Kinetička karakterizacija lipaze iz Thermomyces lanuginosus i njezina upotreba u proizvodnji biodizela iz suncokretovog ulja

Ćurić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:109:537050

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ana Ćurić

KINETIČKA KARAKTERIZACIJA LIPAZE IZ *THERMOMYCES LANUGINOSUS* I NJEZINA UPOTREBA U PROIZVODNJI BIODIZELA IZ SUNCOKRETOVOG ULJA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, srpanj, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek, Hrvatska

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija
Nastavni predmet: Kemijski i biokemijski reaktori
Tema rada je prihvaćena na VIII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 23. travnja 2015.
Mentor: Doc. dr. sc. *Marina Tišma*

KINETIČKA KARAKTERIZACIJA LIPAZE IZ *THERMOMYCES LANUGINOSUS* I NJEZINA UPOTREBA U PROIZVODNJI BIODIZELA IZ SUNCOKRETOVOG ULJA

Ana Ćurić, 251/DI

Sažetak:

Cilj ovoga rada bio je razviti kinetički model hidrolize *p*-NPP-a katalizirane lipazom koristeći tri različita otapala (acetonitril, metanol i etanol), procijeniti kinetičke parametre procesa (V_m i K_m), istražiti utjecaj koncentracije enzima, vrste otapala i temperature na aktivnost lipaze te provesti jednostupanjsku i četverostupanjsku reakciju enzimske sinteze biodizela iz jestivog suncokretovog ulja. Mjerenjima početne reakcijske brzine pokazano je da su najveće volumne aktivnosti lipaze postignute koristeći 5 % (g/g) koncentraciju enzima u pokusima sa svim ispitanim otapalima ($V_{m,etanol}$ = 1373,852 U/mL, $V_{m,acetonitril}$ = 318,817 U/mL, $V_{m,metanol}$ = 1141,068 U/mL). Najveći afinitet prema supstratu (*p*-NPP) lipaza pokazuje u sustavu s acetonitrilom kao otapalom (K_m = 1,0217 mM). U jednostupanjskim i četverostupanjskim procesima proizvodnje biodizela iz jestivog suncokretovog ulja pri različitim temperaturama (T = 40 – 60 °C), najviši udio metil estera postignut je pri T = 40 °C. U jednostupanjskoj reakciji udio metil estera iznosi 94,9 % nakon 96 sati, dok je za isto vrijeme u četverostupanjskoj reakciji udio metil estera iznosio 89,0 %.

Ključne riječi: enzimska sinteza biodizela, lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*

Rad sadrži: Stranica: 41
Slika: 15
Tablica: 4
Literaturnih referenci: 29

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

1.	izv. prof. dr. sc. *Ivica Strelec*	predsjednik
2.	doc. dr. sc. *Marina Tišma*	član-mentor
3.	doc. dr. sc. *Sandra Budžaki*	član
4.	izv. prof. dr. sc. *Mirela Planinić*	zamjena člana

Datum obrane: 16. srpnja 2015.

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

BASIC DUCUMENTATION 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

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Biotechnology
Course title: Chemical and biochemical reactors
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food technology Osijek at its session no. VIII. held on April 23rd, 2015.
Mentor: *Marina Tišma*, PhD, assistant prof.

KINETIC CHARACTERIZATION OF LIPASE FROM *THERMOMYCES LANUGINOSUS* AND ITS USE IN THE PRODUCTION OF BIODIESEL FROM SUNFLOWER OIL

Ana Ćurić, 251/DI

Summary:
The aim of this study was to develop a kinetic model for hydrolysis of *p*-NPP catalyzed with lipase using three different solvents (acetonitrile, methanol and ethanol), to evaluate the kinetic parameters (V_m and K_m), to investigate the influence of enzyme concentration, solvent type and temperature on lipase activity and to perform single step and four step reaction of biodiesel synthesis from edible sunflower oil catalyze by lipase. The initial reaction rate measurements shown that the highest volume activity of lipase was achieved using 5% (g/g) concentration of enzyme in the assays with all tested solvents ($V_{m,\ ethanol}$ = 1373.852 U/mL, $V_{m,\ acetonitrile}$ = 318.817 U/mL, $V_{m,methanol}$ = 1141.068 U/mL). The highest affinity to the substrate (*p*-NPP) lipase shows in reaction with acetonitrile (K_m = 1.0217 mM). In the single step and four step process of biodiesel production from edible sunflower oil at different temperatures (T = 40 – 60 °C), the highest fatty acids methyl esters share were achieved at T = 40 °C. 94.9 % fatty acids methyl esters share was achieved in single step reaction after 96 h and 88.9 % in four step reaction for the same duration.

Key words: enzymatic production of biodiesel, lipase from *Thermomyces lanuginosus*

Thesis contains: Pages: 41
Figures: 15
Tables: 4
References: 29

Original in: Croatian

Defense committee:

1. *Ivica Strelec*, PhD, associate prof. — chair person
2. *Marina Tišma*, PhD, assistant prof. — supervisor
3. *Sandra Budžaki*, PhD, assistant prof. — member
4. *Mirela Planinić*, PhD, associate prof. — stand-in

Defense date: July 16, 2015.

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

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Marini Tišma na predloženoj temi, brojnim savjetima i poticajima te strpljivosti tijekom izrade diplomskog rada.

Doc. dr. sc. Sandri Budžaki zahvaljujem na posvećenom vremenu i korisnim savjetima tijekom provedbe pokusa u laboratoriju.

Hvala svim profesorima, kolegama i prijateljima na dobronamjernim savjetima i lijepim riječima tijekom studiranja.

Najveća hvala mojim roditeljima i sestri koji su uvijek bili uz mene te mi pružali podršku i neizmjernu ljubav tijekom cijelog studiranja.

Sadržaj

1. Uvod 1
2. Biodizel 4
2.1. Idustrijska proizvodnja biodizela 6
2.2. Enzimska proizvodnja biodizela 7
2.3. Lipaze 11
2.3.1. Porijeklo lipaza 11
2.3.2. Specifičnost lipaza 12
2.3.3. Imobilizacija enzima 12
2.4. Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* 13
2.5. Razvoj kinetičkog modela 14
3. Eksperimentalni dio 16
3.1. Cilj rada 17
3.2. Materijali 17
3.2.2. Priprema otopina 17
3.3. Metode 19
3.3.1. Mjerenje aktivnosti enzima lipaze metodom početnih brzina 19
3.3.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije enzima lipaza na volumnu aktivnost enzima 19
3.3.3. Ispitivanje utjecaja temperature na volumnu aktivnost enzima 20
3.4. Procjena kinetičkih parametara nelinearnom regresijom 20
3.5. Proizvodnja biodizela 20
3.5.1. Jednostupanjska reakcija enzimske proizvodnje biodizela 21
3.5.2. Četverostupanjska reakcija enzimske proizvodnje biodizela 21
3.6. Određivanje koncentracije estera 22
3.7. Određivanje gustoće proizvedenog biodizela 22
4. Rezultati i rasprava 23
4.1. Rezultati utjecaja koncentracije enzima lipaze na volumnu aktivnost enzima 24
4.2. Rezultati utjecaja temperature na volumnu aktivnost enzima 30
4.3. Jednostupanjska proizvodnja biodizela 33
4.4. Četverostupanjska proizvodnja biodizela 34
4.5. Određivanje gustoće biodizela 35
5. Zaključci 36
6. Literatura 38

Popis oznaka, kratica i simbola

Δ	promjena
p	para položaj
EC	(*Enzyme classification*) klasifikacija enzima
E	enzim
S	supstrat
ES	enzim-supstrat kompleks
c	množinska koncentracija tvari (mM)
c_S	množinska koncentracija supstrata (mM)
d	promjer kivete (cm)
K_m	Michaelis-ova konstanta (mM)
m	masa (g)
n	broj okretaja miješala (o/min)
PBS	(*Phosphate buffer saline*) fosfatni pufer
r_S	reakcijska brzina (U/mL)
T	temperatura (°C)
T_v	temperatura vrelišta (°C)
V_E	volumen dodanog uzorka u kojem se nalazi enzim (μL)
V_r	ukupni volumen uzorka u kiveti (μL)
V_m	maksimalna reakcijska brzina (U/mL)
V.A.	volumna aktivnost enzima (U/mL)
X	udio (%)
ε	ekstinkcijski koeficijent (L/mmol·cm)
$\frac{\Delta A}{\Delta t}$	promjena apsorbancije u vremenu (min^{-1})
λ	valna duljina (nm)

1. Uvod

Posljednjih nekoliko desetljeća razvija se ljudska svijest o zaštiti okoliša. Smanjenje resursa nafte dovodi populaciju do potražnje alternativnih izvora energije, posebno goriva koja će zamijeniti konvencionalna kao što je to dizel. Alternativna goriva mogu biti iz različitih krutih, tekućih ili plinovitih bioloških izvora, kao jedno takvo je i biodizel. To je tekuće organsko, neotrovno i biorazgradivo gorivo koje se proizvodi iz bioloških izvora biljnih ulja, životinjske masti, otpadnog ulja ili algi. Ovakvo gorivo je ekološki prihvatljivo jer su emisije ugljikovog dioksida onolike koliko kultura za proizvodnju biodizela apsorbira iz atmosfere, ne dolazi do stvaranja sumporovog dioksida prilikom sagorijevanja goriva te su smanjene emisije drugih štetnih tvari kao što je toluol, čađ i ugljikov monoksid.

Proizvodnja biodizela može se provesti trima postupcima, transesterifikacijom, pirolizom i mikroemulzifikacijom. Transesterifikacija je najkorištenija metoda u kojoj sudjeluje triglicerol i alkohol u prisutnosti katalizatora, kemijskog ili enzimskog, pri čemu nastaju alkil esteri (biodizel) i glicerol.

Ovisno o vrsti primijenjenog katalizatora, postoje dva tipa proizvodnje biodizela, enzimski i kemijski postupak. U industriji se uglavnom koristi kemijski postupak u kojem se upotrebljavaju lužine i kiseline kao katalizator. Uglavnom su to natrijeva i kalijeva lužina jer se dobiju visoki prinosi estera kao krajnjeg proizvoda. Međutim, najveći nedostatak kemijske proizvodnje je nastanak sapuna, kao jednog od proizvoda, te se time otežava separacija proizvoda, smanjuje se prinos i čistoća estera. Ovi nedostaci mogu se izbjeći korištenjem enzima kao katalizatora u proizvodnji biodizela.

Enzimska proizvodnja biodizela je jednostavniji postupak proizvodnje alkil estera visoke čistoće. Transesterifikacija enzimom kao biokatalizatorom odvija se pri blagim reakcijskim uvjetima, pri čemu ne nastaju nusproizvodi kao što su sapuni ili kemijski otpad. Kinetika odvijanja enzimskog procesa ovisi o brojnim faktorima: o vrsti i obliku enzima (slobodnog ili imobiliziranog), temperaturi procesa, tipu alkohola, molnim odnosima alkohola i ulja, prisutnosti organskog otapala, udjelu vode i prisutnosti glicerola. U teorijskom dijelu ovoga rada opisan je svaki od navedenih faktora enzimske proizvodnje biodizela.

Katalizatori koji se koriste u reakcijama transesterifikacije su lipaze porijeklom iz različitih izvora, životinjskih, biljnih ili mikrobnih. Mikrobne lipaze imaju niz prednosti nad ostalim izvorima lipaza, te se najčešće koriste u reakcijama transesterifikacije, budući se

mogu izolirati iz brojnih mikroorganizama, a uporaba lipaza može biti u imobiliziranom ili slobodnom obliku.

Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* je jedna od mikrobnih lipaza, gljivičnog porijekla, koja je u ovom radu korištena u slobodnom obliku za sintezu biodizela. Prije postupka sinteze, provedeno je mjerenje volumne aktivnosti u ovisnosti o temperaturi i koncentraciji enzima u tri različita otapala, procijenjeni su kinetički parametri nelinearnom regresijom pomoću programskog paketa Scientist.

Postupak sinteze biodizela proveden je u kotlastom reaktoru, jednostupanjskom i četverostupanjskom reakcijom transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja s metanolom i enzimom lipazom iz *Thermomyces lanuginosus* pri tri različite temperature (T = 40, 50 i 60 °C). Dobiveni rezultati uspoređeni su s literaturnim podacima.

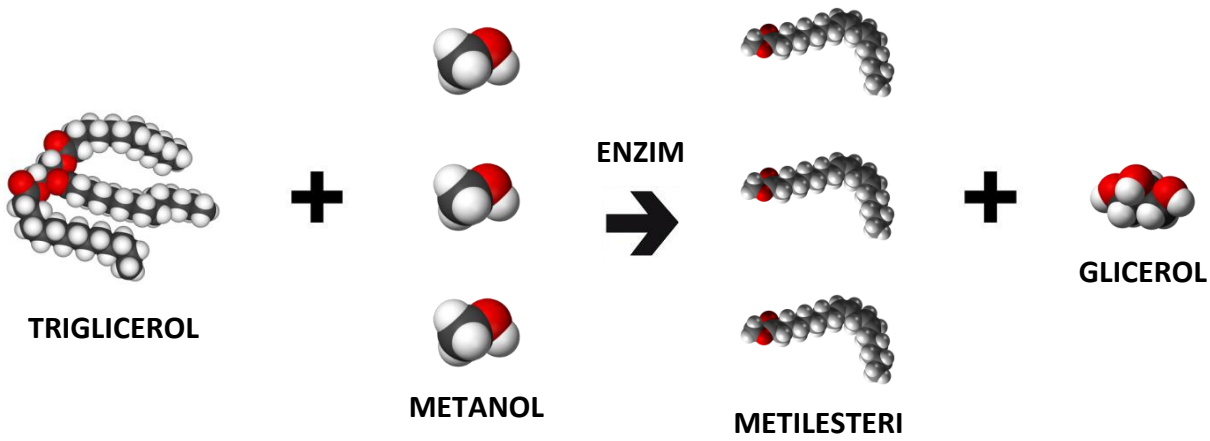
2. Biodizel

Posljednjih godina značajno se razvija potražnja za alternativnim izvorima energije, posebno za gorivima koja mogu zamijeniti konvencionalna kao što su to ona za dizel motore, budući da se smanjuju rezerve nafte u svijetu te raste globalna svijest o zaštiti okoliša. Jedno od takvih alternativnih goriva je biodizel koji se smatra ekološki prihvatljivim jer ne zagađuje životnu sredinu.

Biodizel je tekuće organsko, neotrovno i biorazgradivo gorivo proizvedeno iz bioloških izvora masti i ulja, najčešće poljoprivrednih kultura ili otpadnog ulja pa su emisije ugljikovog dioksida onolike koliko kultura apsorbira iz atmosfere (Stamenković i sur., 2005.; Kiš i sur., 2005.). Ovakvo gorivo je netoksično jer prilikom sagorijevanja ne dolazi do stvaranja sumporovog dioksida, budući da u svom sastavu ne sadrži spojeve sa sumporom. Nadalje, smanjena je emisija drugih štetnih tvari kao što su čađ i toluol te ugljikovog monoksida do 48 % u odnosu na konvencionalna goriva (Ognjanović i sur., 2010.; Drapcho i sur., 2008.).

Biodizel se može proizvesti transesterifikacijom, pirolizom (kreking) te mikoremulzifikacijom. Piroliza ili kreking je postupak konverzije organske tvari u drugu organsku tvar primjenom topline. Pirolizirani materijali mogu biti biljna ulja, životinjske masti, prirodne masne kiseline ili metil esteri masnih kiselina. Mikroemulzifikacija je postupak dobivanja emulzija koje su čisti, stabilni izotropni fluidi s tri komponente (uljna faza, vodena faza i površinski aktivna tvar) (Abbaszaadeh i sur., 2012.; Balat, Balat , 2010.).

Transesterifikacija alkoholom je najčešće korištena metoda dobivanja biodizela, kao glavnog proizvoda, i glicerola. Postupak se sastoji od tri reverzibilne reakcije kod kojih se iz triglicerola viših masnih kiselina s alkoholom u prisutnosti katalizatora dobije smjesa alkilestera (biodizel) (Ranganathan i sur., 2007.; Abbaszaadeh i sur., 2012.). U reakciji (Slika 1.) jedne molekule triacilglicerola s tri mola alkohola nastaju diacilglicerol i monoacilglicerol koji se dalje razlažu sve do glicerola. U svakom stupnju nastaje po jedan metil ester s različitom funkcionalnom skupinom, ta smjesa metil estera naziva se biodizel. Kao supstrati najčešće se upotrebljavaju suncokretovo, sojino ili repičino ulje, a od alkohola se najčešće koriste metanol i etanol. U svrhu ubrzanja kemijske reakcije, u kemijskom procesu proizvodnje koriste se kiseline ili lužine kao katalizatori, a enzimski proces kataliziran je enzimima, odnosno biokatalizatorima (Christopher i sur., 2014., Stamenković i sur., 2005.; Fernandez-Laufente, 2009.).



Slika 1. Reakcija transesterifikacije

2.1. Industrijska proizvodnja biodizela

U industrijskom mjerilu proces proizvodnje najčešće se odnosi na transesterifikaciju triglicerola kemijskim katalizatorima (najčešće natrijeva i kalijeva lužina, sumporna kiselina te natrijev metoksid) s metanolom (Pandey i sur., 2011.; Drapcho i sur., 2008.). Transesterifikacija ulja ili masti lužinama ima veći prinos (94-99 % natrijevim i kalijevim lužinama) te nižu proizvodnu cijenu u odnosu na reakciju kataliziranu kiselinama, zbog čega se lužine češće koriste u industrijskoj proizvodnji biodizela (Ranganathan i sur., 2007.).

Omjer metanola i ulja u ovakvom procesu je 6:1, negdje čak i veći u korist alkohola, jer alkohol povećava prinos proizvoda (Christopher i sur., 2014.). Ovakav način proizvodnje ima određene nedostatke kao što je veći energetski utrošak, potreba za neutralizacijom katalizatora, otežano izdvajanje glicerola iz reakcijske smjese te stvaranje nusproizvoda (sapuna) koji na kraju otežavaju postupak separacije proizvoda, što za posljedicu ima nastajanje velikih količina otpadne vode koju je naknadno potrebno zbrinuti (Ognjanović i sur., 2010.).

Nastanak sapuna može stvoriti i emulzije pri čemu se smanjuje prinos i čistoća estera. Da bi se spriječila saponifikacija, potrebno je provesti predobradu slobodnih masnih kiselina u metilestere, pri čemu se dodaje sumporna kiselina pri visokim temperaturama (Christopher i sur., 2014.).

Navedeni nedostaci kemijske proizvodnje biodizela mogu se zaobići korištenjem heterogenih katalizatora (hidroksida i oksida zemno-alkalijskih metala), transesterifikacijom

u superkritičnim uvjetima ili primjenom enzima kao biokatalizatora (Stamenković i sur., 2005., Bradić i sur., 2010.).

2.2. Enzimska proizvodnja biodizela

Enzimska transesterifikacija je jednostavniji postupak od kemijske, pri čemu se dobije proizvod visoke čistoće pa se smanjuju troškovi faze pročišćavanja proizvoda, reakcija se odvija pri blagim reakcijskim uvjetima (temperatura od 30 do 60 °C), ne nastaje kemijski otpad niti sapuni kao nusprodukti. Ovakav način proizvodnje još nije naišao na industrijsku primjenu zbog moguće inhibicije enzima metanolom, gubitka aktivnosti te visoke cijene enzima (Ranganathan i sur., 2007.).

Kinetika odvijanja enzimskog procesa uvjetovana je različitim faktorima: uporabom slobodnog ili imobiliziranog enzima, vrstom i oblikom enzima, temperaturom procesa, molnim odnosom alkohola i ulja, prisutnošću organskog otapala i vrsti samog otapala, sadržajem vode u uljima te prisutnošću glicerola (Stamenković i sur., 2005.; Surinenaite i sur., 2009.).

Supstrati za enzimsku proizvodnju biodizela

Izbor sirovine ovisi o kinetici procesa te fizikalnim i kemijskim karakteristikama jestivih ili otpadnih ulja i masti.

Izvori triglicerola su: suncokretovo, sojino, repičino, palmino ulje, ulje iz sjemenki kikirikija, duhana, pamuka, *Jatropha* ulje, otpadno ulje, životinjski loj, salo, riblje ulje te alge. Najznačajnija sirovina za proizvodnju biodizela je upravo uljana repica zbog visokog sadržaja ulja (42 - 46 %) i bjelančevina (preko 20 %) (Kiš i sur., 2005.).

Prilikom odabira sirovine, cijena predstavlja ograničavajući faktor, ali uporaba otpadnog ulja ili životinjske masti mogu riješiti taj problem. Osim niske cijene, alternativne sirovine jestivim uljima imaju manje proizvodne zahtjeve, lako su dostupne, postoje određeni nedostaci kao što su niži prinos i manja kvaliteta proizvoda. Životinjske masti povećavaju klizavost prilikom rada motora, stvara se zaštitni sloj pa se sprječavaju gubici od habanja pri radu motora.

Kvaliteta biodizela vezana je uz sadržaj masnih kiselina u sirovini (ulju ili masti). Niski cetanski broj goriva ukazuje na prisutnost nezasićenih masnih kiselina, linolne (C18:2) i linolenska (C18:3), tipično nađene u sojinom ulju, a viši cetanski broj na zasićene masne kiseline kao palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0), prisutne u palminom ulju. Cetanski broj je mjera zapaljivosti goriva pri kompresiji, odgovara postotnom udjelu cetana u smjesi s α-naftalenom. Cetan je ugljikovodik lako zapaljiv pri kompresiji te je njegov broj 100 (Christopher i sur., 2014.).

Acil akceptori

Prinos biodizela povećava se povećanjem koncentracije alkohola do određene koncentracije, ovisno o reakcijskim uvjetima, tipu reakcije, biokatalizatoru, temperaturi, intenzitetu miješanja, vlažnosti i udjelu slobodnih masnih kiselina u supstratu te modelu bioreaktora.

Proizvodnja biodizela zahtjeva uporabu jeftinih i lako dostupnih acilnih akceptora (alkohola) kao što su metanol ili etanol. Za proizvodnju biodizela, uz dva navedena, mogu se koristiti: propanol, butanol i amilni alkohol (Pandey i sur., 2011.). Povećanjem broja ugljikovih atoma, povećava se i cetanski broj, tj. toplinska moć proizvedenog biodizela, međutim, vrijedi da lipaze mogu efikasno katalizirati reakcije ukoliko su supstrati (ulje i alkohol) topljivi jedan u drugom. Alkoholi koji imaju manje od tri ugljikova atoma su polarni, nisu ili su vrlo malo topljivi u uljima, dok su oni s većim ugljikovodičnim lancem topljivi u uljima. Zbog toga se često prilikom uporabe metanola ili etanola koriste organska otapala koja pospješuju ovakve vrste reakcija. Organska se otapala u industrijskoj proizvodnji ne preporučuju, budući da njihovom uporabom rastu troškovi procesa jer ih je potrebno izdvojiti nakon proizvodnje.

U slučaju bez otapala reakcije transesterifikacije mogu biti poboljšane dodavanjem površinski aktivnih tvari, kao što je Tween-40, Tween-80 ili Triton X-100, koji stabiliziraju enzim.

Ukoliko se ne koriste otapala u procesu proizvodnje, prinos se može povećati imobilizacijom enzima, kao takve lipaze mogu se koristiti one izolirane iz *Thermomyces lanuginosus*, *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus oryzae*,

Pseudomonas cepacia i drugih, imobilizirane najčešće na čvrstom nosaču ili nekom drugom tehnikom.

Za većinu reakcija transesterifikacija, kao alkohol se koristi metanol zbog niske cijene i visokog prinosa, a dobiveni metil esteri viših masnih kiselina lakše se odvajaju od glicerola s kojim se slabo miješaju. Metanol je toksičan, u slučaju gutanja i smrtonosan, te izaziva sljepoću pa se ne smatra ekološki prihvatljivim. Kao zamjena za metanol, koristi se ekološki prihvatljiv etanol, koji manje inhibira aktivnost enzima.

Inhibicija aktivnosti enzima alkoholom može se smanjiti na tri načina: prihranjivanjem alkohola u obrocima (višestupanjska reakcija), uporabom organskih otapala (heksan, *terc*-butanol, 1,4-dioksan, aceton), te uporabom alternativnih acil akceptora (dugolančani alkoholi i alkil esteri) (Christopher i sur., 2014.; Ognjanović i sur., 2010.; Robles-Medina i sur., 2009.).

Lipaze kao biokatalizatori zahtijevaju manji omjer alkohola i ulja nego što je to slučaj kod kemijskih katalizatora. Da bi se povećala brzina reakcije i smanjio utjecaj difuzije na brzinu reakcije, potrebno je dodavati alkohol u suvišku. Najčešći molarni omjer alkohol:ulje je između 3:1 i 6:1, u korist alkohola. Prema Wu, (2003.) optimalni omjer metanol:ulje iznosi 3,4:1 pri čemu se dobiju prinosi estera veći od 90 %. Ukoliko se provodi četverostupanjska reakcija, na početku reakcije omjer metanol:ulje je 1:1, a svaka 24 sata dodana je nova količina alkohola u omjeru metanol:ulje od 0,8:1. Nakon provedene četverostupanjske reakcije prinos estera iznosio je 90,2 %. Rodriques i sur. (2010.), usporedili su stabilnost imobilizirane lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* provedbom jednostupanjske i trostupanjske reakcije. U jednostupanjskoj reakciji prinos estera iznosio je 70 %, dok je u trostupanjskoj reakciji prinos bio 85 % (Christopher i sur., 2014.; Aransiola i sur., 2013.; Wu i sur., 2003.; Rodriques i sur. 2010.).

Potrebno je poznavati optimalni odnos metanola i ulja, jer povećanje udjela alkohola iznad optimalne koncentracijske vrijednosti može smanjiti prinos biodizela, budući da dolazi do inhibicije enzima vezanjem alkohola na enzim (Stamenković i sur., 2005.).

Udio vode u reakcijskoj smjesi

Kinetika enzimski katalizirane reakcije ovisi i o udjelu vode prisutne u reakcijskoj smjesi s organskim otapalom. Lipaze su enzimi koje kataliziraju reakcije na granici organske i

vodene faze. Aktivnost lipaze ovisi o međufaznoj površini ulja i vode, a raste s povećanjem udjela vode. Budući da lipaze kataliziraju i hidrolizu, pri prevelikim udjelima vode u reakcijskoj smjesi može doći do hidrolize produkta, zato je potrebno znati optimalni udio vode koji ovisi o vrsti te obliku enzima i supstrata.

Provođenjem enzimske transesterifikacije bez organskog otapala, slobodni enzim je potrebno dodavati u suspenziji s vodom ili puferom. Oblik enzima, slobodni ili imobilizirani, određuje količinu vode u reakcijskoj smjesi. Pri udjelu vode manjem od optimalnog, prinos alkil estera bit će manji jer dolazi do inhibicije enzima alkoholom. Prilikom transesterifikacije rafiniranih ulja preporuča se udio vode u reakcijskoj smjesi od 4 do 30 %, a u slučaju lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* optimalni udio vode je 2 % (Stamenković i sur., 2005., Christopher i sur., 2014.).

Temperatura procesa

Transesterifikacija se provodi pri temperaturi ispod temperature vrenja alkohola da se spriječi isparavanje alkohola, [T_v(metanola) = 65 °C te T_v(etanola) = 78 °C]. Optimalna reakcijska temperatura ovisi o obliku i vrsti korištenog enzima, a za većinu lipaza je između 30 i 60 °C, s prosjekom od 40 °C. Kod transesterifikacije suncokretovog ulja primjenom lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* optimalna temperatura je 50 °C, a u slučaju imobilizirane lipaze iz *Thermomyces lanuginosus* ona je od 40 do 50 °C. Više reakcijske temperature snižavaju viskoznost ulja, povećavaju stupanj reakcije i smanjuju vrijeme trajanja reakcije. Bakterijske lipaze pokazuju najveću termostabilnost koja se može povećati i imobilizacijom enzima na čvrsti nosač (Stamenković i sur., 2005., Ognjanović i sur., 2010.; Yan i sur., 2014.).

Glicerol

Osim alkil estera enzimskom transesterifikacijom nastaje i glicerol pri čemu je omjer prinosa glicerol:biodizel 1:10. Glicerol značajno utječe na aktivnost enzima tako što se adsorbira na nosač imobilizirane lipaze pri čemu se smanjuje vezanje supstrata na aktivno mjesto enzima. Kako bi se smanjio negativni utjecaj glicerola na aktivnost enzima, može se provoditi polukontinuirani proces koji u prvom stupnju uključuje provedbu transesterifikacije, a u drugom ispiranje katalizatora i izdvajanje glicerola. Izdvojeni glicerol se može nakon toga koristiti u proizvodnji hrane, kozmetike, boja, lijekova, papira, tekstila, pasti za zube, životinjske masti, omekšivača, duhana, emulgatora, bioplina i raznih kemikalija

što pozitivno utječe na ukupnu financijsku bilancu proizvodnje biodizela (Stamenković i sur., 2005.; Christopher i sur., 2014.).

2.3. Lipaze

Sve veća pozornost pridaje se upravo lipazama kao biokatalizatorima u procesu proizvodnje biodizela, s nadom da će u skoroj budućnosti zamijeniti kemijske katalizatore. Lipaze ili triacilglicerolester hidrolaze (EC 3.1.1.3) su enzimi koji mogu sudjelovati u reakcijama hidrolize esterske veze triglicerola te reakciji između hidroksilne grupe alkohola i karboksilne skupine masnih kiselina. Budući da mogu sudjelovati u reakcijama esterifikacije i hidrolize, koriste se kao biokatalizatori u reakcijama transesterifikacije.

Lipaze su vrlo rasprostranjene, mogu biti biljnog, životinjskog i mikrobnog porijekla. Uporabom lipaza mikrobnog porijekla ostvaruju se viši prinosi enzima, moguć je uzgoj na jeftinim hranjivim podlogama te je moguća genetička manipulacija. Zbog toga najveći biotehnološki značaj imaju lipaze izolirane iz mikroorganizama, koje su najčešće ekstracelularni enzimi (Ognjanović i sur., 2010.; Fernandez-Laufente, 2009.).

2.3.1. Porijeklo lipaza

Lipaze za proces proizvodnje biodizela izolirane su iz brojnih mikrobnih vrsta: *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Rhizopus oryzae*, *Rhizomucor miehei*, *Candida rugosa*, *Thermomyces lanuginosus* te *Candida antarctica* (Abbaszaadeh i sur., 2012.).

Mikrobne lipaze su većinom ekstracelularne, izolirane iz mezofilnih i termofilnih mikroorganizama s optimalnom aktivnošću od 35 do 50 °C te od 60 do 80 °C. Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* najveću aktivnost pokazuje pri temperaturi od 50 °C pri metanolizi suncokretovog ulja. Većina mezofilnih lipaza je nestabilna pri temperaturama iznad 70 °C gdje termofilne lipaze pokazuju aktivnost sve do 100 °C, u prisutnosti organskog otapala i površinski aktivnih tvari. Istraživanja su pokazala da se aktivnost enzima povećava porastom temperature do određene granice, nakon čega slijedi nagli pad aktivnosti (denaturacija

proteina). Temperaturnu stabilnost može povećati imobilizacija enzima (Christopher i sur., 2014.).

2.3.2. Specifičnost lipaza

Postoji nekoliko vrsta specifičnosti lipaznih enzima: prema esteru, pozicijska specifičnost, prema masnim kiselinama te stehiometrijska specifičnost.

Specifičnost prema esteru odnosi se na vrste estera na koje djeluju (tri-, di- ili monoacilgliceroli). Pozicijska specifičnost dijeli lipaze na *sn*-1,3 specifične (hidroliziraju primarnu estersku vezu u molekuli triglicerola) te nespecifične lipaze (hidroliziraju primarnu i sekundarnu vezu u molekuli triglicerola približno istom brzinom). U proizvodnji metilestera (biodizela) važna je specifičnost prema masnim kiselinama jer dužina lanca masnih kiselina utječe na brzinu reakcije. Ovisno o porijeklu, lipaze pokazuju različite specifičnosti prema masnim kiselinama. Stereokemijska specifičnost očituje se u djelovanju enzima samo na jednom od dva moguća stereokemijska oblika supstrata (Christopher i sur., 2014.; Robles-Medina i sur., 2009.; Fernandez-Laufente, 2009.; Kapoor, Gupta, 2011., Ognjanović i sur., 2010.; Bradić i sur., 2010.).

Aktivnost lipaze ovisi o dužini lanca alkohola, najveći afinitet lipaza prema supstratu pokazuje u reakciji s primarnim alkoholima (metanol, etanol), zatim sekundarnim te s tercijarnim alkoholima (Kapoor, Gupta, 2011.).

2.3.3. Imobilizacija enzima

U svrhu povećanja stabilnosti, povećanja aktivnosti lipaza, ponovne uporabe, lakše separacije te regeneracije biokatalizatora i proizvoda provodi se imobilizacija enzima. Time se omogućava sniženje troškova proizvodnje biodizela i drugih proizvoda jer se imobiliziranim enzimom mogu provoditi kontinuirani procesi.

Imobilizaciju je moguće provesti na četiri načina: vezanje (adsorpcija) na čvrsti nosač, enkapsulacija, kovalentno vezanje i ionska izmjena. Od navedenih metoda najčešće se koristi adsorpcija na čvrsti nosač, iako se trenutna istraživanja baziraju na imobilizaciji unakrsnim vezanjem. Unakrsno vezanje ima određene prednosti nad adsorpcijom na čvrstom nosaču,

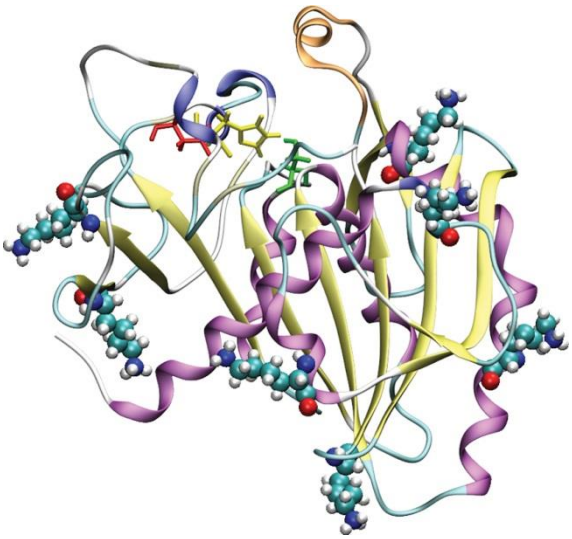
neke od njih su: visoka aktivnost enzima, visoka stabilnost proizvedene superstrukture, ušteda novca izostavljajući materijal za nosač, nema potrebe za pročišćavanjem enzima. Imobilizacijom enzima povećava se radni vijek enzima pa se nakon završetka reakcije transesterifikacije enzim, u slučaju šaržnog procesa, iz reakcijske smjese odvoji dekantiranjem ili filtracijom (Christopher i sur., 2014., Robles-Madina i sur., 2009.).

2.4. Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*

Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* (Slika 2.), prije nazvana *Humicola lanuginosa*, je jednolančani protein sastavljen od 269 aminokiselina, gljivičnog je porijekla, molekulske mase 31,700 g/mol s temperaturnim optimumom od oko 50 °C. Konformacija ovog enzima je sferičnog oblika s katalitičkim mjestom sastavljenim od serina, histidina i asparginske kiseline unutar hidrofobnog dijela enzima koje je blokirano poklopcem od 85 do 93 aminokiseline. Konformacija enzima mijenja se u prisutnosti supstrata koji se pri određenim uvjetima veže na aktivno mjesto (Turcu, 2010.; Zheng i sur., 2011.; Kapoor, Gupta, 2012.).

Visoka aktivnost i stabilnost *Thermomyces lanuginosus* lipaze omogućava njenu široku primjenu: u dvofaznim sustavima voda-organsko otapalo, reakcijskim medijima bez otapala, u ionskim kapljevinama, superkritičnim fluidima te u mikroemulzijama (Fernandez-Laufente, 2009.).

Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* većinom se imobilizira na akrilnoj smoli i kao takva, pri optimalnim uvjetima, nakon 24 sata reakcije na ulju uljane repice daje prinos od 97 % proizvoda (Christopher i sur., 2014.; Pandey i sur., 2011.).



Slika 2. Lipaza iz *Thermomyces lanuginosus*

2.5. Razvoj kinetičkog modela

Leonor Michaelis i Maud Menten razvili su jednostavan kinetički model za odvijanje enzimskih reakcija. Model se temelji na pretpostavci da se supstrat (S) veže na aktivno mjesto enzima (E) pri čemu nastaje enzim-supstrat kompleks (ES). Enzim-supstrat kompleks (ES) može se disocirati u enzim (E) i supstrat (S) ili prevesti u produkt (P).

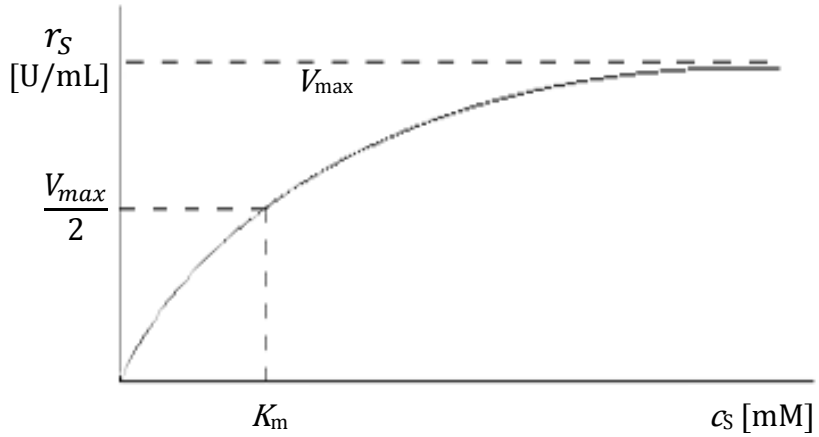
$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Slika 3. Mehanizam enzimske reakcije

Ispitivanjem enzimske kinetike mjeri se brzina vezanja supstrata na enzim. Najčešće se koristi metoda mjerenja početne reakcijske brzine. Pri malim koncentracijama supstrata (c_S) početna reakcijska brzina gotovo linearno ovisi o koncentraciji supstrata (c_S) pa ovaj slučaj pripada prvom redu reakcije. Povećanjem koncentracije supstrata (c_S) početna reakcijska brzina raste eksponencijalno, i to područje naziva se područje Michaelis-Menteničine kinetike. Kada je koncentracija supstrata (c_S) velika i kada se aktivna mjesta na enzimu popune supstratom, krivulja rasta početne reakcijske brzine zauzima nulti red reakcije. Daljnjim povećanjem koncentracije supstrata (c_S) ne raste reakcijska brzina. Tada je

postignuta maksimalna reakcijska brzina (V_{max}). Opisani kinetički model prikazan je jednadžbom (1) i na slici (4).

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m + c_S} \tag{1}$$



Slika 4. Michaelis Menten-ična kinetika

gdje su r_S početna reakcijska brzina (U/mL), V_m ili V_{max} najveća moguća teorijska brzina koja bi se mogla postići kod određene koncentracije enzima (U/mL), c_S koncentracija supstrata (mM), K_m Michaelis-ova konstanta ili ona koncentracija supstrata koja je potrebna da bi se ostvarila polovica maksimalne brzine (mM). V_m i K_m su kinetički parametri koji se mogu procijeniti linearnom ili nelinearnom regresijom (Azocar i sur., 2014., Kovačević, 2008.).

Kod enzimskih reakcija, kinetički parametri se često procjenjuju na temelju rezultata dobivenih metodom početnih brzina, kojom se prati početna reakcijska brzina pri različitim početnim koncentracijama supstrata, ili mjerenjima u šaržnim pokusima kojima se prati promjena koncentracije supstrata s vremenom, a početna se brzina izračunava iz nagiba tangente na krivulju u vremenu nula.

Ovim mjerenjima se dobije nelinearna ovisnost početne reakcijske brzine (izračunata vrijednost) o početnoj koncentraciji supstrata te se iz ovih podataka procjenjuju kinetički parametri, kao što je spomenuto, linearnom ili nelinearnom regresijom. Jedan od načina procjene kinetičkih parametara nelinearnom regresijom je primjena programskog paketa *Scientist* (Scientist handbook, 1986.-1995.).

3. Eksperimentalni dio

3.1. Cilj rada

Cilj rada bio je:

a) razviti kinetički model hidrolize para-nitrofenil palmitat (*p*-NPP-a) katalizirane lipazom koristeći tri različita otapala (acetonitril, metanol i etanol) te procijeniti kinetičke parametre procesa (V_m i K_m)

b) provesti enzimsku sintezu biodizela u jednostupanjskoj i četverostupanjskoj reakciji.

3.2. Materijali

Tijekom istraživanja korišteni su:

- suncokretovo ulje (uljara Čepin, Hrvatska)
- metanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- etanol (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- acetonitril (Sigma Aldrich, SAD)
- lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* (Sigma Aldrich, SAD)
- Triton X-100 (Sigma Aldrich, SAD)
- Tween-80
- *p*-nitrofenil palmitat (*p*-NPP) (Sigma Aldrich, SAD)
- fosfatni pufer (PBS) (Sigma Aldrich, SAD)

3.2.2. Priprema otopina

Priprema fosfatnog (PBS) pufera

Otopina pufera pripremljena je otapanjem praha fosfatnog pufera (PBS pufer) u 1 L deionizirane vode da bi se dobila otopina pufera koncentracije c= 0,01 M (c_{NaCl} = 0,138 M; c_{KCl} = 0,0027 M), pH = 7,4 pri 25 °C.

Priprema otopine enzima

Pripremljene su otopine enzima različitih koncentracija: 2,5 % (g/g), 5 % (g/g) i 10 % (g/g) u fosfatnom puferu.

Priprema otapala

Za pripremu otapala, 50 mL acetonitrila otopljeno je u 50 mL Triton X-100 (1:1, v/v), 50 mL metanola otopljeno je u 50 mL Triton X-100 (1:1, v/v) te 50 mL etanola otopljeno je u 50 mL Triton X-100 (1:1, v/v).

Priprema supstrata

Otopina supstrata *p*-NPP-a (para-nitrofenil palmitat) u otapalu pripremljena je otapanjem 0,1894 g *p*-NPP u 100 mL otapala, pripremljenog na prethodno opisani način.

3.2.3. Aparatura

Za određivanje aktivnosti enzima lipaze korišten je dvozračni spektrofotometar (UV 1700, Shimadzu, Kyoto, Japan).



Slika 5. Spektrofotometar

Plinski kromatograf

Sadržaj estera masnih kiselina određivan je na plinskom kromatografu (GC-2014, Shimadzu, Kyoto, Japan).



Slika 6. Plinski kromatograf

3.3. Metode

3.3.1. Mjerenje aktivnosti enzima lipaze metodom početnih brzina

Aktivnost enzima lipaze određena je spektrofotometrijski. Mjerenje apsorbancije je provedeno u UV kiveti unutarnjeg promjera (*d*) 1 cm, pri valnoj duljini (*λ*) od 405 nm u vremenskom periodu (*t*) od 100 s. Iz dobivene vrijednosti promijene apsorbancije u vremenu (d*A*/d*t*) izračunata je volumna aktivnost (*V.A.*) enzima lipaze prema jednadžbi (2).

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (2)$$

gdje je *V.A.* volumna aktivnost enzima lipaze (U/mL), V_r ukupni volumen uzorka u kiveti (µL), ε ekstincijski koeficijent (ε_{405} = 0,0555 L/mmol·cm), *d* promjer kivete (*d* = 1 cm), V_E volumen dodanog enzima (µL), $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca, min^{-1}).

3.3.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije enzima lipaza na volumnu aktivnost enzima

Određivanje utjecaja koncentracije enzima na volumnu aktivnost provedeno je metodom početnih brzina na spektrofotometru u UV kiveti ukupnog volumena od 2100 µL pri valnoj duljini od 405 nm. Ispitivanje je provedeno u tri različita otapala (acetonitril, metanol i etanol), pri temperaturi od 40 °C te pri tri različite koncentracije enzima (enzim:

2,5, 5 i 10 %, g/g). Iz dobivene promjene apsorbancije u vremenu (d*A*/d*t*) izračunata je volumna aktivnost (*V*.*A*.) prema jednadžbi (1).

3.3.3. Ispitivanje utjecaja temperature na volumnu aktivnost enzima

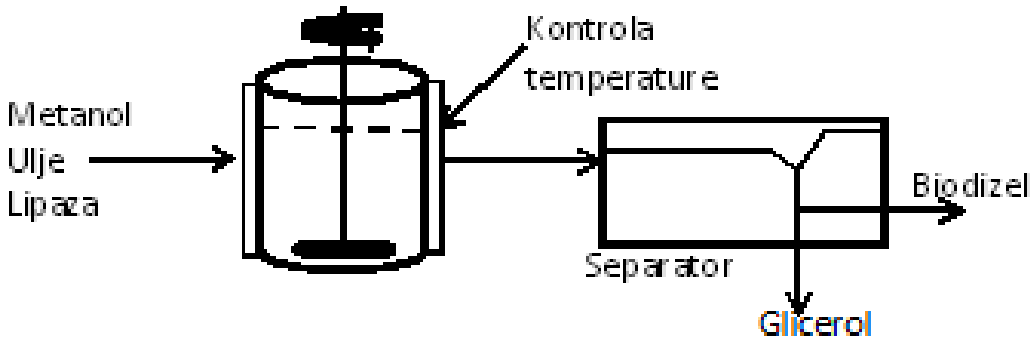
Istraživanje utjecaja temperature na volumnu aktivnost enzima provedeno je metodom početnih brzina na spektrofotometru u UV kiveti ukupnog volumena od 2100 µL pri valnoj duljini od 405 nm. Ispitivanje je provedeno u tri različita otapala (acetonitril, metanol i etanol), pri temperaturnom rasponu od 30 °C do 60 °C te pri tri različite koncentracije enzima (enzim: 2,5, 5 i 10 %, g/g). Iz dobivene promjene apsorbancije u vremenu (d*A*/d*t*) izračunata je volumna aktivnost (*V*.*A*.) prema jednadžbi (1).

3.4. Procjena kinetičkih parametara nelinearnom regresijom

Nakon provedenog mjerenja metodom početnih reakcijskih brzina na spektrofotometru, dobiveni su rezultati promijene apsorbancije u vremenu (d*A*/d*t*) pomoću kojih je izračunata volumna aktivnost (*V*.*A*.). U programskom paketu *Scientist* odabran je Michaelis Menten-ičin kinetički model, zadane su zavisne i nezavisne varijable, uneseni su rezultati dinamičke promjene apsorbancije u vremenu (zavisna varijabla) za svaku koncentraciju supstrata (nezavisna varijabla), a za procjenu parametara korištena je simpleks metoda i metoda najmanjih kvadrata. Rezultati dobiveni pomoću matematičkog modela su uspoređeni sa eksperimentalnim podacima te su po potrebi ponovno proračunati u programu sve dok nije postignuta minimalna pogreška između eksperimentalnih i procijenjenih vrijednosti. Razlika između eksperimentalnih vrijednosti i onih izračunatih po modelu dana je kao suma kvadrata odstupanja.

3.5. Sinteza biodizela

Sinteza biodizela transesterifikacijom iz jestivog suncokretovog ulja s metanolom provedena je u kotlastom reaktoru, uz lipazu iz *Thermomyces lanuginosus* kao biokatalizatorom. Provedena su dva pokusa: šaržni (jednostupanjska reakcija) i šaržni s pritokom (četverostupanjska reakcija).



Slika 7. Shematski prikaz enzimske sinteze biodizela

3.5.1. Jednostupanjska reakcija enzimske sinteze biodizela

U jednostupanjskoj reakciji, pripremljena je reakcijska smjesa na način da je metanol dodan u suvišku u odnosu na suncokretovo ulje (ulje:metanol = 1:3,4, v/v). Masa reakcijske smjese bila je 550,95 g, od čega je masa suncokretovog ulja m_{ulja} = 450 g, masa metanola m_{MetOH} = 55,95 g, masa dodane lipaze m_{lipaze} = 45 g, pripremljene u 0,01 M fosfatom puferu pri 7,4 pH (m_{lipaze}:m_{ulja} = 1:10). Provedena su tri pokusa pri tri različite temperature (T = 40, 50 i 60 °C). Pokusi su trajali 96 sati, uz konstantno miješanje (n = 600 o/min). Svakih 12 sati uzorkovano je 100 µL uzorka koji su potom analizirani na plinskom kromatografu. Nakon provedenog pokusa, glicerol je razdvojen od biodizela u lijevku za odjeljivanje.

3.5.2. Četverostupanjska reakcija enzimske sinteze biodizela

Reakcijska smjesa sastojala se iz suncokretovog ulja, metanola i enzima u puferskoj otopini. Na početku kemijske reakcije metanol i ulje su u reaktor dodani u jednakim molarnim omjerima (ulje:metanol = 1:1, v/v), svaka sljedeća 24 sata metanol je dodavan u obrocima (ulje:metanol = 1:0,8, v/v), dok se pri zadnjem dodavanju nije postigao molarni omjer metanola i ulja kao i u jednostupanjskoj reakciji (ulje:metanol = 1:3,4, v/v). Masa reakcijske smjese na kraju procesa sinteze biodizela bila je 550,95 g, od čega je masa suncokretovog ulja m_{ulja} = 450 g, masa metanola m_{MetOH} = 55,95 g, masa dodane lipaze m_{lipaze}= 45 g, pripremljene u 0,01 M fosfatom puferu pri 7,4 pH (m_{lipaze}:m_{ulja} = 1:10).

Provedena su tri pokusa pri tri različite temperature (T = 40, 50 i 60 °C). Pokusi su trajali 96 sati, uz konstantno miješanje (n = 600 o/min). Svakih 12 sati uzorkovano je 100 µL uzorka koji su potom analizirani na plinskom kromatografu. Nakon provedenog pokusa, glicerol je razdvojen od biodizela u lijevku za odjeljivanje.

3.6. Određivanje koncentracije estera

Sadržaj estera određivan je na plinskom kromatografu Shimadzu GC-2014 (Kyoto, Japan) opremljenim s plameno ionizacijskim detektorom (FID detektor - *Flame Ionization Detector*) i autosampler-om koristeći helij kao plin nositelj, te Zebron ZB-wax (30 m x 0,53 mm x 1,00 µm) kolonu. Kao interni standard korišten je metil heptadekanoat, C17:0 (Sigma Aldrich, SAD).

Metoda se sastoji od održavanja temperature na 180 °C jednu minutu, a zatim zagrijava na 230 °C brzinom od 5 °C min^{-1}. Ukupno vrijeme određivanja je 20 minuta. Identifikacija pikova napravljena je pomoću standarda F.A.M.E. mix GLC-10[25].

3.7. Određivanje gustoće sintetiziranog biodizela

Kako bi se biodizel mogao koristiti u motorima s unutarnjim izgaranjem, potrebno je zadovoljiti zahtjeve kvalitete, a gustoća je glavna fizikalna veličina koja direktno utječe na djelotvornost motora. Gustoća biodizela određena je prema europskim propisima Europskog odbora za normizaciju (EN 14214) čistog biodizela (Standard EN 14214, 2003.).

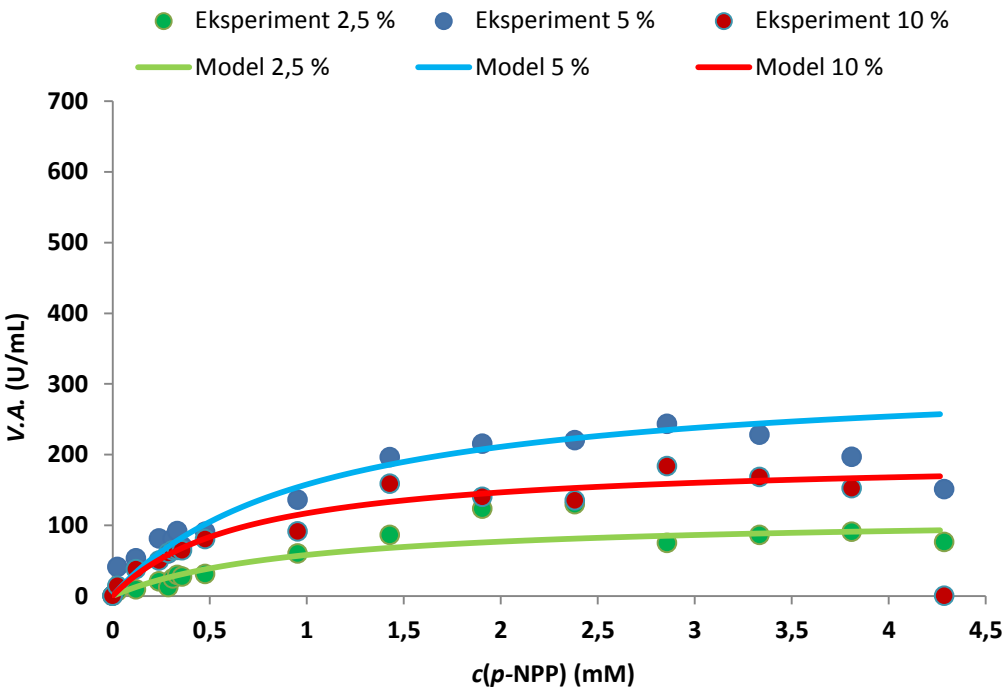
4. Rezultati i rasprava

Određivanje volumne aktivnosti (*V*.*A*.) u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a s tri različita otapala, pri različitim temperaturama te s tri koncentracije enzima, provedena su metodom početnih brzina u spektrofotometru. Na osnovu dobivenih rezultata ovisnosti volumne aktivnosti enzima o koncentraciji supstrata, postavljen je kinetički model i procijenjeni su kinetički parametri.

4.1. Rezultati utjecaja koncentracije enzima lipaze na volumnu aktivnost enzima

Istraživanje utjecaja koncentracije enzima lipaze na volumnu aktivnost lipaze u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a s tri različita otapala, acetonitrilom, metanolom i etanolom, pri različitim temperaturama (T = 30 - 60 °C) provedena su na dvozračnom spektrofotometru, u UV kiveti pri 405 nm, gdje su kao emulgatori korišteni Triton X-100 i Tween 80.

U ovom radu Tween 80 je korišten u pokusima u kojima je korišten acetonitril kao otapalo. Napravljena su tri različita pokusa, s različitim udjelima Tweena 80: Tween 80:acetonitril = 1:100 (w/v); 10:100 (w/v); 20:100 (w/v); 30:100 (w/v). Međutim, u niti jednom pokusu lipaza nije bila aktivna. Rezultati mjerenja dobiveni uporabom Tritona X-100 kao emulgatora u pripremi otapala prikazani su grafički (Slika 8. - 11.). Rezultati procijenjenih kinetičkih parametara (V_m i K_m) prikazani su tablično (Tablice 1. - 3.).



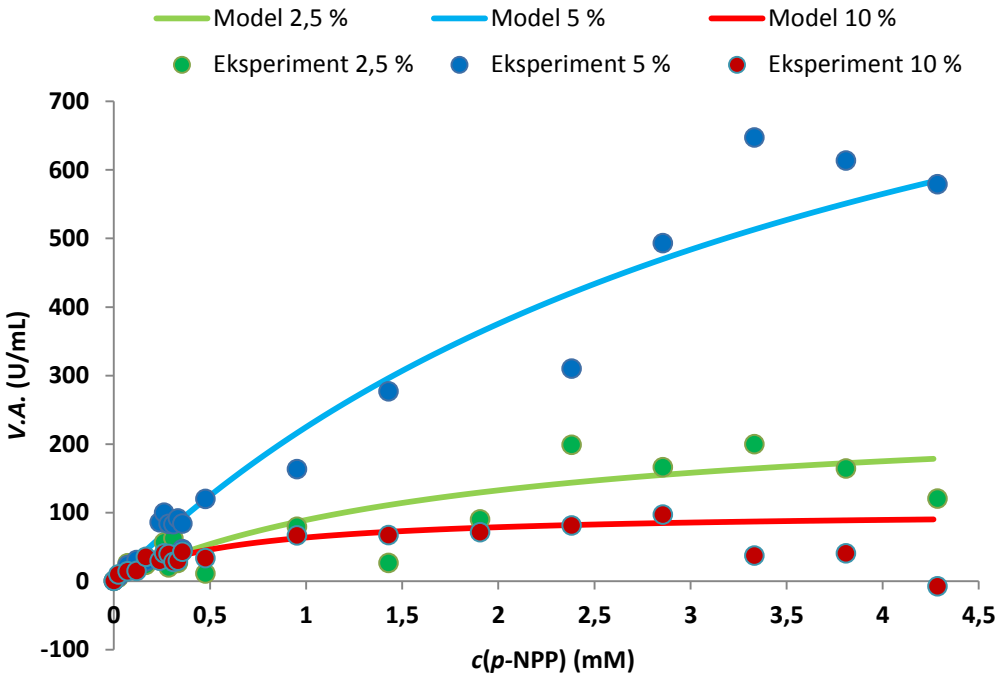
Slika 8. Ovisnost volumne aktivnosti lipaze (*V.A.*) o koncentraciji supstrata *c*(*p*-NPP) u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a katalizirane lipazom, otapalo: acetonitril, emulgator: Triton X-100, T = 40 °C, V_{uk} = 2100 µL, *c*(*p*-NPP) = 0 - 4,3 mM, enzim: 2,5, 5 i 10 % (g/g)

Tablica 1. Rezultati procijenjenih kinetičkih parametara za reakciju hidrolize supstrata *p*-NPP katalizirane lipazom, s acetonitrilom kao otapalom i Tritonom X-100 kao emulgatorom

Otopina enzima u puferu %	Parametar	Jedinica	Vrijednost
2,5	V_m	U/mL	113,928 ± 9,509
	K_m	mM	0,964 ± 0,210
5	V_m	U/mL	318,817 ± 19,698
	K_m	mM	1,028 ± 0,155
10	V_m	U/mL	196,209 ± 12,288
	K_m	mM	0,677 ± 0,125

Prema grafičkom prikazu ovisnosti volumne aktivnosti lipaze o koncentraciji supstrata *p*-NPP-a s acetonitrilom kao otapalom (Slika 8.) vidljivo je da se radi o Michaelis-Menteničinom tipu kinetike. Iako je bilo za očekivati da će brzina reakcije biti veća s najvišom koncentracijom enzima, s obzirom da je maksimalna reakcijska brzina jednaka produktu katalitičke konstante enzima i koncentracije enzima, to se nije dogodilo.

Najveća maksimalna aktivnost lipaze (V_m = 318,817 ± 19,698 U/mL) postignuta je kada je korištena 5 %-tna otopina enzima u fosfatnom puferu (Tablica 1). Najniža aktivnost lipaze (V_m = 113,928 ± 9,509 U/mL) u reakciji hidrolize *p*-NPP-a bila je uz 2,5 %-tnu otopinu enzima u fosfatnom puferu. Maksimalna aktivnost lipaze u reakciji u kojoj je korištena najveća koncentracija enzima (10 %-tna otopina enzima u puferu), iznosila je 196,209 ± 12,288 U/mL.



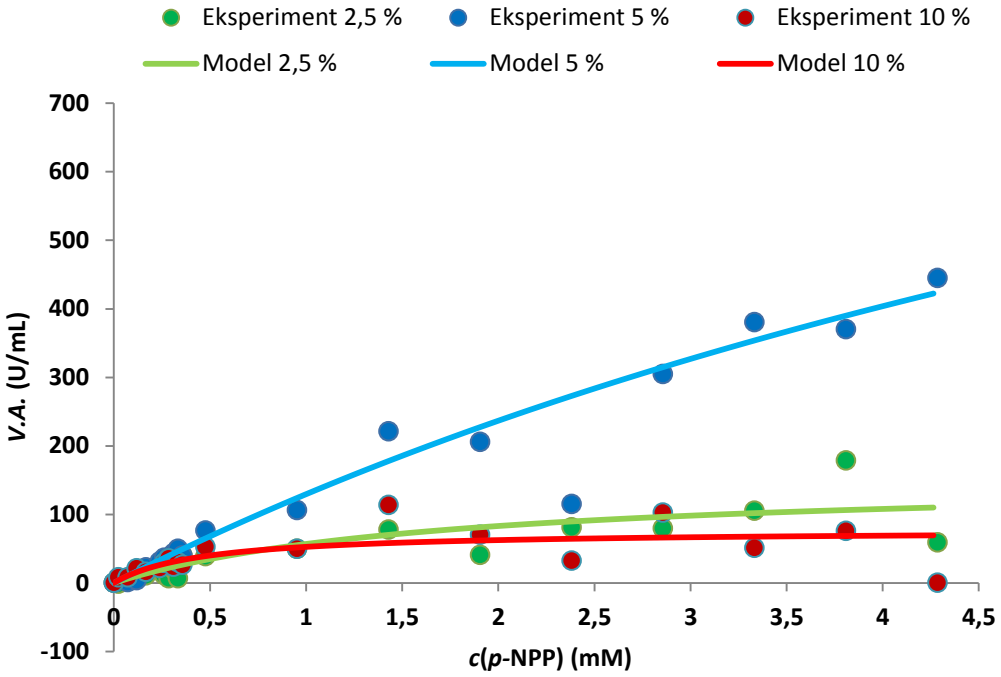
Slika 9. Ovisnost volumne aktivnosti (*V.A.*) o koncentraciji supstrata *c*(*p*-NPP) u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a katalizirane lipazom, otapalo: metanol, emulgator: Triton X-100, *T* = 40 °C, V_{uk} = 2100 µL, *c*(*p*-NPP) = 0 - 4,3 mM, enzim: 2,5, 5 i 10 % (g/g)

Tablica 2. Rezultati procjene kinetičkih parametara za reakciju hidrolize supstrata *p*-NPP katalizirane lipazom, s metanolom kao otapalom i Tritonom X-100 kao emulgatorom

Otopina enzima u puferu %	Parametar	Jedinica	Vrijednost
2,5	V_m	U/mL	257,276 ± 25,998
	K_m	mM	1,885 ± 0,415
5	V_m	U/mL	1141,068 ± 86,452
	K_m	mM	4,078 ± 0,524
10	V_m	U/mL	103,099 ± 8,484
	K_m	mM	0,621 ± 0,127

Iz grafičkog prikaza ovisnosti volumne aktivnosti lipaze (*V.A.*) o koncentraciji supstrata *p*-NPP-a s metanolom kao otapalom (Slika 9.) vidljivo je da se radi o Michaelis-Menteničinom tipu kinetike. U reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a očekivalo se da će najviša aktivnost lipaze biti pri najvišoj koncentraciji enzima, 10 %-tna otopina enzima u puferu, međutim, to se nije dogodilo.

Pokazano je da je najveća maksimalna aktivnost lipaze (V_m = 1141,068 ± 86,452 U/mL) postignuta kada je korištena 5 %-tna otopina enzima u fosfatnom puferu (Tablica 2). Najniža aktivnost lipaze (V_m = 103,099 ± 8,484 U/mL) u reakciji hidrolize *p*-NPP-a bila je uz 10 %-tnu otopinu enzima u fosfatnom puferu. Maksimalna aktivnost lipaze u reakciji u kojoj je korištena najniža koncentracija enzima (2,5 %-tna otopina enzima u puferu), iznosila je 257,276 ± 25,998 U/mL.



Slika 10. Ovisnost volumne aktivnosti (*V.A.*) o koncentraciji supstrata *c*(*p*-NPP) u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a katalizirane lipazom, otapalo: etanol, emulgator: Triton X-100, T = 40 °C, V_{uk} = 2100 µL, *c*(*p*-NPP) = 0 - 4,3 mM, enzim: 2,5, 5 i 10 % (g/g)

Tablica 3. Rezultati procjene kinetičkih parametara za reakciju hidrolize supstrata *p*-NPP katalizirane lipazom, s etanolom kao otapalom i Tritonom X-100 kao emulgatorom

Otopina enzima u puferu %	Parametar	Jedinica	Vrijednost
2,5	V_m	U/mL	154,164 ± 14,949
	K_m	mM	1,712 ± 0,338
5	V_m	U/mL	1373,852 ± 337,168
	K_m	mM	9,607 ± 3,138
10	V_m	U/mL	76,902 ± 6,738
	K_m	mM	0,461 ± 0,107

Prema grafičkom prikazu ovisnosti volumne aktivnosti lipaze (*V.A.*) o koncentraciji supstrata *p*-NPP-a s metanolom kao otapalom (Slika 10.) vidljivo je da se radi o Michaelis-Menteničinom tipu kinetike.

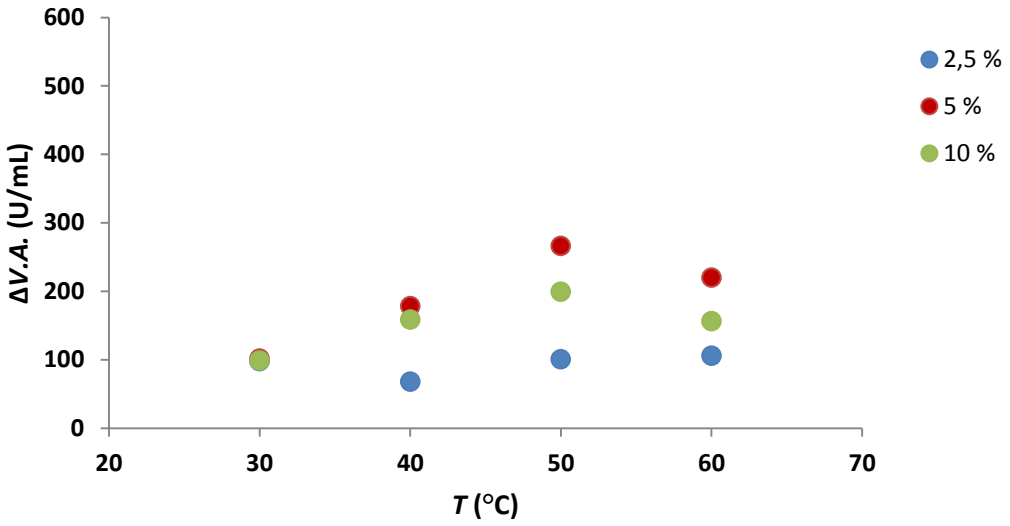
Pokazano je da je najveća maksimalna aktivnost lipaze (V_m = 1373,852 ± 337,168 U/mL) postignuta je kada je korištena 5 %-tna otopina enzima u fosfatnom puferu (Tablica 3). Najniža aktivnost lipaze (V_m = 76,902 ± 6,738 U/mL) u reakciji hidrolize *p*-NPP-a bila je uz 10 %-tnu otopinu enzima u fosfatnom puferu. Maksimalna aktivnost lipaze u reakciji u kojoj je korištena najniža koncentracija enzima (2,5 %-tna otopina enzima u puferu), iznosila je 154,164 ± 14,949 U/mL.

Tablica 4. Procijenjeni parametri u sva tri otapala (acetonitril, metanol, etanol) pri 5 %-tnoj otopini enzima i Tritonom X-100 kao emulgatorom

Otapalo	V_m (U/mL)	K_m (mM)
Acetonitril	318,817 ± 19,698	1,028 ± 0,155
Metanol	1141,068 ± 86,452	4,078 ± 0,524
Etanol	1373,852 ± 337,168	9,607 ± 3,138

Usporedbom rezultata mjerenja s tri različita otapala, pokazano je da je najveća maksimalna aktivnost lipaze postignuta primjenom etanola kao otapala (V_m = 1373,852 U/mL). Iz tabličnog prikaza procijenjenih parametara (Tablica 4.), vidljivo je da enzim lipaza pokazuje najveći afinitet prema supstratu *p*-NPP-u s acetonitrilom kao otapalom (K_m = 1,028 ± 0,155 mM). Surinenaite i sur., 2009., koristili su lipazu iz *Pseudomonas Mendocina* pri hidrolizi raznih *p*-nitrofenil estera, među njima i *p*-NPP, s 2-propanolom kao otapalom. Pri hidrolizi *p*-NPP dobivena je maksimalna aktivnost lipaze 276 ± 54 U/mg, a početna koncentracija dodanog enzima bila je 1 μg/mL.

4.2. Rezultati utjecaja temperature na volumnu aktivnost enzima

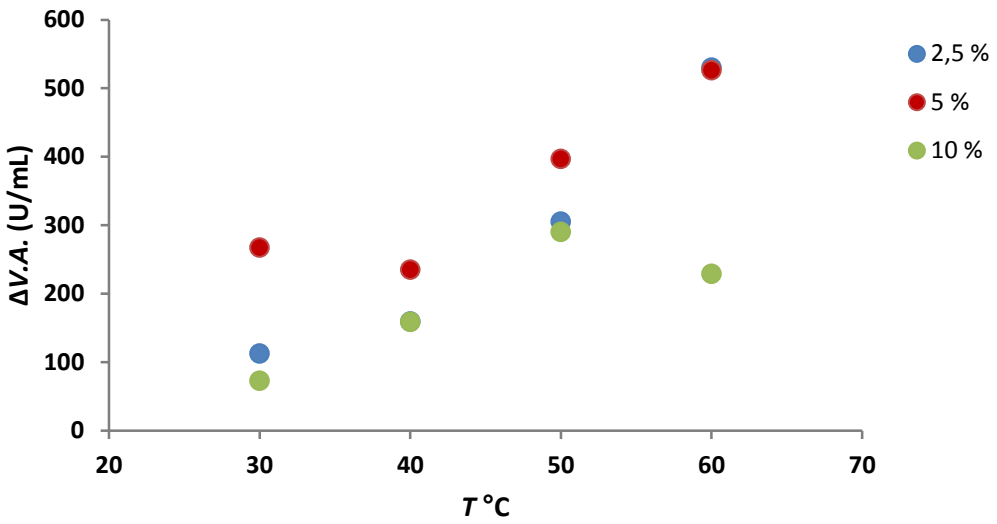


Slika 11. Ovisnost volumne aktivnosti (*V.A.*) o temperaturi (*T*) u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a katalizirane lipazom, otapalo: acetonitril, emulgator: Triton X-100, *T* = 30 - 60 °C, V_{uk} = 2100 µL, *c*(*p*-NPP) = 2,3810 mM, enzim: 2,5, 5 i 10 % (g/g)

Iz grafičkog prikaza ovisnosti volumne aktivnosti (*V.A.*) o temperaturi (*T*), u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a s acetonitrilom kao otapalom (Slika 11.), vidljivo je da je najviša aktivnost enzima lipaze (*V.A.* = 266,038 U/mL) postignuta pri 50 °C u reakciji s 5 % dodanog enzima u puferu.

U reakciji hidrolize supstrata acetonitrilom, uz dodatak 10 %-tne otopine enzima u puferu, najviša volumna aktivnost lipaze (*V.A.* = 199,387 U/mL) postignuta je pri 50 °C.

U reakciji hidrolize supstrata actetontrilom, uz dodatak 2,5 %-tne otopine enzima u puferu, najviša volumna aktivnost lipaze (*V.A.* = 105,700 U/mL) postignuta je pri temperaturi od 60 °C.

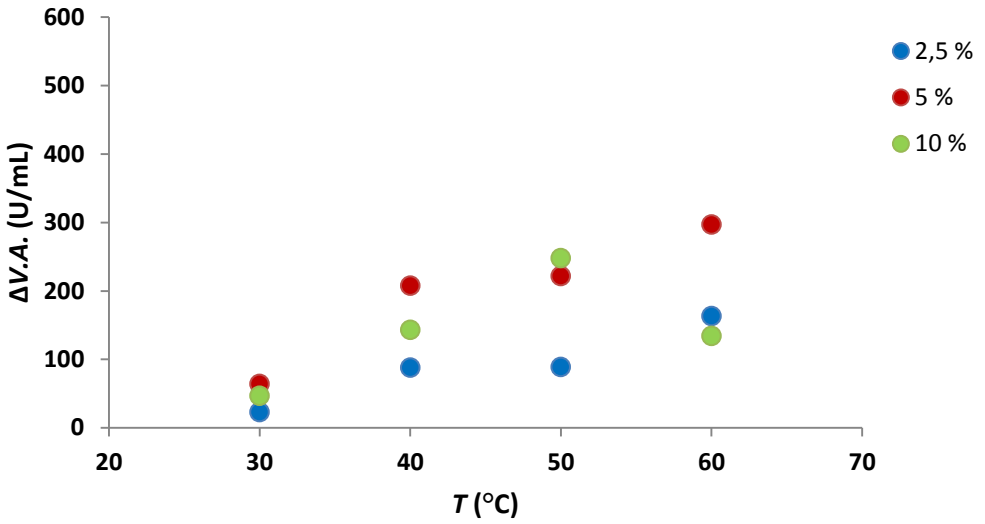


Slika 12. Ovisnost volumne aktivnosti (*V.A.*) o temperaturi (*T*) u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a katalizirane lipazom, otapalo: metanol, emulgator: Triton X-100 *T* = 30 - 60 °C, V_{uk} = 2100 µL, *c*(*p*-NPP) = 2,3810 mM, enzim: 2,5, 5 i 10 % (g/g)

Prema grafičkoj ovisnosti volumne aktivnosti (*V.A.*) o temperaturi (*T*), u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a s metanolom kao otapalom (Slika 12.), vidljivo je da je najviša aktivnost enzima lipaze (*V.A.* = 526,287 U/mL) postignuta pri 60 °C, uz 5 %-tnu otopinu enzima u puferu.

U reakciji hidrolize supstrata, kataliziranom s 10 %-tnom otopinom enzima u puferu, najviša volumna aktivnost lipaze (*V.A.* = 290,787 U/mL) bila je pri 50 °C.

Prema grafičkom prikazu najviša volumna aktivnost lipaze (*V.A.* = 529,900 U/mL) u reakciji kataliziranoj s otopinom od 2,5 % enzima u puferu, bila je u reakciji pri 60 °C.



Slika 13. Ovisnost volumne aktivnosti (*V.A.*) o temperaturi (*T*) u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a katalizirane lipazom, otapalo: etanol, emulgator: Triton X-100, *T* = 30 - 60 °C, V_{uk} = 2100 µL, *c*(*p*-NPP) = 2,3810 mM, enzim: 2,5, 5 i 10% (g/g)

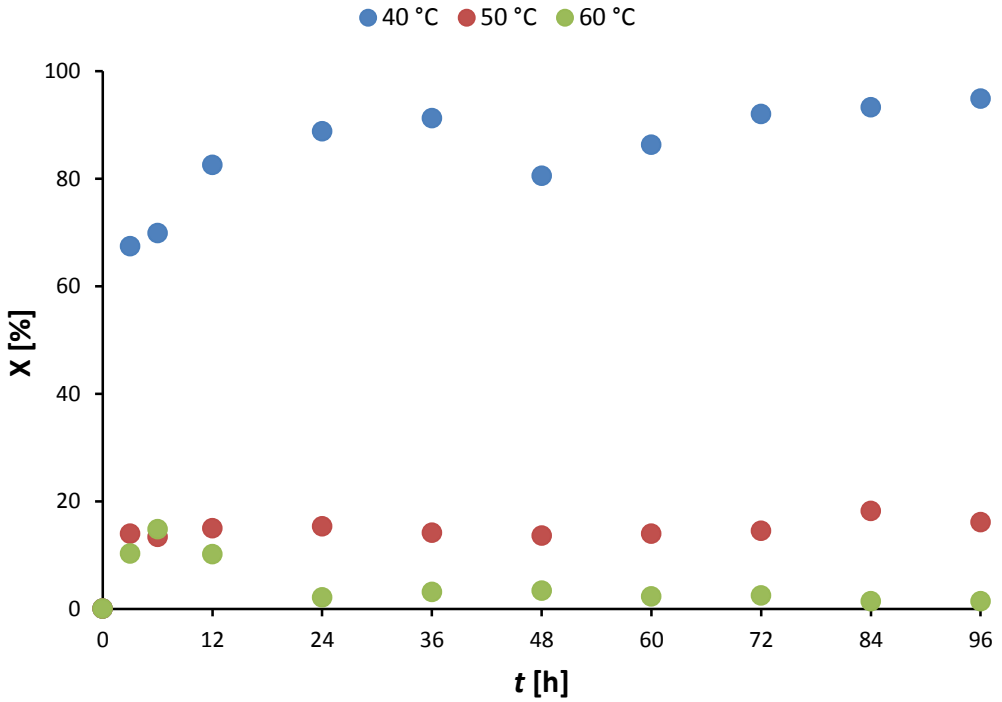
Iz grafičkog prikaza ovisnosti volumne aktivnosti (*V.A.*) o temperaturi (*T*), u reakciji hidrolize supstrata *p*-NPP-a s etanolom kao otapalom (Slika 13.), vidljivo je da je najviša aktivnost enzima lipaze (*V.A.* = 297,027 U/mL) postignuta pri 60 °C, kada je korištena 5 %-tna otopina enzima kao katalizator.

U reakciji hidrolize supstrata acetonitrilom, dodatkom 10 %-tne otopine enzima u puferu, najviša volumna aktivnost lipaze (*V.A.* = 247,743 U/mL) je postignuta pri 50 °C.

U reakciji hidrolize katalizirane s otopinom od 2,5 % enzima u puferu, postignuta je najviša volumna aktivnost (*V.A.* = 163,024 U/mL) pri temperaturi od 60 °C.

Dobiveni rezultati su u skladu s podacima iz literature, gdje je također pokazano da lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* ima najveću aktivnost pri temperaturi od 50 °C te da je za višu aktivnost enzima potrebna manja koncentracija istog (Christopher i sur., 2014.).

4.3. Jednostupanjska sinteza biodizela



Slika 14. Ovisnost udjela estera (*X*, %) o vremenu (*t*) trajanja jednostupanjske transesterifikacije suncokretovog ulja s metanolom uz katalizator lipazu, *T* = 40 - 60 °C, enzim: 5 % (g/g)

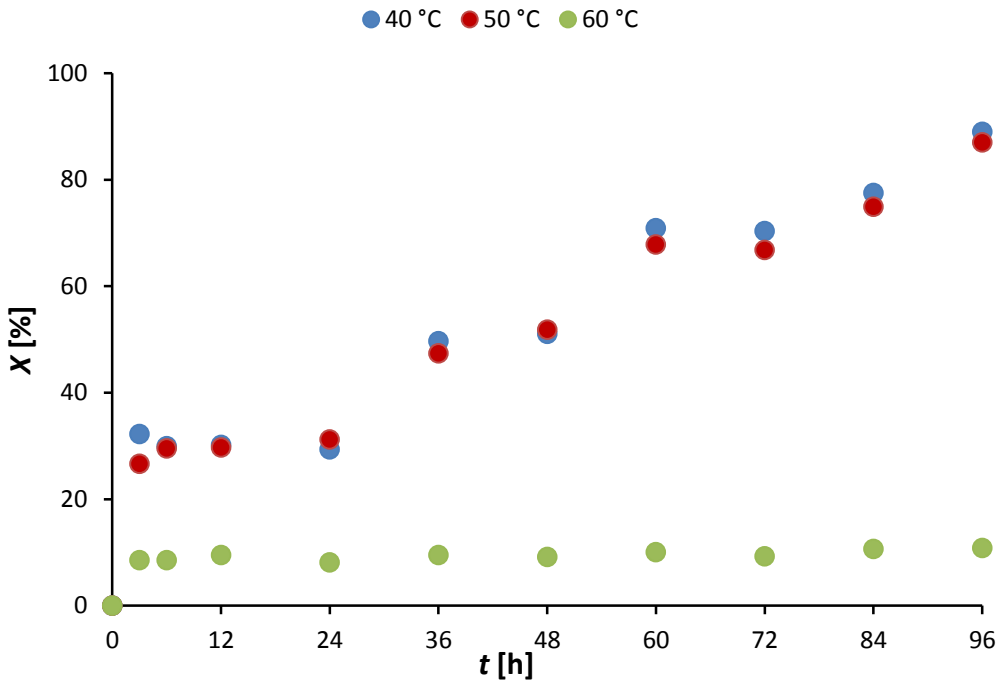
Prema grafičkom odnosu udjela nastalih metil estera (*X*, %) o vremenu (*T*) (Slika 14.) u jednostupanjskoj reakciji vidljivo je da je aktivnost enzima u reaktoru gotovo stalna, možemo reći da je enzim stabilan kroz 96 sati trajanja reakcije transesterifikacije suncokretovog ulja pri temperaturi od 40 °C.

U jednostupanjskoj reakciji već nakon 12 sati trajanja reakcije pri temperaturi od 40 °C postignut je 88,5 %-tni udio metil estera (*X*), a nakon 96 sati iznosio je 94,9 %. Pri temperaturi od 50 °C nakon 12 sati reakcije postignut je 15,0 %-tni udio metil estera te nakon 96 sati 16,1 %-tni udio. U reakciji pri 60 °C postignute su manje konverzije supstrata u produkt, nakon 12 sati udio estera bio je 10,1 % te nakon 96 sati *X* je iznosio 1,4 %. Prema literaturi, visoki udio metil estera može se može se dobiti nakon 4 sata reakcije transesterifikacije na sirovom palminom ulju, uz imobiliziranu lipazu iz Thermomyces lanuginosus (Sim i sur., 2013.). Dizge i sur., 2009., procesom proizvodnje biodizela iz

suncokretovog ulja nakon 24 sata reakcije imobiliziranom lipazom iz *Thermomyces lanuginosus* dobili su prinose do od 90 do 97 %. Prema Fernandez-Laufente, 2010., imobilizirana lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* u hidrolizi suncokretovog ulja pri 60 °C dala je udio estera od 85,3 %.

Rita i sur., koristeći palmino ulje kao supstrat za proizvodnju biodizela te lipazu iz *Thermomyces lanuginosus* imobiliziranu na granuliranoj smoli, molarni omjer ulja i alkohola bio je 1:4, dobili su udio estera od 89,9 % (Chouhan i sur., 2011.). Medina i sur., koristili su etil acetat kao acil akceptor u reakciji transesterifikacije suncokretovog ulja pri čemu su dobili udjele estera veće od 90 % (Robles-Medina i sur., 2009.).

4.4. Četverostupanjska sinteza biodizela



Slika 15. Ovisnost udjela estera (*X*, %) o vremenu (*t*) trajanja četverostupanjske transesterifikacije suncokretovog ulja s prihranjivanjem metanola u obrocima, uz katalizator lipazu, enzim: 5 % (g/g), *T* = 40 - 60 °C

U četverostupanjskoj reakciji pri 40 °C nakon 12 sati trajanja reakcije, udio nastalih metil estera (*X*, %) iznosio je 30,2 % te nakon 96 sati reakcije udio je bio 89,0 % (Slika 15.). U reakciji pri 50 °C nakon 12 sati postignut je 29,7 %-tni te 87 %-tni udio estera nakon 96 sati. Pri reakcijskoj temperaturi od 60 °C, udio dobivenih estera je najniži, nakon 12 sati *X* = 9,5 % te nakon 96 sati *X* = 10,8 %. Rezultati su u skladu s literaturnim podacima, gdje je pokazano da sadržaj estera raste svakim ponovnim dodavanjem metanola u obrocima (Wu i sur., 2003.).

4.5. Rezultati određivanja gustoće biodizela

Gustoća sintetiziranog biodizela iz jestivog suncokretovog ulja jednostupanjskom reakcijom bila je 886,0 g/L te 886,2 g/L četverostupanjskom reakcijom. Rezultati gustoće biodizela su u skladu sa zahtjevima prema hrvatskim normama HRN EN 142014:2012, koji su bazirani na Europskim normama EN 142014, gdje gustoća biodizela mora biti između 860 i 900 g/L (Standard EN 14214, 2003.).

5. Zaključci

Na osnovu eksperimentalnih rezultata dobivenih u ovom radu, mogu se donijeti sljedeći zaključci:

Dokazano je da na aktivnost enzima lipaza utječe koncentracija dodanog enzima u puferu, temperatura pri kojoj se provodi reakcija hidrolize supstrata te odabir otapala.

U reakciji hidrolize *p*-NPP-a, uz 5 %-tnu otopinu dodanog enzima u puferu, najveća maksimalna aktivnost lipaze postignuta je primjenom etanola kao otapala (V_m = 1373,852 ± 337,168 U/mL).

Najveći afinitet lipaza prema supstratu *p*NPP lipaza pokazuje u reakciji hidrolize s acetonitrilom kao otapalom gdje je K_m iznosio 0,890 ± 0,163 mM.

Eksperimentalni rezultati kinetike hidrolize *p*-NPP u pokusima sa sva tri ispitana alkohola (acetonitril, metanol, etanol) i s Tritonom X-100 kao emulgatorom, dobiveni metodom početnih brzina, pokazuju dobro slaganje s rezultatima dobivenim simulacijama pomoću pretpostavljenog Michaelis-Menteničinog kinetičkog modela.

U jednostupanjskim i četverostupanjskim postupcima sinteze biodizela iz jestivog suncokretovog ulja pri različitim temperaturama (T = 40 – 60 °C), najviši udio nastalih metil estera postignut je pri T = 40 °C. U jednostupanjskoj reakciji udio metil estera bio je 94,9 % nakon 96 sati, dok je u četverostupanjskoj reakciji, za isto vrijeme reakcije, nastali udio metil estera iznosio 89,0 %.

Rezultati gustoće sintetiziranog biodizela (jednostupanjskom reakcijom: 886,0 g/L te četverostupanjskom reakcijom: 886,2 g/L) iz jestivog suncokretovog ulja su u skladu sa zahtjevima prema hrvatskim normama HRN EN 142014:2012, prema kojima gustoća biodizela mora biti između 860 i 900 g/L.

6. Literatura

1. Abbaszaadeh A, Ghobadian B, Omidkhah MR, Najafi G: Current biodiesel production technologies: *Energy Conversion and Management*, 63: 138-148, 2012.
2. Aransiola EF, Ojumu TV, Oyekola OO, Madzimbamuto TF, Ikhu-Omoregbe DIO: A review of current technology for biodiesel production: State of the art. *Biomass and bioenergy*, 61: 276-297, 2014.
3. Azocar L, Navia R, Beroiz L, Jeison D, Ciudad G: Enzymatic biodiesel production kinetics using co-solvent and an anhydrous medium: a strategy to improve lipase performance in a semi-continuous reactor. *New Biotechnology*, 31: 5, 2014.
4. Balat M, Balat H: Progress in biodiesel processing. *Aplied Energy*, 87: 1815-1835, 2010.
5. Bradić MR, Ognjanović ND, Bezbradica DI, Grbavčić SŽ, Avramović N, Mijin DŽ, Knežević-Jugović ZD: Enzimska sinteza monoacilglicerola. *Hemijska industrija*, 64: 375-388, 2010.
6. Chouhan APS, Sarma AK: Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15: 4378-4399, 2011.
7. Christopher LP, Kumar H, Zambare VP: Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*, 119: 497-520, 2014.
8. Committee for Standardization Automotive fuels – fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines – requirements and test methods. European Committee for Standardization, Brussels; Standard EN 14214, 2003.
9. Dizge N, Aydiner C, Derya Y. Imer DY, Bayramoglu M, Tanriseven A, Keskinler B: Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*, 100: 1983–1991, 2009.
10. Drapcho CM, Phu Nhuan N, Walker TH: Biofuels Engineering Process Technology. The *McGraw-Hill Companies*, 2008.
11. Fernandez-Laufente R: Lipase from Thermomyces lanuginosus: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62: 197–212, 2010.
12. Findrik Blažević Z: Bioreakcijska tehnika 1. *Interna skripta*, Fakultet kemijskog inženjerstva I tehnologije, Zagreb, 2012.
13. Gog A, Roman M, Tosa M, Paizs C, Irimie FD: Biodiesel production using enzymatic transesterification-Current state and perspectives. *Renewable energy*, 39: 10-16, 2012.
14. Kapoor M, Gupta MN: Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process*

Biochemistry, 47: 555-569, 2012.

15. Kiš D, Jurić T, Emert R, Plašćak I: Alternativno gorivo-biodizel. *Pregledni znanstveni članak*, Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek, 2005.
16. Kovačević T: Biokatalitička razgradnja lignoceluloze. *Završni rad*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2008.
17. Ognjanović ND, Petrović SD, Bezbradica DI, Knežević-Jugović ZD: Lipaze kao biokatalizatori u sintezi biodizela. *Hemijska industrija*, 59: 49-59 2010.
18. Pandey A, Larroche Ch, Ricke SC, Dussap CG, Gnansounou E: Alternative feedstocks and conversion processes. *Academic Press*, 2011.
19. Ranganathan SV, Narasimhan SL, Muthukumar K: An overview of enzymatic production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 99: 3975–3981, 2008.
20. Robles-Medina A, González-Moreno PA, Esteban-Cerdán L, Molina-Grima E: Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances*, 27: 398-408, 2009.
21. Rodrigues RC, Pessela BCC, Volpato G, Fernandez-Lafuente R, Guisan JM, Ayub MAZ: Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized–stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. *Process Biochemistry*, 45: 1268-1273, 2010.
22. Scientist handbook, Micromath, Salt Lake City, 1986.-1995.
23. Sim JH, Khor GK, Kamaruddin AH, Bhatia S: Thermodynamic studies on activity and stability of immobilized Thermomyces lanuginosus in producing fatty acid methyl ester (FAME). *International Journal of Scientific and Research Publications*, 3: 4, 2013.
24. Surinėnaitė B, Bendikienė V, Juodka B: The hydrolytic activity of *Pseudomonas mendocina* 3121-1 lipase. A kinetic study. *Biologija*, 55: 71-79, 2009.
25. Stamenković OS, Lazić ML, Veljković VB, Skala DU: Dobijanje biodizela tranesterifikacijom katalizovanom enzimima. *Hemijska industrija*, 59: 49-59, 2005.
26. Turcu MC: Lipase-catalyzed approaches towards secondary alcohols: Intermediates for Enantiopurge drugs. Turun Yliopisto, University of Turku, 2010.
27. Zheng YY, GuoXH, Song NN, Li DCh: Thermophilic lipase from Thermomyces lanuginosus: Gene cloning, expression and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69: 127–132, 2011.
28. Wu H, Zong M, Luo Q: Enzymatic conversion of waste oil to biodiesel in solvent-free system. *American Chemical Society, Division of Fuel Chemistry*, 48: 533, 2003.

29. Yan Y, Li X, Wang G, Gui X, Li G, Su F, Wang X, Liu T: Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. *Applied Energy*, 113: 1614-1631, 2014.