimerni lanac [15]. S obzirom da nastali kraći polimerni lanci i dalje podliježu depolimerizaciji, proces se nastavlja sve dok nastali reakcijski produkti nisu toliko male molekulske mase, da pri temperaturi pri kojoj se provodi piroliza počnu isparavati i napuštati reakcijsku smjesu u obliku plina.

Fragmentacija obuhvaća reakcije u kojima dolazi pregrupiranja postojećih i nastajanja novih kemijskih veza unutar polimera koji sačinjavaju biomase, uz oslobađanje niskomolekulskih, kratkolančanih molekula koje reakcijsku smjesu napuštaju u obliku plina [15].

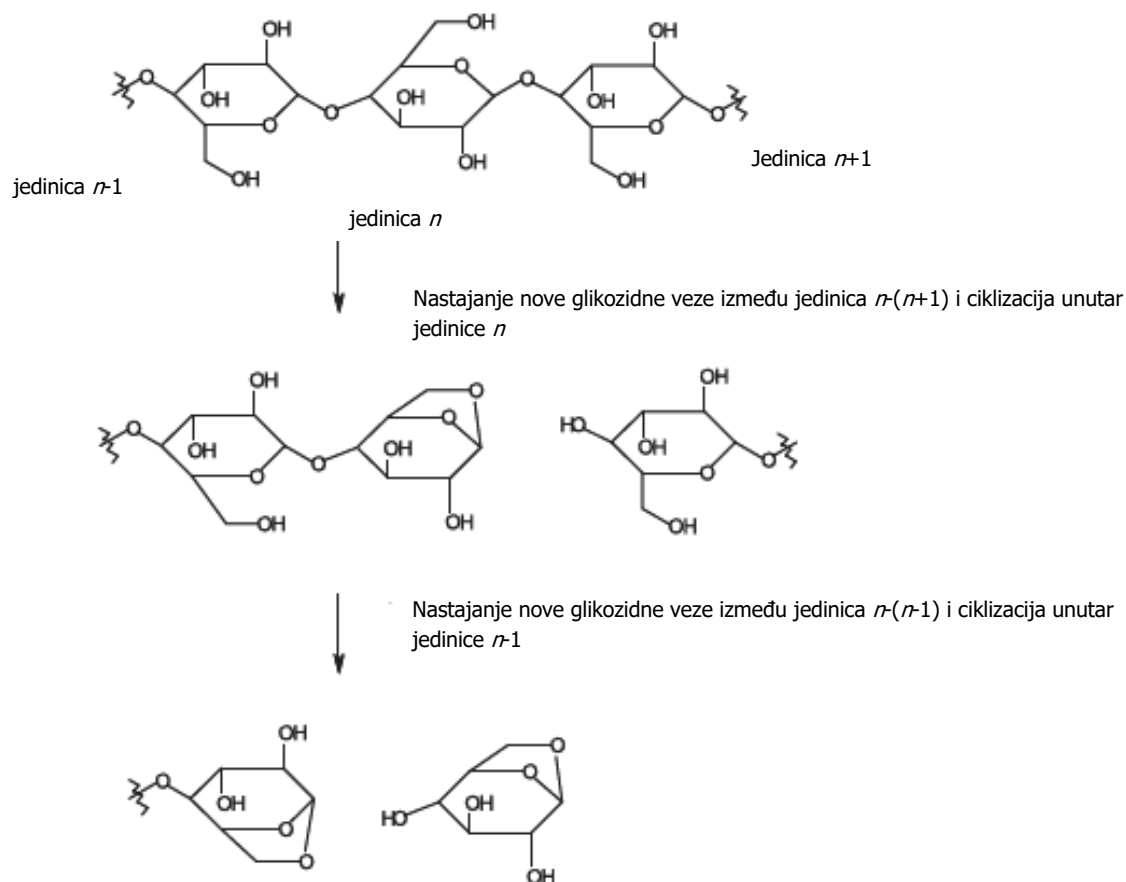
Sva tri opisana procesa shematski su prikazana na slici 1, na kojoj su naznačeni i uvjeti pri kojima je pojedini proces značajnije favoriziran.



Slika 1. Shematski prikaz primarnih procesa tijekom pirolize lignocelulozne biomase. Na desnoj strani slike naznačeni su uvjeti koji favoriziraju pojedini proces (preuzeto i prilagođeno iz [15]).

Pri temperaturama nižim od 500 °C favoriziran je proces pougljenjivanja, dok se reakcije depolimerizacije i fragmentacije odvijaju sporije i ne doprinose značajnije produktima pirolize. Stoga je pri nižim temperaturama pirolize favorizirano nastajanje čvrstih pirolitičkih produkata policikličke aromatske strukture, uz oslobađanje relativno male količine hlapljivih i plinovitih produkata. Depolimerizacija i fragmentacija biomase dominiraju pri temperaturama pirolize višim od 600 °C, pa se pri tim uvjetima pirolizom biomase dobivaju uglavnom hlapljivi i plinoviti produkti. Nastajanje hlapljivih produkata doprinosi i povećanje brzine zagrijavanja biomase. Pri većim se brzinama zagrijavanja novonastale polimerne komponente proizašle iz procesa depolimerizacije fragmentiraju prije nego se ponovnom repolimerizacijom stignu stabilizirati [13].

Osim opisanih primarnih procesa, tijekom pirolize biomase dolazi i do brojnih sekundarnih reakcija. Sekundarne reakcije uzrokovane su ispreplitanjem temperaturnih intervala u kojima dolazi do primarnih procesa razgradnje hemiceluloze, celuloze i lignina, zbog čega ta tri glavna sastojka biomase i (među)produkti njihove razgradnje stupaju u međusobne kemijske interakcije. Primjerice, interakcije između lignina i celuloze tijekom pirolize smanjuju prinos pirolitičkog ugljika jer lignin ometa polimerizaciju levoglukozana, glavnog produkta razgradnje celuloze (slika 2).



Slika 2. Depolimerizacija celuloze do levoglukozana (preuzeto i prilagođeno iz [15]).

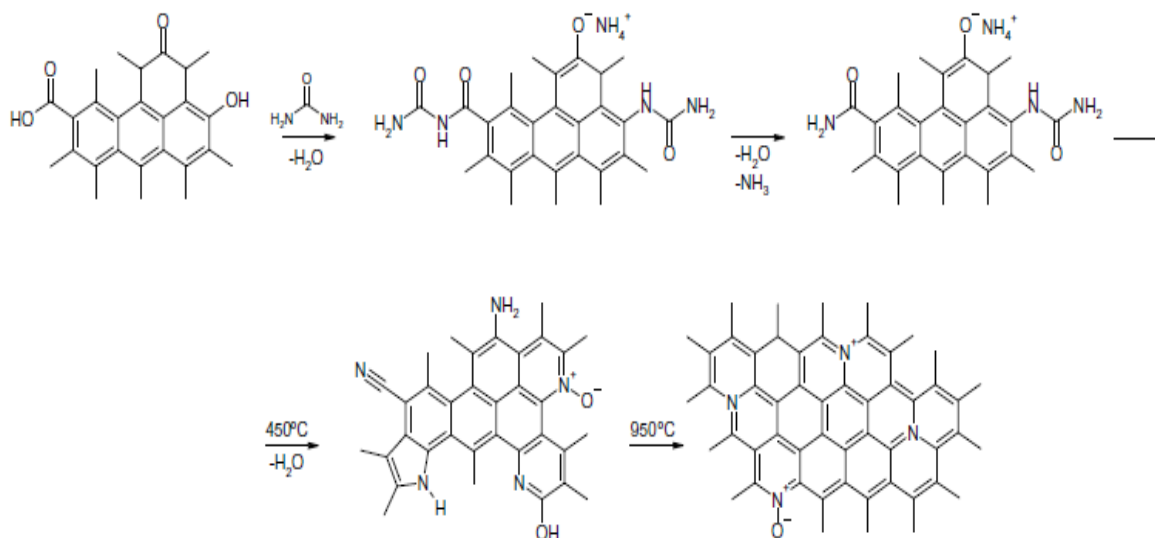
2.3.2. Katalizirana piroliza

S obzirom na složenost mehanizma pirolize i velik broj reakcija koje se tijekom nje istovremeno odvijaju, na nastajanje pojedinih produkata pirolize, njihov relativni udio i svojstva značajno se može utjecati dodatkom tvari koje ubrzavaju ili usporavaju pojedine primarne ili sekundarne pirolitičke procese, reagiraju s međuproduktima ili produktima pirolize ili na neki drugi način utječu na svojstva pirolitičkog produkta. Te se tvari uobičajeno nazivaju *katalizatorima pirolize* (iako se u većini slučajeva one ne ponašaju kao pravi katalizatori jer se tijekom pirolize kemijski mijenjaju), a piroliza u njihovom prisustvu naziva se *kataliziranom pirolizom*. Katalizatori se u biomasu gotovo redovito dodaju prije pirolize, najčešće impregnacijom biomase otopinom katalizatora i potom njenim sušenjem. Uvođenje kemijske obrade sirovine pred pirolizu dodavanjem raznih kemijskih spojeva u

većini slučajeva sprječava gasifikaciju sirovine tijekom pirolize te pogoduju povećanju poroznosti, tj. aktivaciji pirolitičkog ugljika uklanjanjem ostalih elemenata. Od katalizatora, u svrhu povećanja poroznosti i smanjenja temperature pirolize najviše se koriste $ZnCl_2$ i H_3PO_4 . Fosforna se kiselina kao katalizator koristi kod lignoceluloznih sirovina sa velikim udjelom hlapivih komponenata jer je mehanizam reakcije takav da nastaju esterske veze između OH skupine na šećeru i fosforne kiseline, pri čemu levoglukozan ne ciklizira. Spomenute esterske veze nastaju i između polimernih lanaca, čime se oni drže na međusobno fiksnoj udaljenosti, što umanjuje mogućnost njihove kondenzacije te rezultira povećanjem volumena (odn. smanjenjem gustoće) pirolitičkog produkta. Cinkov klorid se koristi kod pirolize sirovina sa velikim udjelom kisika (lignocelulozna biomasa). Kation Zn^{2+} iz cinkova klorida, kao tipična Lewisova kiselina kompleksira s kisikovim funkcionalnim skupinama komponenata biomase, uglavnom s kisikom iz OH i glikozidnih skupina polisaharida, olakšavajući cijepanje glikozidne veze i dehidraciju nastalih monomernih jedinica. Pored navedenog utjecaja na brzinu cijepanja i dehidracije polisaharida biomase, $ZnCl_2$ i H_3PO_4 pri visokoj temperaturi daju oksidne produkte (ZnO i P_2O_5), koji se ugrađuju u ugljičnu matricu. Ekstrakcijom pirolitičkog produkta vodom ili razrijeđenom kiselinom (uglavnom pri povišenoj temperaturi) iz ugljične se matrice nakon pirolize uklanjaju fosfor i cink, što rezultira nastajanjem mikropora ili malih mezopora [16].

Osim radi smanjenja temperature pirolize i modificiranja poroznosti pirolitičkog ugljika, biomasa se može impregnirati i katalizatorima koji utječu na stanje površine pirolitičkih produkata, prvenstveno na vrstu i udio površinskih funkcionalnih skupina. Na taj se način, primjerice, mogu dobiti pirolitički ugljici s povećanim udjelom kisikovih ili dušikovih površinskih skupina, a prikladnim odabirom uvedenih funkcionalnih skupina može se utjecati i na naboj površine pirolitičkog ugljika. Najčešće se na površinu pirolitičkih ugljika uvode dušikove funkcionalne skupine, u koju svrhu se najčešće koriste amonijak, urea i melamin [17], a vrsta uvedenih površinskih funkcionalnih skupina u najvećoj mjeri ovisi o temperaturi pirolize i brzini zagrijavanja biomase. Pokazano je da se pri većim brzinama zagrijavanja biomase tijekom pirolize usporava otpuštanje funkcijskih površinskih skupina, dok pri sporom zagrijavanju dolazi do značajnijeg gubitka površinskih aktivnih skupina [18]. S obzirom na temperaturu pirolize, u temperaturnom području između 400 i 700 °C dominiraju amidi, aromatski amini i protonirani amidi, dok pri temperaturama višim od 700 °C najviše su zastupljeni piridin, pirol, aromatski amini, kvaterni dušik i protonirani piridin [16]. Važno je naglasiti da su te površinske skupine pri nižim temperaturama smještene izvan strukture aromatskog prstena i imaju lokaliziran naboj, dok se pri višim

temperaturama dušične skupine ugrađuju u aromatski prsten te gube naboj ili se on delokalizira (slika 3).



Slika 3. Pretpostavljene reakcije uree s kondenziranim ugljičnim strukturama biomase pri različitim temperaturama pirolize. Preuzeto i prilagođeno iz [18].

Zanimljiv primjer uporabe katalizatora u pirolizi biomase jest i favoriziranje grafitiziranja pirolitičkog ugljika. Grafitizacijom se postiže da struktura pirolitičkog produkta iz neuređene (u kojoj su atomi ugljika nasumice sp^2 i sp^3 hibridizirani, pa ne postoji njihovo strukturno uređenje, osim lokalnog) prijeđe u manje ili više uređenu, koju karakterizira postojanje domena u kojima su ugljikovi atomi sp^2 hibridizirani i međusobno povezani u uređenu strukturu grafita. Time se značajno povećava električna vodljivost pirolitičkog ugljika i omogućuje njegova primjena kao elektrodnog materijala. Grafitizacija pirolitičkog ugljika dobivenog pirolizom nemodificirane lignocelulozne biomase odvija se tek pri vrlo visokim temperaturama ($1200\text{--}1600^\circ\text{C}$), zbog čega dobivanje grafitiziranih pirolitičkih ugljika zahtijeva relativno velik utrošak energije. Uporabom prikladnog katalizatora grafitizaciju je moguće provesti i pri znatno nižim temperaturama, između 600 i 900°C [14]. Najučinkovitijim katalizatorima grafitizacije pri pirolizi biomase dosad su se pokazale soli željeza [13]. Tijekom procesa pirolize katalizirane željezovim solima zbivaju se tri procesa: termička razgradnja željezovih soli do oksida, karbotermalna redukcija željezovih

oksida do elementarnog željeza te reakcija željeza s ugljikom, uz nastajanje željezova karbida, Fe₃C. Prijelaz željeznih soli u željezni oksid zbiva se pri temperaturama između 400 i 500 °C. Pri temperaturama oko 625 °C nastali željezni oksidi reduciraju se do nanočestica elementarnog željeza, koje pri temperaturama iznad 700 °C s amorfnim pirolitičkim ugljikom daju željezov karbid. Željezov karbid je metastabilan i pri temperaturama višim od 750 °C spontano se raspada u elementarno željezo i grafit, čime se zatvara opisani katalitički ciklus [14, 19].

2.4. Bioelektrokataliza

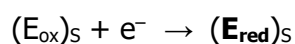
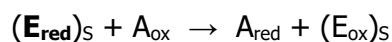
Pod pojmom bioelektrokataliza podrazumijeva se uporaba bioloških struktura kao katalizatora u elektrokemijskim reakcijama [20]. Najčešće se u tu svrhu koriste enzimi iz skupine oksidoreduktaza, no u novije vrijeme sve se intenzivnije istražuje i bioelektrokatalitička primjena cijelih stanica [20].

Kod bioelektrokatalize enzim funkcionira kao i svaki drugi elektrokemijski katalizator. Primjerice, enzim u nativnom reduciranom stanju (E_{red}) reagira s tvari A_{ox} iz otopine, prevodeći je u njen reducirani oblik, A_{red} , i pritom se oksidira u E_{ox} . Regeneracija enzima u katalitički aktivno stanje provodi se izravnom ili neizravnom elektrokemijskom redukcijom E_{ox} u E_{red} . Kod neizravne elektrokemijske regeneracije katalitički aktivnog oblika enzima kao prijenosnici elektrona između elektrode i enzima koriste se male redoks-aktivne molekule, tzv. medijatori elektrona. U navedenom primjeru, oksidirani oblik enzima vratio bi se u katalitički aktivan oblika reakcijom s reduciranim oblikom medijatora (M_{red}), koji bi se potom regenerirao redukcijom na katodi. Cijeli katalitički ciklus prikazuju jednadžbe:



S obzirom da se pri opisanoj indirektnoj (neizravnoj) bioelektrokatalizi enzim i medijator u reakcijskom sustavu nalaze u istoj fazi kao i produkt katalizirane reakcije, po završetku procesa potrebno ih je na prikladan način separirati, što komplicira i poskupljuje proces. Stoga je daleko povoljnije enzim imobilizirati izravno na elektrodu, čime se katalitički proces prevodi u heterogen, pa iz procesa izostaje stupanj separacije enzima iz reakcijske

smjese. U slučaju da je enzim imobiliziran na elektrodu moguće izravno elektrokemijski oksidirati ili reducirati, postaje suvišnom i uporaba medijatora, čime se bioelektrokatalitički proces dodatno pojednostavljuje i pojeftinjuje. U tom slučaju, tzv. izravne bioelektrokatalize, bioelektrokatalitički ciklus opisan je sa:



gdje prva jednadžba prikazuje pretvorbu supstrata A kataliziranu enzimom imobiliziranim na elektrodu, $(\mathbf{E})_S$, a druga izravnu elektrokemijsku redukciju imobiliziranog enzima, čime se on vraća u katalitički aktivno stanje.

Do sada se samo relativno mali broj enzima iz skupine oksidoreduktaza, otprilike njih tridesetak [21], pokazalo prikladnim za primjenu u izravnoj bioelektrokatalizi. Razlog tome leži u činjenici da većina enzima aktivni (redoks-) centar ima smješten duboko u globuli proteina, pa je brzina prijelaza elektrona s elektrode na redoks-centar enzima imobiliziranog na elektrodu vrlo spori proces, zbog čega se postižu vrlo male katalitičke struje, ili bioelektrokatalitički efekt u potpunosti izostaje. Stoga su za primjenu u izravnoj bioelektrokatalizi prikladni samo enzimi čiji se redoks-centar nalazi na površini ili vrlo blizu površine enzimske globule. Takav je enzim peroksidaza iz hrena (EC 1.11.7.1, dalje u tekstu skraćena kao HRP, prema engl. *Horseradish peroxidase*), relativno mali glikoprotein mase 44 kDa, koji katalizira oksidaciju većeg broja organskih i anorganskih supstrata (npr. aromatskih hidrokso-derivata, fenolnih kiselina, indola, amina, ferocijanida, tiocijanata...) vodikovim peroksidom [22]. Redoks-aktivni centar peroksidaze je hem, koji u nativnom, katalitički aktivnom stanju enzima sadrži željezo u oksidacijskom stanju +2 te koji je smješten u relativno plitkom džepu, na maloj udaljenosti od površine enzima. Uporaba peroksidaze u industrijskoj katalizi nije značajna, no izravna bioelektrokataliza peroksidaze intenzivno se proučava zbog primjene u elektrokemijskim biosenzorima treće generacije temeljenim na oksidazama, u kojima bioelektrokatalitička elektroda modificirana peroksidazom funkcionira kao visokoselektivni i osjetljivi pretvornik za detekciju vodikova peroksida nastalog u oksidazom kataliziranoj pretvorbi analita.

Katalitički ciklus HRP [22] započinje oksidacijom enzima sa H_2O_2 u oksidirani oblik zvan "spoj 1". Spoj 1 u svojoj strukturi sadrži željezo u tzv. oksiferilnom obliku ($\text{Fe}^{+4}=\text{O}$) i porfirinski radikal. Kako bi se enzim vratio u početno, katalitički aktivno stanje, redukcija spoja 1 odvija se sukcesivno kroz dvije reakcije. U prvoj reakciji spoj 1 oksidira jednu

molekulu kosupstrata (najčešće organskog spoja iz skupine supstituiranih fenola), pri čemu dolazi do redukcije porfirinskog radikala, uz istovremeno zadržavanje željeza u oksidiranom, oksiferilnom obliku. Takav intermedijarni oblik HRP naziva se "spojem 2". Spoj 2 u sljedećem stupnju reagira s drugom molekulom kosupstrata, pri čemu se enzim reducira do početnog stanja. Pri obje reakcije troši se jedan ion H^+ , pri čemu se sumarno oslobađaju dvije molekule vode.

U posebnom slučaju peroksidaze adsorbirane na metalnu ili ugljičnu elektrodu, redukcija spoja 1 i spoja 2 može se provesti i elektrokemijski, izravnim prijenosom elektrona s elektrode na hem peroksidaze [23]. Zbog smještaja hema blizu površine molekule HRP, prijenos elektrona prilično je efikasan pa se HRP često koristi kao modelni enzim pri proučavanju bioelektrokatalize. Dosadašnja istraživanja pokazala su da najbolja bioelektrokatalitička svojstva HEP ispoljava ako je adsorbirana na grafit, dok je stabilnost HRP na drugim elektrodnim materijalima (primjerice, elektrodama od plemenitih metala) značajno lošija [23].

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Peroksidaza iz hrena (EC 1.11.7.1., liofilizirana) nabavljena je od Sigmee i imala je aktivnost od 290 U/mg. Vodena otopina sulfoniranog ionomera *Nafiona* (protonirani oblik, $w = 5\%$ u smjesi vode i niskomolekulskih alkohola) dobavljena je od Aldricha. Sve ostale kemikalije korištene u radu bile su *p.a.* čistoće i korištene su bez daljnjeg pročišćavanja.

Za osiguravanje inertne atmosfere pri pirolizi i uklanjanje kisika iz otopina pri elektrokemijskim mjerenjima korišten je dušik nominalne čistoće 99,996 %.

3.1.2. Uzorci

Kao otpadna kava korištena je kava Frank STRETTO iskorištena za pripremu *espresso* kave u obližnjem ugostiteljskom objektu. Svjež uzorak otpadne kave (mase otprilike 250 g) ispran je tri puta sa po 1000 mL deionizirane vode, vakuumski profiltriran i osušen u sušioniku pri 110 °C. Otpadna kava do uporabe je čuvana u zatvorenoj posudi, u mraku.

3.1.3. Mjerni uređaji

Otpadna kava pirolizirana je u električnoj cjevnoj peći konstruiranoj i izrađenoj u okviru ovog rada. Unutarnja cijev peći bila je promjera 25 mm i duljine 30 cm, a zagrijavala se električnim grijačem maksimalne snage 240 W, čime se postizala maksimalna radna temperatura od 900 °C i brzina zagrijavanja od 100 °C/min. Snaga grijača podešavana je varijabilnim transformatorom, a regulacija temperature ostvarena je dvopoložajnim regulatorom na kojeg je bio priključen termopar K-tipa, korišten kao osjetilo temperature. Konstrukcija cjevne peći bila je takva da je omogućavala pirolizu u inertnoj atmosferi dušika te kontrolirani protok dušika tijekom cijelog trajanja mjerenja. Protok dušika kroz peć reguliran je laboratorijskim masenim kontrolerom protoka tvrtke Bronhorst (USA) .

Za elektrokemijska mjerenja korišten je potenciostat Iskra MA4200 (Iskra, Slovenija). Elektrokemijska ćelija bila je klasičnog troelektrodnog tipa, s platinskom pomoćnom elektrodom i Hg|Hg₂Cl₂|3.5M KCl referentnom elektrodom ($E = 0,252$ V prema standardnoj vodikovoj elektrodi pri 25 °C). Kao radna elektroda korištena je rotirajuća grafitna disk-elektroda promjera 7 mm, priključena na rotator Beckman R-6000.

Za morfološku analizu uzorka korišten je visokorezolucijski pretražni elektronski mikroskop JSM 7000 (Jeol, Japan), opremljen izvorom s emisijom polja (FE - field emission), dok je za transmisivsku elektronsku mikroskopiju korišten visokorezolucijski elektronski mikroskop FEI Titan 80–300 (FEI, SAD) pri akcelerirajućem naponu od 200 kV.¹

Rendgenski difraktogrami praškastih uzoraka snimljeni su na rendgenskom difraktometru LabX XRD – 6000 (Shimadzu, Japan), koristeći CuK- α zračenje ($\lambda = 1,5405$ Å).²

3.2. Metode

3.2.1. Priprema pirolitičkog ugljika

Za pripremu pirolitičkog ugljika korištena je otpadna kava dodatno usitnjena u tarioniku i prosijana kroz set standardnih sita. Za sve eksperimente korištena je frakcija veličine čestica između 100 i 200 μm . Pirolizi su podvrgnuta dva uzorka: nemodificirana otpadna kava (uzorak označen kao U1) i otpadna kava impregnirana željezovim(II) nitratom (uzorak označen kao U2-Fe).

3.2.1.1. Impregnacija otpadne kave sa Fe(NO₃)₂

Usitnjena i prosijana kava frakcije 200 – 100 μm pomješana je s vodenom otopinom Fe(NO₃)₂·9H₂O, masenog udjela $w(\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}) = 10$ %, u omjeru 1 g kave : 4 mL otopine Fe(NO₃)₂·9H₂O. Suspenzija je u zatvorenoj posudi ostavljena stajati na sobnoj temperaturi preko noći, nakon čega je osušena u sušioniku pri 110 °C.

¹ Transmisivske elektronske mikrografije uzoraka dobivene su ljubaznošću dr. M. Willingera i dr. M. Plodineca s Instituta "Fritz Haber" Društva "Max Planck" u Berlinu (Njemačka).

² Rendgenske difraktograme uzoraka snimio je prof.dr.sc. S. Kurajica s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

3.2.1.2. Piroliza

Otpadna kava pirolizirana je u lađicama duljine 80 i širine 10 mm, načinjenima od visokotemperaturne keramike. Masa uzorka podvrgnutog pirolizi tipično je iznosila između 0,8 i 0,9 g. Prije pirolize kroz cjevnu peć s uzorkom otpadne kave propušan je plinoviti dušik protokom od 1 L/min tijekom 10 minuta kako bi se iz unutrašnjosti cijevi uklonio kisik. Piroliza je provedena tijekom 2 h, pri temperaturi od 850 °C, uz brzinu zagrijavanja od 100 °C/min. Nakon završetka pirolize uzorak je ostavljen u cjevnoj peći pod strujom dušika sve dok se nije ohladio na temperaturu manju od 100 °C kako bi se spriječila oksidacija vrućeg uzorka na zraku. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, produkt dobiven pirolizom usitnjen je u ahatnom tarioniku u fini prah.

3.2.1.3. Uklanjanje željeza iz uzoraka piroliziranih nakon impregnacije sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$

Kako bi se iz pirolitičkog ugljika dobivenog iz otpadne kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ uklonilo željezo, produkt dobiven pirolizom ($m \approx 250$ mg) ekstrahiran je tri puta sa po 10 mL klorovodične kiseline, množinske koncentracije $c(\text{HCl}) = 1,0$ mol/L, tijekom 12 h, uz periodično ispiranje i dodavanje svježih porcija kiseline. Uspješnost uklanjanja željeza provjerena je u otopini nakon treće ekstrakcije kvalitativnim kolorimetrijskim testom s ferocijanidom, koji je bio negativan. Uzorci su nakon ekstrakcije isprani s deioniziranom vodom do neutralnog pH i osušeni u sušioniku pri 110 °C.

3.2.2. Priprema bioelektrokatalitičkih elektroda

3.2.2.1. Imobilizacija peroksidaze na pirolitički ugljik

Otopina peroksidaze priređena je otapanjem 3,9 mg peroksidaze u 1,3 mL fosfatnog pufera, koncentracije 0,1 mol/L (pH = 6,0). Za imobilizaciju je uzeto 10 mg uzorka pirolitičkog ugljika (uzorak U1 ili U2-Fe ekstrahiran sa HCl) i suspendirano u 250 μL otopine peroksidaze tijekom 2 h, kako bi se enzim adsorbirao na površinu pirolitičkog ugljika. Nakon imobilizacije, pirolitički ugljik odvojen je od otopine centrifugiranjem, ispran je s fosfatnim puferom (pH = 6,0) i odmah potom korišten za pripremu elektroda.

3.2.2.2. Priprema elektroda

Pirolitički ugljik s imobiliziranom peroksidazom suspendiran je u 25 μL 1 %-tne otopine ionomera Nafiona, dobivene miješanjem 50 μL 5 %-tne otopine Nafiona sa 200 μL fosfatnog pufera, koncentracije 0,1 mol/L (pH = 6,0). Dobivena suspenzija homogenizirana je vorteksiranjem. Volumen od 10 μl suspenzije deponiran je mikropipetom na grafitnu disk elektrodu u što jednoličnijem sloju i elektroda je ostavljena da se osuši na zraku. Nakon sušenja, elektrode su čuvane uronjene u fosfatni pufer (pH = 6,0), pri 4 °C, u mraku.

3.2.3. Određivanje bioelektrokatalitičke aktivnosti elektroda

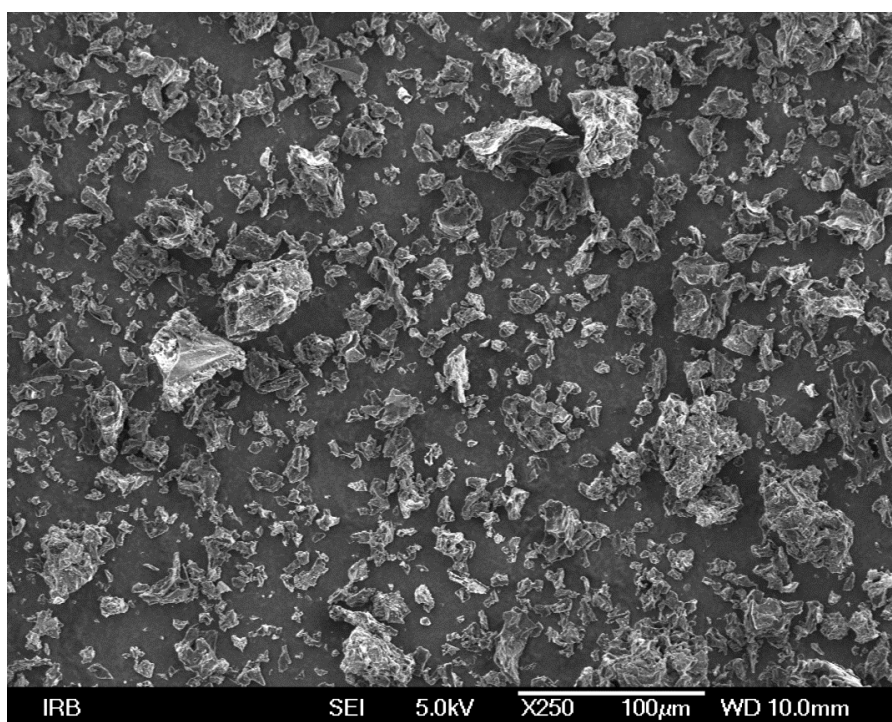
U svim elektrokemijskim mjerenjima kao osnovni elektrolit korišten je fosfatni pufer, koncentracije 0,1 mol/L, čiji je pH iznosio 6,0. Prije mjerenja, iz osnovnog elektrolita uklonjen je kisik propuhivanjem dušika.

Bioelektrokatalitička aktivnost priređenih elektroda određivana je amperometrijski pri potencijalu od 200 mV, u hidrodinamičkim uvjetima (brzina rotacije elektrode: 1500 o/min), mjerenjem promjene struje uslijed dodatka vodikova peroksida u osnovni elektrolit. Mjerenja su provedena u području koncentracija H_2O_2 između 5 i 500 $\mu\text{mol/L}$.

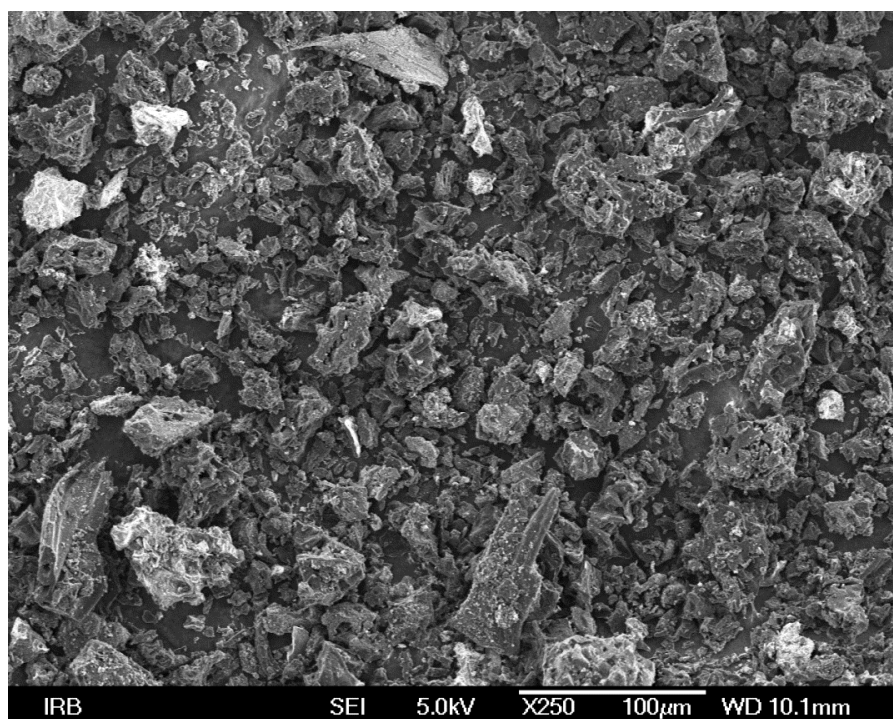
4. Rezultati

4.1. Morfološka i strukturna karakterizacija uzorka

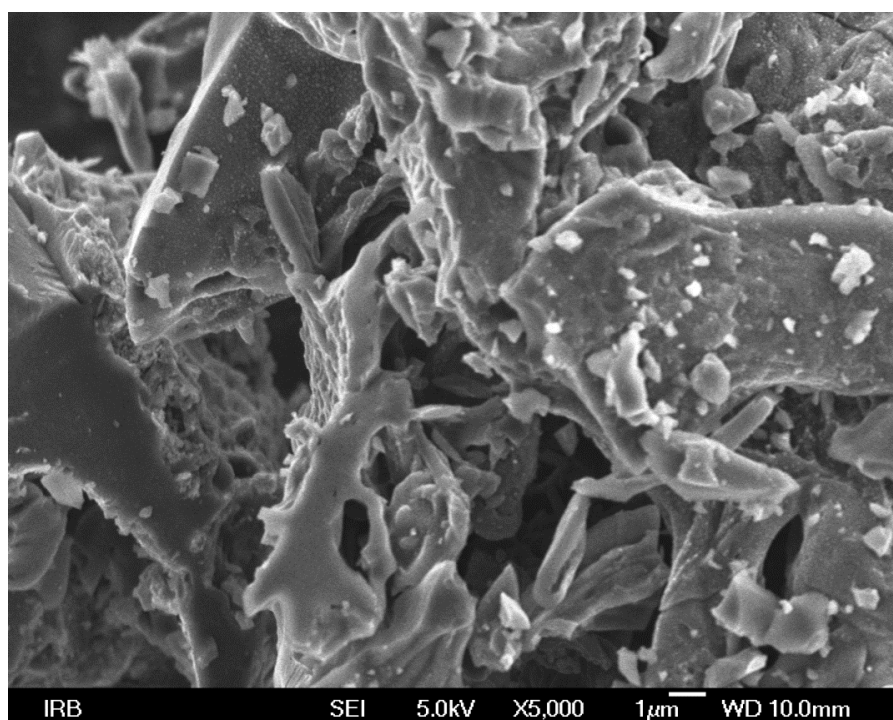
Da bi se utvrdile morfološke značajke dobivenih uzoraka pirolitičkog ugljika, na pretražnom elektronskom mikroskopu snimljene su mikrografije uzoraka U1 i U2-Fe (slike 4-7). Na mikrografijama snimljenim pri manjem povećanju (slike 4 i 5) vidljivo je da se oba uzorka sastoje od čestica veličine 5 - 50 μm , nepravilnog oblika. Na mikrografijama snimljenim pri većem povećanju (slike 6 i 7) uočava se veća strukturiranost površine kod uzoraka koji su bili impregnirani željezovim nitratom, pri čemu je njihova površina prekrivena i većim brojem nanočestica. Uzorak dobiven pirolizom nemodificirane kave pokazuje pretežito glatku, slabo strukturiranu površinu.



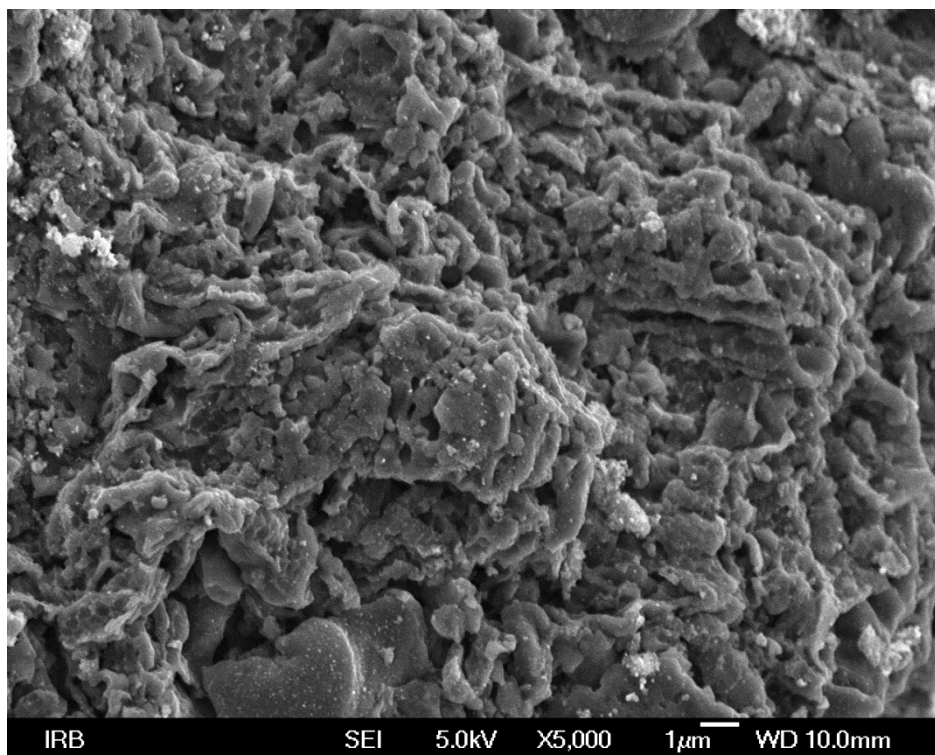
Slika 4. Mikrografija na malom povećanju pirolitičkog ugljika dobivenog pirolizom nemodificirane otpadne kave.



Slika 5. Mirkografija na malom povećanju pirolitičkog ugljika dobivenog iz otpadne kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$.



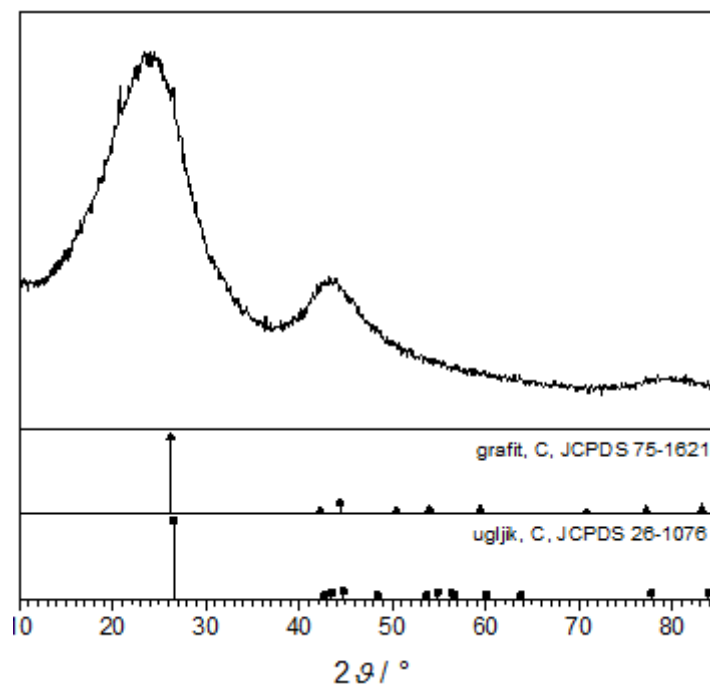
Slika 6. Mirkografija na velikom povećanju pirolitičkog ugljika dobivenog pirolizom nemodificirane otpadne kave.



Slika 7. Mikrografija na velikom povećanju pirolitičkog ugljika dobivenog iz otpadne kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$

Da bi se dobio uvid u strukturu dobivenih pirolitičkih ugljika, uzorci su podvrgnuti rendgenskoj difrakciji. Dobiveni difraktogrami prikazani su na slikama 8, 9 i 10. Na difraktogramu ugljika dobivenog pirolizom nemedificirane kave (uzorak U1) u području kuteva 2θ od 10 do 85 stupnjeva uočavaju se tri vrlo široka, razvučena difrakcijska maksimuma pri kutevima 2θ od 24,3 43,3 i 79,0 stupnjeva (slika 8). Maksimumi pri ovim kutevima poklapaju se u određenoj mjeri sa difrakcijskim maksimumima grafita (*JCPDS 75-1621*) i heksagonskog grafita (*JCPDS 26-1076*). Ovaj uzorak daje difraktogram sa razvučenim pikovima što ukazuje na prevladavanje amornog ugljika uz samo malu, lokalnu uređenost (tj. ograničenu na nekoliko međuatomskih udaljenosti) sa sp^2 hibridiziranim ugljikovim atomima povezanim u heksagonske strukture.

Na difraktogramu uzorka U2-Fe (slika 9), dobivenog pirolizom otpadne kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, u području kuteva 2θ od 10 do 85 stupnjeva uočava se širok difrakcijski maksimum pri $2\theta = 25,93^\circ$ te veći broj oštih difrakcijskih maksimuma u području kuteva od 30 do 85 stupnjeva. Difrakcijski maksimum pri kutu od $25,93^\circ$ poklapa se sa maksimumom grafita, dok su ostali difrakcijski maksimumi pripisani postojanju cementita



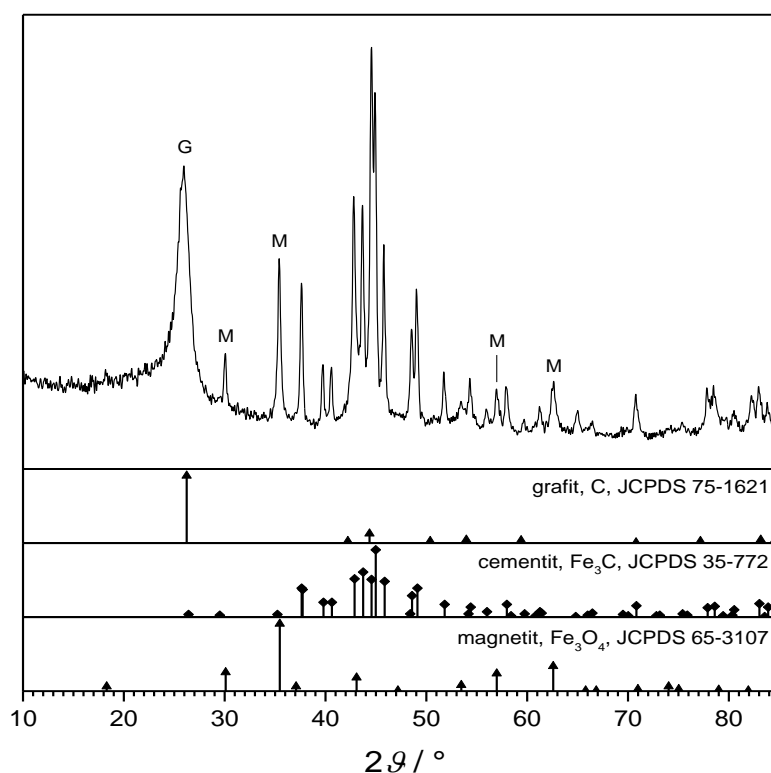
Slika 8. Rendgenski difraktogram praškastog uzorka pirolitičkog ugljika dobivenog iz nemodificirane otpadne kave (uzorak U1). Na dnu slike naznačene su pozicije difrakcijskih maksimuma standarda grafita i heksagonskog (sp^2 hibridiziranog) ugljika.

(željezov karbid, Fe_3C) i magnetita (Fe_3O_4). Relativno velika širina difrakcijskog maksimuma pri $2\theta = 25,93^\circ$, koji se poklapa s difrakcijskim maksimumom grafita, ukazuje na postojanje grafitnih domena kod uzorka dobivenog kataliziranom pirolizom, no očito je da su te domene ili nanometarskih dimenzija ili su u određenoj mjeri neuređene, ili oboje.

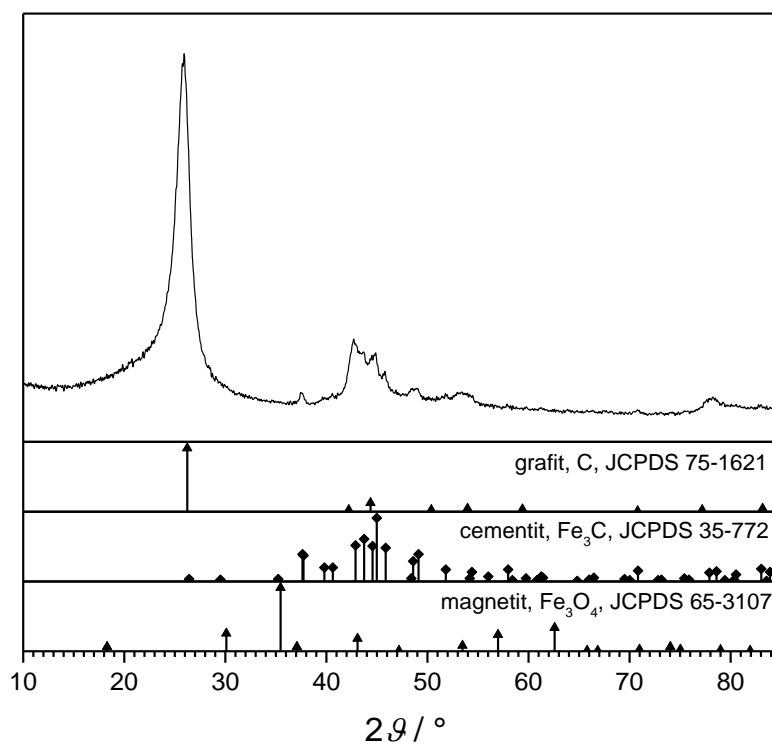
Na difraktogramu uzorka U2-Fe koji je nakon pirolize ekstrahirano kiselinom (slika 10), u području kuteva 2θ od 10 do 85 stupnjeva može se uočiti da su difrakcijski maksimumi cementita u odnosu na uzorak iz kojeg željezo nije ekstrahirano značajno manji. Također, uočava se nestajanje difrakcijskih maksimuma magnetita. To upućuje na zaključak da se sav magnetit u uzorku U2 nalazi na površini čestica pirolitičkog ugljika i dostupan je kiselini (u kojoj se otopio tijekom ekstrakcije), dok je bar dio čestica cementita ugrađen u ugljičnu matricu i nije dostupan za reakciju s kiselinom tijekom ekstrakcije uzorka.

Da bi se dobio bolji uvid u strukturu pirolitičkog ugljika dobivenog iz otpadne kave impregnirane sa $Fe(NO_3)_2$ te potvrdila pretpostavka o postojanju čestica cementita ugrađenih u grafitnu matricu, uzorak U2 ekstrahirano kiselinom karakteriziran je

visokorezolucijskom transmisijском elektrоnskom mikroskopijom (HR-TEM). Karakteristične mikrografije prikazane su na slikama 11 i 12. Pri manjem povećanju na mikrografiji se uočavaju čestice pirolitičkog ugljika (područja slabijeg kontrasta) u koje su ugrađene nanočestice veličine od 5 do 50 nm, a koje se, u skladu s prethodno opisanim rezultatima dobivenim rendgenskom difrakcijom, mogu pripisati cementitu. Na visokorezolucijskoj TEM snimci uočava se nanočestica otprilike elipsoidnog oblika, okružena vrpcom paralelnih nanoravnina, čiji međusobni razmak iznosi između 0,37 i 0,39 nm. Razmak između kristalnih ravnina nanočestice, izmjeren sa mikrografije, iznosi 0,221 nm, što se vrlo dobro slaže s difrakcijskim maksimumom cementita pri $2\theta = 44,99^\circ$

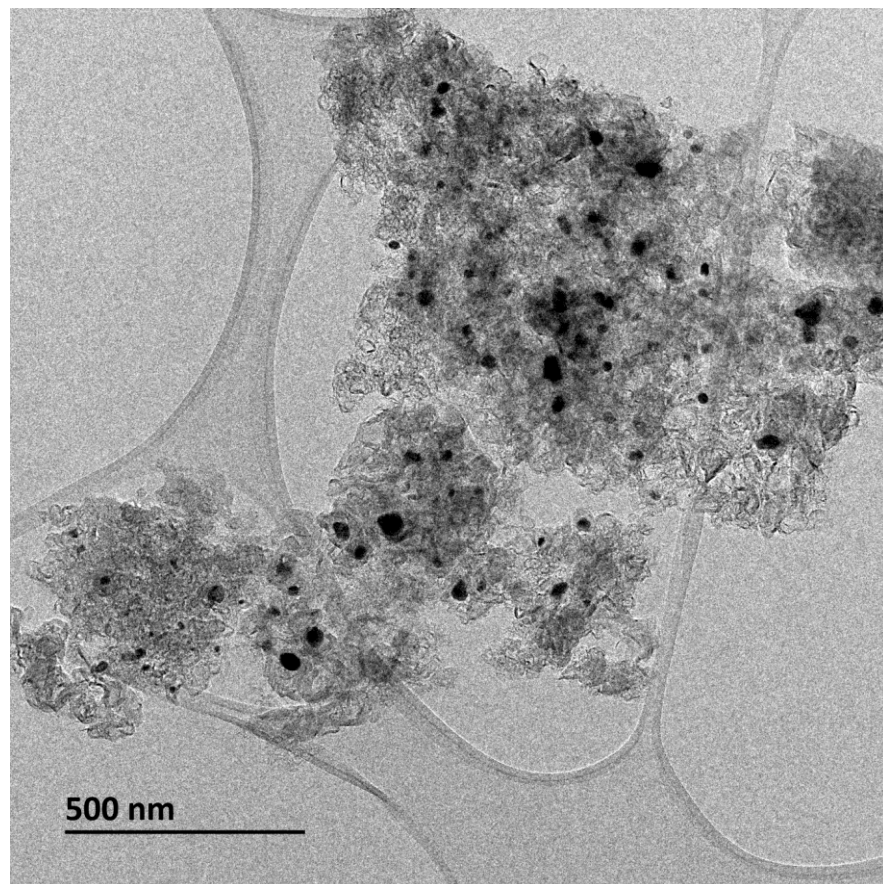


Slika 9. Rendgenski difraktogram praškastog uzorka pirolitičkog ugljika dobivenog iz otpadne kave modificirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ (uzorak U2-Fe). Na dnu slike naznačene su pozicije difrakcijskih maksimuma standarda grafita, cementita i magnetita. Karakteristični difrakcijski maksimumi grafita i magnetita na difraktogramu su označeni sa "G" i "M". Neoznačeni difrakcijski maksimumi pripadaju cementitu.

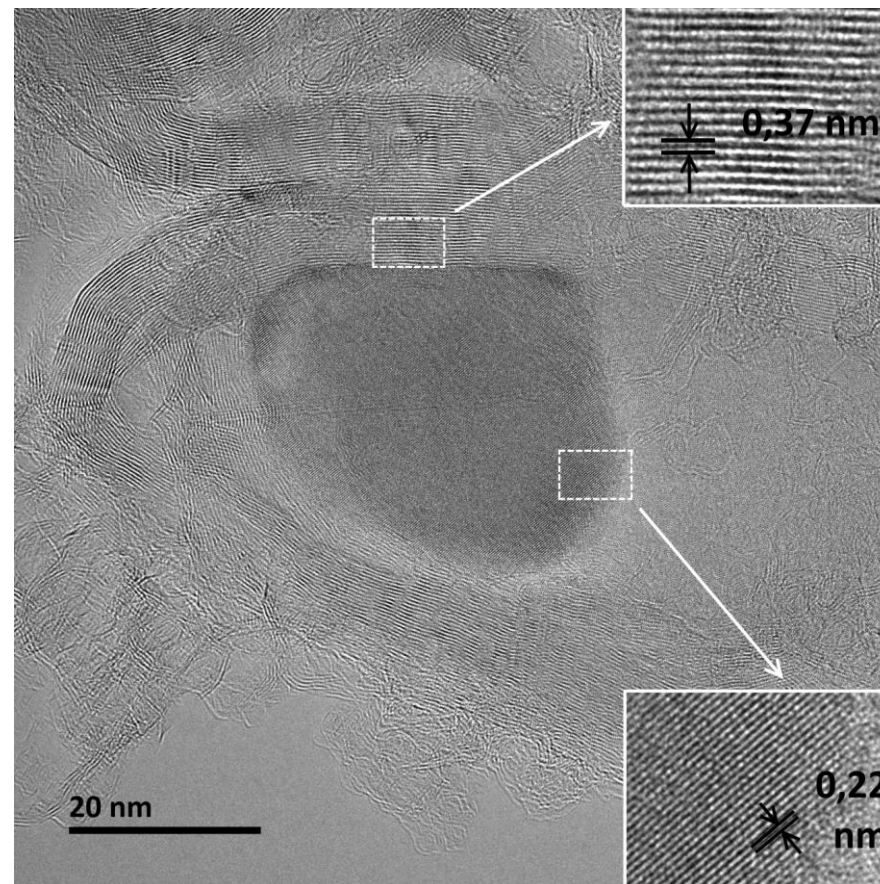


Slika 10. Rendgenski difraktogram praškastog uzorka pirolitičkog ugljika dobivenog iz otpadne kave modificirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ (uzorak U2-Fe), nakon ekstrakcije s HCl. Na dnu slike naznačene su pozicije difrakcijskih maksimuma standarda grafita, cementita i magnetita.

($d = 0,220$ nm), pa je očito da je nanočestica građena od cementita. Udaljenost između atomskih ravnina u vrpce koja okružuje nanočesticu cementita kreće se u području između $0,37$ i $0,39$ nm, što se dobro slaže s međuravninskim razmakom u grafitu ($d = 0,335$ nm), pa je očito riječ o grafitnoj domeni nastaloj u okolini cementitne nanočestice.



Slika 11. Transmisijska elektronska mikrofografija ugljika dobivenog pirolizom kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ te ekstrahirane sa HCl.

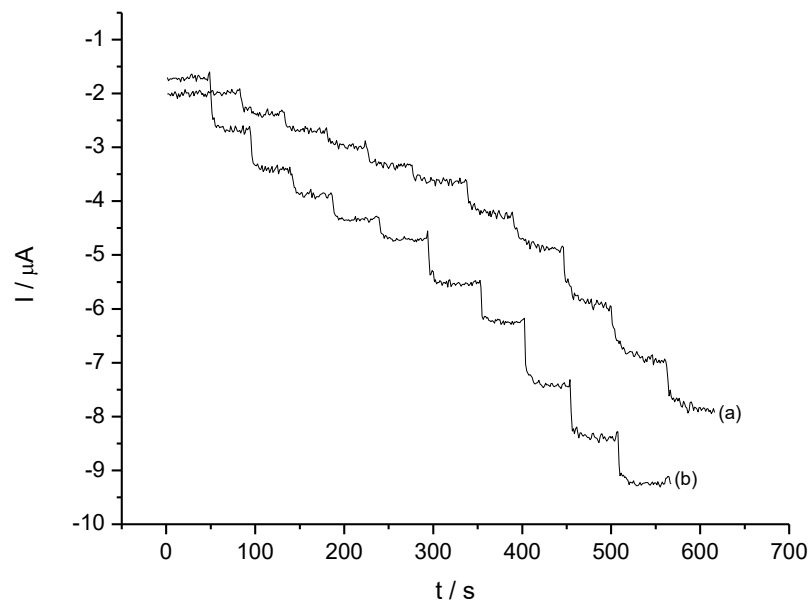


Slika 12. Visokorezolucijska transmisijska elektronska mikrofografija ugljika dobivenog pirolizom kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ i ekstrahirane sa HCl.

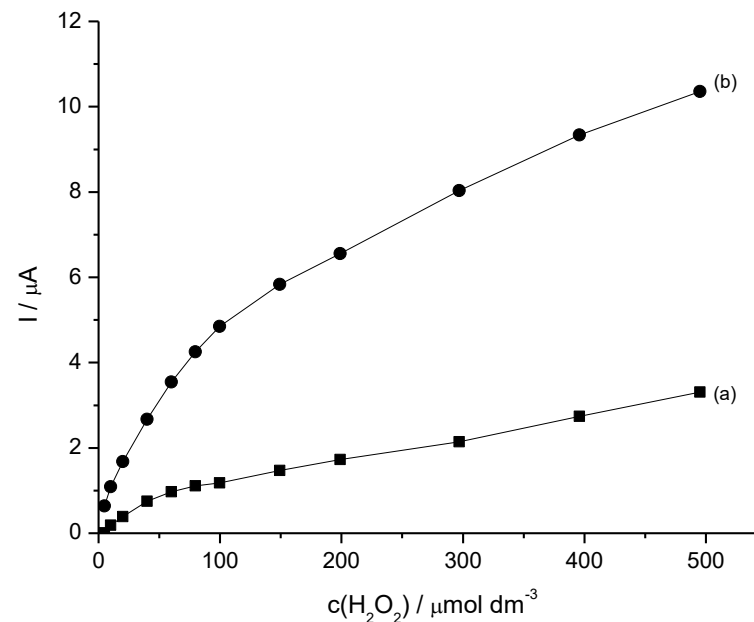
4.2. Bioelektrokatalitička svojstva

Primjenjivost priređenih uzoraka pirolitičkog grafita kao elektrodnog materijala u bioelektrokatalizi istražena je snimanjem katalitičkih struja redukcije vodikova peroksida na elektrodama čiji se katalitički aktivni sloj sastojao od pirolitičkog grafita s imobiliziranom peroksidazom. Mjerenja su provedena pri konstantnom potencijalu elektrode od 0,20 V, u hidrodinamičkim uvjetima, uz sukcesivne dodatke vodikova peroksida u mjernu elektrokemijsku ćeliju. Tipičan strujni odziv pri opisanim mjerenjima prikazan je na slici 13. Uočljivo je da dodatkom vodikova peroksida raste katodna (redukcijaska) struja te da je porast struje otprilike proporcionalan koncentraciji dodanog H_2O_2 . S obzirom da je preliminarnim mjerenjima utvrđeno da se pri identičnim uvjetima na nemodificiranim elektrodama ne uočava nikakav porast katodne struje, može se zaključiti da je porast struje vidljiv na slici 13 posljedica bioelektrokatalitičke redukcije vodikova peroksida, koju katalizira peroksidaza imobilizirana na pirolitički ugljik. Radi lakše usporedbe bioelektrokatalitičkih svojstava ispitivanih elektroda, dobiveni strujni odzivi u nastavku teksta prikazani su kumulativno, tj. na način da su porasti struje uslijed pojedinačnih dodataka vodikova peroksida zbrojeni i prikazani sumarno u ovisnosti o ukupnoj koncentraciji vodikova peroksida u elektrokemijskoj ćeliji. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 14–16.

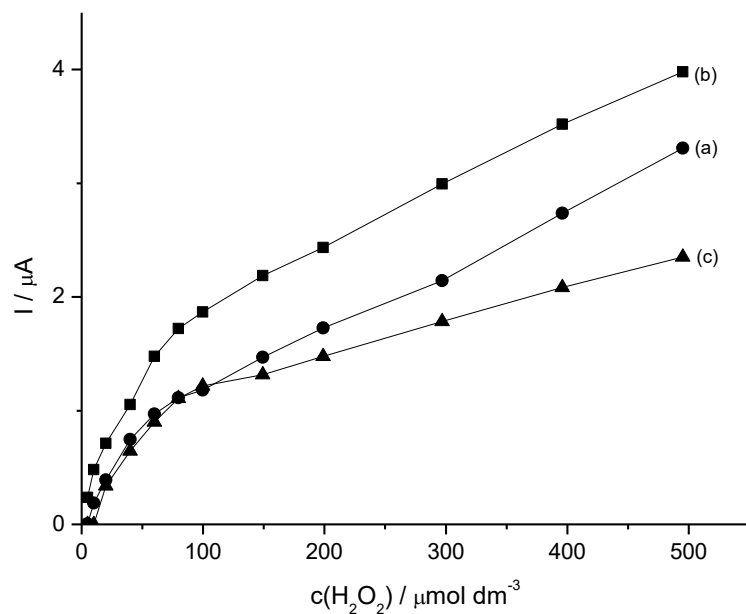
Usporedbom kumulativnih strujnih krivulja snimljenih na elektrodama 24 h nakon imobilizacije peroksidaze (slika 14), tijekom kojeg vremena su elektrode skladištene u 0,1 M fosfatnom puferu (pH = 6,0) pri temperaturi od 4 °C kako bi se s površine elektroda desorbirao labilno vezan enzim, uočljivo je da su bioelektrokatalitičke struje u prosjeku 2,5 puta veće na elektrodi načinjenoj od pirolitičkog ugljika dobivenog pirolizom otpadne kave u prisutnosti $Fe(NO_3)_2$, nego na elektrodi načinjenoj od pirolitičkog ugljika dobivenog pirolizom nemodificirane otpadne kave.



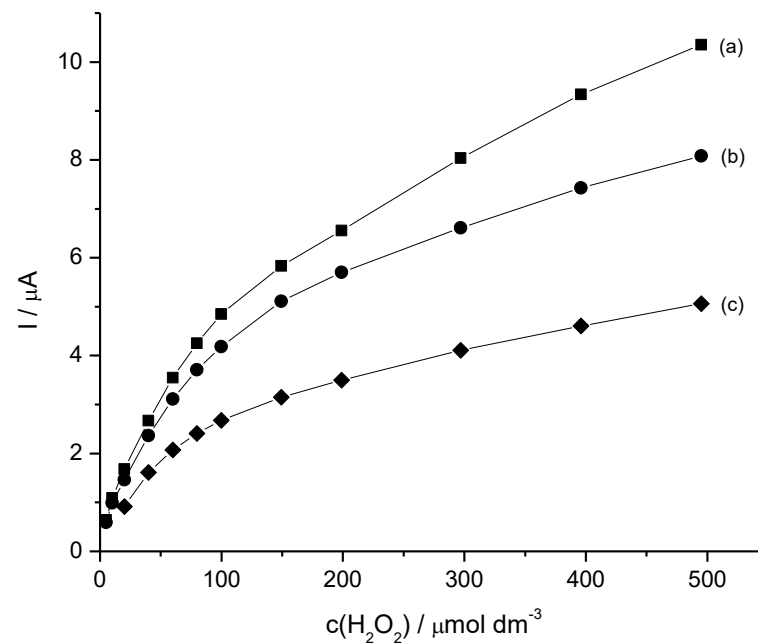
Slika 13. Strujni odziv snimljen na rotirajućoj disk-elektrodi modificiranoj pirolitičkim ugljikom s imobiliziranom peroksidazom pri sukcesivnim dodacima vodikova peroksida u području koncentracija od 5 do 500 $\mu\text{mol/L}$. Osnovni elektrolit: 0,1 M fosfatni pufer, pH 6,0. Radni potencijal elektrode: 0,20 V. Brzina rotacije elektrode: 1500 o/min. Prikazane su amperometrijske krivulje elektroda modificiranih pirolitičkim ugljikom dobivenim pirolizom a) bez prisustva katalizatora i b) u prisutnosti $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$.



Slika 14. Usporedba bioelektrokatalitičke aktivnosti peroksidaze imobilizirane na pirolitički ugljik dobiven pirolizom (a) kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ i (b) nemođificirane kave. Bioelektrokatalitičke struje snimljene su nakon što je elektroda po imobilizaciji peroksidaze skladištena 24 h u 0,1 M fosfatnom puferu, pH = 6,0, pri 4 °C. Ostali uvjeti kao na slici 13.



Slika 15. Bioelektrokatalitička aktivnost peroksidaze imobilizirane na pirolitički ugljik dobiven pirolizom nemodificirane otpadne kave, snimljena nakon skladištenja elektrode tijekom (a) 1 dana, (b) 3 dana i (c) 7 dana. Ostali uvjeti kao na slikama 14 i 15.



Slika 16. Bioelektrokatalitička aktivnost peroksidaze imobilizirane na pirolitički ugljik dobiven pirolizom otpadne kave modificirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, snimljena nakon skladištenja elektrode tijekom (a) 1 dana, (b) 3 dana i (c) 7 dana. Ostali uvjeti kao na slikama 14 i 15.

5. Rasprava

5.1. Morfologija i struktura uzoraka

Na temelju istraživanja strukture uzoraka provedenih rendgenskom difrakcijskom analizom i transmisijском elektrоnskom mikroskopijom može se zaključiti da se uzorci pirolitičkog ugljika dobiveni pirolizom nemodificirane otpadne kave i otpadne kave modificirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ strukturno značajno razlikuju. Dok uzorci pirolitičkog grafita dobiveni pirolizom nemodificirane otpadne kave u rendgenskoj difrakciji pokazuju sliku tipičnu za neuređene, amorfne uzorke, iz čega se može zaključiti da su građeni najvećim dijelom od amornog sp^2 -hibridiziranog ugljika (slika 8), uzorci pirolitičkog grafita dobiveni pirolizom u prisutnosti $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ imaju uređeniju strukturu, koja se približava strukturi grafita, kako je vidljivo iz značajno definiranijeg difrakcijskog maksimuma pri kutu $2\theta = 25,93^\circ$, koji se poklapa s difrakcijskim maksimumom grafita (slike 9 i 10). Postojanje grafitnih domena u uzorku dobivenom pirolizom otpadne kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ potvrđeno je i visokorezolucijskom transmisijском elektrоnskom mikroskopijom, koja je pokazala postojanje grafitnih domena sastavljenih od nekoliko desetaka atomskih nanoravnina ugljika (slika 12), koje su u uzorku uglavnom nepravilnog oblika, tj. mjestimice deformirane i zakrivljene. Uočena nepravilnost, odn. djelomična neuređenost grafitnih domena u skladu je s relativno velikom širinom pripadajućeg difrakcijskog maksimuma pri $2\theta = 25,93^\circ$.

Uzorak pirolitičkog grafita dobiven pirolizom otpadne kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ u svom sastavu pokazuje i postojanje dviju faza koje sadrže željezo: magnetita (Fe_2O_3) i cementita (željezov karbid, Fe_3C), kako je vidljivo na slikama 9 i 10. Prisutnost cementita u uzorku može se lako objasniti i u skladu je s ponašanjem sličnih uzoraka opisanim u literaturi [14]. Naime, kako je spomenuto u poglavlju 2.3.2., tijekom pirolize biomase u prisutnosti željezovih soli sukcesivno se zbivaju tri procesa: termička razgradnja željezovih soli do oksida (Fe_2O_3 i FeO), redukcija željezovih oksida do elementarnog željeza te reakcija željeza s ugljikom, koja rezultira nastajanjem željezova karbida, Fe_3C [14]. Iako opisani proces pretpostavlja i nastajanje Fe_2O_3 , začuđujuće je što je ta faza uočena u produktu nakon pirolize, jer je njeno nastajanje prema literaturnim podacima ograničeno na područje temperatura između 400 i 500 °C, nakon čega dolazi do redukcije željezovih oksida do elementarnog željeza. Postojanje te faze u uzorku nakon pirolize proturječi i kemijskoj logici jer je piroliza provedena na visokoj temperaturi (850 °C), u potpuno

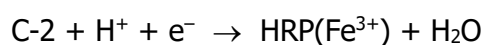
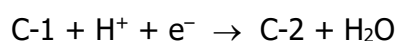
neoksidirajućoj atmosferi (atmosfera N_2). Pri tim uvjetima eventualno nastali željezovi oksidi moraju se reducirati s ugljikom nastalim pirolizom biomase do elementarnog željeza. Jedino logično objašnjenje za prisutnost magnetita u piroliziranom uzorku jest pretpostavka da je tijekom skladištenja uzorka na zraku došlo do oksidacije nanočestica željeza s površine uzorka u željezov(III) oksid, što je vjerojatno olakšano i povećanom kemijskom reaktivnošću koja se obično uočava kod nanočestica metala. U prilog toj pretpostavci govori i činjenica da je postojanje magnetita potvrđeno samo u uzorku pirolitičkog ugljika koji nije bio ekstrahiran s kiselinom (slika 9), dok je u istom uzorku nakon ekstrakcije uočeno postojanje samo cementitne faze (slika 10). Drugim riječima, sav magnetit iz uzorka bio je dostupan djelovanju kiseline, odn. morao se nalaziti na površini čestica pirolitičkog grafita ili u otvorenim porama.

U uzorku dobivenom pirolizom otpadne kave impregnirane sa $Fe(NO_3)_2$ dio nanočestica cementita ugrađen je u ugljičnu matricu, što proizlazi iz činjenice da je postojanje cementitne faze vidljivo na difraktogramu uzorka nakon ekstrakcije s HCl, u kojoj je cementit lako topljiv (slika 10), a što potvrđuju i transmisivske mikrografije prikazane na slikama 11 i 12, na kojima je vidljiv veći broj nanočestica veličina između 5 i 50 nm (slika 11), koje su kristalne strukture i u kojima razmak atomskih ravnina odgovara onome u kristalnoj rešetki cementita (slika 12). S obzirom da su nanočestice cementita zarobljene u ugljičnoj matrici, može se pretpostaviti da one tijekom pirolize kroz nju putuju te da se grafitne domene formiraju duž njihove putanje koju opisuju u ugljičnoj matrici, kao posljedica raspada Fe_3C na elementarno željezo i grafit. Time se ujedno može objasniti i zakrivljenost grafitnih domena uočena na slici 12. Zanimljiva posljedica pretpostavljenog gibanja nanočestica cementita kroz ugljičnu matricu jest formiranje pora u pirolitičkom ugljiku dobivenom pirolizom otpadne kave impregnirane sa $Fe(NO_3)_2$. Te bi pore trebale biti promjera komparabilnog s promjerom nanočestica cementita, tj. 5–50 nm. Naznaka postojanja pora može se uočiti na pretražnoj elektronskoj mikrografiji uzorka piroliziranog uz prisutnost $Fe(NO_3)_2$ (slika 7), no zbog relativno male rezolucije mikrografije pore tih veličina nije moguće jasno razlučiti. No jasno je da piroliza provedena u prisutnost $Fe(NO_3)_2$, osim što rezultira grafitizacijom pirolitičkog ugljika, uzrokuje i njegove značajne morfološke promjene, jer je površina čestica pirolitičkog grafita dobivenog pirolizom nemodificirane otpadne kave (slika 6) značajno manje stukturirana. Iz toga proizlazi i zaključak da pirolitički ugljik dobiven pirolizom otpadne kave u prisutnosti $Fe(NO_3)_2$ treba imati značajno veću specifičnu površinu od pirolitičkog grafita dobivenog pirolizom nemodificirane otpadne kave. Taj zaključak je značajan jer se njime mogu objasniti razlike

u bioelektrokatalitičkim svojstvima uzoraka s imobiliziranom peroksidazom, kako je objašnjeno u sljedećem poglavlju.

5.2. Bioelektrokatalitička svojstva pirolitičkih ugljika s imobiliziranom peroksidazom

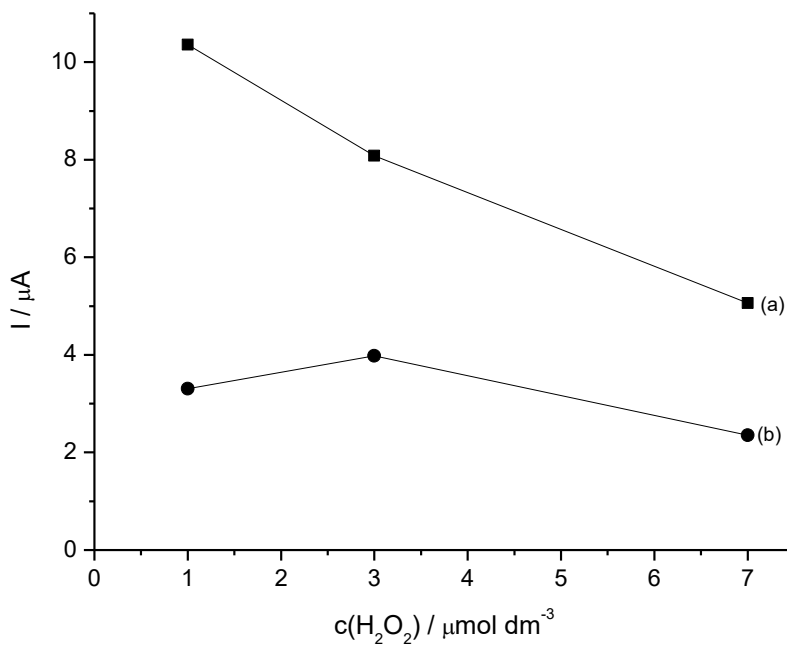
Mjerenja katalitičke struje redukcije vodikova peroksida na elektrodama modificiranim uzorcima pirolitičkog grafita na koje je fizikalnom adsorpcijom bila imobilizirana peroksidaza (slike 13–16) jasno pokazuje da obje ispitivane vrste pirolitičkog ugljika (pirolitički ugljik dobiven pirolizom nemodificirane otpadne kave i pirolitički ugljik dobiven pirolizom kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$) mogu poslužiti kao nosači za imobilizaciju peroksidaze te da u oba slučaja imobilizirani enzim pokazuje bioelektrokatalitička svojstva. Naime, pri potencijalu od 0,20 V prema kalomelovoj referentnoj elektrodi, na kojem su provedena mjerenja, na nemodificiranoj elektrodi ne dolazi do redukcije vodikova peroksida, jednako kao ni na elektrodi modificiranoj pirolitičkim ugljicima bez adsorbirane peroksidaze. Stoga pojava katodne struje u prisutnosti vodikova peroksida na elektrodama modificiranim s pirolitičkim ugljikom na kojeg je imobilizirana peroksidaza, pri uvjetima gdje u mjernom sustavu nije prisutan potencijalni medijator elektrona, nedvojbeno upućuje na zaključak da opažena struja mora biti rezultat bioelektrokatalitičkog ciklusa peroksidaze [22,23]:



u kojem $\text{HRP}(\text{Fe}^{3+})$ predstavlja katalitički aktivno oksidacijsko stanje peroksidaze, a C-1 i C-2 označavaju spoj 1 i spoj 2, koji se do početnog, katalitički aktivnog stanja peroksidaze reduciraju izravnom elektrokemijskom oksidacijom, tj. izravnim prijenosom elektrona s elektrode na redoks-centar peroksidaze.

Usporedba bioelektrokatalitičkih struja na elektrodama modificiranim s pirolitičkim ugljikom dobivenim pirolizom nemodificirane kave i kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ pokazuje da je tijekom cijelog vremena skladištenja elektroda uočeno da elektrode s peroksidazom imobiliziranom na pirolitički ugljik dobiven pirolizom u prisutnosti $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$

pokazuju 2,5–3 puta veću bioelektrokatalitičku aktivnost nego elektrode s peroksidazom imobiliziranom na pirolitički ugljik dobiven iz nemodificirane otpadne kave.



Slika 17. Promjena maksimalne bioelektrokatalitičke struje redukcije H_2O_2 , izmjerene pri koncentraciji H_2O_2 od $500 \mu\text{mol/L}$, tijekom 7 dana skladištenja elektroda s peroksidazom imobiliziranom na pirolitički ugljik dobiven pirolizom (a) otpadne kave impregnirane sa $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ i (b) nemodificirane otpadne kave.

6. Zaključak

Na temelju istraživanja provedenih u ovome radu može se zaključiti sljedeće:

- 1) Pirolizom otpadne mljevene kave zaostale nakon pripreme *espresso* kave pri temperaturi od 850 °C u inertnoj atmosferi dobiva se pirolitički ugljik na čiju se strukturu može utjecati dodatkom željezovih soli kao katalizatora pirolize. Pirolizom otpadne kave bez prisustva katalizatora dobiva se pirolitički ugljik amorfnе strukture u kojoj su atomi ugljika sp^2 -hibridizirani i povezani u nepravilnu heksagonsku mrežu. Pirolizom otpadne kave u prisutnosti $Fe(NO_3)_2$ dobiva se pirolitički ugljik uređenije strukture, koju karakterizira postojanje grafitnih domena.
- 2) Čestice pirolitičkog ugljika dobivenog pirolizom u prisutnosti $Fe(NO_3)_2$ kao katalizatora pokazuju značajnije strukturiranje površine od čestica pirolitičkog ugljika dobivenog pirolizom nemodificirane otpadne kave. Pirolitički ugljik dobiven katalitičkom pirolizom uz $Fe(NO_3)_2$ veće je specifične površine od pirolitičkog ugljika dobivenog pirolizom bez prisustva katalizatora.
- 3) Na površinu pirolitičkog ugljika dobivenog kataliziranom i nekataliziranom pirolizom otpadne kave moguće je imobilizirati peroksidazu fizikalnom adsorpcijom. Dobiveni pirolitički ugljici s adsorbiranom peroksidazom mogu se s uspjehom upotrijebiti za izradu bioelektrokatalitičkih elektroda, pri čemu elektrode načinjene od pirolitičkog ugljika dobivenog kataliziranom pirolizom u prisutnosti $Fe(NO_3)_2$ pokazuju 2,5–3 puta veću bioelektrokatalitičku aktivnost od elektroda načinjenih od pirolitičkog ugljika dobivenog nekataliziranom pirolizom.
- 4) Bolja bioelektrokatalitička aktivnost elektroda načinjenih od pirolitičkog ugljika dobivenog kataliziranom pirolizom mogla bi se pripisati njenoj većoj specifičnoj površini, te posljedično većoj količini adsorbiranog enzima, no tu je pretpostavku potrebno provjeriti dodatnim eksperimentima.

Literatura

1. L. F. Ballesteros, J. A. Teixeira, S. I. Mussatto. (2014) Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food And Bioprocess Technology* 7:3493-3503
2. R. Campos-Vega, G. Loarca-Piña, H. Vergara-Castañeda, B.D. Oomah. (2015) Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects, *Trends in Food Science & Technology*, 45:24-36
3. D. Pujol, C. Liu, J. Gominho, M.À. Olivella, N. Fiol, I. Villaescusa, H. Pereira. (2013) The chemical composition of exhausted coffee waste. *Industrial Crops and Products* 50:423-429
4. D. R. Vardon, B. R. Moser, W. Zheng, K. Witkin, R. L. Evangelista, T. J. Strathmann, K. Rajagopalan, B. K. Sharma. (2013) Complete Biochar Utilization of Spent Coffee Grounds To Produce Biodiesel, Bio-Oil. *ACS Sustainable Chemhemistry and Engineering*, 1:1286–1294
5. Y.Liu, Q. Tu, G. Knothe, M. Lu. (2017) Direct transesterification of spent coffee grounds for biodiesel production. *Fuel* 199:157-161
6. L. Yang, L. Nazari, Z. Yuan, K. Corcadden, C. Xu, Q. He. (2016) Hydrothermal liquefaction of spent coffee grounds in water medium for bio-oil production. *Biomass and Bioenergy*, 86: 191-198
7. J. P. Bok, H. S. Choi, Y. S. Choi, H. C. Park, S. J. Kim. (2012) Fast pyrolysis of coffee grounds: Characteristics of product yields and biocrude oil quality. *Energy* 47:7-24
8. X. Ma, F. Ouyang. (2013) Adsorption properties of biomass-based activated carbon prepared with spent coffee grounds and pomelo skin by phosphoric acid activation. *Applied Surface Science* 268:566-570
9. M. Kim, H.Min, N. Koo, J. Park, S. Lee, G.Bak, J. Kim. (2014) The effectiveness of spent coffee grounds and its biochar on the amelioration of heavy metals-contaminated water and soil using chemical and biological assessments. *Journal of Environmental Management* 146:124-130
10. Y. Soo Yun, M. H. Park, S. J. Hong, M. E. Lee, Y. W. Park, H. Jin. (2015) Hierarchically Porous Carbon Nanosheets from Waste Coffee Grounds for Supercapacitors. *Applied Material Interfaces* 7:3684–3690
11. C. Huang, T. Sun, D. Hulicova-Jurcakova.(2013) Wide Electrochemical Window of Supercapacitors from Coffee Bean-Derived Phosphorus-Rich Carbons. *ChemSusChem* 6: 2330-2339

12. S. K. Ramasahayam, A. L. Clark, Z. Hicks, T. Viswanathan. (2015) Spent coffee grounds derived P, N co-doped C as electrocatalyst for supercapacitor applications. *Electrochimica Acta* 168:414-422
13. T. Kan, V. Strezov, T. J. Evans. (2016) Lignocellulosic biomass pyrolysis: A review of product properties and effects of pyrolysis parameters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 57:1126–1140
14. J. Hoekstra, A.M. Beale, F. Soulimani, M. Versluijs-Helder, D. van de Kleut, J.M. Koelewijn, J.W. Geus, L.W. Jenneskens. (2016) The effect of iron catalyzed graphitization on the textural properties of carbonized cellulose: Magnetically separable graphitic carbon bodies for catalysis and remediation. *Carbon* 107:248-260
15. F. X. Collard, J. Blin. (2014) A review on pyrolysis of biomass constituents: Mechanisms and composition of the products obtained from the conversion of cellulose, hemicelluloses and lignin. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 38:594–608
16. T. E. Rufford, J. Zhu, D. Hulicova-Jurcakova (2014) Green Carbon Materials: Advances and Applications, 1. izd, CRC Press, str. 35-52, 100-104
17. M. Seredych, D. Hulicova-Jurcakova, G. Qing Lu, T. J. Bandoz. (2008) Surface functional groups of carbons and the effects of their chemical character, density and accessibility to ions on electrochemical performance. *Carbon* 46: 1475 –1488
18. K. Kirtania, J. Tanner, K. B. Kabir, S. Rajendran, S. Bhattacharya. (2014) In situ synchrotron IR study relating temperature and heating rate to surface functional group changes in biomass. *Bioresource Technology* 151:36-42
19. E. Thompson, A. E. Danks, L. Bourgeois and Z. Schnepf. (2014) Iron-catalyzed graphitization of biomass. *Green chemistry* 17:551-556
20. A. A. Karyakin. (2012) Principles of direct (mediator free) bioelectrocatalysis. *Bioelectrochemistry* 88 :70-75
21. J. Masa, W. Schuhmann. (2016) Electrocatalysis and bioelectrocatalysis – distinction without a difference. *Nano Energy* 29:466-475
22. E. E. Ferapontova. (2004) Direct Peroxidase Bioelectrocatalysis on a Variety of Electrode Materials. *Electroanalysis* 16:13-14.
23. J. N. Rodriguez-Lopez, D. J. Lowe, J. Hernandez-Ruiz, A. N. P. Hiner, F. Garcia-Canovas and R. N. F. Thorneley. (2001) Mechanism of Reaction of Hydrogen Peroxide with Horseradish Peroxidase: Identification of Intermediates in the Catalytic Cycle. *Journal of the American Chemical Society* 123:11838-11847
23. X. Li, V. Strezov, T. Kan. (2014) Energy recovery potential analysis of spent coffee grounds pyrolysis products. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 110:79–87

24. H. Shi. (1996) Activated carbons and double layer capacitance. *Electrochimica acta*. 41:1633-1639
25. T. E. Rufford, D. Hulicova-Jurcakova, Z. Zhu, G. Qing Lu. (2008) Nanoporous carbon electrode from waste coffee beans for high performance supercapacitors. *Electrochemistry Communications* 10:1594–1597
26. A. de Poulpiquet, A. Ciaccafava, E. Lojou. (2013) New trends in enzyme immobilization at nanostructured interfaces for efficient electrocatalysis in biofuel cells. *Electrochimica Acta* 126:104-114
27. T. Sun, B. D. A. Levin, J. J. L. Guzman, A. Enders, D. A. Muller, L. T. Angenent, J. Lehmann. (2017) Rapid electron transfer by the carbon matrix in natural pyrogenic carbon. *Nature Communications* 8:14873-14882
28. K. Wang, K. Ho Kim, R. C. Brown. (2013) Catalytic pyrolysis of individual components of lignocellulosic biomass. *Green chemistry* **16**:727-735
29. J. Hoekstra, M. Versluijs-Helder, E. J. Vlietstra, J. W. Geus, L. W. Jenneskens. (2015) Carbon-Supported Base Metal Nanoparticles: Cellulose at Work. *ChemSusChem* 8:985-989
30. I. Milosavljevic, V. Oja, E. M. Suuberg. (1996) Thermal Effects in Cellulose Pyrolysis: Relationship to Char Formation Processes. *Industrial and engineering chemistry research* 35:653-662
31. T. E. Rufford, D. Hulicova-Jurcakova, Z. Zhu, G. Qing Lu. (2010) A comparative study of chemical treatment by FeCl₃, MgCl₂, and ZnCl₂ on microstructure, surface chemistry, and double-layer capacitance of carbons from waste biomass. *Journal of materials research* 25:1451-1459
32. S.I. Yang, M. S. Wu, C.Y. Wu. (2014) Application of biomass fast pyrolysis part I: Pyrolysis characteristics and products. *Energy* 66:162-171
33. J. Hoekstra, A. M. Beale, F. Soulimani, M. Versluijs-Helder, J. W. Geus, L. W. Jenneskens. (2015) Base Metal Catalyzed Graphitization of Cellulose: A Combined Raman Spectroscopy, Temperature-Dependent X-ray Diffraction and High-Resolution Transmission Electron Microscopy Study. *The Journal of Physical Chemistry C* 119: 10653–10661
34. L. Zou , Y. Qiao , Z.-Yu Wu , X. S. Wu , J. L. Xie , S. H. Yu , J. Guo, C. Ming Li. (2016) Tailoring Unique Mesopores of Hierarchically Porous Structures for Fast Direct Electrochemistry in Microbial Fuel Cells. *Energy Mater* 6:1501-535
35. A. Fischer, S. Du, J. A. Valla, G. M. Bollas. (2015) The effect of temperature, heating rate, and ZSM-5 catalyst on the product selectivity of the fast pyrolysis of spent coffee grounds. *RSC Advances*. 5:29252-29261