

# Sinteza biodizela iz otpadnih jestivih ulja i masti katalizirana lipazama iz bakterije *Bulkholderia cepacia*

---

Cikoja, Mihael

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:109:814943>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

**Mihael Cikoja**

**SINTEZA BIODIZELA IZ OTPADNIH JESTIVIH ULJA I MASTI  
KATALIZIRANA LIPAZAMA IZ BAKTERIJE *Burkholderia cepacia***

DIPLOMSKI RAD

Osijek, ožujak 2022.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

### Diplomski sveučilišni studij procesnog inženjerstva

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti

**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija

**Nastavni predmet:** Energija i okoliš

**Tema rada** je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 24. lipnja 2021.

**Mentor:** prof. dr. sc. *Sandra Budžaki*

**Pomoć pri izradi:** *Marta Ostojić*, mag. ing. proc.

### Sinteza biodizela iz otpadnih jestivih ulja i masti katalizirana lipazama iz bakterije *Burkholderia cepacia*

*Mihael Cikoja*, 0113141405

**Sažetak:** Biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina (eng. FAME; *Fatty Acid Methyl Esters*) iz ulja i masti različitih izvora, a industrijski se najčešće proizvodi kemijski kataliziranom reakcijom transesterifikacije. Biodizel predstavlja ekološki prihvatljivu alternativu uobičajenom fosilnom dizelskom gorivu. S druge strane, postoji i nekoliko ekološki prihvatljivijih alternativa uobičajenoj industrijskoj proizvodnji biodizela, poput zamjene kemijskih katalizatora enzimskim te uporabe otpadnih biljnih ulja i životinjskih masti za razliku od svježih. U okviru ovog rada, provedena je enzimska sinteza biodizela iz tri različite vrste otpadnih biljnih ulja te iz jedne otpadne životinjske masti. Obzirom da takva ulja i masti ne predstavljaju „idealne“ sirovine, prethodno su im određeni osnovni parametri kvalitete. Provedbom 24 h sinteze pri 50 °C i pH 10, uz korištenje lipaze iz *B. cepacia* aktivnosti 250 U/g i uz prisustvo metanola, dobiven je biodizel prihvatljive kvalitete (udio FAME > 96,5 %) iz svih vrsta otpadnih ulja, dok je maksimalni udio FAME u biodizelu sintetiziranom iz otpadne životinjske masti iznosio  $95,08 \pm 4,55$  %. Otpadno suncokretovo ulje se pokazalo kao najprikladnija sirovina te je maksimalni udio FAME pri njegovom korištenju kao sirovine iznosio  $99,50 \pm 0,04$  %.

**Ključne riječi:** biodizel, enzimska sinteza, lipaza, *B. cepacia*, otpadna ulja i masti

**Rad sadrži:** 36 stranica  
6 slika  
4 tablice  
7 jednadžbi  
31 literaturna referenca

**Jezik izvornika:** hrvatski

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

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i>      | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i>     | član-mentor   |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i> | član          |
| 4. prof. dr. sc. <i>Tihomir Moslavac</i>   | zamjena člana |

**Datum obrane:** 11. ožujka 2022.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u** Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

**University Josip Juraj Strossmayer in Osijek**  
**Faculty of Food Technology Osijek**  
**Department of Process Engineering**  
**Subdepartment of energy, environment and sustainable development**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program of Process Engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Energy and environment

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX held on June 24, 2021.

**Mentor:** *Sandra Budžaki*, PhD, prof.

**Technical assistance:** *Marta Ostožić*, mag. ing. proc.

### **Synthesis of Biodiesel from Waste Edible Oils and Fats Catalysed by Lipases Derived from *Burkholderia cepacia* Bacterium**

*Mihael Cikoja*, 0113141405

**Summary:** Biodiesel is a mixture of Fatty Acid Methyl Esters (FAME) from oils and fats of various sources industrially produced by a chemically catalysed transesterification reaction. Biodiesel is an environmentally friendly alternative to conventional fossil diesel fuel. On the other hand, there are several more environmentally friendly alternatives to conventional industrial biodiesel production, such as replacing chemical catalysts with enzymatic ones and using waste vegetable oils and animal fats as opposed to fresh ones. Within this paper, enzymatic synthesis of biodiesel from three different types of waste vegetable oils and one waste animal fat was reported. Since such oils and fats are not ideal as raw materials, the basic quality parameters have been determined beforehand. By performing 24 h of synthesis at 50 ° C and pH 10, using lipase from *B. cepacia* with an activity of 250 U/g and in the presence of methanol, biodiesel of acceptable quality (FAME content > 96.5 %) was obtained from all types of waste oils, while the maximum FAME content in biodiesel synthesized from animal waste fat was  $95.08 \pm 4.55$  %. Non-edible sunflower oil proved to be the most suitable raw material for biodiesel production and the maximum FAME content in its use as raw material was  $99.50 \pm 0.04$  %.

**Key words:** biodiesel, enzymatic synthesis, lipase, *B. cepacia*, waste oils and fats

**Thesis contains:** 36 pages  
6 figures  
4 tables  
7 equations  
31 references

**Original in:** Croatian

### Defense committee:

- |  |              |
|--|--------------|
| 1. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof.           | chair person |
| 2. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, prof.          | supervisor   |
| 3. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof. | member       |
| 4. <i>Tihomir Moslavac</i> , PhD, prof.        | stand-in     |

**Defense date:** March 11, 2022.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek.



Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj „IP-2020-02-6878.“

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. BIODIZEL</b> .....	<b>5</b>
2.1.1. Svojstva biodizela .....	5
2.1.2. Proizvodnja biodizela.....	7
<b>2.2. LIPAZE</b> .....	<b>9</b>
2.2.1. Katalitička i supstratna specifičnost lipaze .....	11
2.2.2. Lipaze iz bakterije <i>Burkholderia cepacia</i> .....	11
<b>2.3. OTPADNA BILJNA ULJA I ŽIVOTINJSKE MASTI</b> .....	<b>12</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2. MATERIJALI</b> .....	<b>15</b>
3.2.1. Sirovine .....	15
3.2.2. Katalizator.....	15
3.2.3. Sastav reakcijske smjese.....	16
3.2.4. Kemikalije .....	16
3.2.5. Aparatura.....	17
<b>3.3. METODE</b> .....	<b>17</b>
3.3.1. Karakterizacija sirovina .....	17
3.3.2. Određivanje supstratne specifičnosti lipaze.....	19
3.3.3. Sinteza biodizela .....	20
3.3.4. Određivanje udjela i profila FAME u biodizelu .....	21
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>22</b>
<b>4.1. KARAKTERIZACIJA SIROVINA</b> .....	<b>23</b>
4.1.1. Udio i profil masnih kiselina .....	23
4.1.2. Osnovni parametri kvalitete.....	25
<b>4.2. SUPSTRATNA SPECIFIČNOST LIPAZE</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3. UDIO I PROFIL FAME U BIODIZELU</b> .....	<b>27</b>
4.3.1. Udio FAME.....	27
4.3.2. Profil FAME.....	29
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>31</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>33</b>

## **1. UVOD**

Naftna kriza, poskupljenje cijena i smanjenje dostupnosti naftnih goriva, kao i shvaćanje štetnih posljedica koje izgaranje takvih goriva ostavlja na okoliš, dovelo je do razvoja alternativnih goriva - biogoriva, među koje se ubraja i biodizel. Biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina (FAME; *Fatty Acid Methyl Esters*), koji se proizvode iz različitih vrsta jestivih, nejestivih i otpadnih biljnih ulja i životinjskih masti te ulja mikro- i makro-algi. Biodizel se industrijski, gotovo isključivo proizvodi kemijski kataliziranom reakcijom transesterifikacije, iz svježih biljnih ulja, pri čemu se kao katalizator najčešće koristi natrijev hidroksid. Tako se u Europi kao sirovina za industrijsku proizvodnju biodizela, najčešće koristi svježe repičino ulje (Bajpai i Tyagi, 2006).

Kemijski kataliziranu sintezu biodizela prati niz nedostataka, poput visokih potreba za energijom i vodom, kao i visokih koncentracija nastalih nusprodukata i otpadne vode. Suprotno tome, enzimski katalizirana sinteza biodizela, predstavlja ekološki prihvatljivu alternativu kemijskoj sintezi, čijom se provedbom značajno smanjuje potreba za potrošnjom energije, ali i količina nastalih nusprodukata i otpadne vode. Kao biokatalizator pri enzimski kataliziranoj reakciji transesterifikacije, odnosno pri enzimskoj sintezi biodizela, koristi se enzim lipaza, čija je visoka cijena glavna kočnica široke industrijske provedbe enzimski katalizirane sinteze biodizela (Gabremariam i Marchetti, 2017).

Osim cijene enzima, najveći trošak u industriji biodizela općenito, predstavlja cijena sirovine. Svježa jestiva ulja su svojim karakteristikama optimalne sirovine za proizvodnju biodizela, ali im je i cijena relativno visoka. Kako bi se smanjili troškovi proizvodnje, ali i kako bi se riješio sve veći problem njihovog zbrinjavanja, otpadna ulja i masti počela su se razmatrati kao alternativne sirovine za proizvodnju biodizela. Međutim, otpadna ulja i masti nisu optimalne kvalitete, odnosno, korištenjem ulja i masti u procesu prženja hrane, odvijaju se određene promjene u uljima i mastima, od čega je najznačajnije povećanje udjela slobodnih masnih kiselina. Visok udio slobodnih masnih kiselina predstavlja problem pri kemijski kataliziranoj sintezi biodizela, budući da ih kemijski katalizatori nisu u mogućnosti transformirati u metilne estere, odnosno biodizel. S druge strane, enzimi imaju mogućnost transformacije svih vrsta masnih kiselina, pa tako i onih slobodnih u metilne estere (Vela i sur., 2020). Iz tog razloga, velik broj znanstvenih istraživanja usmjeren je ka razvoju optimalnih procesa za enzimski kataliziranu sintezu biodizela iz otpadnih jestivih biljnih ulja i životinjskih masti. Međutim, u većini znanstvenih radova (Charpe i Rathod, 2011; Budžaki i sur., 2015; Nie i sur., 2006; Chen



i sur., 2009; Watanabe i sur., 2001; Halim i sur., 2009; Adewale i sur., 2016; Salum i sur., 2010; You i sur., 2013; Silva i sur., 2014; Da Ros i sur., 2010), uočen je nedostatak kemijske karakterizacije osnovnih parametara kvalitete otpadnih ulja i masti. Poznavanje vrijednosti osnovnih parametara kvalitete sirovina pomoglo bi razumijevanju procesa enzimske sinteze, odnosno odabiru najboljih sirovina, kojima bi se proizveo biodizel najbolje kvalitete pod optimalnim uvjetima sinteze.

U ovom radu provedene su enzimski katalizirane sinteze biodizela iz različitih vrsta otpadnih jestivih biljnih ulja i životinjske masti, kojima su prethodno određeni osnovni parametri kvalitete. Kao katalizator korištena je komercijalna lipaza iz bakterije *Burkholderia cepacia*.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. BIODIZEL

Prema Uredbi o kakvoći biogoriva (Vlada RH, 2005) biodizel se definira kao: „metilni ester masnih kiselina (FAME) koji se proizvodi od biljnog ili životinjskog ulja, koji ima svojstva dizela“.

Točnije, biodizel je biogorivo, proizvedeno iz obnovljivih izvora energije, odnosno iz jestivih, nejestivih i otpadnih biljnih ulja i životinjskih masti te u novije vrijeme, iz ulja mikro- i makroalgi. Biodizel predstavlja ekološki prihvatljivu alternativu dizelskom gorivu, proizvedenom iz neobnovljivih izvora energije, odnosno nafte, a njegova upotreba ne zahtijeva velike preinake na postojećim dizelskim motorima u automobilima, kamionima, autobusima i sl. (Bajpai i Tyagi, 2006). Biodizel se može koristiti kao samostalno gorivo, a češće u mješavini s fosilnim dizelom, u različitim omjerima, pri čemu se takvo gorivo označava oznakom BXX, gdje XX predstavlja postotni udio biodizela u mješavini (npr. B5, B10, B20, B100 i sl.) (Ostojčić, 2018).

Osim navedenog, biodizel se može definirati i prema Gabremariam i Marchetti (2017) kao: „mono – alkilni ester dugolančanih masnih kiselina iz biljnih ulja ili životinjskih masti i alkohola“.

Prva primjena biljnih ulja u dizelskim motorima zabilježena je još početkom 20. stoljeća, od strane samog tvorca dizelskog motora, Rudolfa Diesela. Usprkos tome, biodizel je na većem značaju dobio tek 80-ih godina prošlog stoljeća, kada je počeo i interes znanstvene zajednice, a i javnosti, za očuvanje okoliša, odnosno smanjenje štetnih utjecaja koje su ljudske aktivnosti nanijele okolišu, posebice u vidu ispuštanja štetnih plinova u atmosferu i pridonošenja efektu staklenika. Unatoč tome, upotreba biodizela i dalje nije na zavidnoj razini te fosilna goriva i dalje dominiraju tržištem, ponajprije zbog svojih jeftinijih troškova proizvodnje (Gabremariam i Marchetti, 2017).

### 2.1.1. Svojstva biodizela

Biodizel je biorazgradiva i netoksična tekućina, koja svojim izgaranjem emitira znatno manje štetnih plinova u atmosferu, u odnosu na fosilni dizel. Točnije, izgaranjem biodizela, ne dolazi do emisije sumpora, odnosno sumpornih spojeva, dolazi do znatno manjih emisija CO<sub>2</sub> i suspendiranih čestica u atmosferu. Biodizel je CO<sub>2</sub> neutralan, što znači da prilikom izgaranja, u atmosferu oslobađa onu količinu CO<sub>2</sub>, koju je biljka, od čijeg je ulja proizveden biodizel, upila iz atmosfere za vrijeme svoga rasta. Ako se uzme u obzir cjelokupni životni ciklus biodizela, odnosno sve korake od sadnje biljaka, proizvodnje ulja i njegove transformacije u biodizel, pa

sve do njegovog izgaranja, tada se događa određeno oslobađanje CO<sub>2</sub> u atmosferu, čime biodizel više nije CO<sub>2</sub> neutralan, međutim, količine oslobođenog CO<sub>2</sub>, su i dalje znatno manje u usporedbi sa životnim ciklusom fosilnog dizela (Gabremariam i Marchetti, 2017).

Biodizel je prvo biogorivo, čija su svojstva, odnosno karakteristike, tj. parametri kvalitete, definirani normom HR EN 14214:2019 (HZN, 2019), a koja su prikazana u **Tablici 1**.

**Tablica 1** Svojstva biodizela zadana normom HR EN 14214 (HZN, 2019)

Svojstvo	Mjerna jedinica	Minimum	Maksimum	Test metoda
Udio metilnih estera masnih kiselina	% (m/m)	96,5	-	EN 14103
Gustoća pri 15 °C	kg/m <sup>3</sup>	860	900	EN ISO 3675 EN ISO 12185
Viskoznost pri 15 °C	mm <sup>2</sup> /s	3,50	5,00	EN ISO 3140
Točka zapaljenja	°C	101	-	EN ISO 2719 EN ISO 3679
Cetanski broj	-	51,0	-	EN ISO 5165
Korozija bakrene trake (3h pri 50 °C)	stopa	klasa 1		EN ISO 2160
Oksidacijska stabilnost (pri 110 °C)	h	8,0	-	EN 14112 prEN 15751
Kiselinski broj	mgKOH/g	-	0,50	EN 14104
Jodni broj	gl <sub>2</sub> /100g	-	120	EN 14111 EN 16300
Metil esteri linoleinske kiseline	% (m/m)	-	12,0	EN 14103
Polinezasićeni (>=4 dvostruke veze) metil esteri	% (m/m)	-	1,00	EN 15779
Udio metanola	% (m/m)	-	0,20	EN 14110
Udio monoglicerida	% (m/m)	-	0,70	EN 14105
Udio diglicerida	% (m/m)	-	0,20	EN 14105

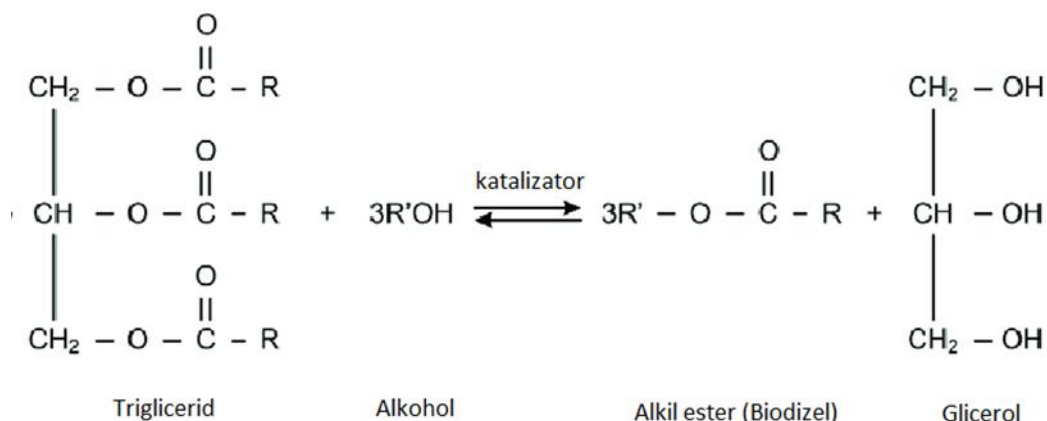
Udio triglicerida	% (m/m)	-	0,20	EN 14105
Slobodni glicerol	% (m/m)	-	0,02	EN 14105 EN 14106
Ukupni glicerol	% (m/m)	-	0,25	EN 14105
Udio vode	mg/kg	-	500	EN ISO 12937
Ukupna kontaminacija	mg/kg	-	24	EN 12662
Udio sulfoniranog pepela	% (m/m)	-	0,02	ISO 3987
Udio sumpora	mg/kg	-	10,0	EN ISO 20846 EN ISO 20884 EN ISO 13032
Metali 1. skupine (Na + K)	mg/kg	-	5,0	EN 14108 EN 14109 EN 14538
Metali 2. skupine (Ca + Mg)	mg/kg	-	5,0	EN 14538
Udio fosfora	mg/kg	-	4,0	EN 14107 EN 16294

### 2.1.2. Proizvodnja biodizela

Biodizel se načelno može proizvesti na četiri različita načina (Gabremariam i Marchetti, 2017):

- direktnim korištenjem ulja ili mješavine ulja i fosilnog dizela,
- mikroemulzifikacijom,
- pirolizom
- i transesterifikacijom.

Transesterifikacija je najčešće korištena metoda za dobivanje biodizela iz biljnih ulja i životinjskih masti, čime nastaju esteri masnih kiselina koji su kemijskim sastavom slični fosilnom dizelu. Transesterifikacija je reverzibilna kemijska reakcija (**Slika 1**) u kojoj sudjeluju masne kiseline iz ulja ili masti i alkohol (metanol), a koja se može odvijati u prisustvu ili bez prisustva katalizatora.



**Slika 1.** Reakcija transesterifikacije (Gabremariam i Marchetti, 2017)

Kao produkt reakcije nastaju metilni esteri masnih kiselina, odnosno biodizel te glicerol kao nusprodukt. Kada reakcija transesterifikacije nije katalizirana, odvija se uz prisustvo topline ili pod visokim tlakom, međutim najčešće je slučaj da se reakcija transesterifikacije odvija uz prisustvo katalizatora, koji može biti kemijski ili enzimski (Gabremariam i Marchetti, 2017).

Osim navedene podjele, katalizatori se još mogu podijeliti prema fazi u kojoj se nalaze, odnosno prema tome jesu li u istoj fazi kao i reakcijska smjesa, u ovom slučaju, u tekućoj. Prema takvoj podjeli, razlikuju se heterogeni i homogeni katalizatori. Pri industrijskoj proizvodnji biodizela, najčešće se provodi homogena kemijski katalizirana reakcija transesterifikacije. Kao kemijski katalizatori mogu se koristiti kiseli ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) ili lužnati ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$ ) katalizatori, dok je najčešći slučaj primjene lužnatih katalizatora, točnije  $\text{NaOH}$ . Kemijska sinteza biodizela je trenutno najkorištenija metoda, zbog niske cijene katalizatora i relativno kratkog vremena reakcije. Međutim, kemijski katalizirana sinteza biodizela ima i određene nedostatke u odnosu na enzimski kataliziranu sintezu. Naime, potrebna je viša temperatura za odvijanje reakcije, što zahtjeva i veću potrošnju energije te nastaju sapuni kao nusprodukti. Sapuni nastaju sekundarnom reakcijom saponifikacije, između lužnatog katalizatora i slobodnih masnih kiselina iz ulja ili masti, a njihovo odvajanje od konačnog produkta, biodizela, vrlo je zahtjevno (Abbaszaadeh i sur., 2012; Gabremariam i Marchetti, 2017).

Enzimski katalizirana sinteza biodizela, podrazumijeva korištenje enzima lipaza kao katalizatora reakcije transesterifikacije. Takva reakcija zahtjeva blaže reakcijske uvjete, prije svega nižu temperaturu, a u potpunosti je i eliminirana sporedna reakcija saponifikacije, što smanjuje količinu nastalih nusprodukata i olakšava pročišćavanje konačnog produkta reakcije,

biodizela. Osim navedenog, enzimaska sinteza je primjenjiva na širi spektar sirovina, u odnosu na kemijsku sintezu, budući da je manje osjetljiva na kemijski sastav i svojstva sirovina, posebice u vidu sadržaja slobodnih masnih kiselina. Međutim, glavna kočnica široke industrijske primjene enzima kao katalizatora pri sintezi biodizela, je njihova cijena, ali i duže reakcijsko vrijeme, u odnosu na kemijske katalizatore. Kako bi se riješio problem visoke cijene enzima, čest je slučaj njegove imobilizacije, čime je omogućena njegova višekratna uporaba (Gabremariam i Marchetti, 2017).

Kao sirovine za proizvodnju biodizela, koriste se različiti obnovljivi izvori energije, odnosno jestiva, nejestiva i otpadna biljna ulja i životinjske masti, uljni otpad iz industrijske proizvodnje ulja i masti te ulja mikro- i makro-algi. Obzirom na korištenu sirovinu pri njegovoj proizvodnji, biodizel se može klasificirati u četiri generacije biogoriva. Prvu generaciju predstavlja biodizel proizveden iz jestivih biljnih ulja i životinjskih masti, drugu generaciju predstavlja biodizel proizveden iz otpadnih ulja i masti, bila ona iz domaćinstava, restorana ili industrije, treću generaciju predstavlja biodizel proizveden iz ulja mikro- i makro-algi, dok četvrtu generaciju predstavlja biodizel proizveden iz genetski modificiranih algi i drugih mikroorganizama (Ostojčić, 2018). Najčešće korištene sirovine za proizvodnju biodizela u Europi su repičino i suncokretovo ulje, dok je u SAD-u to sojino ulje (Bajpai i Tyagi, 2006).

## **2.2. LIPAZE**

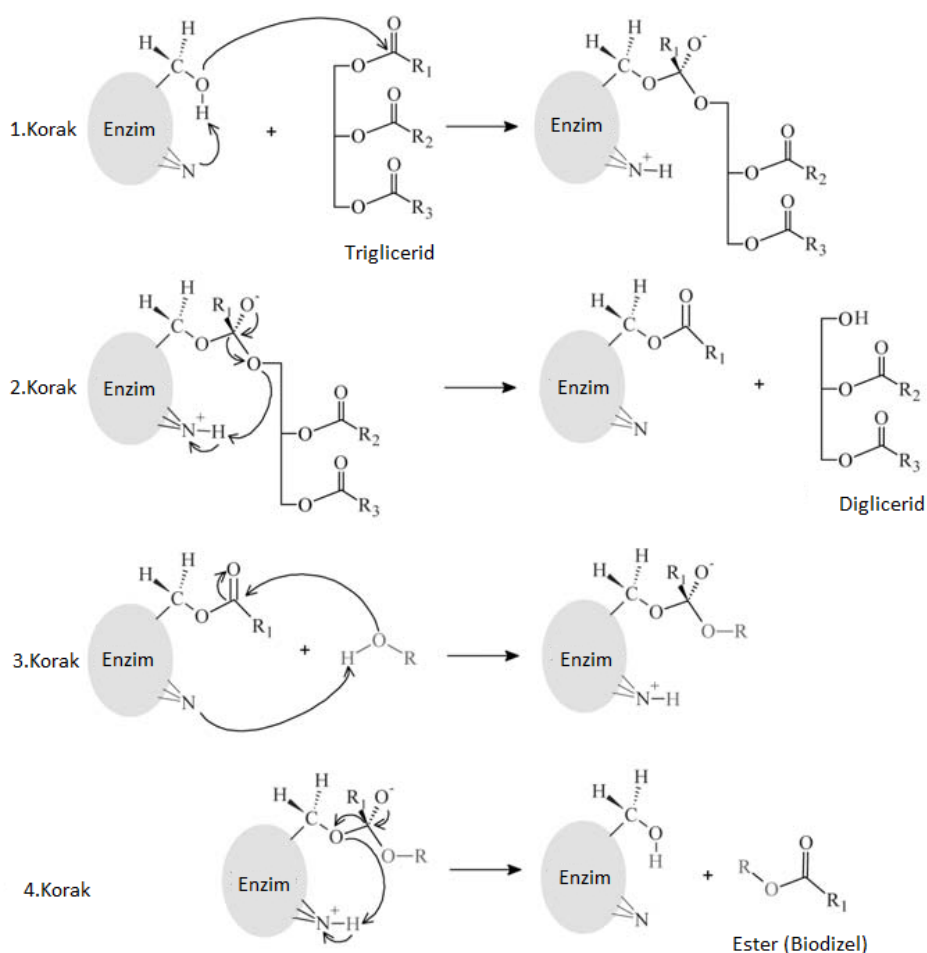
Lipaze ili triacilglicerol acilhidrolaze (EC 3.1.1.3) su enzimi koji kataliziraju tri vrste kemijskih reakcija:

- hidrolizu,
- esterifikaciju
- i transesterifikaciju.

Lipaze mogu biti biljnog, životinjskog ili mikrobnog podrijetla, stoga svojstva i cijena pojedine lipaze, ovisi o izvoru iz kojega je izolirana. Pri proizvodnji biodizela, najčešće se koriste mikrobne lipaze, koje mogu biti izolirane iz različitih vrsta bakterija, plijesni i kvasaca. Izolacija lipaze iz mikrobnih izvora je jeftinija, jednostavnija i brža te lipaze pokazuju veću aktivnost, stabilnost i ekološki su prihvatljivije u odnosu na lipaze izolirane iz ostalih izvora. Mikrobne lipaze se većinom izlučuju izvan stanice, optimalan pH im je u rasponu 7,5 – 9, a s obzirom na

mikroorganizam iz kojeg su izolirane, mogu biti mezofilne ili termofilne te im je optimalna temperatura 35 – 50 °C za lipaze izolirane iz mezofilnih mikroorganizama i 60 – 80 °C za lipaze izolirane iz termofilnih mikroorganizama. Iako su im to optimalne temperature, lipaze ostaju aktivne i pri blažim uvjetima (npr. sobna temperatura) što smanjuje potrošnju energije u procesima u kojima se koriste (Moazeni i sur., 2019).

Osim pH i temperature, optimalna aktivnost lipaza pri enzimskoj sintezi biodizela, ovisi i o vrsti korištenog alkohola, molarnom omjeru supstrata i alkohola, masenom omjeru supstrata i lipaze, aktivitetu vode te koncentraciji glicerola. Iz tog razloga, potrebno je pažljivo odabrati uvjete provedbe enzimске sinteze biodizela, kako ne bi došlo do inaktivacije enzima i smanjenja njegove učinkovitosti (Szczesna Antczak i sur., 2009).



**Slika 2.** Mehanizam reakcije transesterifikacije katalizirane lipazom (Batista i sur., 2014)



Kao što je već navedeno, lipaze kataliziraju tri vrste kemijskih reakcija, a pri sintezi biodizela, najznačajnija je njihova sposobnost kataliziranja reakcije transesterifikacije. Mehanizam reakcije transesterifikacije kataliziran lipazom, prikazan je na **Slici 2**. Reakcija započinje nukleofilnim napadom hidroksilne skupine aminokiselinskog ostatka enzima na ugljikov atom karbonilne skupine triglicerida, čime nastaje kompleks enzim – supstrat. Nakon toga, kisikov atom glicerola se protonira s protonom iz amino skupine enzima, što rezultira cijepanjem CO veze i stvaranjem molekule diacilglicerida i acil – enzim međuprodukta. Zatim se događa alkoholni napad na acil – enzim međuprodukt, čime nastaje alkohol acilirani enzimski kompleks. Naposljetku se enzim rekonstituira te nastaje molekula estera, odnosno biodizela (Batista i sur., 2014).

### 2.2.1. Katalitička i supstratna specifičnost lipaze

Osim uvjeta provedbe, važno je odabrati lipaze koje nisu visoko katalitički specifične. Katalitička specifičnost lipaza se odnosi na regiospecifičnost i specifičnost s obzirom na dužinu ugljikohidratnog lanca triglicerida. Regiospecifičnost podrazumijeva položaj cijepajuće esterske veze na lancu triglicerida, a prema regiospecifičnosti razlikuju se tri vrste lipaza:

- *sn* – 1,3 – specifične (hidroliziraju esterske veze na R1 i R3 položaju triglicerida),
- *sn* – 2 – specifične (hidroliziraju esterske veze na R2 položaju triglicerida), i
- nespecifične lipaze (hidroliziraju sve esterske veze u trigliceridima).

Supstratna specifičnost je sposobnost enzima da razlikuje strukturne osobine različitih supstrata, u ovom slučaju, triglicerida. Strukturne osobine triglicerida na temelju kojih lipaze razlikuju različite supstrate, su dužina lanca masnih kiselina, broj i položaj dvostrukih veza u lancu, prisutnost i vrsta funkcionalnih skupina, ali i priroda supstrata, odnosno jesu li masne kiseline slobodne, vezane, esterificirane, i sl. U većini slučajeva, pod optimalnim uvjetima, lipaze pokazuju najveću supstratnu specifičnost prema C18 masnim kiselinama (Szczena Antczak i sur., 2009).

### 2.2.2. Lipaze iz bakterije *Burkholderia cepacia*

*Burkholderia cepacia* su kompleks devet genetički različitih, ali fenotipno sličnih bakterija. Točnije, to su Gram – negativni bacili koji ne stvaraju spore. Mogu se pronaći u različitim okolišima, gdje mogu imati pozitivne, ali i negativne učinke na biljke te imaju sposobnost

razgrađivanja polutanata. Kod ljudi se smatraju patogenim mikroorganizmima, koji uzrokuju infekcije plućnog sustava. U novije vrijeme, započeo je interes korištenja ovih bakterija u biotehnoške, industrijske i agronomske svrhe (Mahenthiralingam i sur., 2005).

Lipaza iz *B. cepacia* (BCL; *Burkholderia cepacia* Lipase) je izvanstanična lipaza, otporna na toplinu i različita organska otapala, koja uključuju i kratkolančane alkohole (metanol). Upravo zbog otpornosti na metanol, BCL je izrazito korisna pri sintezi biodizela, budući da ne dolazi do inaktivacije enzima djelovanjem metanola, što je čest problem prilikom enzimske sinteze biodizela. Također, BCL je nespecifična lipaza s gledišta regiospecifičnosti i može hidrolizirati esterske veze na svim položajima trigliceridnog lanca, a osim toga pokazuje i visoku aktivnost prema različitim vrstama trigliceridnih supstrata, bez obzira na dužinu lanca masnih kiselina. Optimalna temperatura za BCL iznosi 50 °C, ali pokazuje visoku aktivnost i pri temperaturama do 75 °C (Sanchez i sur., 2017).

### 2.3. OTPADNA BILJNA ULJA I ŽIVOTINJSKE MASTI

Kao što je već napomenuto, sirovine za proizvodnju biodizela mogu biti svježa jestiva, nejestiva i otpadna biljna ulja i životinjske masti te ulja mikro- i makro-algi. Svježa ulja su svojim karakteristikama najprikladnije sirovine za sintezu biodizela, međutim, cijena im je relativno visoka, što poskupljuje cijenu proizvodnje biodizela. Osim toga, poznata je i dilema *gorivo/hrana*, odnosno treba li ono što se može konzumirati kao hrana, koristiti za proizvodnju goriva. Kako bi se smanjili troškovi proizvodnje biodizela te kako bi se riješila spomenuta dilema, poseže se za korištenjem otpadnih jestivih biljnih ulja i masti kao sirovina za proizvodnju biodizela, a tako proizveden biodizel, predstavlja biogorivo druge generacije. Problem zbrinjavanja otpadnog ulja sve više dolazi do izražaja, stoga je njegova transformacija u koristan proizvod vrlo poželjna. Procjenjuje se da u svijetu na godišnjoj razini nastaje oko 15 milijuna tona otpadnog ulja, a njegovo nepravilno zbrinjavanje, može dovesti do toga da 1 L otpadnog ulja, kontaminira čak 1000 L vode. Osim toga, otpadno ulje predstavlja veliki problem i u radu uređaja za obradu otpadnih voda, pa tako njegova prisutnost u otpadnim vodama, poskupljuje troškove rada tih uređaja za 25 % (Casallas i sur., 2018).

Prema čl. 3. Pravilnika o gospodarenju otpadnim uljima (MZOPUG, 2006), otpadna jestiva ulja definiraju se kao: „svako ulje koje nastaje obavljanjem ugostiteljske i turističke djelatnosti, industriji, obrtu, zdravstvenoj djelatnosti, javnoj upravi i drugim sličnim djelatnostima u kojima

se priprema više od 20 obroka dnevno“. Istim Pravilnikom definirana je i zabrana nepropisnog odlaganja takvih ulja te se potiče njihova uporaba. Pod postupkom uporabe, između ostalog misli se i na konverziju otpadnih jestivih ulja u biodizel. Važno je napomenuti da se spomenuti Pravilnik još uvijek ne odnosi na otpadna jestiva ulja nastala u kućanstvima.

Tijekom procesa prženja hrane, ulja i masti se izlažu temperaturama iznad 150 °C i dolaze u kontakt sa zrakom i vlagom iz hrane koja se prži. Uslijed toga, dolazi do termooksidacijskih promjena u uljima i mastima, odnosno senzorska svojstva i kvaliteta ulja i masti se smanjuju. Termooksidacijske promjene nastaju uslijed odvijanja reakcija hidrolize, oksidacije i polimerizacije, a kao produkti termooksidacijskih reakcija nastaju dimeri, trimeri, polimeri masnih kiselina, i drugi ciklički, hlapivi i nehlapivi spojevi. Osnovni parametri kvalitete masti i ulja se mijenjaju tijekom procesa prženja, točnije, povećava se udio slobodnih masnih kiselina, povećava se vrijednost peroksidnog broja te se smanjuje vrijednost jodnog broja (Vasiljević i sur., 2017).

Najznačajnija promjena parametara kvalitete sa stajališta sinteze biodizela, je povećanje udjela slobodnih masnih kiselina, koje nastaju hidrolizom uz prisustvo vlage iz hrane i visoke temperature. Upravo zbog visokog udjela slobodnih masnih kiselina, otpadna jestiva ulja i masti nisu prikladne sirovine za kemijsku sintezu biodizela, budući da kemijski katalizatori, prije svega NaOH, ne može provesti transformaciju slobodnih masnih kiselina u metilne estere (biodizel), već se one transformiraju u neželjeni nusprodukt, sapune. Zbog toga se učinkovitost sinteze smanjuje, a nastali sapuni zahtijevaju kompleksne postupke izdvajanja iz biodizela. Kako bi se taj problem riješio, otpadna jestiva ulja i masti moraju proći određenu predobradu, prije nego postanu pogodne sirovine za kemijsku sintezu, ili se može provesti enzimska sinteza biodizela. Naime, enzimi imaju sposobnost transesterifikacije svih vrsta masnih kiselina, uključujući i slobodne masne kiseline (Vasiljević i sur., 2017; Vela i sur., 2020).

### **3.EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovoga diplomskog rada bio je sintetizirati biodizel iz otpadnih biljnih ulja i životinjske masti. Sinteza je provedena uz pomoć biokatalizatora, enzima lipaze porijeklom iz bakterije *Burkholderia cepacia*. U okviru rada određeni su osnovni parametri kakvoće sirovine (udio slobodnih masnih kiselina, peroksidni broj, jodni broj te udio i profil masnih kiselina u sastavu svake pojedine sirovine), kao i kemijski sastav sintetiziranog biodizela (udio i profil metilnih estera masnih kiselina). Osim navedenog, određena je i supstratna specifičnost lipaze iz *B. cepacia* u odnosu na svaku pojedinu sirovinu. Ukupno su korištena tri otpadna biljna ulja različitog sastava te jedna otpadna mast životinjskog porijekla.

### 3.2. MATERIJALI

#### 3.2.1. Sirovine

Kao sirovine za sintezu biodizela koristila su se tri različita otpadna jestiva biljna ulja te jedna otpadna životinjska mast, iz domaćinstva. Otpadna ulja i mast označeni su brojevima 1-4, a predstavljali su kako slijedi:

- 1 - otpadno jestivo suncokretovo ulje iz jednog domaćinstva,
- 2 - mješavina nekoliko vrsta otpadnih jestivih biljnih ulja,
- 3 - otpadno jestivo suncokretovo ulje iz drugog domaćinstva, i
- 4 - otpadna svinjska mast.

Sirovine nisu podvrgnute nikakvim tretmanima pročišćavanja prije karakterizacije kao ni sinteze biodizela.

#### 3.2.2. Katalizator

Kao katalizator pri sintezi biodizela iz otpadnih jestivih biljnih ulja i životinjske masti korištena je komercijalna Amano Lipaza iz bakterije *B. cepacia* (SIGMA Aldrich Chemistry, Japan) za industrijsku primjenu. Industrijski enzimi su enzimi koji se posebno proizvode za industrijsku primjenu pri čemu im se nativna svojstva poboljšavaju primjenom proteinskog i genetičkog inženjeringa (Moazeni i sur., 2019).

### 3.2.3. Sastav reakcijske smjese

Sastav reakcijskih smjesa za sintezu biodizela u okviru ovoga rada prikazan je u **Tablici 2**. Sastav reakcijske smjese kao i uvjeti sinteze odabrani su prema Ostojčić i sur. (2020).

**Tablica 2.** Sastav reakcijske smjese

Molarni omjer metanol:ulje	Aktivnost lipaze (U/g reakcijske smjese)	Omjer ulje:lipaza+pufer	Koncentracija pufera (mmol/L)
3,4:1	250	10:1	200

### 3.2.4. Kemikalije

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela ovoga rada, korištene su slijedeće kemikalije: ortofosfatna kiselina ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 85%; Carlo Erba, Francuska), ledena octena kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; VWR chemicals, Francuska i Avantor performance materials, Njemačka), borna kiselina ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; Pharmacia Biotech, Švedska), kalijev klorid (KCl; Merck-Alkaloid, Makedonija), natrijev hidroksid (NaOH; GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska i T.T.T. Hrvatska), metanol (MetOH; J.T. Baker, Poljska), natrijev hidroksid (NaOH, 0,1 mol/L, volumetrijski standard; GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska), etanol (EtOH, 96%; KEFO, Slovenija), dietil-eter ( $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ ; Carlo Erba Reagents, Francuska), fenolftalein (Kemika, Hrvatska i Carlo Erba Reagents, Francuska), kloroform ( $\text{CHCl}_3$ ; Carlo Erba Reagents, Francuska), kalijev jodid (KI; Kemika, Hrvatska), škrob topljivi, indikator (Kemika, Hrvatska), natrijev tiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 0,1 M, volumetrijski standard; GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska), jod monobromid (IBr, 0,1 M; KEFO, Slovenija), natrijev klorid (NaCl; GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska), kalijev digidrogenfosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; BDH Prolabo, UK), arapska guma (Acros Organics, Francuska), glicerol ( $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$ , redestilirani; GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska), dinatrijev hidrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; Acros Organics, Belgija), natrijev dihidrogenfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; Acros Organics, Indija), *n*-heptan (Carlo Erba Reagents, Francuska), aceton (GRAM-MOL, Zagreb, Hrvatska).

### 3.2.5. Uređaji

Tijekom provedbe eksperimentalnog dijela ovoga rada, korišteni su slijedeći uređaji: magnetna mješalica (Tehtnica Rotamix 550 MMH, Slovenija), pH metar (Hanna instruments 2211 pH/ORP Meter, Rumunjska), vibrirajuća miješalica (DLAB, MX-S i Tehntnica Vibromix 114, Slovenija), analitička vaga (3NM KERN EW 220, Njemačka), tehnička vaga (OHAUS, SAD), centrifuga (Tehtnica CENTRIC 150, Slovenija), vodena kupelj s cirkulacijom (B. Braun Thermomix 1420, Njemačka), vodena kupelj (MEMMERT WNB14, Njemačka), plinski kromatograf (GC-2010 Plus; Schimadzu, Japan), kotlasti reaktor volumena 250 mL s mješaćim tijelom (DURAN®, Njemačka).

## 3.3. METODE

### 3.3.1. Karakterizacija sirovina

Za provedbu karakterizacije otpadnih jestivih ulja i masti korištene su metode za određivanje profila masnih kiselina, određivanje udjela slobodnih masnih kiselina (SMK) te jednog i peroksidnog broja.

#### 3.3.1.1. *Određivanje udjela i profila masnih kiselina*

Profil masnih kiselina korištenih otpadnih ulja i masti određen je plinskom kromatografijom na uređaju Shimadzu GC-2010 Plus (Japan) opremljenim s plameno-ionizacijskim (FID) detektorom (*Flame Ionization Detector*) i SH-FAMEWAX™ kapilarnom kolonom ( $L=30$  m,  $I.D.=0,32$  mm ID i  $d=0,25$   $\mu$ m). Početna temperatura kolone od 120 °C održavana je 5 minuta, nakon čega je uslijedilo postupno povećanje temperature brzinom 5 °C/min do konačne temperature od 220 °C koja je zadržana 20 minuta. Temperatura injektora bila je 240 °C, temperatura detektora 250 °C, a volumen injektiranja uzorka 2  $\mu$ L (omjer cijepanja 1:100). Plin nosioc bio je dušik sa brzinom protoka od 1,26 mL/min. Prije analize, masne kiseline u otpadnim uljima i masti transesterificirane su u metilne estere masnih kiselina hladnom otopinom kalijevog hidroksida (EC, 2002). Rezultati su izraženi kao postotak identificirane masne kiseline u odnosu na ukupne masne kiseline (%).

#### 3.3.1.2. *Određivanje udjela SMK*

Udio slobodnih masnih kiselina (SMK) određen je titrimetrijskom metodom prema USP - NF (2017). Metoda se temelji na neutraliziranju SMK titracijom s natrijevim hidroksidom, pri čemu

udio SMK predstavlja volumen natrijevog hidroksida utrošenog za neutralizaciju SMK u 100 g ulja ili masti, a izražava se kao postotak oleinske kiseline. Udio slobodnih masnih kiselina određen je na način da je 5 g ( $\pm 0,01$  g) ulja ili masti pomiješano s 50 mL neutralne smjese etera i etanola (1:1) i promućkano. Nakon toga je dodano 250  $\mu$ L indikatora fenolftaleina te je reakcijska smjesa titrirana s 0,1 M otopinom natrijevog hidroksida do promjene boje iz prozirne u ružičastu. Udio SMK izračunat je prema jednadžbi (1). Mjerenja su ponovljena u pet paralela za svaki uzorak ulja i masti te je rezultat izražen kao srednja vrijednost.

$$\%SMK = \frac{10 \times b}{a} \times 0,282 \text{ [\% oleinske kis.]} \quad (1)$$

gdje je  $a$  masa uzorka (g) i  $b$  volumen 0,1 M NaOH utrošenog za titraciju (mL).

### 3.3.1.3. Određivanje jodnog broja

Jodni broj u odabranim uljima i masti je određen titrimetrijski, metodom po Hanušu, prema USP - NF (2017) uz minimalne modifikacije. Metoda je provedena na način da je 0,2 g ulja ili masti otopljeno u 10 mL kloroforma, nakon čega je u reakcijsku smjesu dodano 15 mL 0,1 M otopine jodovog monobromida te je smjesa dobro promućkana i ostavljena da stoji 30 minuta u tamnom prostoru. Nakon isteka vremena, dodano je 15 mL 10 %-tne otopine kalijevog jodida i 150 mL prokuhane i ohlađene destilirane vode. Provedena je titracija s 0,1 M otopinom natrijevog tiosulfata do pojave svijetložute boje, nakon čega je dodano 1,5 mL 1 %-tne indikator otopine škroba te je titracija nastavljena do gubitka plave boje.

Titracije su ponovljene u šest paralela za svaki uzorak ulja i masti te je rezultat izražen kao srednja vrijednost. Osim glavnih proba, odrađena je i slijepa proba, na isti način kao i glavne probe, ali bez dodanog uzorka ulja ili masti.

Jodni broj je određen prema jednadžbi (2).

$$JODNI \text{ BROJ} = \frac{(a - b) \times 0,01269}{c} \times 100 \text{ [g/100g]} \quad (2)$$

gdje je  $a$  volumen utrošenog 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  za titraciju slijepa probe (mL),  $b$  volumen utrošenog 0,1 M  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  za titraciju glavne probe (mL) te  $c$  masa uzorka (g).



#### 3.3.1.4. Određivanje peroksidnog broja

Peroksidni broj u odabranim uljima i masti je određen metodom po Wheeleru prema USP - NF (2017) uz minimalne modifikacije. Metoda je provedena na način da je u tikvicu, s prethodno odvaženim 1 g ulja ili masti, dodano 10 mL smjese ledene octene kiseline i kloroforma (3:2). Nakon toga je dodano 0,2 mL hladno zasićene otopine kalijevog jodida te je sadržaj tikvice mućkan točno jednu minutu. Zatim je dodano 20 mL prethodno prokuhane i ohlađene destilirane vode. Naposljetku je dodano 0,5 mL 1 %-tne indikator otopine škroba te je smjesa titrirana s 0,01 M otopinom natrijevog tiosulfata do gubitka crno-smeđe boje.

Titracije su ponovljene u pet paralela za svaki uzorak ulja i masti te je osim toga provedena i slijepa proba. Slijepa proba je provedena na isti način kao i glavne probe, ali bez dodanog uzorka ulja ili masti.

Peroksidni broj označava mL 0,002 M otopine natrijevog tiosulfata potrebnog za redukciju one količine joda koju oslobodi 1 g ulja ili masti iz kalijevog jodida, a računa se prema jednadžbi (3).

$$PEROKSIDNI\ BROJ = \frac{(a - b) \times 5}{c} [mmolO_2/kg] \quad (3)$$

gdje je  $a$  volumen 0,01 M  $Na_2S_2O_3$  utrošenog za titraciju glavne probe (mL),  $b$  volumen 0,01 M  $Na_2S_2O_3$  utrošenog za titraciju slijepa probe (mL) te  $c$  masa uzorka (g).

#### 3.3.2. Određivanje supstratne specifičnosti lipaze

Supstratna specifičnost lipaze prema korištenim otpadnim uljima i masti, određena je titrimetrijskim testom za mjerenje aktivnosti lipaze prema Ostojčić i sur. (2020). Test je proveden pri temperaturi od 50 °C i pri pH 8 (fosfatni pufer) i pH 10 (Britton-Robinson pufer), kako bi se rezultati mogli usporediti s rezultatima danim u Ostojčić i sur. (2020). Test je proveden u pet paralela za svaki od uzoraka ulja i masti te za oba pufera.

Test je proveden na način da je u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL dodano 4 mL pufera, 1 mL otopine enzima u puferu koncentracije 1 mg/mL (s tim da je u slijepu probu umjesto 1 mL otopine enzima dodan 1 mL pufera) te 5 mL emulzije ulja/masti u emulzifikacijskom reagensu (30:70). Emulzifikacijski reagens je pripremljen na način da je u 250 mL destilirane vode otopljeno 10 g arapske gume te je dodano 17,9 g NaCl, 0,41 g  $KH_2PO_4$  i 540 mL glicerola.

Tikvice su inkubirane 10 min u vodenoj kupelji termostatiranoj na 50 °C, uz stalno miješanje. Nakon isteka 10 min, u reakcijsku smjesu dodano je 10 mL inaktivatora lipaze, tj. otopine acetona i etanola pomiješanih u omjeru 1:1. Zatim je reakcijska smjesa titrirana s 0,05 M natrijevog hidroksida uz dodatak 250 µL indikatora fenolftaleina, do pojave jarko ružičaste boje.

Supstratna specifičnost lipaze izražena je preko aktivnosti lipaze, koja je izračunata prema jednadžbi (7) koristeći jednadžbe (4-6).

$$V(\text{NaOH}) = V_{GP} - V_{SP} \quad [\text{mL}] \quad (4)$$

$$n(\text{NaOH}) = c(\text{NaOH}) \times V(\text{NaOH}) \quad [\mu\text{mol}] \quad (5)$$

$$n(\text{MK}) = n(\text{NaOH}) \times 3 \quad [\mu\text{mol}] \quad (6)$$

$$A = \frac{n(\text{MK})}{t_{\text{inkubacije}}} \left[ \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right] = [U] \quad (7)$$

gdje je  $V_{GP}$  volumen NaOH utrošen za titraciju glavne probe (mL),  $V_{SP}$  volumen NaOH utrošen za titraciju slijepa probe (mL),  $n(\text{NaOH})$  množina NaOH (µmol),  $c(\text{NaOH})$  molarna koncentracija NaOH (µmol/mL),  $V(\text{NaOH})$  volumen NaOH (mL),  $n(\text{MK})$  množina oslobođenih masnih kiselina (µmol),  $A$  aktivnost lipaze (U) te  $t_{\text{inkubacije}}$  vrijeme inkubacije (min).

### 3.3.3. Sinteza biodizela

Uvjeti sinteze biodizela postavljeni su prema Ostojčić i sur. (2020) u kojem su određeni optimalni parametri za aktivnost korištene lipaze iz *B. cepacia*. Sinteza je provedena u staklenom kotlastom reaktoru, volumena 250 mL, uronjenom u vodenu kupelj termostatiranu na 50 °C. Osim toga, reaktor je postavljen i na magnetnu mješalicu kako bi se osiguralo kontinuirano miješanje reakcijske smjese tijekom 24 h koliko je provođena sinteza.

Sastav reakcijske smjese postavljen je kako je već opisano u poglavlju 3.2.3., odnosno za svaku sintezu odvagano je 163,63 g uzorka ulja ili masti i 20,35 g metanola. Nakon homogeniziranja reakcijske smjese pomoću magnetne mješalice i njenog termostatiranja na odgovarajuću temperaturu u vodenoj kupelji, reakcija transesterifikacije započela je dodatkom 16,36 g

otopine enzima u puferu, koja se sastojala od 2,86 g lipaze i 13,5 g 0,2 M Britton-Robinson pufera pH 10, kako bi aktivnost lipaze u reakcijskoj smjesi bila 250 U/g.

Iz reakcijske smjese izuzimani su uzorci biodizela nakon 1, 3, 6 i 24 h sinteze te čuvani za daljnje analize. Sinteza je ponovljena tri puta za svaki uzorak ulja i masti.

Nakon završetka sinteze, odnosno nakon 24 h od početka sinteze, reakcijska smjesa je prebačena u lijevak za odjeljivanje, gdje se razdvojila u dvije faze:

- liofilna faza (gornji sloj) te
- hidrofilna faza (donji sloj).

Pri tome, liofilni sloj čini biodizel, odnosno smjesa metilnih estera masnih kiselina te neizreagirani triacilgliceroli iz ulja/masti dok hidrofilni sloj čini glicerol, voda iz ulja ili masti i iz pufera, lipaza te neizreagirani metanol.

#### **3.3.4. Određivanje udjela i profila FAME u biodizelu**

Analiziran je svaki od izuzetih uzoraka biodizela, na način da se izuzeti uzorak profiltrirao kroz filter za šprice (nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filter, veličine pora 0,45  $\mu\text{m}$  i promjera 25 mm), kako bi se uklonila lipaza iz uzorka. Nakon toga je uzorak centrifugiran prema Chungcharoen i sur. (2017), odnosno na 2100 o/min u trajanju od 5 min, čime je postignuto razdvajanje liofilnog (biodizela) od hidrofilnog sloja (glicerola). Razrjeđenje uzorka biodizela bilo je 100 puta, što je postignuto razrjeđivanjem 20  $\mu\text{L}$  uzorka biodizela u 1980  $\mu\text{L}$  *n*-heptana.

Udio i profil FAME u sintetiziranom biodizelu određen je prema postupku opisanom u poglavlju 3.3.1.1.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

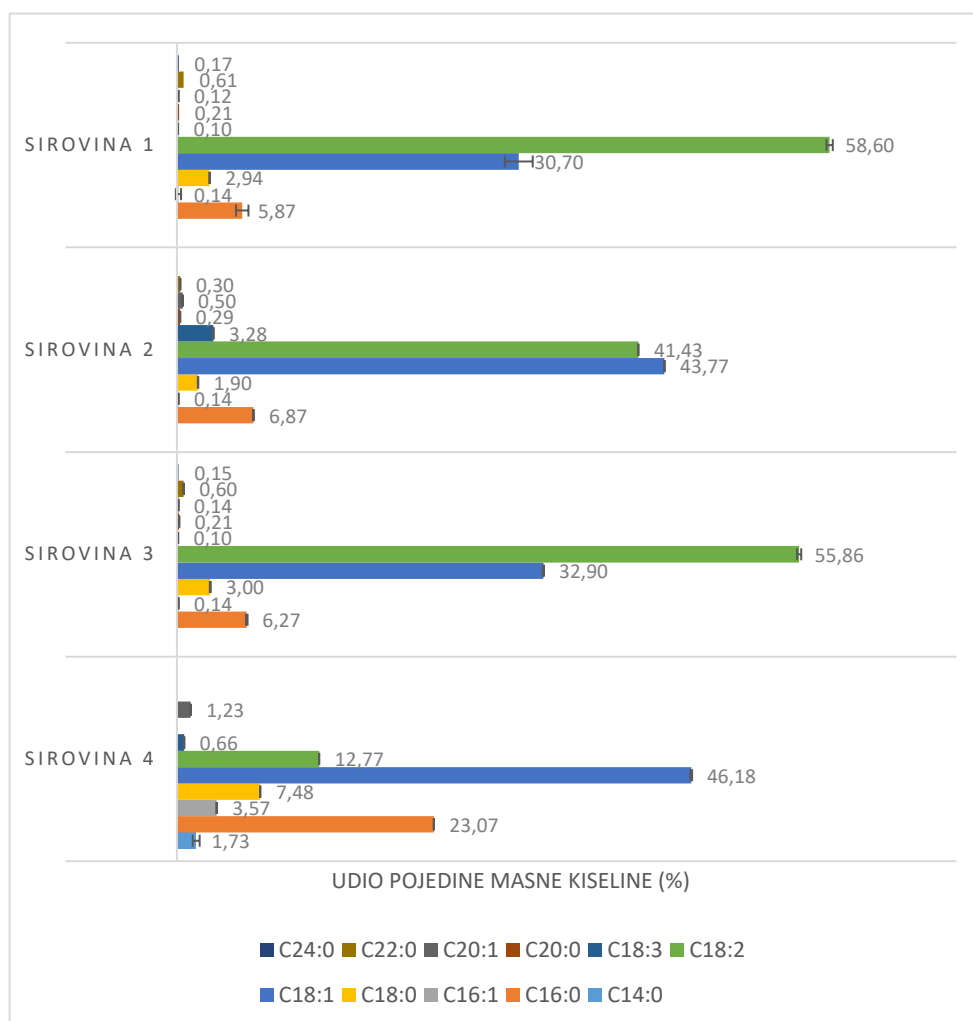
## 4.1. KARAKTERIZACIJA SIROVINA

### 4.1.1. Udio i profil masnih kiselina

Analizom otpadnih jestivih ulja i masti, korištenih za sintezu biodizela, na plinskom kromatografu, utvrđen je slijedeći ukupni udio masnih kiselina (m.k.) (**Tablica 3**) te sastav i udio pojedinih masnih kiselina u analiziranim uzorcima ulja i masti (**Slika 3**).

**Tablica 3.** Udio masnih kiselina u analiziranim uljima i masti

Sirovine	1	2	3	4
Udio m.k. (%)	99,43 ± 0,03	98,47 ± 0,01	99,35 ± 0,01	96,67 ± 0,08



**Slika 3.** Udio i profil masnih kiselina analiziranih otpadnih ulja i masti

Dobivene vrijednosti udjela pojedinih masnih kiselina u sastavu analiziranih otpadnih suncokretovih ulja, odnosno sirovine 1 i 3, u potpunosti odgovaraju vrijednostima definiranim u Pravilniku o jestivim uljima i mastima (MP, 2019), dok otpadna svinjska mast, odnosno sirovina 4, blago premašuje dozvoljene vrijednosti udjela C20:1 masne kiseline, čiji je dozvoljeni udio prema Pravilniku do 1 %, a u sirovini 4 njen udio iznosi  $1,23 \pm 0,05$  %. Udio masnih kiselina u sastavu mješavine nekoliko različitih vrsta biljnih ulja, nije definiran spomenutim Pravilnikom.

U otpadnim suncokretovim uljima (sirovine 1 i 3) najzastupljenije masne kiseline su linolna kiselina (C18:2n6c) i oleinska kiselina (C18:1n9c+t), a njihov udio je iznosio 58,6 % (C18:2n6c) i  $30,7 \pm 0,08$  % (C18:1n9c+t) u sirovini 1 te  $55,86 \pm 0,01$  % (C18:2n6c) i 32,9 % (C18:1n9c+t) u sirovini 3. U otpadnoj mješavini različitih vrsta biljnih ulja, sirovini 2, najzastupljenije masne kiseline su također linolna kiselina (C18:2n6c) i oleinska kiselina (C18:1n9c+t), ali obrnutim redoslijedom, a njihov udio je iznosio  $43,77 \pm 0,06$  % (C18:1n9c+t) i  $41,43 \pm 0,19$  % (C18:2n6c). U otpadnoj svinjskoj masti, odnosno u sirovini 4, najzastupljenije masne kiseline su oleinska kiselina (C18:1n9c+t) i palmitinska kiselina (C16:0), a njihov udio je iznosio  $46,18 \pm 1,25$  % (C18:1n9c+t) i  $23,07 \pm 0,56$  % (C16:0).

Drugim riječima, u svim analiziranim otpadnim uljima bez obzira na porijeklo i sastav (sirovine 1-3) najzastupljenije su nezasićene masne kiseline. S druge strane, u uzorku otpadne masti (sirovina 4) prisutan je i znatan udio zasićenih masnih kiselina. Osim toga, u sirovini 2 prisutan je najveći broj različitih masnih kiselina, što je bilo i za očekivati budući da je sirovina 2, mješavina različitih vrsta biljnih ulja, a uz to prisutan je i relativno visok udio linoleinske kiseline (C18:3n3) pa se može pretpostaviti da je jedno od ulja u sastavu mješavine, repičino ili sojino ulje.

Što se tiče ukupnog udjela masnih kiselina u analiziranim uljima i masti, u sirovini 1 izmjeren je najveći udio masnih kiselina te je on iznosio  $99,43 \pm 0,03$  %, dok je najmanji udio masnih kiselina izmjeren u sirovini 4 i iznosio je  $96,67 \pm 0,08$  %.

Budući da niti u jednoj sirovini nije izmjeren udio masnih kiselina od 100 %, sirovine su sadržavale i određene nečistoće zaostale od procesa prženja te vodu iz namirnica koje su se u njima pržile. Sirovine 1 i 3 sadržavale su  $0,57 \pm 0,03$  % i  $0,65 \pm 0,01$  % nečistoća i time ne odgovaraju Pravilniku, kojim je propisan maksimalni udio vode, hlapivih i netopivih nečistoća od 0,25 %, za rafinirana ulja. Sirovina 2 sadržavala je  $1,53 \pm 0,01$  % nečistoća, čime također ne

odgovara Pravilniku, kojim je propisan maksimalni udio vode i nečistoća od 0,45 %, za mješavine različitih vrsta ulja. Sirovina 4 sadržavala je najviše nečistoća od svih analiziranih sirovina, točnije  $3,33 \pm 0,08$  %, čime ni ona nije odgovarala Pravilniku kojim je propisan maksimalni udio vode i nečistoća od 0,7 %, za životinjsku mast.

#### 4.1.2. Osnovni parametri kvalitete

Vrijednosti osnovnih parametara kvalitete, odnosno udjela SMK, jodnog i peroksidnog broja, korištenih otpadnih jestivih ulja i masti, dani su u **Tablici 4**.

**Tablica 4.** Osnovni parametri kvalitete korištenih otpadnih jestivih ulja i masti

Sirovine	1	2	3	4
<b>Udio SMK (%)</b>	$0,37 \pm 0,02$	$2,92 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,01$	$0,51 \pm 0,01$
<b>Jodni broj (gl<sub>2</sub>/100g)</b>	$123,88 \pm 2,41$	$116,68 \pm 2,11$	$120,34 \pm 2,23$	$74,72 \pm 3,89$
<b>Peroksidni broj (mmolO<sub>2</sub>/kg)</b>	$3,98 \pm 0,33$	$1,29 \pm 0,26$	$1,40 \pm 0,42$	$1,60 \pm 0,42$

Usporedbom dobivenih vrijednosti sa zahtjevima za kvalitetu jestivih biljnih ulja i životinjskih masti, definiranih ranije spomenutim Pravilnikom, može se zaključiti da kvaliteta analiziranih otpadnih ulja i masti, gotovo u potpunosti odgovara kvaliteti svježih jestivih ulja i masti. Sirovina 1, odnosno otpadno suncokretovo ulje, blago premašuje dozvoljene vrijednosti udjela slobodnih masnih kiselina, točnije udio SMK u sirovini 1 iznosio je  $0,37 \pm 0,02$  %, dok je dozvoljena vrijednost udjela SMK za rafinirana ulja 0,3 %. U ostalim analiziranim parametrima, sirovina 1 odgovara vrijednostima definiranim Pravilnikom. Otpadna mješavina različitih vrsta biljnih ulja, odnosno sirovina 2, također odstupa od propisanih vrijednosti za mješavine različitih vrsta i/ili kategorija ulja biljnog podrijetla, jedino po udjelu slobodnih masnih kiselina, koji je za sirovinu 2 iznosio  $2,92 \pm 0,04$  %, dok dozvoljena vrijednost iznosi 2 %. Sirovina 3 svojom kvalitetom analiziranih parametara, u potpunosti odgovara kvaliteti propisanoj Pravilnikom. Sirovina 4, odnosno otpadna svinjska mast, blago premašuje dozvoljene

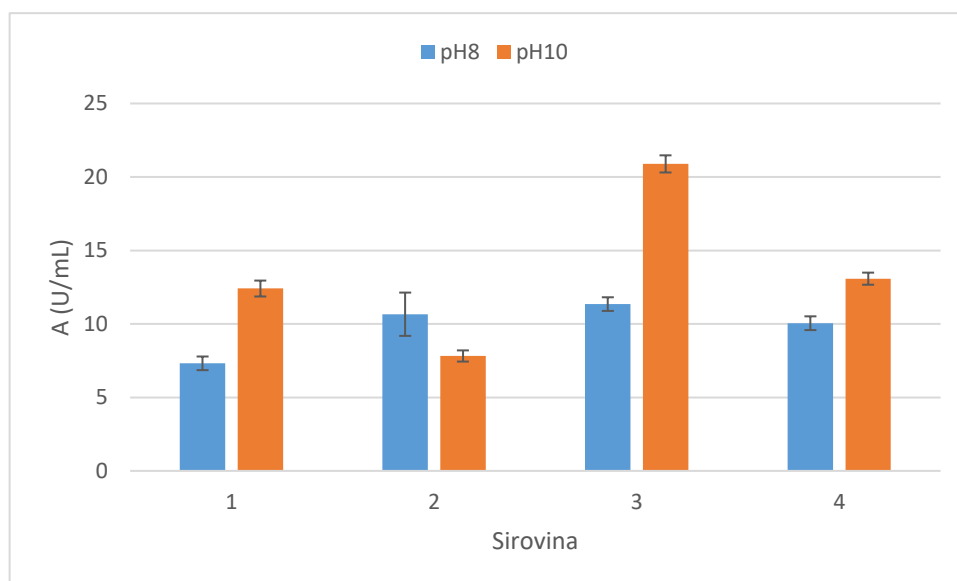
vrijednosti jednog broja, propisane za svinjsku mast, koji je za sirovinu 4 iznosio  $74,72 \pm 3,89$  g I<sub>2</sub>/100g masti, dok dozvoljeni raspon vrijednosti jednog broja iznosi 45 – 70 g I<sub>2</sub>/100g masti.

Veće vrijednosti udjela SMK od onih propisanih Pravilnikom, bile su i za očekivati za analizirana otpadna ulja, budući da slobodne masne kiseline nastaju za vrijeme procesa prženja, odnosno pod utjecajem visoke temperature. S druge strane, također je bilo za očekivati da te vrijednosti neće znatno odstupati od Pravilnika, a u nekim slučajevima će biti i u skladu s Pravilnikom, budući da se radi o otpadnim uljima i masti iz domaćinstva, a ne iz restorana, gdje se ulja i masti intenzivnije koriste, odnosno isto ulje ili mast se koristi više puta za proces prženja hrane.

Od analiziranih otpadnih ulja i masti, sirovina 3 najbolje je kvalitete, budući da u analiziranim parametrima u potpunosti odgovara zahtjevima za kvalitetu jestivog suncokretovog ulja.

#### 4.2. SUPSTRATNA SPECIFIČNOST LIPAZE

Supstratna specifičnost lipaze iz *B. cepacia* prema pojedinom uzorku ulja i masti (supstratu), pri dva različita pH (8 i 10), grafički je prikazana na **Slici 4**.



**Slika 4.** Supstratna specifičnost lipaze prema analiziranim uljima i masti u dva različita pufera

Lipaza pokazuje veću aktivnost pri pH 10, za analizirane sirovine 1, 3 i 4, dok je za sirovinu 2 odnosno za mješavinu različitih vrsta biljnih ulja, veća aktivnost izmjerena pri pH 8.

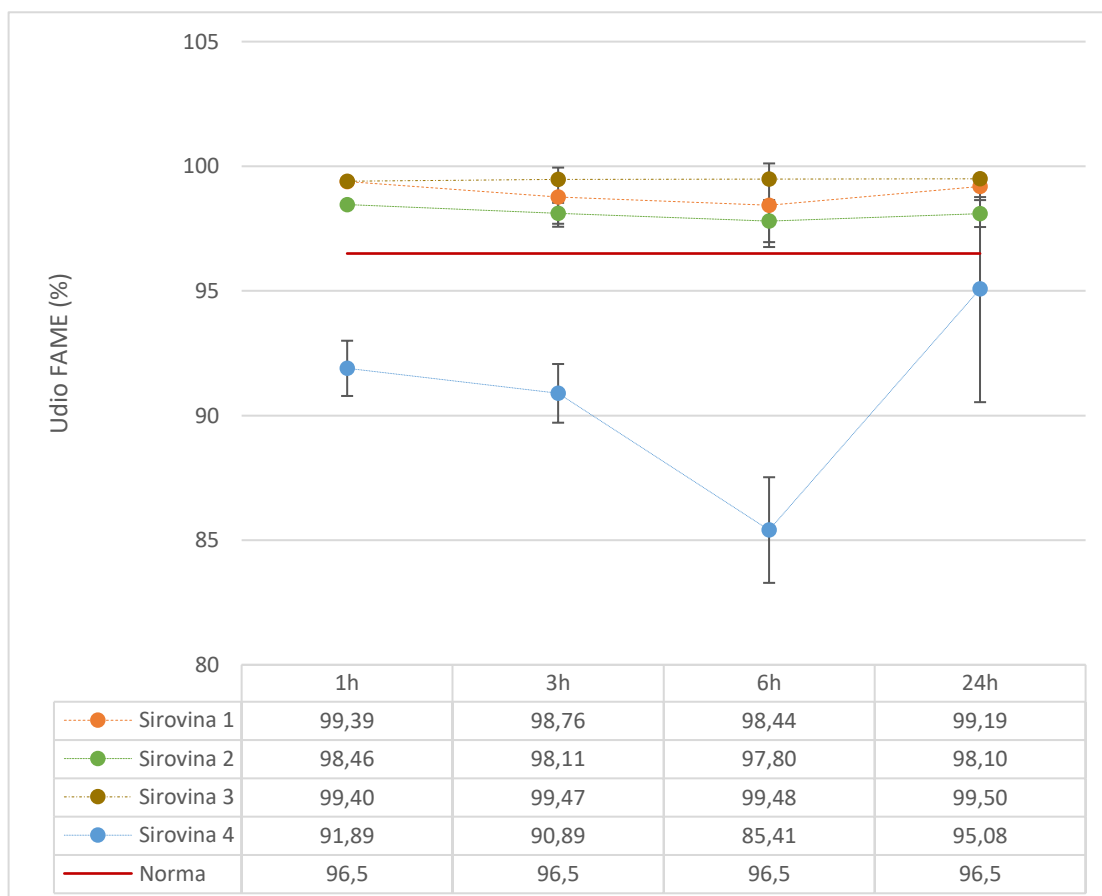


Gledajući samo aktivnost lipaze pri pH 10, najmanja supstratna specifičnost lipaze izmjerena je također prema sirovini 2 te je iznosila  $7,82 \pm 0,38$  U/mL. S druge strane, lipaza je pokazala najveću supstratnu specifičnost prema sirovini 3, odnosno jednom od otpadnih suncokretovih ulja, a ona je iznosila  $20,89 \pm 0,58$  U/mL. Izmjerena supstratna specifičnost lipaze prema sirovini 3, usporediva je sa supstratnom specifičnosti lipaze prema svježem jestivom suncokretovom ulju, određenoj u Ostojčić i sur. (2020), dok su vrijednosti supstratne specifičnosti lipaze prema ostalim uljima i masti, usporedive s vrijednostima za otpadna jestiva ulja i masti iz istog rada.

### 4.3. UDIO I PROFIL FAME U BIODIZELU

#### 4.3.1. Udio FAME

Udio FAME u sintetiziranom biodizelu, u ovisnosti o vremenu sinteze, grafički je prikazan na Slici 5.



**Slika 5.** Udio FAME u ovisnosti o vremenu sinteze, u biodizelu sintetiziranom iz otpadnih jestivih ulja i masti

Biodizel prihvatljive kvalitete, propisane Uredbom o kakvoći biogoriva (Vlada RH, 2005), odnosno biodizel s udjelom FAME većim od 96,5 %, dobiven je sintezom iz sirovina 1, 2, i 3, točnije iz otpadnih suncokretovih ulja te iz otpadne mješavine biljnih ulja. Biodizel sintetiziran iz sirovine 4, točnije iz otpadne svinjske masti, nije sadržavao dovoljan udio FAME propisan spomenutom Uredbom. Najveći udio FAME u biodizelu sintetiziranom iz sirovine 4, dobiven je nakon 24 h sinteze, a iznosio je  $95,08 \pm 4,55$  %. Ovo nije iznenađujuće, budući da je udio ukupnih masnih kiselina u sirovini 4 bio najmanji od svih analiziranih ulja i masti, i iznosio je svega  $96,67 \pm 0,08$  %, što bi zahtijevalo gotovo 100 %-tnu konverziju masnih kiselina u metilne estere, kako bi udio FAME odgovarao zahtjevima kvalitete.

U biodizelu sintetiziranom iz sirovina 1, 2 i 3, zahtjevi za kvalitetu propisani Uredbom, odnosno minimalni udio FAME, postignuti su već nakon prvog sata sinteze. Udio FAME nakon prvog sata sinteze iznosio je  $99,39 \pm 0,06$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 1,  $98,46 \pm 0,05$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 2 te  $99,40 \pm 0,09$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 3. Slične vrijednosti udjela FAME nakon 1 h sinteze, dobivene su i u Ostojčić i sur. (2020), ali za biodizel sintetiziran iz svježeg suncokretovog ulja.

Najveći udio FAME izmjeren je u biodizelu sintetiziranom iz sirovine 3, nakon 24 h sinteze te je iznosio  $99,50 \pm 0,04$  %. Ovo je bilo i za očekivati, budući da je od svih korištenih sirovina, sirovina 3 bila najbolje kvalitete (**Tablica 4**), a osim toga, lipaza iz *B. cepacia* je pokazala najveću supstratnu specifičnost također prema ovoj sirovini (**Slika 4**).

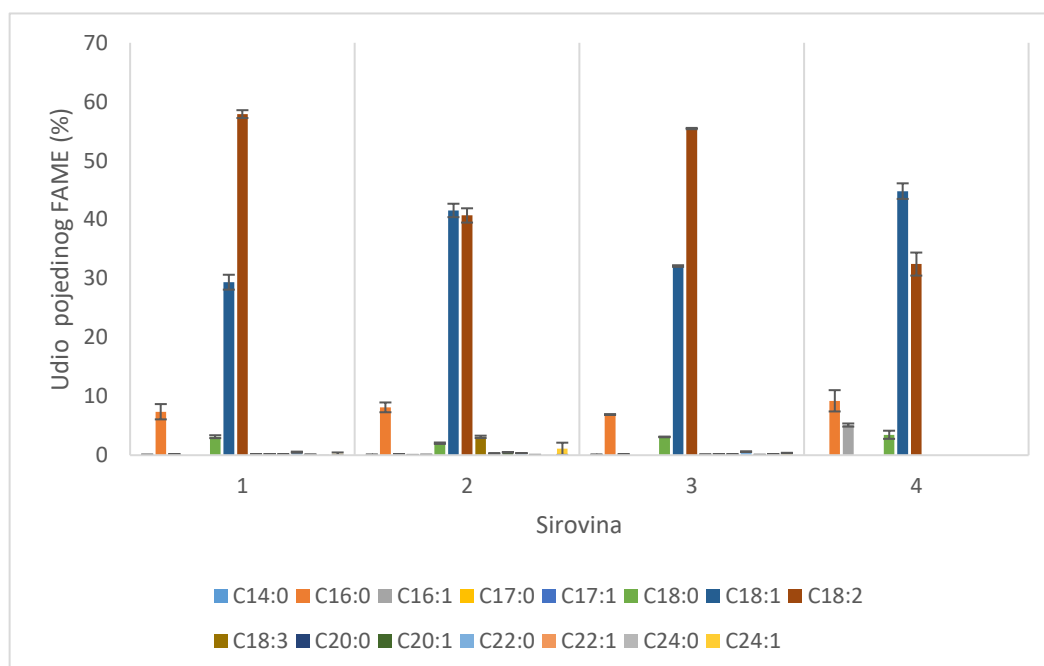
Dobivene vrijednosti udjela FAME u sintetiziranom biodizelu iz otpadnih jestivih ulja su više u usporedbi s vrijednostima pronađenim u literaturi za enzimsku sintezu biodizela iz otpadnih jestivih ulja, koristeći enzime iz različitih izvora. Točnije, u Charpe i Rathod (2011) i Watanabe i sur. (2001) dobivene vrijednosti udjela FAME iznosile su 66,12 % i 92,7 % nakon 24 h sinteze, u Budžaki sur. (2015) dobivena vrijednost udjela FAME iznosila je 82,57 % nakon 96 h sinteze, dok su u Chen i sur. (2009), Halim i sur. (2009) i Nie i sur. (2006) dobivene vrijednosti udjela FAME kontinuiranim postupkom sinteze biodizela, iznosile kako slijedi 91,08 %, 79,1 % i 92 %. Što se tiče otpadne životinjske masti, Adewale i sur. (2016), uspjeli su enzimskom sintezom iz otpadne životinjske masti, sintetizirati biodizel prihvatljive kvalitete, odnosno udjela FAME od 96,8 % nakon 20 min sinteze potpomognute ultrazvukom te uz molarni omjer metanola i ulja 6:1.

Osim toga, dobivene vrijednosti udjela FAME u biodizelu sintetiziranom iz otpadnih jestivih ulja i masti, koristeći lipazu iz *B. cepacia*, znatno su više u odnosu na vrijednosti pronađene u literaturi za biodizel sintetiziran iz svježih ulja i masti, koristeći također lipazu iz *B. cepacia*. Točnije, u You i sur. (2013) i Silva i sur. (2014) dobivene vrijednosti udjela FAME iznosile su 94 % i 86,9 % nakon 24 h sinteze, dok je u Salum i sur. (2010) dobivena vrijednost FAME iznosila 95 % nakon 46 h sinteze te je u Da Ros i sur. (2010) dobivena vrijednost FAME iznosila 89,7 % nakon 48 h sinteze.

U dostupnim znanstvenim radovima, uočen je znatan nedostatak provedbe dostatne karakterizacije sirovina za sintezu biodizela. U slučajevima kada je karakterizacija provedena, najčešće je provedeno samo određivanje udjela slobodnih masnih kiselina, dok su ostali parametri kvalitete ulja i masti korištenih za sintezu biodizela, vrlo rijetko određivani. Osim toga, uočen je i nedostatak provedbe karakterizacije lipaze, tj. supstratne specifičnosti prema korištenim sirovinama. Iz tog razloga, rezultati dobiveni u ovome radu, ne mogu se u potpunosti usporediti s rezultatima iz literature.

#### 4.3.2. Profil FAME

Udio svakog pojedinog metilnog estera masnih kiselina u sastavu biodizela sintetiziranog iz četiri različita otpadna ulja/masti, nakon 24 h sinteze, grafički je prikazan na **Slici 6**.



**Slika 6.** Udio pojedinog metilnog estera masnih kiselina u sastavu sintetiziranog biodizela

Najzastupljeniji metilni esteri u svim analiziranim uzorcima biodizela, bili su metilni esteri linolne kiseline (C18:2n6c) i metilni esteri oleinske kiseline (C18:1n9c+t). Usporedbom s udjelima pojedine masne kiseline u polaznim sirovinama (**Slika 3**), to je bilo i za očekivati za biodizel sintetiziran iz sirovine 1, 2 i 3, budući da su linolna (C18:2n6c) i oleinska kiselina (C18:1n9c+t) najzastupljenije masne kiseline u tim sirovinama. U biodizelu sintetiziranom iz sirovine 4, metilni esteri ovih kiselina su također najzastupljeniji, međutim u polaznoj sirovini su najzastupljenije masne kiseline, oleinska (C18:1n9c+t) i palmitinska (C16:0), dok je linolna kiselina (C18:2n6c) tek treća najzastupljenija masna kiselina, što djelomično objašnjava činjenicu da biodizel sintetiziran iz sirovine 4 ne zadovoljava minimalne zahtjeve Norme u vidu udjela FAME.

Točnije, u uzorcima biodizela sintetiziranog iz otpadnih suncokretovih ulja, odnosno sirovina 1 i 3, najzastupljeniji metilni ester bio je metilni ester linolne kiseline (C18:2n6c), čiji je udio iznosio  $57,9 \pm 0,66$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 1 i  $55,44 \pm 0,11$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 3. Drugi najzastupljeniji metilni ester u istim uzorcima biodizela, bio je metilni ester oleinske kiseline (C18:1n9c+t), čiji je udio iznosio  $29,36 \pm 1,26$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 1 i  $32,10 \pm 0,14$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 3.

U uzorcima biodizela sintetiziranog iz otpadne mješavine biljnih ulja, odnosno sirovine 2 te otpadne svinjske masti, odnosno sirovine 4, najzastupljeniji metilni ester, bio je metilni ester oleinske kiseline (C18:1n9c+t), čiji je udio iznosio  $41,54 \pm 1,14$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 2 i  $44,82 \pm 1,32$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 4. Drugi najzastupljeniji metilni ester u istim uzorcima, bio je metilni ester linolne kiseline (C18:2n6c), čiji je udio iznosio  $40,7 \pm 1,21$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 2 i  $32,44 \pm 1,96$  % za biodizel sintetiziran iz sirovine 4.

Normom HR EN 14214 (HZN, 2019) (**Tablica 1**), zadan je maksimalni udio metilnih estera linoleinske kiseline (C18:3n3) od 12 %. Sintetizirani biodizel iz svih sirovina odgovara zahtjevima Norme, odnosno, udio metilnih estera linoleinske kiseline u biodizelu sintetiziranom iz sirovine 1 iznosio je  $0,12 \pm 0,028$  %, u biodizelu sintetiziranom iz sirovine 2 iznosio je  $3,11 \pm 0,202$  %, a u biodizelu sintetiziranom iz sirovine 3 iznosio je  $0,10 \pm 0,001$  %, dok u biodizelu sintetiziranom iz sirovine 4, nije prisutan metilni ester linoleinske kiseline.

## **5.ZAKLJUČCI**

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

1. Otpadna jestiva biljna ulja i životinjske masti lošije su kvalitete od svježih ulja i masti.
2. U usporedbi s Pravilnikom za jestiva rafinirana ulja, sirovina 3, odnosno jedno od otpadnih suncokretovih ulja, najbolje je kvalitete od svih korištenih sirovina
3. Lipaza je pokazala najveću supstratnu specifičnost prema sirovini 3, koja je pri pH 10 iznosila  $20,89 \pm 0,58$  U/mL.
4. Enzimskom sintezom iz dvije vrste otpadnog suncokretovog ulja i otpadne mješavine biljnih ulja, pri 50 °C i pH 10, uz korištenje lipaze iz *B. cepacia*, aktivnosti 250 U/g, dobiven je biodizel s udjelom FAME većim od onog minimalnog (96,5 %) propisanog Normom, i to nakon 1 h sinteze.
5. Najveći udio FAME dobiven enzimskom sintezom biodizela iz otpadne svinjske masti, nakon 24 h sinteze, iznosio je  $95,08 \pm 4,55$  %, što ne zadovoljava Normu.
6. Najveći udio FAME od svih uzoraka biodizela, postignut je u biodizelu dobivenom iz sirovine 3, nakon 24 h sinteze, a iznosio je  $99,50 \pm 0,04$  %.

## **6.LITERATURA**

- Abbaszaadeh A, Ghobadian B, Omidkhah M R, Najafi G: Current biodiesel production technologies: A comparative review. *Energy Conversion and Management* 63:138-148, 2012.
- Adewale P, Dumont M J, Ngadi M: Enzyme-catalyzed synthesis and kinetics of ultrasonic assisted methanolysis of waste lard for biodiesel production. *Chemical Engineering Journal* 284:158-165, 2016.
- Bajpai D, Tyagi V K: Biodiesel: Source, Production, Composition, Properties and Its Benefits. *Journal of Oleo Science* 55:487-502, 2006.
- Batista A, Almeida Silva T, Vieira A, De Oliveria M: Biotechnological Applications of Lipases in Biodiesel Production. U *Fungal Enzymes*, str. 294-315. CRC Press, Boca Raton, SAD, 2013.
- Budžaki A, Šalić A, Zelić B, Tišma M: Enzyme-catalysed Biodiesel Production from Edible and Waste Cooking Oils. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 29:329-333, 2015.
- Casallas I D, Carvajal E, Mahecha E, Castrillon C, Gomez H, Lopez C, Malagon-Romero D: Pre-treatment of Waste Cooking Oils for Biodiesel Production. *Chemical Engineering Transactions* 65:385-390.
- Charpe T W, Rathod V K: Biodiesel production using waste frying oil. *Waste Management* 31:85-90, 2011.
- Chen Y M, Xiao B, Chang J, Fu Y, Lv P M, Wang X W: Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. *Energy Conversion and Management* 50:668-673, 2009.
- Chuncharoen T, Netjaibun K, Pratabkong T, Suwannasam P, Limmun W: Effects of inner angle of bowl, flow rate and speed on the efficiency of glycerol separation from the raw biodiesel using cylindrical bowl centrifuge. *Energy Procedia* 138:405-410, 2017.
- Da Ros P C, Silva G A, Mendes A A, Santos J C, De Castro H F: Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. *Bioresource Technology* 101:5508-5516, 2010.
- EC, European Commission, Commission Regulation (EC) No 796/2002 of 6 May 2002 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis and the additional notes in the Annex to Council Regulation (EEC) No 2658/87 on the tariff and statistical nomenclature and on the Common Customs Tariff. *Official Journal of the European Communities* L128, 8-28, 2002.
- Gebremariam S M, Marchetti J M: Biodiesel production technologies: review. *AIMS Energy* 5:425-457, 2017.



- Halim S F A, Kamaruddin A H, Fernando W J N: Continuous biosynthesis of biodiesel from waste cooking palm oil in a packed bed reactor: optimization using response surface methodology (RSM) and mass transfer studies. *Bioresource Technology* 100:710-716, 2009.
- HZN, Hrvatski zavod za norme: Tekući naftni proizvodi – metilni esteri masnih kiselina (FAME) za dizelske motore i grijanje – Zahtjevi i metode ispitivanja (EN 14214:2012+A2:2019). HRN EN 14214:2019
- Mahenthiralingam E, Urban T A, Goldberg J B: The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature Reviews Microbiology* 3:144-156, 2005.
- Moazeni F, Chen Y C, Zhang G: Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. *Journal of Cleaner Production* 216:117-128, 2019.
- MP, Ministarstvo poljoprivrede RH: *Pravilnik o jestivim uljima i mastima*, Narodne Novine 11/2019–229.
- MZOPUG, Ministarstvo zaštite okoliša, prostornog uređenja i graditeljstva RH: *Pravilnik o gospodarenju otpadnim uljima*. Narodne novine 124/2006-2762.
- Nie K L, Xie F, Wang F, Tan T W: Lipase catalysed methanolysis to produce biodiesel: optimization of the biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 43:142-147, 2006.
- Ostojčić M, Budžaki S, Flanjak I, Bilić Rajs B, Barišić I, Nam Tran N, Hessel V, Strelec I: Production of biodiesel by *Burkholderia cepacia* lipase as a function of process parameters. *Biotechnology Progress* 37:e3109, 2020.
- Ostojčić M: Sinteza biodizela u mikroreaktorima upotrebom komercijalne i nepročišćene lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2018.
- Salum T F C, Villeneuve P, Barea B, Yamamoto C I, Cocco L C, Mitchell D A, Krieger N: Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by *Burkholderia cepacia* LTEB11. *Process Biochemistry* 45:1348-1354, 2010.
- Sanchez D A, Tonetto G M, Ferreira M L: *Burkholderia cepacia* lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnology and Bioengineering* 115:6-24, 2017.
- Silva W C, Teixeira L F, Carvalho A K F, Mendes A A, de Castro H F: Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 20:881-886, 2014.
- Szczesna Antczak M, Kubiak A, Antczak T, Bielecki S: Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. *Renewable Energy* 34:1185-1194, 2009.
- USP - NF, United States Pharmacopeia and National Formulary: Chemical Tests and Assays: (401) Fats and Fixed Oils. U *USP 40 – NF 37*, str. 332 – 345. United States Pharmacopeial Convention, Sjedinjene Američke Države, 2017.

- Vasiljević Lj, Gligorić M, Dobrnjac S, Aleksić V: Uticaj prženja suncokretovog ulja na sadržaj slobodnih masnih kiselina. *5. međunarodni kongres „Inženjerstvo, ekologija i materijali u procesnoj industriji“*. Tehnološki fakultet Zvornik, 2017.
- Vela M A F, Acevedo-Paez J C, Urbina-Suarez N, Basto Y A R, Gonzalez-Delgado A D: Enzymatic Transesterification of Waste Frying Oil from Local Restaurants in East Colombia Using a Combined Lipase System. *Applied Sciences* 10:1-16, 2020.
- Vlada Republike Hrvatske: *Uredba o kakvoći biogoriva*, Narodne Novine 141/2005–2651.
- Watanabe Y, Shimada Y, Sugihura A, Tominaga Y: Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed reactor. *Journal of the American Oil Chemists` Society* 78:703-707, 2001.
- You Q, Yin X, Zhao Y, Zhang Y: Biodiesel production from jathropa oil catalysed by immobilized *Burkholderia cepacia* lipase on modified attapulgit. *Bioresource Technology* 148:202-207, 2013.