

Lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* i *Burkholderia cepacia* kao biokatalizatori u sintezi biodizela

Barišić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:839493>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-09**

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

Iva Barišić

LIPAZE IZ *Pseudomonas fluorescens* I *Burkholderia cepacia* KAO
BIOKATALIZATORI U SINTEZI BIODIZELA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2019.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za Procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Energija i okoliš

Tema rada je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2018./2019. održanoj 16. srpnja 2019.

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

Pomoć pri izradi: *Marta Ostojčić*, asistent

Lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* i *Burkholderia cepacia* kao biokatalizatori u sintezi biodizela

Iva Barišić, 0113137549

Sažetak:

U današnjoj industrijskoj proizvodnji biodizela kao katalizator koristi se natrijev hidroksid, no ovaj način proizvodnje ima brojne nedostatke. Stoga se sve više istražuju alternativni oblici proizvodnje biodizela, među kojima se ističe upotreba biokatalizatora - lipaza. U usporedbi s kemijski kataliziranom, reakcija katalizirana lipazama je jednostavnija i ekološki prihvatljivija. U ovom radu provedena je biotehnoška karakterizacija Amano lipaza iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* primjenom dva različita testa, spektrofotometrijskog uz *p*-nitrofenil palmitat kao supstrat i titrimetrijskog testa uz maslinovo ulje kao supstrat te je procijenjeno kako se primjena eksperimentalno određenog optimalnog pH i optimalne temperature odražava na učinkovitost biokatalitičke sinteze biodizela u kotlastom bioreaktoru uz svježe suncokretovo ulje i metanol kao supstrate u reakcijama transesterifikacije navedenim lipazama. Potom je udio metilnih estera masnih kiselina u sirovom biodizelu određen na plinskom kromatografu te je na temelju dobivenih rezultata procijenjeno da lipaza iz *Burkholderia cepacia* pokazuje veću efikasnost u proizvodnji biodizela.

Ključne riječi: biodizel, lipaza, transesterifikacija

Rad sadrži: 42 stranice
22 slika
7 tablica
26 literaturnu referencu

Jezik izvornika: hrvatski

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

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

Datum obrane: 16. rujan 2019

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process engineering
Subdepartment of Thermodynamics and Reaction Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program 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. 10 held on July 16, 2019.

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

Technical assistance: *Marta Ostojčić*, assistant

Lipase from *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia cepacia* as biocatalysts in biodiesel synthesis

Iva Barišić, 0113137549

Summary:

In today's industrial production of biodiesel, sodium hydroxide is being used as a catalyst, but this production method has numerous disadvantages. Therefore, alternative forms of biodiesel production are being explored, among which the use of lipase as biocatalysts is emphasized. Compared to chemically catalyzed, the lipase catalyzed reaction is simpler and more environmentally friendly. In this master thesis, biotechnological characterization of Amano lipases from *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* bacteria was conducted, by using two different tests, spectrophotometric with *p*-nitrophenyl palmitate as a substrate and a titrimetry test with olive oil as a substrate, and it was estimated that using experimentally specified optimal pH and optimal temperature reflects on efficiency of biocatalytic synthesis of biodiesel in batch bioreactor with fresh sunflower oil and methanol as substrates in transesterification reaction with listed lipases. Afterwards, the proportion of fatty acid methyl esters in crude biodiesel was determined on a gas chromatograph and, based on the obtained results, it was estimated that lipase from *Burkholderia cepacia* showed a higher efficiency in biodiesel production.

Key words: Biodiesel, lipase, transesterification

Thesis contains: 42 pages
22 figures
7 tables
26 references

Original in: Croatian

Defense committee:

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

Defense date: September 16, 2019

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

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

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. LIPAZE	4
2.1.1. Lipaza iz <i>Burkholderia cepacia</i>	5
2.1.2. Lipaza iz <i>Pseudomonas fluorescens</i>	6
2.2. BIODIZEL	6
2.2.1. Sirovine u proizvodnji biodizela	7
2.2.2. Proizvodnja biodizela	8
2.3. REAKTORI	9
2.3.1. Kotlasti bioreaktor	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. ZADATAK	13
3.2. MATERIJALI	13
3.2.1. Sirovine	13
3.2.2. Lipaze	13
3.2.3. Kemikalije	13
3.2.4. Priprema otopina	14
3.2.5. Aparatura	16
3.3. METODE	17
3.3.1. Određivanje aktivnosti lipaza	17
3.3.2. Biotehnoška karakterizacija lipaza	21
3.3.3. Sinteza biodizela	21
3.3.4. Određivanje udjela metilnih estera masnih kiselina u biodizelu	23
4. REZULTATI I RASPRAVA	25
4.1. BIOTEHNOLOŠKA KARAKTERIZACIJA LIPAZA	26
4.1.1. Usporedba aktivnosti lipaza određenih spektrofotometrijskim i titrimetrijskim testom	27
4.1.2. pH optimum lipaza	28
4.1.3. Optimalna temperatura za aktivnost lipaza	32
4.2. UUDIO METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA U BIODIZELU	35
5. ZAKLJUČCI	38
6. LITERATURA	40

1. UVOD

Ograničene količine fosilnih goriva i jačanje svijesti o njihovom štetnom djelovanju na okoliš doveli su do potrebe za potražnjom alternativnih i obnovljivih izvora energije. Biodizel je biorazgradivo, netoksično, ekološki prihvatljivo, tekuće gorivo koje može uspješno zamijeniti fosilno dizelsko gorivo. Međutim, uobičajeni postupak proizvodnje biodizela transesterifikacijom biljnih ulja i metanola uz prisustvo kemijskih katalizatora ima nekoliko nedostataka kao što su visoki proizvodni troškovi, nastajanje nusproizvoda sporednim reakcijama te potreba za neutralizacijom katalizatora i izdvajanjem nastalog glicerola iz reakcijske smjese (Meher i sur., 2006; Sinčić, 2008; Rajalingam i sur., 2016). Upravo ovo su ključni razlozi za pronalaženje alternativnih tehnologija proizvodnje biodizela.

Jedno od mogućih rješenja je primjena novih oblika katalizatora – biokatalizatora, odnosno lipaza. Lipaze omogućuju dobivanje željenog produkta u visokim omjerima, sposobne su djelovati u blagim procesnim uvjetima pri čemu ne nastaju nusprodukti te je izdvajanje nastalih željenih produkata iz reakcijske smjese nezahjevno. Međutim, unatoč relativno velikom broju dostupnih komercijalnih lipaza, industrijska primjena ostaje ograničena zbog visoke cijene pojedinih lipaza koje uvjetuju cijenu konačnog proizvoda, a koji je nerijetko skuplji u odnosu na one dobivene konvencionalnim tehnologijama proizvodnje (Ognjanović i sur., 2010; Yücel i sur., 2012).

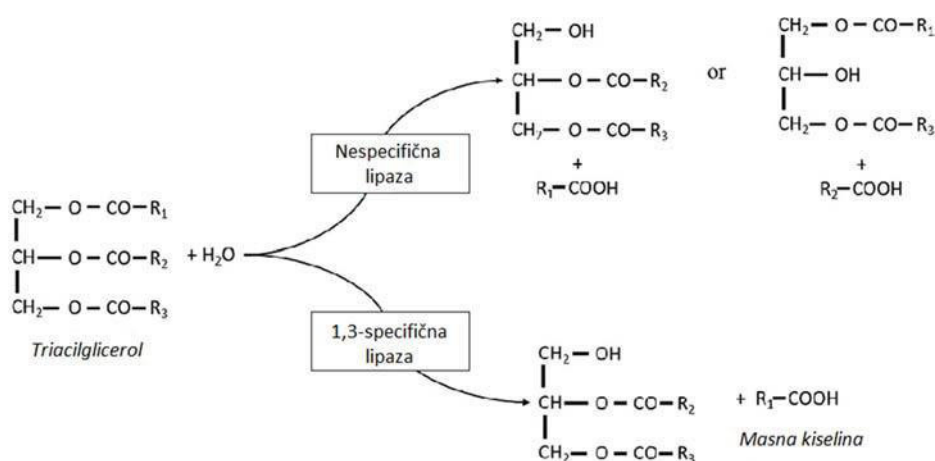
U okviru ovog diplomskog rada provedena je biotehnoška karakterizacija Amano lipaza iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* te ispitana njihova biokatalitička sposobnost sinteze biodizela pri eksperimentalno određenim pH optimumu i optimalnoj temperaturi. Eksperimentalni dio proveden je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek u Laboratoriju za procesno inženjerstvo.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIPAZE

Lipaze (triacilglicerol-acilhidrolaze, EC 3.1.1.3) su enzimi koji kataliziraju hidrolizu triacilglicerola do diacilglicerola, monoacilglicerola, masnih kiselina i glicerola. To su svestrani biokatalizatori koji osim hidrolize triacilglicerola, pri pogodnim okolišnim/reakcijskim uvjetima kataliziraju i reakcije esterifikacije, interesterifikacije, acidolize i aminolize. Prema tome, imaju potencijal primjene u industriji deterdženata, tekstila, masti i ulja te kozmetičkoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji (Houde et al., 2003; Ognjanović i sur., 2010).

Lipaze predstavljaju važnu skupina biokatalizatora koje imaju značajnu primjenu u biotehnološkim procesima. Jedne od njihovih najvažnijih karakteristika su supstratna i reakcijska selektivnost/specifičnost na temelju kojih se može usmjeriti odvijanje reakcije i dobivanje čistog proizvoda u visokom prinosu. Lipaze pokazuju supstratnu specifičnost prema svojim supstratima preko tri različita aspekta: vrsti lanca masne kiseline (zasićene ili nezasićene masne kiseline), položaju cijepanja esterske veze na okosnici glicerola (regiospecifičnost) i stereoisomera estera (očituje se u djelovanju enzima samo na jednom od dva moguća stereokemijska oblika supstrata). Lipaze koje se nalaze u slobodnom ili imobiliziranom obliku mogu se klasificirati u dvije skupine prema njihovoj regiospecifičnosti, odnosno prema položaju cijepajuće veze (**Slika 1**) (Muralidhar i sur., 2002; Ognjanović i sur., 2010; Güzel, 2012).

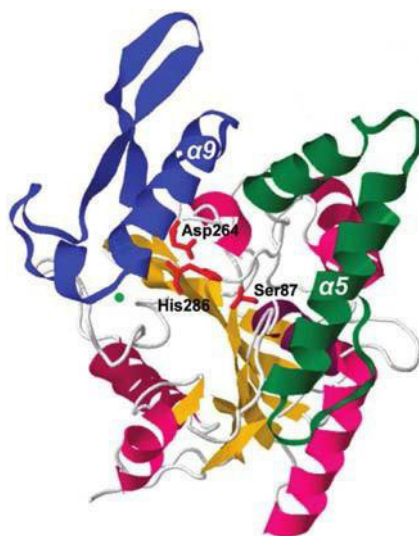


Slika 1 Hidroliza triacilglicerola djelovanjem nespecifične i 1,3-specifične lipaze (Preuzeto i prilagođeno iz rada Ali i Elozeiri, 2017)

Prvu skupinu čine pozicijski nespecifične lipaze koje cijepaju sve tri esterske veze, odnosno dolazi do potpune razgradnje triacilglicerola do glicerola i slobodnih masnih kiselina. Drugu skupinu predstavljaju 1,3-specifične lipaze koje kataliziraju samo hidrolizu primarnih esterskih veza pozicioniranih na C1 i C3 atomima glicerola (Grbavčić, 2014). Kao primjer ove dvije skupine, mogu se navesti lipaze korištene u ovom diplomskom radu: lipaza iz *Burkholderia cepacia* koja se ubraja u regionespecifične lipaze, te lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* koja se ubraja u 1,3-specifične lipaze.

2.1.1. Lipaza iz *Burkholderia cepacia*

Lipaza iz *Burkholderia cepacia*, poznata kao i *Pseudomonas cepacia* lipaza, komercijalni je enzim i jedan je od najčešće korištenih biokatalizatora u biotehnološkim procesima, kao što su esterifikacija, hidroliza i transesterifikacija. Polipeptidni lanac ove lipaze sastoji se od 320 aminokiselinskih ostataka, a molekulska masa joj iznosi 33 128 g/mol. Za katalitičku aktivnost ovog enzima zaduženi su ostaci aminokiselina serin, histidin i asparaginske kiseline (**Slika 2**). Raširena primjena ove lipaze posljedica je njene temperaturne stabilnosti i tolerancije na različita otapala, uključujući alkohole s kratkim lancem (1-4 atoma ugljika) (Sanchez i sur., 2017). Aktivna je u pH rasponu od 4,0 do 10,5 te u temperaturnom rasponu od 30 do 85 °C. Upravo iz gore navedenog lipaza iz bakterije *Burkholderia cepacia* ima veliki potencijal za uporabu kao biokatalizator u proizvodnji biodizela.



Slika 2 Struktura *Burkholderia cepacia* u otvorenoj aktivnoj konformaciji (Sanchez i sur., 2018)

2.1.2. Lipaza iz *Pseudomonas fluorescens*

Lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* komercijalni je enzim molekulske mase 32 000 g/mol i često korišten biokatalizator u biotehnološkim procesima, prvenstveno u reakcijama transesterifikacije. Aktivna je u pH rasponu od 5,0 do 11,0 te u temperaturnom rasponu od 5 do 55 °C.

Slično drugim slobodnim enzimima, lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* ima nekoliko nedostataka, poput loše stabilnosti i nemogućnosti višekratne upotrebe, koji se mogu poboljšati imobilizacijom lipaze (Dwivedee et al., 2017).

2.2. BIODIZEL

Biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina (FAME) koja se proizvodi od biljnih ulja (jestivih i nejestivih) ili životinjskih masti, a može se koristiti kao biogorivo u dizelskim motorima (Uredba o kakvoći biogoriva, NN 141/2005, NN 33/2011). Sukladno hrvatskoj normi HRN:EN 14214 udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu iznosi minimalno 96,5% (m/m).

Biodizel je ekološki prihvatljivo biogorivo prvenstveno zbog upotrebe obnovljivih sirovina za njegovu proizvodnju. Naime, izgaranjem fosilnih goriva oslobađa se ugljikov dioksid (CO₂) koji kao staklenički plin najviše doprinosi globalnom zagrijavanju. Suprotno tome, sagorijevanjem biodizela u atmosferu se vraća ona količina CO₂ koju je biljka potrošila procesom fotosinteze iz atmosfere (Budžaki i Miljić, 2017).

Proizvodnja i upotreba biodizela imaju niz prednosti. Ispušni plinovi nastali tijekom izgaranja biodizela sadrže znatno manje ugljikova monoksida (CO), sumporovog dioksida (SO₂), neizgorenih ugljikovodika, čađi i policikličkih aromata, nego u slučaju fosilnih goriva. Biodizel ima znatno bolju mazivost od fosilnog dizela, više plamište (iznad 100 °C) što osigurava sigurniji rad i skladištenje, može se koristiti u postojećim dizelskim motorima te smanjuje ovisnost mnogih zemalja o uvozu nafte (Gerpen, 2005).

Međutim, uz navedene prednosti posjeduje i neke nedostatke. Za razliku od fosilnih goriva, biodizel ima znatno manji sadržaj energije i sagorijevanjem se oslobađa veća koncentracija dušikovih oksida (NO_x). Najveći problem predstavlja proizvodnja biodizela iz sirovina predviđenih za ljudsku prehranu, čime se povećava cijena i smanjuje dostupnost hrane.

Biodizel se može koristiti u svom čistom obliku (B100) ili miješati s fosilnim dizelskim gorivom u određenim omjerima. Smjese su označene kao Bxx, pri čemu xx predstavlja postotak biodizela u miješanom gorivu. Najčešće mješavine biodizela su B2 (2% biodizel, 98% dizel), B5 (5% biodizel, 95% dizel) te B20 (20% biodizel, 80% dizel) (Yücel et al., 2012).

2.2.1. Sirovine u proizvodnji biodizela

Biodizel se klasificira u generacije na temelju postupaka proizvodnje i vrste korištenih sirovina, iako nema točne tehničke definicije (Sinčić, 2014).

U prvu generaciju ubraja se biodizel proizveden transesterifikacijom jestivih biljnih ulja i životinjskih masti. Jestiva biljna ulja poput suncokretovog, maslinovog, sojinog, palminog, kukuruznog te ulja sjemenki pamuka široko su korištena u enzimskoj transesterifikaciji. U razvijenim zemljama jestiva ulja čine više od 95% sirovina za sintezu biodizela, budući da biodizel proizveden iz tih ulja ima svojstva vrlo slična dizelu na bazi nafte. Međutim, kontinuirana i velika proizvodnja biodizela iz jestivih ulja u posljednje vrijeme postavlja etičko pitanje, budući da se hrana koristi kao sirovina za proizvodnju goriva (Balat, 2011).

Drugoj generaciji pripada biodizel proizveden iz nejestivih ulja ili otpadnih jestivih ulja/masti. Glavni izvori nejestivih ulja su *Jatropha curcas* (barbadoski orašćić), *Pongamia pinnata* (karanja), *Euphorbia lathyris* (unakrsnolisna mlječika), *Ficus elastica* (kaučuk), *Nicotina tabacuma* (duhan) i *Sapium sebiferum* (kinesko lojno drvo), dok se u otpadna jestiva ulja i masti ubrajaju otpadno ulje nakon pripreme hrane te životinjske masti poput govedeg i svinjskog loja. Preporuča se proizvodnja biodizela iz navedenih, alternativnih, sirovina koje nisu pogodne za daljnju upotrebu zbog prisutnosti toksičnih tvari, a njihovo zbrinjavanje košta. Iako sirovine druge generacije obično ne utječu na opskrbu ljudi hranom te se mogu uzgajati u pustošima koje nisu pogodne za prehrambene usjeve i dalje nisu dovoljno obilne da bi služile za intenzivnu proizvodnju biodizela.

Sirovine za sintezu treće i četvrte generacije biodizela obuhvaćaju biodizel podrijetlom iz mikro- i makro algi te genetički modificiranih algi i mikroorganizama koje predstavljaju najperspektivnije alternativne izvore lipida zbog visoke fotosintetske učinkovitosti proizvodnje biomase i produktivnosti u usporedbi s konvencionalnim usjevima. Pored njihove brze reprodukcije, lakše se uzgajaju u usporedbi s biljnim vrstama, mogu se uzgajati u okruženjima koja nisu pogodna za uzgoj ostalih usjeva (svježa, bočata i slana voda; neobrađive površine,

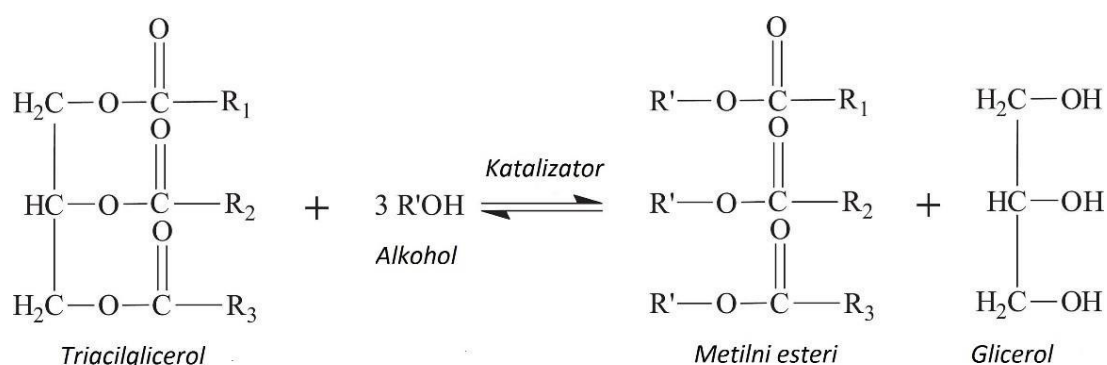
bioreaktori), daju veći prinos ulja za sintezu biodizela te se njihovom primjenom reducira upotreba hrane za proizvodnju biodizela (Ahmad i sur., 2011; Sinčić, 2014).

2.2.2. Proizvodnja biodizela

Biodizel se može proizvesti na nekoliko načina: pirolizom, mikroemulzifikacijom ili transesterifikacijom. Piroliza je postupak cijepanja većih organskih molekula pri povišenoj temperaturi s ciljem dobivanja molekula manje molekulske mase i drugačijih svojstava. Mikroemulzifikacija je metoda nastajanja mikroemulzije, odnosno termodinamički stabilne izotropne tekućine koju tvore tri komponente: uljna faza, vodena faza i površinski aktivna tvar (Sinčić, 2008; Rajalingam i sur., 2016).

U današnje vrijeme, najznačajniji postupak sinteze biodizela je transesterifikacija koja se može provoditi nekatalitičkim i katalitičkim postupcima. Nekatalitički postupci podrazumijevaju provođenje transesterifikacije bez katalizatora, odnosno direktnu reakciju ulja/masti i alkohola pri visokoj temperaturi i tlaku (Budžaki i Miljić, 2017).

Industrijski postupci proizvodnje biodizela baziraju se na katalitičkoj transesterifikaciji koja predstavlja reakciju triacilglicerola (ulja/masti) s alkoholom u prisutnosti katalizatora, čime nastaju esteri masnih kiselina i sporedni produkt glicerol. Reakcija je reverzibilna i odvija se u tri stupnja (**Slika 3**). U prvom stupnju triacilgliceroli se prevode u diacilglicerole, u drugom u monoacilglicerole, a u trećem i posljednjem koraku nastaju esteri i glicerol.



Slika 3 Reakcija transesterifikacije (Preuzeto i prilagođeno iz rada Pereira i sur., 2014)

U reakciji se upotrebljavaju primarni i sekundarni monohidratni alifatski alkoholi s 1-8 atoma ugljika. Najčešće se koriste metanol i etanol, posebice metanol zbog polarnosti, mogućnosti brze reakcije s triacilglicerolima i niske cijene. Za provođenje transesterifikacije stehiometrijski

omjer alkohola i triacilglicerola treba biti 3:1. Međutim, u praksi, alkohol se dodaje u suvišku kako bi se reakcija pomakla u desno u smjeru nastajanja produkta (Ma i Hanna, 1999).

Za ubrzavanje reakcije i povećanje prinosa, postupak transesterifikacije provodi se u prisutnosti katalizatora, kemijskih (kiselinski i alkalni) ili enzimskih (lipaze). Kao kiselinski katalizatori uglavnom se koriste sumporna (H_2SO_4) i klorovodična kiselina (HCl). Ovi katalizatori daju vrlo visoke prinose, ali reakcije su spore i zahtijevaju temperature iznad $100\text{ }^\circ\text{C}$. Kiselinski katalizirana transesterifikacija treba se provoditi bez vode, kako bi se izbjeglo konkurentno stvaranje karboksilnih kiselina koje smanjuju prinose estera masnih kiselina. Današnja industrijska proizvodnja temelji se na provedbi transesterifikacije uz primjenu alkalnih katalizatora, najčešće NaOH i KOH. Alkalni katalizatori provode transesterifikaciju znatno brže od reakcije katalizirane kiselinom, međutim, prisutnost vode i velika količina slobodnih masnih kiselina uzrokuju saponifikaciju (neželjenu sporednu reakciju), a time i nepotpunu reakciju transesterifikacije tijekom procesa s naknadnim stvaranjem emulzije i poteškoćama u odvajanju glicerola (Vargas i sur., 2018).

U usporedbi s kemijski kataliziranom, enzimaska reakcija je jednostavnija i ekološki prihvatljivija. Odvija se u blagim reakcijskim uvjetima, pri temperaturama od 30 do $60\text{ }^\circ\text{C}$, omogućava izdvajanje glicerola bez dodatnog pročišćavanja i ukoliko se mogu izdvojiti iz reakcijske smjese katalizatori se mogu ponovo koristiti. U reakciji transesterifikacije ne nastaju sapuni kao nusproizvodi, prema tome dobije se biodizel bolje kvalitete i nema potrebe za ispiranjem vodom, čime se smanjuju količine otpadne vode koja predstavlja ekološki problem. Unatoč navedenim prednostima, enzimaska proizvodnja biodizela još nije konkurentna kemijskim kataliziranim reakcijama, prvenstveno zbog visokih cijena pojedinih lipaza, male aktivnosti i ograničenom broju lipaza dostupnih u industrijskim količinama (Ognjanović i sur., 2010; Yücel i sur., 2012).

2.3. REAKTORI

Proizvodnja biodizela može se provoditi u kontinuiranim, polukontinuiranim i diskontinuiranim reaktorskim sustavima. Kriteriji koje je potrebno uzeti u obzir pri odabiru reaktorskog sustava su kapacitet proizvodnog postrojenja i svojstva sirovina.

Kontinuirani reaktorski sustavi uglavnom se koriste za industrijska postrojenja velikih kapaciteta i pri upotrebi visoko kvalitetnih sirovina. To podrazumijeva dodavanje reaktanata

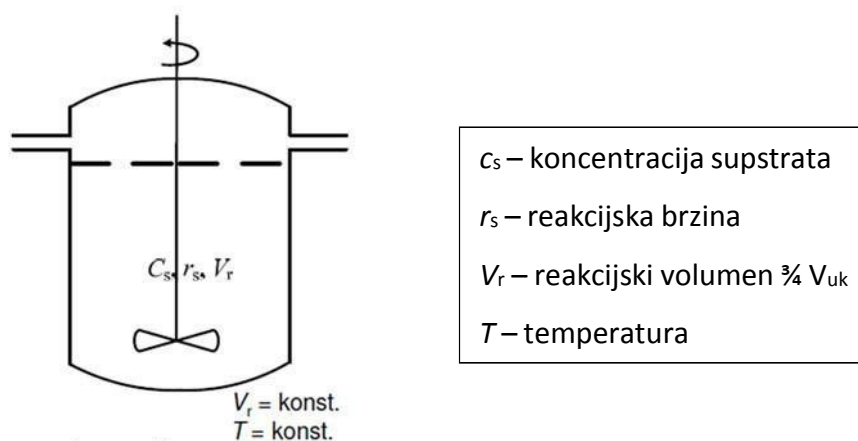
u reaktor ili kontinuirani ulaz sirovina, dok se produkti postupno odvajaju odnosno kontinuirano odvođe iz reaktora. Prednosti kontinuirane obrade obuhvaćaju smanjenje volumena reaktora, posljedično i smanjenje kapitalnih troškova, lakšu kontrolu procesa i manje varijacije u kvaliteti proizvoda. Međutim, ova metoda ima i neke neizbježne nedostatke. U prisutnosti vlage ili slobodnih masnih kiselina dolazi do nastajanja sapuna koji pogoduju emulziji između glicerola i ulja, što zahtijeva pročišćavanje koje predstavlja dodatni trošak (Gomzi, 1998; Sinčić, 2008).

U polukontinuiranim postrojenjima biodizel se proizvodi u kotlastom bioreaktoru, uz kontinuirano odvođenje proizvoda iz sustava (Budžaki i sur., 2017).

Diskontinuirani reaktorski sustavi uglavnom se koriste za manja postrojenja. Omogućuju prilagodbu procesnih parametara karakteristikama sirovina u svakoj šarži, stoga je ovaj tip postrojenja pogodan kada se radi s velikim brojem sirovina različitih karakteristika (otpadna ulja, rafinirana i nerafinirana ulja, ulja zaostala nakon prženja). Glavni predstavnik diskontinuiranog reaktorskog sustava je kotlasti bioreaktor (Sinčić, 2008).

2.3.1. Kotlasti bioreaktor

Kotlasti bioreaktor se često koristi u industriji za provedbu velikog broja reakcija, posebice u proizvodnji biodizela. Izveden je u obliku zatvorenog kotla opremljenog miješalom, s otvorima za punjenje i pražnjenje reakcijske smjese te plaštom (ili zmijačom) za zagrijavanje ili hlađenje (Slika 4).



Slika 4 Shematski prikaz kotlastog bioreaktora (Tišma, 2016)

U kotlastim bioreaktorima, odnosno u diskontinuiranim sustavima za vrijeme trajanja reakcije nema izmjene sadržaja s okolinom. Bioreaktori se pune određenim količinama reakcijske smjese, zatim se zatvaraju, a željeni reakcijski uvjeti se konfiguriraju (temperatura, tlak i brzina

miješanja). Reakcija započinje, traje određeno vrijeme i nakon završetka reakcije sadržaj bioreaktora se prazni. Potencijalne pogreške u odabiru optimalnih uvjeta procesa mogu se korigirati tijekom procesa. Kotlasti bioreaktor je primjer zatvorenog sustava za koji je karakteristično nestacionarno stanje (veličine stanja ovisne o vremenu) i idealno miješanje (vrijednosti veličina stanja su neovisne o položaju unutar bioreaktora).

Pozitivne karakteristike ovih bioreaktora obuhvaćaju dobre osobine miješanja, lako rukovanje katalizatorima koji se koriste u proizvodnji biodizela i mogućnost da se svaka serija s obzirom na kvalitetu sirovine može obraditi tako da se postigne maksimalna razina količine i kvalitete gotovog proizvoda.

Kotlasti bioreaktori posjeduju nekoliko nedostataka u odnosu na kontinuirane sustave. Naime, zahtijevaju veće dimenzije reaktora, a time i veće kapitalne troškove, pokazuju manju učinkovitost u odnosu na kontinuirane procese zbog prirode pokretanja i zaustavljanja procesa u svrhu punjenja i pražnjenja bioreaktora te mogu uzrokovati varijacije u kvaliteti šarže, odnosno proizvoda (Bart i sur., 2010). Na **Slici 5** prikazan je model kotlastog bioreaktora korišten u okviru ovog diplomskog rada za provođenje sinteze biodizela.



Slika 5 Kotlasti bioreaktor ($V = 250 \text{ mL}$)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je provesti biotehnološku karakterizaciju Amano lipaza iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* primjenom 2 različita testa za određivanje aktivnosti lipaza, spektrofotometrijskog testa uz *p*-nitrofenil palmitat kao supstrat i titrimetrijskog testa uz maslinovo ulje kao supstrat, te procijeniti kako se primjena eksperimentalno određenih optimalnog pH i optimalne temperature odražava na učinkovitost biokatalitičke sinteze biodizela u kotlastom bioreaktoru uz svježe suncokretovo ulje i metanol kao supstrate u reakcijama transesterifikacije navedenim lipazama. Pri tome je procjenu primijenjenih optimalnih uvjeta (pH optimum, temperaturni optimum) na biokatalitičku sintezu biodizela bilo potrebno provesti na osnovi rezultata analize udjela metilnih estera plinskom kromatografijom, te na osnovi dobivenih rezultata o udjelu metilnih estera u sintetiziranom biodizelu predložiti pouzdaniji test za određivanje aktivnosti lipaza, kao i učinkovitiju lipazu za sintezu biodizela.

3.2. MATERIJALI

3.2.1. Sirovine

Sirovina korištena za sintezu biodizela je svježe jestivo suncokretovo ulje (*Zorela*, Srbija) kupljeno u supermarketu NTL u Osijeku.

3.2.2. Lipaze

Amano lipaza iz *Burkholderia cepacia* i Amano lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* (Sigma-Aldrich) korištene su za sintezu biodizela.

3.2.3. Kemikalije

U ovom diplomskom radu korištene su sljedeće kemikalije: natrijev dihidrogen fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; Sigma-Aldrich), dinatrijev fosfat (Na_2HPO_4 ; Acros Organics), 1 mol/L fosforna kiselina, 85% (H_3PO_4 ; Kemika), 1 mol/L natrijev hidroksid (NaOH; Kefo), Tris-baza ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$; Acros Organics), 1 mol/L klorovodične kiselina (HCl; Carlo Erba reagens), *p*-nitrofenilpalmitat, 98+% ($\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{NO}_4$; Alfa Aesar), 2-propanol ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$; Kemika), arapska guma (Acros Organics), kloroform (CHCl_3 ; Carlo Erba), izoamilni alkohol ($\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$; Kemika), glicin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$; Fisher Chemical), ledena octena kiselina (CH_3COOH ; Macron), borna kiselina

(H_3BO_3 ; Gram-mol), natrijev hidroksid (NaOH ; Gram-mol), maslinovo ulje (Sigma-Aldrich), glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$; Alkaloid Skopje), kalijev dihidrogen fosfat (KH_2PO_4 ; Fisher Chemical), natrijev klorid (NaCl ; Sigma-Aldrich), aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$; Gram-mol), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$; Kefo), fenolftalein ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$; Kemika), metanol (CH_3OH ; J.T. Baker), *n*-heptan 99+% (C_7H_{16} ; Sigma-Aldrich).

3.2.4. Priprema otopina

Priprema otopina natrijeva fosfatnog pufera (pH 6,0; 7,0 i 8,0). Za pripremu 500 mL 0,1 mol/L fosfatnog pufera određene pH vrijednosti, u laboratorijskoj čaši na magnetnoj miješalici, otopljena je odgovarajuća količina natrijevog dihidrogen fosfata i dinatrijevog fosfata u 480 mL destilirane vode (**Tablica 1**). pH otopine podešen je dodatkom 1 mol/L fosforne kiseline ili 1 mol/L natrijevog hidroksida. Otopina iz čaše prenesena je u odmjernu tikvicu od 500 mL i nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina skladištena je u Shott-ovoj boci u hladnjaku na +4 °C.

Tablica 1 Priprema otopine natrijeva fosfatnog pufera

pH	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ [g]	Na_2HPO_4 [g]
6,0	3,84	0,55
7,0	1,73	2,47
8,0	0,27	3,80

Priprema 56,98 mmol/L natrijeva fosfatnog pufera. Za pripremu 56,98 mmol/L fosfatnog pufera iz 0,1 mol/L fosfatnog pufera odmjeren je 56,98 mL i preneseno u odmjernu tikvicu od 100 mL. Odmjerna tikvica nadopunjena je destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina skladištena je u Shott-ovoj boci u hladnjaku na +4 °C.

Priprema 1 mol/L Tris baze. Za pripremu 100 mL 1 mol/L Tris baze, u laboratorijskoj čaši na magnetnoj miješalici, otopljeno je 12,114 g Tris baze u 80 mL destilirane vode. Otopina iz čaše prenesena je u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina skladištena je u laboratorijskoj boci u hladnjaku na +4 °C.

Priprema 56,98 mmol/L Tris-HCl pufera (pH 8,0 i 9,0). Za pripremu 200 mL 56,98 mmol/L Tris-HCl pufera, u laboratorijsku čašu na magnetnoj miješalici, dodano je 11,4 mL 1 mol/L Tris baze

i 170 mL destilirane vode. Postepenim dodavanjem malih volumena 1 mol/L klorovodične kiseline pH otopine podešen je na 8,0, odnosno 9,0. Otopina iz čaše prenesena je u odmjernu tikvicu od 200 mL i nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina skladištena je u laboratorijskoj boci u hladnjaku na +4 °C.

Priprema 56,98 mmol/L glicin-NaOH pufera (pH 9,0 i 10,0). Za pripremu 56,98 mmol/L glicin-NaOH pufera iz 0,1 mol/L glicin-NaOH pufera odmjeren je 56,98 mL i preneseno u odmjernu tikvicu od 100 mL. Odmjerna tikvica nadopunjena je destiliranom vodom do oznake te skladištena u laboratorijskoj boci u hladnjaku na +4 °C. Za pripremu 100 mL 0,1 mol/L glicin-NaOH pufera, u laboratorijskoj čaši na magnetnoj miješalici otopljeno je 0,3754 g 0,2 mol/L glicina u 25 mL destilirane vode. Dodatkom 0,1 mol/L natrijvog hidroksida pH otopine je podešen na 9,0, odnosno 10,0. Otopina iz čaše prenesena je u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina skladištena je u laboratorijskoj boci u hladnjaku na +4 °C.

Priprema univerzalnog pufera po Britton – Robinsonu. Univerzalni pufer po Britton – Robinsonu tvore dvije komponente, otopina A i otopina B. Za pripremu 1000 mL otopine A dodano je 2,3 mL 0,04 mol/L fosforne kiseline, 2,29 mL ledene octene kiseline i 2,4736 g borne kiseline u 1000 mL destilirane vode u laboratorijsku čašu na magnetskoj miješalici. Za pripremu 1000 mL otopine B otopljeno je 8 g 0,2 mol/L natrijevog hidroksida u 1000 mL destilirane vode u laboratorijskoj čaši na magnetskoj miješalici. Zatim su otopina A i otopina B pomiješane u odgovarajućim omjerima za postizanje potrebne pH vrijednosti, kako je prikazano u **Tablici 2**.

Tablica 2 Priprema 100 mL univerzalnog pufera po Britton – Robinsonu

pH	Otopina A [mL]	Otopina B [mL]
6,0	70,5	29,5
7,0	65,6	34,4
8,0	62,4	37,6
9,0	59,5	40,5
10,0	56,2	43,8
11,0	54,6	45,4

Priprema reakcijske smjese za spektrofotometrijski test aktivnosti lipaza. Za pripremu 40 mL otopine supstrata u laboratorijsku čašu, omotanu aluminijskom folijom, na magnetnoj miješalici dodano je 36 mL otopine željenog pufera (56,98 mmol/L). Potom je otopljeno 0,0411 g emulgatora 0,1% w/v arapske gume na način da je mikropipetom dodan 1 mL pufera iz čaše u eppendorficu sa odvagom arapskom gumom i promiješano na vibrirajućoj miješalici te prenesen nazad u čašu. Postupak je ponavljan dok sva arapska guma u eppendorfici nije otopljena. U pripremljeni pufer s emulgatorom kap po kap je dodano 4 mL 10,2564 mmol/L otopine *p*-nitrofenil palmitata (*p*-NPP) u 2-propanolu. Tako pripremljena otopina odmah je korištena za određivanje aktivnosti lipaza. Otopina *p*-NPP u 2-propanolu ($c = 10,2564$ mmol/L) pripremljena je miješanjem 0,0155 g *p*-NPP sa 4 mL 2-propanola na vibrirajućoj miješalici.

Priprema Marmur otopine. Za pripremu Marmur otopine pomiješani su kloroform i izoamilni alkohol u volumnom omjeru 24:1 te je tako pripremljena otopina čuvana u laboratorijskoj boci na sobnoj temperaturi.

Priprema emulzije supstrata za titrimetrijski test aktivnosti lipaza. Emulzija supstrata je pripremljena emulgiranjem 30 mL maslinovog ulja sa 70 mL emulgirajućeg reagensa tijekom 3 min primjenom homogenizatora (Ika T10 standard). Emulgirajući reagens (1 L) tvore 17,9 g natrijevog klorida, 0,4 g kalijevog dihidrogen fosfata, 540 mL glicerola, 10 g arapske gume i destilirana voda.

3.2.5. Aparatura

Za izradu ovog diplomskog rada korištena je slijedeća aparatura: analitička vaga (Crystal 200 CE), pH metar (Hanna Instruments), magnetna miješalica (Ika Werke), vibrirajuća miješalica (Tehtnica), homogenizator (Ika T10 standard) centrifuga, (Hermle Z 326 K), UV-VIS spektrofotometar (Shimadzu, UV-1280), vodena kupelj (Julabo SW23), plinski kromatograf GC-2010 s FID detektorom, kolona: SH-Rtx-Wax ($L = 30$ m, $I.D. = 0,25$ mm, $d = 0,25$ μ m), plin nosioc: dušik, (Shimadzu).

3.3. METODE

3.3.1. Određivanje aktivnosti lipaza

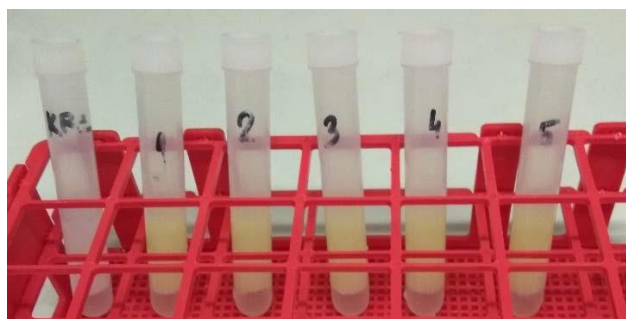
Aktivnost Amano lipaza porijeklom iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* određena je na dva načina: spektrofotometrijskim testom uz *p*-nitrofenil palmitat kao supstrat te titrimetrijskim testom uz maslinovo ulje kao supstrat.

Spektrofotometrijski test određivanja aktivnosti lipaza provoden je prema metodi Palacios i suradnika (2014.) uz minimalne modifikacije, prema protokolu prikazanom **Tablici 3**. Ova se metoda određivanja aktivnosti lipaze temelji na određivanju intenziteta žutog obojenja reakcijske smjese pri 410 nm proporcionalnog koncentraciji *p*-nitrofenola koji se oslobodi tijekom enzimske hidrolize *p*-NPP.

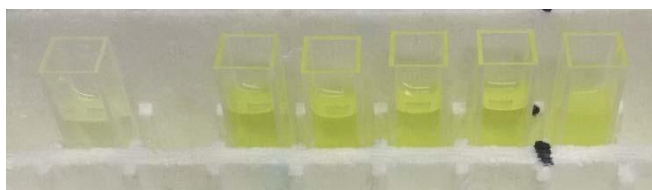
Tablica 3 Protokol spektrofotometrijskog testa za određivanje aktivnosti lipaze

Reagensi	Glavna proba	Kontrola raspada supstrata
Reakcijska smjesa	3,9 mL	3,9 mL
Predinkubacija 5 min		
Destilirana voda	-	100 µL
Lipaza	100 µL	-
Miješanje na vibrirajućoj miješalici 15 sekundi, inkubacija 5 min pri 40°C		
Marmur otopina	1,5 mL	1,5 mL
Miješanje na vibrirajućoj miješalici 30 s, centrifugiranje 10 min pri 15 000 <i>g</i>		
Izdvajanje gornjeg sloja i mjerenje njegove apsorbancije pri 410 nm		

Spektrofotometrijski test aktivnosti lipaza provođen je u pet paralela, a sastojao se od nekoliko koraka. Nakon petominutne inkubacije u vodenoj kupelji pri 40°C, reakcijskoj smjesi je dodano 100 µL otopine lipaze, da bi potom smjesa bila kratko izmiješana na vibrirajućoj miješalici i inkubirana 5 minuta pri 40°C u svrhu provedbe enzimske reakcije. Po isteku inkubacije enzimska reakcija je prekinuta dodatkom Marmurove otopine, miješana 30 sekundi na vibrirajućoj miješalici i potom centrifugirana tijekom 10 minuta pri 15 000 g, u svrhu odvajanja slojeva (**Slika 6**). Potom je pomoću mikropipete izuzeto oko 1,5 - 2 mL gornjeg sloja i otpipetirano u PMMA kivete (**Slika 7**), te je intenzitet obojenja mjeren pri 410 nm uz baždarenje spektrofotometra destiliranom vodom kao slijepom probom. Paralelno sa provedbom testa aktivnosti, provođen je i test kontrole raspada supstrata pri čemu je postupak bio identičan, izuzev činjenice da je termostatiranoj reakcijskoj smjesi umjesto otopine enzima dodano 100 µL destilirane vode. Intenzitet apsorbancije glavnih proba umanjen za intenzitet apsorbancije kontrole raspada supstrata preračunat je u koncentraciju *p*-nitrofenola pomoću molarnog apsorpcijskog koeficijenta (ϵ) *p*-nitrofenola izračunatog iz baždarnog dijagrama koji je pripremljen sa poznatim koncentracijama *p*-nitrofenola u puferu korištenom za pripremu reakcijske smjese.



Slika 6 Izgled reakcijske smjese nakon prekida reakcije i centrifugiranja



Slika 7 Pripremljeni uzorci za određivanje apsorbancije pri 410 nm

Aktivnost lipaza izražena je u internacionalnim jedinicama po mililitru enzima (U/mL) pri čemu jedna U predstavlja onu količinu lipaze koja razgradi 1 µmol *p*-nitrofenil palmitata za 1 minutu pri reakcijskim uvjetima provedbe testa.

Aktivnost lipaza izračunata je prema prikazanoj jednadžbi (1):

$$V.A. = \frac{(A_{GP,410\text{ nm}} - A_{KRS,410\text{ nm}}) \cdot D_f \cdot V_{uk}}{t \cdot V_E \cdot d \cdot \varepsilon} \left[\frac{U}{mL} \right] \quad (1)$$

gdje je :

$V. A.$ – volumna aktivnost lipaze (U/mL)

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

$A_{KRS, 410\text{ nm}}$ – apsorbancija kontrole raspada supstrata izmjerene na valnoj duljini od 410 nm

D_f – faktor razrjeđenja

V_{uk} – ukupni volumen reakcijske smjese (mL)

t – vrijeme trajanja testa (min)

V_E – volumen enzima dodanog u test (mL)

d – duljina puta kroz kivetu (cm) – 1 cm

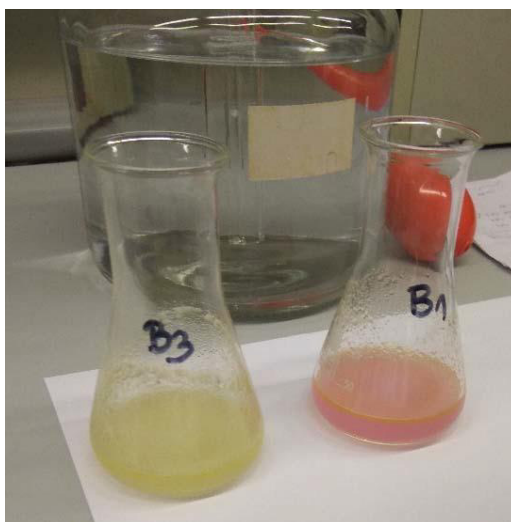
ε – molarni apsorpcijski koeficijent *p*-nitrofenola

Titrimetrijski test određivanja aktivnosti lipaza provode se prema metodi Mustrante i suradnika (1993.) uz minimalne modifikacije, a prema protokolu prikazanom u **Tablici 4**. Ova se metoda određivanja aktivnosti lipaza temelji na titraciji slobodnih masnih kiselina u reakcijskoj smjesi pomoću natrijeva hidroksida u prisutnosti fenolftaleina kao indikatora, pri čemu je količina slobodnih masnih kiselina u reakcijskoj smjesi rezultat enzimske hidrolize maslinova ulja.

Tablica 4 Protokol titrimetrijskog testa za određivanje aktivnosti lipaze

Reagens	Slijepa proba	Glavna proba
Emulzija supstrata	5 mL	5 mL
200 mM natrijev fosfatni pufer pH 7,0	4 mL	4 mL
Predinkubacija 5 min u vodenoj kupelji s tresilicom pri 40°C		
Destilirana voda	1 mL	-
Otopina lipaze (1 mg/mL)	-	1 mL
Inkubacija 10 min u vodenoj kupelji s tresilicom pri 40°C		
Smjesa aceton-etanol (1:1)	10 mL	10 mL

Titrimetrijski test aktivnosti lipaza provođen je u tri paralele. Nakon dodatka 1 mL enzima masene koncentracije 1 mg/mL predinkubiranoj smjesi emulzije i pufera, reakcijska smjesa je inkubirana pri 40°C uz trešenje u vodenoj kupelji, da bi nakon 10 minuta inkubacije enzimski reakcija bila inhibirana dodatkom 10 mL smjese aceton-etanol. Potom je ovoj smjesi dodano 5 kapi otopine fenolftaleina, te su oslobođene masne kiseline titrirane otopinom natrijevog hidroksida koncentracije 0,025 mol/L, do pojave ružičaste boje postojane 30 sekundi (**Slika 8**).



Slika 8 Uzorak prije (B3) i poslije (B1) titracije otopinom NaOH

Aktivnost lipaza izražena je u internacionalnim jedinicama po mL enzima (U/mL), pri čemu 1 U predstavlja onu količinu enzima koji katalizira oslobađanje 1 μ mol masnih kiselina iz maslinova ulja tijekom jedne minute.

Aktivnost lipaze određena je prema prikazanoj jednadžbi (2):

$$V.A. = \frac{(V_{GP} - V_{SP}) \cdot C_{NaOH} \cdot 1000}{t_{ink}} \left[\frac{U}{mL} \right] \quad (2)$$

gdje je:

$V.A.$ – volumna aktivnost lipaze (U/mL)

V_{GP} – volumen glavne probe (mL)

V_{SP} – volumen slijepe probe (mL)

C_{NaOH} – koncentracija natrijevog hidroksida (mol/dm^3)

1000 – faktor za konverziju mjerne jedinice

t_{ink} – vrijeme inkubacije (min)

3.3.2. Biotehnološka karakterizacija lipaza

Biotehnološka karakterizacija lipaza uključila je određivanje dva ključna parametra: optimalnog pH i optimalne temperature za aktivnost lipaza i to primjenom oba testa za određivanje aktivnosti, spektrofotometrijskog i titrimetrijskog.

Određivanje optimalnog pH za aktivnost lipaza provedeno je u rasponu pH vrijednosti od 6 do 10, ili u rasponu od 6 do 11. U prvom slučaju (raspon pH 6-10) korištena su tri različita puferiska sustava: natrijev fosfatni pufer (pH 6, 7 i 8), tris-HCl pufer (pH 8 i 9), te glicin-natrijev hidroksidni pufer (pH 9, i 10), a u drugom slučaju (raspon pH 6-11) korišten je univerzalni Britton-Robinsonov pufer (pH 6, 7, 8, 9, 10, 11). Aktivnost lipaza određena je sukladno protokolima za spektrofotometrijski (**Tablica 3**) i titrimetrijski test (**Tablica 4**), ali uz korištenje gore navedenih pufera. U slučaju spektrofotometrijskog testa, ovi su puferi korišteni za pripremu reakcijske smjese, kao i za pripremu baždarnog dijagrama za određivanje molarnog apsorpcijskog koeficijenta *p*-nitrofenola, a u slučaju titrimetrijskog testa, umjesto dodatka 4 mL 200 mmol/L fosfatnog pufera pH 7,0 u reakcijsku smjesu je dodano 4 mL odgovarajućeg pufera.

Određivanje optimalne temperature za aktivnost lipaza provedeno je pri eksperimentalno određenom pH optimumu u rasponu temperatura od 30 do 60°C. Aktivnost lipaza određena je sukladno protokolima za spektrofotometrijski (**Tablica 3**) i titrimetrijski test (**Tablica 4**), pri temperaturama 30, 40, 50, 55 i 60°C, pri čemu su se koristili puferi pri kojima je ustanovljen pH optimum.

3.3.3. Sinteza biodizela

Sinteze biodizela provedene su transesterifikacijom svježeg jestivog ulja i metanola Amano lipazama podrijetlom iz *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* u kotlastom bioreaktoru pri reakcijskim uvjetima određenim biotehnološkom karakterizacijom navedenih lipaza (**Tablica 5**). Reakcije transesterifikacije su provedene svakom lipazom zasebno.

Tablica 5 Sastav reakcijskih smjesa i reakcijski uvjeti za sinteze biodizela

Lipaza	Sastav reakcijske smjese	Pufer	t [°C]	Oznaka uzorka biodizela
<i>Burkholderia cepacia</i>	163,63 g jestivog suncokretovog ulja + 20,35 g metanola + 16,36 g lipaze u puferu	Univerzalni pufer po Britton-Robinsonu pH 10,0	50	1
		Natrij-natrij fosfatni pufer pH 7,0	50	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Univerzalni pufer po Britton-Robinsonu pH 10,0	55	3
		Natrij-natrij fosfatni pufer pH 8,0	55	4

Od aparature korišten je kotlasti bioreaktor volumena 250 mL (**Slika 5**), vodena kupelj koja je održavala stalnu temperaturu reakcijske smjese i magnetna miješalica kako bi se osigurala homogenost reakcijske smjese (**Slika 9**).



Slika 9 Sinteza biodizela u kotlastom bioreaktoru

Reakcija je započela dodavanjem otopine enzima u puferu nakon što se reakcijska smjesa, sastavljena od ulja i metanola, homogenizirala i postigla jednoliku željenu temperaturu. Reakcijsku smjesu tvorilo je 163,63 g svježeg jestivog suncokretovog ulja, 20,35 g metanola (omjer ulja i metanola = 1:3,4) te 16,36 g puferske otopine enzima neophodne za postizanje aktivnosti od 500 U/g reakcijske smjese.

Nakon završetka sinteze, odnosno nakon 24 h, reakcijska smjesa kvantitativno je prenesena u lijevak za odjeljivanje kako bi se razdvojile faze tijekom 24 h. Gornju fazu tvorili su metilni esteri masnih kiselina (biodizel), dok su donju fazu predstavljale ostale komponente, odnosno glicerol, metanol, lipaza u puferu i voda (**Slika 10**). Nastalom biodizelu određen je udio metilnih estera masnih kiselina (FAME) plinskom kromatografijom nakon sinteze i nakon razdvajanja faza tijekom 24 h u lijevku za odjeljivanje.



Slika 10 Razdvojene faze reakcijske smjese nakon 24 h odjeljivanja u lijevku za odjeljivanje

3.3.4. Određivanje udjela metilnih estera masnih kiselina u biodizelu

Udio metilnih estera u biodizelu određen je na Shimadzu GC-2010 plinskom kromatografu opremljenom plameno-ionizacijskim detektorom (FID) i SH-Rtx-Wax kapilarnom kolonom ($L = 30$ m, $I.D. = 0,25$ mm, $d = 0,25$ μ m). Dušik je korišten kao plin nosioc s konstantnim linearnim protokom brzine od 1,33 mL/min, dok je kao otapalo korišten *n*-heptan. Početna temperatura kolone od 120 °C održavana je tijekom 5 min, a zatim se postupno povećavala za 5 °C/min do konačne temperature od 220 °C koja je održavana tijekom 15 min. Temperatura plameno-ionizacijskog detektora iznosila je 300 °C.

Da bi se odredio udio metilnih estera masnih kiselina u biodizelu, u eppendorficu je odmjereno 1980 μL heptana i 20 μL biodizela kako bi se postiglo razrjeđenje od 100x, odnosno kako bi dobivene vrijednosti bile u rasponu baždarnog dijagrama. Sadržaj eppendorfice promiješan je na vibrirajućoj miješalici i profiltriran u drugu eppendorficu preko filtera za špricu (nesterilni Hydrophobic PTFE Syringe filteri, pora: 0,45 μm , promjer: 25 mm). Zatim je sadržaj eppendorfice raspodijeljen u tri vijalice koje su analizirane na plinskom kromatografu.

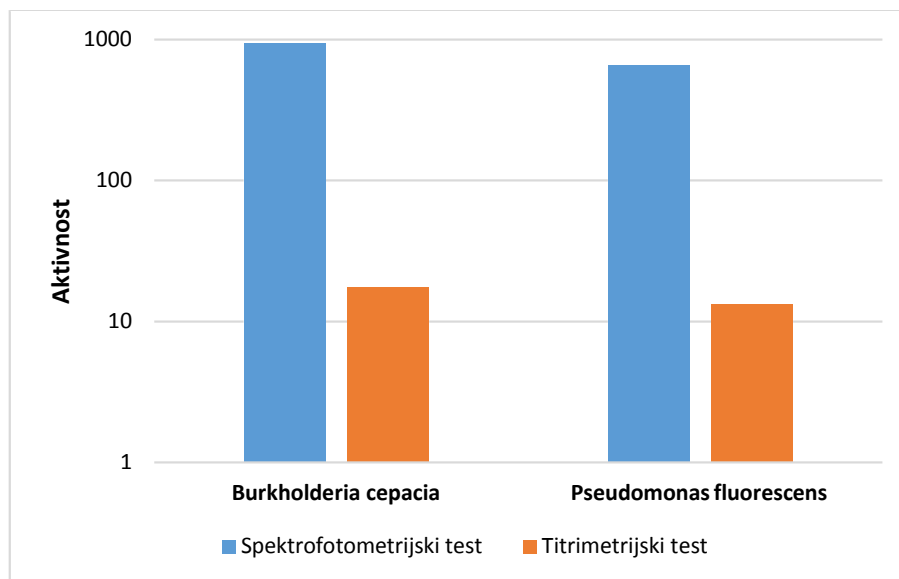
Identifikacija izdvojenih metilnih estera masnih kiselina (FAME) u uzorcima biodizela postignuta je na temelju usporedbe vremena zadržavanja s vremenom zadržavanja certificiranog referentnog standarda (Supelco F.A.M.E. Mix, C4-C24, St. Louis, SAD) analiziranog pod istim uvjetima. Rezultati su izraženi kao postotak identificirane masne kiseline u odnosu na ukupno određene masne kiseline (%).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. BIOTEHNOLOŠKA KARAKTERIZACIJA LIPAZA

Biotehnološka karakterizacija Amano lipaza porijeklom iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* uključila je određivanje dva ključna parametra: optimalnog pH i optimalne temperature za aktivnost lipaza i to primjenom oba testa za određivanje aktivnosti, spektrofotometrijskog i titrimetrijskog. Spektrofotometrijski test aktivnosti proveden je uz *p*-nitrofenilpalmitat kao supstrat, a titrimetrijski uz maslinovo ulje kao supstrat. Pri tome je ključno naglasiti da su za određivanje optimalnog pH za aktivnost lipaza korištena dva pristupa. U prvom slučaju su za određivanje optimalnog pH korišteni različiti puferski sustavi kako bi se postigao željeni raspon pH (6-10) i to natrijev fosfatni pufer za pH 6, 7 i 8, tris-HCl pufer za pH 8 i 9, te glicin-natrijev hidroksidni pufer za pH 9, i 10, a u drugom slučaju korišten je univerzalni Britton-Robinsonov pufer pri kojem je zapravo puferom istog sastava komponentata postignut raspon pH od 6 do 11. Zatim je pri eksperimentalno određenim uvjetima optimalnog pH provedeno ispitivanje utjecaja temperature na aktivnost lipaza i to pri temperaturama 30, 40, 50, 55 i 60°C, te je određena optimalna temperatura aktivnosti ispitivanih lipaza. Potom su eksperimentalno određeni pH optimum i optimalna temperatura za aktivnost lipaza primijenjeni u procesu biokatalitičke sinteze biodizela lipazama iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens*. Sve ovo trebalo je zapravo poslužiti kako bi se mogli predložiti adekvatni testovi i uvjeti za ispitivanje aktivnosti lipaza, a koji su povezani sa biokatalitičkom sintezom biodizela.

4.1.1. Usporedba aktivnosti lipaza određenih spektrofotometrijskim i titrimetrijskim testom

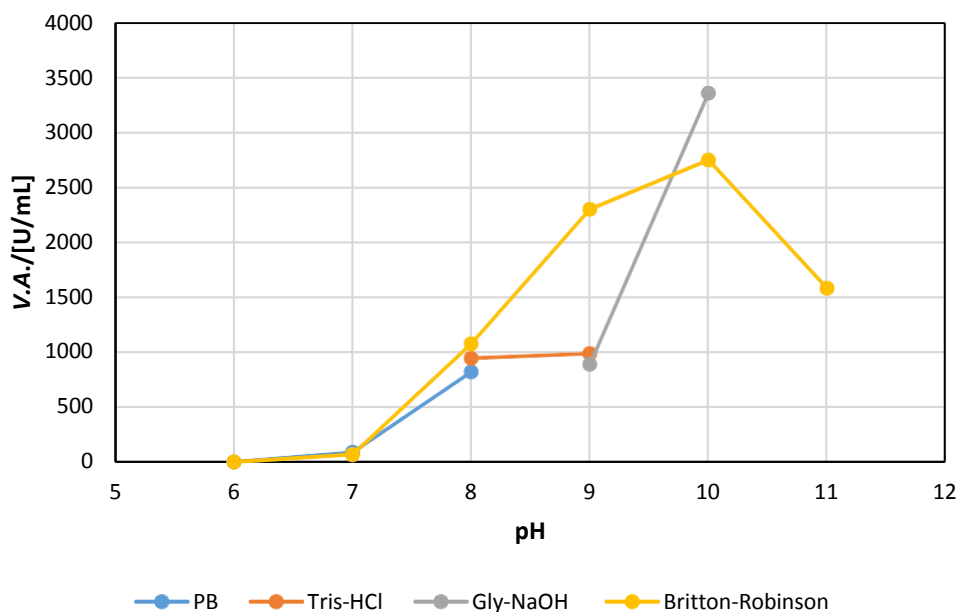


Slika 11 Usporedba aktivnosti lipaza određenih spektrofotometrijskim i titrimetrijskim testom pri standardnim reakcijskim uvjetima

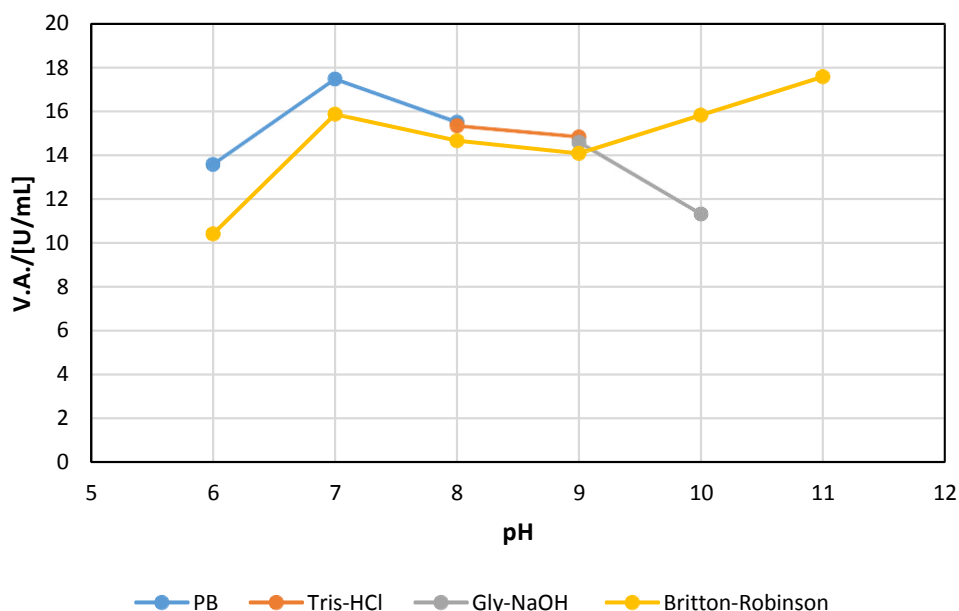
Iz **Slike 11** je vidljivo da spektrofotometrijski test pokazuje veće vrijednosti aktivnosti lipaza iz *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* u odnosu na titrimetrijski test, pri standardnim reakcijskim uvjetima. Za obje lipaze spektrofotometrijski test proveden je uz tris-HCl pufer pH vrijednosti 8,0 pri temperaturi od 40 °C, dok je titrimetrijski test proveden na istoj temperaturi, ali uz primjenu natrij fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0. Spektrofotometrijskim testovima uz primjenu lipaza iz *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* postižu se i do 50 puta veće vrijednosti aktivnosti u odnosu na rezultate dobivene titrimetrijskim testovima. Varijabilnost rezultata paralela titrimetrijskom metodom je manja od 1 %, dok je kod spektrofotometrijskog testa iznosila i 20 %. Iz rezultata je primjetno da lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* ima oko 30 % nižu aktivnost u odnosu na lipazu iz *Burkholderia cepacia*.

Na osnovi podataka, za lipazu iz *Burkholderia cepacia* ne može se odrediti koji je test pouzdaniji, budući da sintezom biodizela u reakcijskim uvjetima određenim pomoću oba testa nastaju podjednake količine metilnih estera (**Tablica 7**). U slučaju lipaze iz *Pseudomonas fluorescens*, na osnovu podataka, može se zaključiti da je prihvatljiviji titrimetrijski test (**Tablica 7**). Zbog lakšeg iščitavanja rezultata podatci optimalnog pH i temperaturnog optimuma prikazani su za svaki test zasebno.

4.1.2. pH optimum lipaza



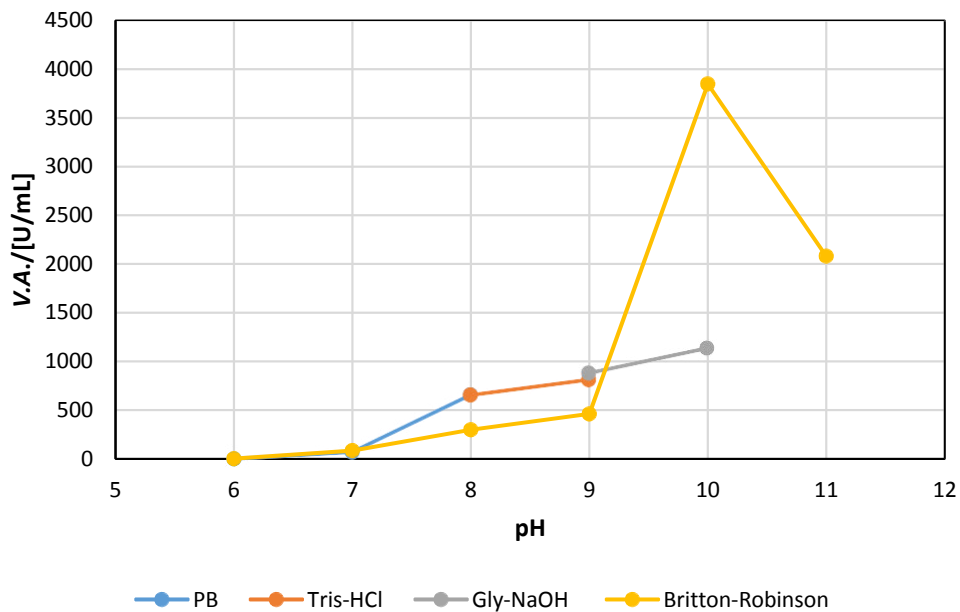
Slika 12 Ovisnost volumne aktivnosti lipaze iz *Burkholderia cepacia* o pH pri upotrebi sustava različitih pufera i univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu pri pH rasponu od 6,0 do 11,0 uz primjenu spektrofotometrijskog testa



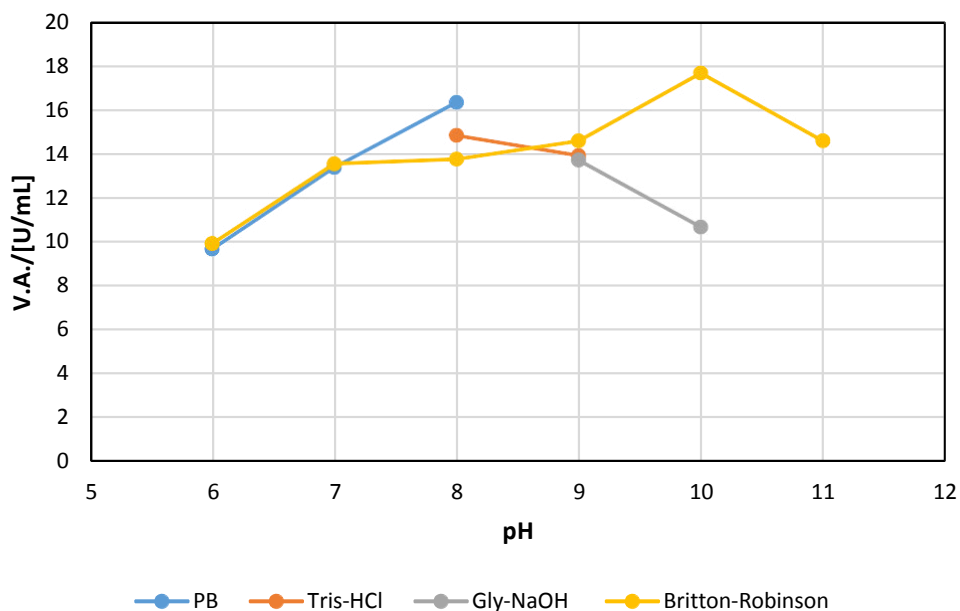
Slika 13 Ovisnost volumne aktivnosti lipaze iz *Burkholderia cepacia* o pH pri upotrebi sustava različitih pufera i univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu-u pri pH rasponu od 6,0 do 11,0 uz primjenu titrimetrijskog testa

Iz rezultata je vidljivo da pH utječe na aktivnost lipaze iz *Burkholderia cepacia*, ali da je aktivnost ovisna i o primjenjenom puferu. **Slika 12** prikazuje da se u rasponu pH od 6,0 do 8,0 pri upotrebi natrij fosfatnog pufera (PB) i univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu ne mogu zamijetiti značajnije razlike aktivnosti lipaze. Međutim, kako se povećava pH vrijednost vidljivo je da lipaza pokazuje znatno veću aktivnost u univerzalnog puferu po Britton-Robinsonu u odnosu na tris-HCl pufer te na glicin-NaOH pufer pri pH 9,0. Upotrebom sustava različitih pufera, aktivnost lipaze je znatno manja u odnosu na aktivnost postignutu upotrebom univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu pri pH 10,0, dok točka pri pH 11,0 nije određena budući da raspon glicin-NaOH pufera nije u tom navedenom rasponu. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da lipaza iz *Burkholderia cepacia* pokazuje optimalni pH pri 10,0 uz primjenu univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu, stoga je navedeni pufer pouzdaniji za određivanje spektrofotometrijskim testom. Međutim, optimalna pH vrijednost aktivnosti lipaze dobivena ovim testom ne odgovara vrijednostima koju su proizvođači naveli kao optimalnu (pH 7,0).

Iz **Slike 13** je vidljivo da oba puferka sustava u titrimetrijskom testu pokazuju slične vrijednosti aktivnosti lipaze iz *Burkholderia cepacia* u pH rasponu od 6,0 do 9,0. Međutim, primjenom univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu pri pH vrijednosti 10,0 i 11,0 došlo je do neutvrđenog rasta aktivnosti. Prema tome, kao optimalni određen je pH 7,0 postignut natrij fosfatnim puferom čime je ostvarena pH vrijednost koju su proizvođači naveli kao optimalnu.



Slika 14 Ovisnost volumne aktivnosti lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* o pH pri upotrebi sustava različitih pufera i univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu pri pH rasponu od 6,0 do 11,0 uz primjenu spektrofotometrijskog testa

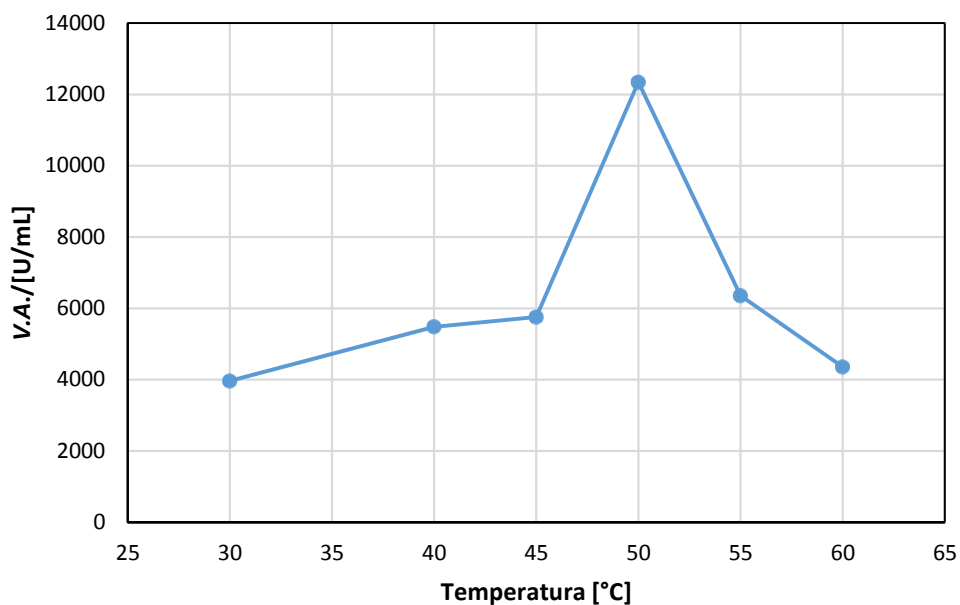


Slika 15 Ovisnost volumne aktivnosti lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* o pH pri upotrebi sustava različitih pufera i univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu pri pH rasponu od 6,0 do 11,0 uz primjenu titrimetrijskog testa

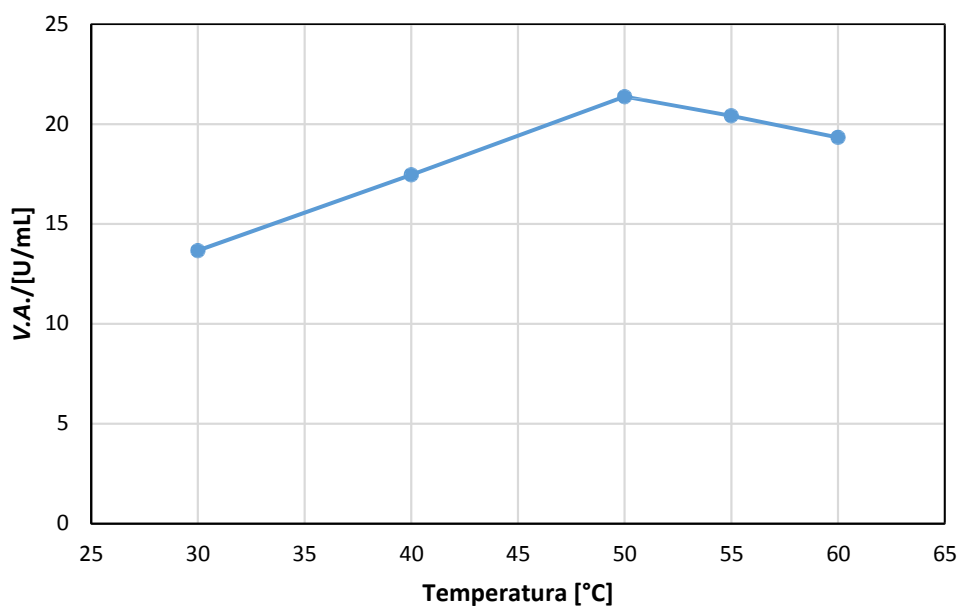
Slika 14 prikazuje promjene aktivnosti lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* primjenom univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu i sustava različitih pufera tijekom spektrofotometrijskog testa. U rasponu pH od 6,0 do 7,0 pri upotrebi natrij fosfatnog pufera i univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu ne mogu se zamijeniti značajnije razlike aktivnosti lipaze, no kako se povećava pH vrijednost povećavaju se razlike između navedenih pufera. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* pokazuje optimalni pH pri 10,0 uz primjenu univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu, stoga je navedeni pufer pouzdaniji za određivanje spektrofotometrijskim testom. Međutim, optimalna pH vrijednost aktivnosti lipaze dobivena ovim testom ne odgovara vrijednostima koju su proizvođači naveli kao optimalnu (pH 8,0).

Slika 15 prikazuje promjene aktivnosti lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* primjenom univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu i sustava različitih pufera tijekom titrimetrijskog testa. U rasponu pH od 6,0 do 7,0 pri upotrebi natrij fosfatnog pufera i univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu razlike su minimalne, no pri pH 8,0 uslijedile su veće razlike u vrijednostima aktivnosti lipaze. Iako je najveća aktivnost postignuta pri pH 10,0 primjenom univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu, zbog oscilacija rezultata prilikom ponavljanja testa, kao optimalna određena je pH vrijednost 8,0 postignuta natrij fosfatnim puferom čime je za lipazu iz *Pseudomonas fluorescens* postignuta pH vrijednost navedena kao optimalna od strane proizvođača.

4.1.3. Optimalna temperatura za aktivnost lipaza



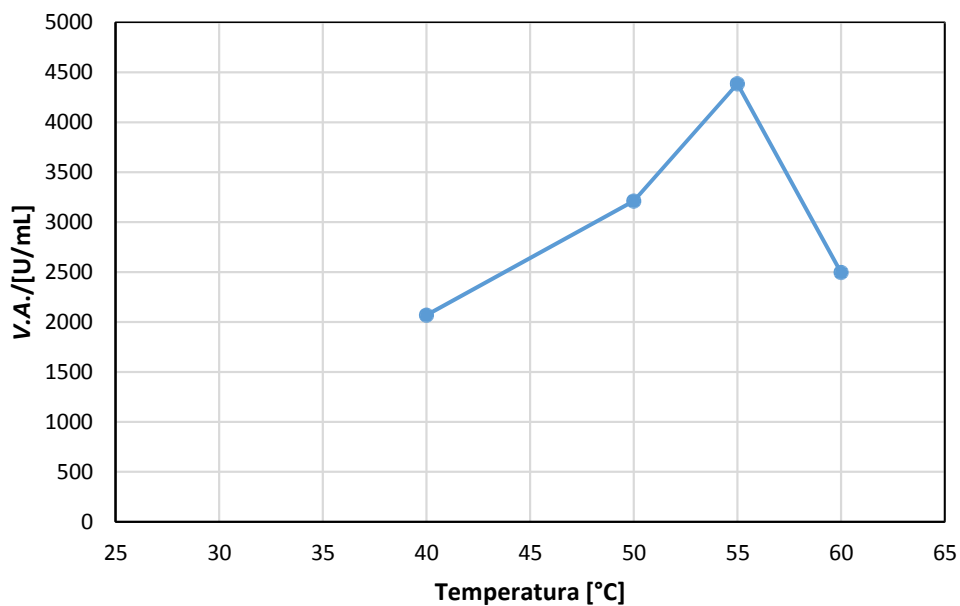
Slika 16 Ovisnost volumne aktivnosti lipaze iz *Burkholderia cepacia* o temperaturi u rasponu od 30 do 60 °C pri upotrebi pufera po Britton-Robinsonu optimalne pH vrijednosti 10,0 uz primjenu spektrofotometrijskog testa



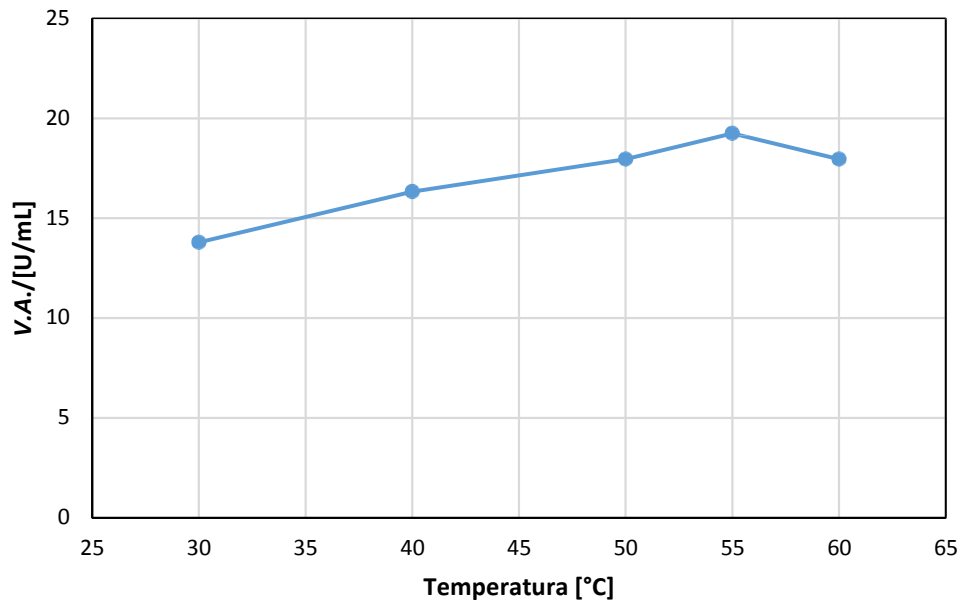
Slika 17 Ovisnost volumne aktivnosti lipaze iz *Burkholderia cepacia* o temperaturi u rasponu od 30 do 60 °C pri upotrebi natrij fosfatnog pufera optimalne pH vrijednosti 7,0 uz primjenu titrimetrijskog testa

Rezultati pokazuju da aktivnost lipaze iz *Burkholderia cepacia* osim o promjeni pH vrijednosti ovisi i o promjeni temperature. **Slika 16** prikazuje optimalnu temperaturu aktivnosti lipaze, određenu spektrofotometrijskim testom, uz primjenu univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu optimalne pH vrijednosti 10,0. Porastom temperature dolazi i do porasta aktivnosti lipaze pri čemu se najveća aktivnost postiže pri 50 °C. Stoga je navedena temperatura određena kao optimum.

Slika 17 prikazuje optimalnu temperaturu aktivnosti lipaze, određenu titrimetrijskim testom, uz primjenu natrij fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0. I u ovom slučaju najveća aktivnost lipaze postiže se pri temperaturi od 50 °C koja je prema tome određena kao optimalna. U oba testa, uz primjenu različitih pufera različite pH vrijednosti postignuta je optimalna temperatura aktivnosti lipaze iz *Burkholderia cepacia* koju su proizvođači naveli kao optimalnu za navedenu lipazu.



Slika 18 Ovisnost volumne aktivnosti lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* o temperaturi u rasponu od 40 do 60 °C pri upotrebi pufera po Britton-Robinsonu optimalne pH vrijednosti 10,0 uz primjenu spektrofotometrijskog testa



Slika 19 Ovisnost volumne aktivnosti lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* o temperaturi u rasponu od 30 do 60 °C pri upotrebi natrij fosfatnog pufera optimalne pH vrijednosti 8,0 uz primjenu titrimetrijskog testa

Rezultati pokazuju da aktivnost lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* osim o promjeni pH vrijednosti ovisi i o promjeni temperature. **Slika 18** prikazuje optimalnu temperaturu aktivnosti lipaze određenu spektrofotometrijskim testom, uz primjenu univerzalnog pufera po Britton-Robinsonu optimalne pH vrijednosti 10,0. U ovom slučaju pri temperaturi od 55 °C postignuta je najveća aktivnost lipaze, stoga je navedena temperatura određena kao optimum.

Slika 19 prikazuje optimalnu temperaturu aktivnosti lipaze, određenu titrimetrijskim testom uz primjenu natrij fosfatnog pufera pH vrijednosti 8,0. I u ovom slučaju najveća aktivnost lipaze postiže se pri temperaturi od 55 °C koja je prema tome određena kao optimalna. U oba testa postignuta je optimalna temperatura aktivnosti lipaze iz *Pseudomonas fluorescens* koju su proizvođači naveli kao optimalnu za navedenu lipazu.

Tablica 6 Optimalni uvjeti postignuti biotehnoškom karakterizacijom lipaza

Lipaza	Test	Optimalni pH	Optimalna temperatura [°C]
<i>Burkholderia cepacia</i>	Spektrofotometrijski	10,0	50
	Titrimetrijski	7,0	50
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Spektrofotometrijski	10,0	55
	Titrimetrijski	8,0	55

4.2. UDIO METILNIH ESTERA MASNIH KISELINA U BIODIZELU

Tablica 7 prikazuje srednje vrijednosti udjela i sastav metilnih estera masnih kiselina u svakom od uzoraka biodizela sintetiziranog transesterifikacijom iz svježeg jestivog ulja i metanola u kotlastom bioreaktoru, tijekom 24 h, kataliziranom lipazama iz *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens*, sa svakom lipazom odvojeno, u reakcijskim uvjetima (optimalni pH i temperatura) koji su određeni biotehnoškom karakterizacijom navedenih lipaza. Nakon sinteze biodizela, iz gornje faze reakcijske smjese koju tvore metilni esteri masnih kiselina, uzeti su uzorci za određivanje udjela i sastava FAME na plinskom kromatografu.

Tablica 7 Srednje vrijednosti udjela metilnih estera masnih kiselina u sintetiziranom biodizelu

Udio metilnih estera masnih kiselina (%)	Broj uzorka biodizela*			
	1	2	3	4
C14:0	0,07	0,07	-	-
C16:0	6,45	6,42	5,11	8,55
C16:1	0,12	0,11	-	-
C18:0	2,96	2,96	-	-
C18:1	28,40	28,20	11,37	12,06
C18:2	58,17	58,13	30,17	41,21
C18:3	0,21	0,21	-	-

C20:0	0,16	0,05	-	-
C20:1	0,06	0,14	-	-
C22:1	0,68	0,68	-	-
C22:2	0,29	0,31	8,12	10,06
Ukupni nastali metilni esteri masnih kiselina	97,6	97,3	54,8	71,9

*Broj uzorka biodizela: 1 *B. cepacia*, univerzalni pufer po Britton-Robinsonu pH 10,0, 50 °C
 2 *B. cepacia*, natrij fosfatni pufer pH 7,0, 50 °C
 3 *P. fluorescens*, univerzalni pufer po Britton-Robinsonu pH 10,0, 55 °C
 4 *P. fluorescens*, natrij fosfatni pufer pH 8,0, 55 °C

Udio metilnih estera pripadajućih masnih kiselina u produktu (biodizelu) kreće se u rasponu od 54,8 do 97,6%. Najveći udio metilnih estera u iznosu od 97,6%, određen je u uzorku biodizela broj 1, dobivenom reakcijom kataliziranom lipazom iz *Burkholderia cepacia*, pri temperaturi od 50 °C, uz primjenu univerzalnog pufer po Britton-Robinsonu pH vrijednosti 10,0 za pripremu lipaze.

Udio metilnih estera masnih kiselina biodizela, prema normi HRN:EN 14214, treba biti jednak ili veći od 96,5%. Uzorci biodizela 1 i 2 (biokatalizator lipaza iz *Burkholderia cepacia*) zadovoljavaju normu s vrijednostima udjela metilnih estera masnih kiselina od 97,6 i 97,3%. Nasuprot tome, uzorci biodizela 3 i 4 (biokatalizator lipaza iz *Pseudomonas fluorescens*) ne zadovoljavaju normu s vrijednostima udjela metilnih estera masnih kiselina od 54,8 i 71,9% (Tablica 7).

Pretpostavlja se da je reakcija katalizirana lipazom iz *Burkholderia cepacia* dala bolje rezultate jer je ta lipaza nespecifična, dok je lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* 1,3-specifična. Naime, molekula glicerola, kao osnovni gradivni element triacilglicerola, sadrži dvije primarne (pozicije sn-1 i sn-3) i jednu sekundarnu hidroksilnu skupinu (pozicija sn-2). Nespecifične lipaze ne pokazuju specifičnost u pogledu pozicije na molekuli glicerola stoga hidroliziraju primarne i sekundarnu estersku vezu u molekuli triacilglicerola gotovo istom brzinom. Prema tome, lipaza iz *B. cepacia* potpuno cijepa triacilglicerole do slobodnih masnih kiselina i glicerola, odnosno sve tri masne kiseline dostupne su za metiliranje. S druge strane, lipaza iz *P. fluorescens* hidrolizira primarne esterske veze u molekuli triacilglicerola, ali nije sposobna

svojim aktivnim mjestom doći do esterske veze masne kiseline pozicionirane na drugom mjestu molekule glicerola, odnosno samo dvije masne kiseline su dostupne za metiliranje. Stoga, umjesto tri metilna estera masnih kiselina od jedne molekule triacilglicerola nastaju dvije molekule metil estera masnih kiselina i jedna molekula monoacilglicerola s masnom kiselinom pozicioniranom na drugom mjestu molekule glicerola.

5. ZAKLJUČCI

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

1. Dokazano je da na aktivnost Amano lipaza iz *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* utječu korišteni supstrati (*p*-nitrofenil palmitat i maslinovo ulje), vrsta i pH vrijednost pufera te temperatura na kojoj su se provodili testovi određivanja biotehnoloških svojstva lipaza.
2. Spektrofotometrijskim testovima uz primjenu lipaza iz *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* postižu se i do 50 puta veće vrijednosti aktivnosti u odnosu na rezultate dobivene titrimetrijskim testovima.
3. Primjenom spektrofotometrijskog testa lipaza iz *Burkholderia cepacia* pokazuje najveću aktivnosti primjenom pufera po Britton-Robinsonu pH vrijednosti 10,0 pri temperaturi od 50 °C. Titrimetrijskim testom navedena lipaza pokazuje najveću aktivnost primjenom natrij fosfatnog pufer pH vrijednosti 7,0 pri temperaturi od 50 °C.
4. Primjenom spektrofotometrijskog testa lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* pokazuje najveću aktivnosti primjenom pufera po Britton-Robinsonu pH vrijednosti 10,0 pri temperaturi od 55 °C. Titrimetrijskim testom navedena lipaza pokazuje najveću aktivnost primjenom natrij-natrij fosfatnog pufer pH vrijednosti 8,0 pri temperaturi od 55 °C.
5. Najveći ukupni udio metilnih estera masnih kiselina od 97,6% postignut je sintezom biodizela uz biokatalizator lipazu iz *Burkholderia cepacia* pripremljenu u puferu po Britton- Robinsonu pH vrijednosti 10,0 pri temperaturi od 50 °C, nakon 24 h.
6. Zbog svoje nespecifičnosti lipaza iz *Burkholderia cepacia* pokazuje veću efikasnost u proizvodnji biodizela u odnosu na 1,3-specifičnu lipazu iz *Pseudomonas fluorescens*.

6. LITERATURA

- Ahmad, A.L., Mat Yasin, N.H., Derek, C.J.C., Lim, J.K. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 15: 584-593, 2011.
- Ali, A.S., Elozeiri, A.A. Metabolic Processes During Seed Germination. In *Advances in Seed Biology*. Intech, Egypt, 2017.
- Bart, J.C.J., Palmeri, N., Cavallaro, S. Industrial process technology for biodiesel production. In *Biodiesel science and technology: From soil to oil*. Woodhead Publishing Series in Energy, UK, 2010.
- Budžaki, S., Miljić, G., Tišma, M., Sundaram, S., Hessel, V. Is there a future for enzymatic biodiesel industrial production in microreactors?. *Applied Energy* 201: 124-134, 2017.
- Budžaki, S., Miljić, G. Otpadno ulje i nusproizvodi prehrambene industrije kao sirovine za proizvodnju biodizela. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.
- Dwivedee, B.P., Bhaumik, J., Rai, S.K., Laha, J.K., Baanerjrr, U.C. Development of nanobiocatalysts through the immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase for applications in efficient kinetic resolution of racemic compounds. *Bioresource Technology* 239: 464-471, 2017.
- Gomzi, Z. *Kemijski reaktori*. Hinus, Zagreb, 1998.
- Grbavčić, S.Ž. Proizvodnja mikrobnih lipaza i proteaza kao aditiva u formulacijama detergenata. *Doktorska disertacija*. Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2014.
- Güzel, G. *Sustainable Biocatalytic Biodiesel Production - A Thermodynamic Analysis*. Aarhus University, Denmark, 2012.
- Houde, A., Kademi, A., Leblanc, D. Lipases and their industrial applications: an overview. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 118(1-3): 155-170, 2014.
- Ma, F., Hanna, M.A. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology* 70: 1-15, 1999.
- Meher, L.C., Vidya Sagar, D., Naik, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 10: 248-268, 2006.
- Muralidhar, R.V., Chirumamilla, R.R., Marchant, R., Ramachandran, V.N., Ward, O.P., Nigram, P. Understanding lipase stereoselectivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18: 81-97, 2002.
- Mustranta, A., Forssell, P., Poutanen, K. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme Microb Technology* 15(2): 133-9, 1993.
- Ognjanović, N.D., Petrović, S.D., Bezbradica, D.I., Knežević-Jugović, Z.D. Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela. *Hemijska industrija* 64: 1-8, 2010.

- Palacios, D., Busto, M., Ortega, N. Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media. *LWT-Food Science and Technology* 55: 536-542, 2014.
- Pereira, C.O., Portilho, M.F., Henriques, C.A., Zotin, F.M.Z. SnSO₄ as Catalyst for Simultaneous Transesterification and Esterification of Acid Soybean Oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 25: 2409-2416, 2014.
- Rajalingam, A., Jani, S.P., Senthil Kumar, A., Adam Kham, M. Production methods of biodiesel. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 8(3): 170-173, 2016.
- Salis A., Pinna, M., Monduzzi, M., Solinas, V. Biodiesel production from triolein and short chain alcohols through biocatalysis. *Journal of Biotechnology* 119: 291-299, 2005.
- Sanchez, D.A., Tonetto, G.M., Ferreira, M.L. Burkholderia cepacia lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnology and bioengineering* 115(1): 6-24, 2018.
- Sinčić, D. *Biodizel-Svojstva i tehnologija proizvodnje*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.
- Sinčić, D. Kemijsko-inženjerski aspekti proizvodnje biodizela. I. Biogoriva, svojstva biodizela i osnove proizvodne tehnologije. *Kemija u industriji* 63(1-2): 19-31, 2014.
- Van Gerpen, J. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology* 86: 1097-1107, 2005.
- Van Gerpen, J., Shanks, B., Pruszko, R. *Biodiesel production technology*. National Renewable Energy Laboratory, USA, 2004.
- Vargas, M., Niehaus, X., Casas-Godoy, L., Sandoval, G. Lipases as biocatalyst for biodiesel production. *Methods in Molecular Biology* 1835: 377-390, 2018.
- Yücel, S., Terzioğlu, P., Özcimen, D. Lipase Applications in Biodiesel Production. In *Biodiesel - Feedstocks, Production and Applications*. IntechOpen, Istanbul, 2012.