

# Polimerizacija flavonoida katalizirana enzimom lakaza porijeklom iz *T. versicolor*

---

Palaversa, Bruna

Undergraduate thesis / Završni rad

2025

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:991947>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-01**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Bruna Palaversa

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, veljača 2025.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja                     **Bruna Palaversa**                    

Predala je izrađen završni rad dana:           18. veljače 2025.          

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Bruno Zelić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Katarina Mužina, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog  
inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred  
povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana:           21. veljače 2025.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Bruna Palaversa

POLIMERIZACIJA FLAVONOIDA KATALIZIRANA ENZIMOM LAKAZA  
PORIJEKLOM IZ *T. VERSICOLOR*

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

Neposredni voditelj: doc. dr. sc. Anita Šalić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Bruno Zelić

2. doc. dr. sc. Anita Šalić

3. doc. dr. sc. Katarina Mužina

Zagreb, veljača 2025.

## *Zahvala*

*Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Bruni Zeliću na savjetima, strpljenju te vodstvu kroz ovaj rad.*

*Veliko hvala doc. dr. sc. Aniti Šalić za neposredno vodstvo, pomoć te mnogobrojne upute i savjete prilikom izvedbe eksperimentalnog dijela u laboratoriju, ali i prilikom izrade samog rada.*

*Hvala mojim kolegicama, prijateljima i roditeljima na podršci, svako razdoblje života je lakše kada iza mene stoje dobri ljudi poput vas.*

*Za kraj, najveće hvala mojem dečku Luki, koji je kroz godine bio moj oslonac i glavni motivator te uz čiju je bezuvjetnu potporu moje studentsko putovanje bilo znatno ugodnije.*

## SAŽETAK

Flavonoidi su prirodni fitokemijski spojevi koji se nalaze u biljkama. Ključni su za brojne biološke funkcije te igraju važnu ulogu u biljnom metabolizmu. Antioksidativna i antimikrobna svojstva flavonoida usko su povezana s njihovom kemijskom strukturom, a poseban utjecaj na njihovu aktivnost ima stupanj polimerizacije. Polimerni oblici flavonoida pokazuju jača antioksidativna i antimikrobna svojstva, te bolju toplinsku stabilnost.

U okviru provedenih istraživanja flavonoidi su polimerizirani pomoću enzima lakaza porijeklom iz gljive *T. versicolor* poznate pod nazivom puranov rep. Polimerizacija je provedena u dvije vrste reaktora: šaržnom reaktoru i protočnom mikroreaktoru. Tijekom provedbe reakcije polimerizacije praćen je utjecaj reakcijskog vremena odnosno vremena zadržavanja na karakteristične veličine procesa, konverziju, učinkovitost procesa polimerizacije i procesnu stabilnost lakaze. Oligomerna struktura dobivenih polimera, odnosno broj monomera koji čine strukturu produkta, potvrđena je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR), UV-Vis spektroskopijom (UV-Vis) te kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

Ključne riječi: *Trametes versicolor*, enzim lakaza, flavonoidi, polimerizacija

## SUMMARY

Flavonoids are natural phytochemical compounds found in plants. They are important for numerous biological functions and play a significant role in plant metabolism. The antioxidant and antimicrobial properties of flavonoids are closely linked to their chemical structure, with the degree of polymerization having a particular influence on their activity. Polymerized forms of flavonoids exhibit stronger antioxidant and antimicrobial properties, as well as better thermal stability.

In this study, flavonoids were polymerized using the enzyme laccase produced by the fungus *Trametes versicolor*, commonly known as turkey tail. The polymerization was carried out in two types of reactors: a batch reactor and a flow microreactor. While performing the polymerization reaction, the effects of reaction time or residence time on key process parameters such as conversion, polymerization efficiency, and enzyme process stability were monitored. The oligomeric structure, i.e., the number of monomers forming the structure, was confirmed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), UV-Vis Spectroscopy (UV-Vis), and High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Keywords: *Trametes versicolor*, laccase, flavonoids, polymerization

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	2
2.1 Polifenoli .....	2
2.1.1 Flavonoidi .....	2
2.2 Enzimi .....	5
2.2.1 Mehanizam djelovanja enzima .....	5
2.2.2 Podjela enzima .....	6
2.3 Enzim lakaza .....	7
2.3.1 Izvori enzima lakaza .....	7
2.3.2 Upotreba enzima lakaza .....	8
2.4 Kemijski reaktori .....	8
2.4.1. Kotlasti reaktor .....	8
2.4.2 Mikroreaktor .....	10
3.1 Materijali .....	12
3.1.1 Kemikalije .....	12
3.1.2 Oprema .....	13
3.2 Metode .....	13
3.2.1 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije flavonoida .....	13
3.2.2 Bradford test za određivanje koncentracije proteina .....	14
3.2.3 Izrada baždarnog pravca za čisti apigenin .....	15
3.2.4 Određivanje aktivnosti enzima lakaza .....	15
3.2.5 Analiza uzorka infracrvenom spektroskopijom s Fourireovom transformacijom (FTIR) .....	16
3.2.6 Analiza uzorka kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC) .....	17
3.2.7 Ekstrakcija apigenina iz komercijalnog pripravka Apigenin Swanson .....	17
3.2.8 Utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju ekstrahiranog apigenina .....	18
3.2.9 Stabilnost apigenina u 95%-tnom etanolu .....	18
3.2.10 Utjecaj količine etanola na učinkovitost ekstrakcije apigenina .....	18
3.2.11 Polimerizacija flavonoida-apigenina u šaržnom reaktoru .....	19
3.2.12 Polimerizacija flavonoida apigenina u cijevnom mikroreaktoru .....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	21



4.1 Utjecaj otapala na ekstrakciju apigenina iz pripravka Apigenin Swanson .....	21
4.2 Utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju ekstrahiranog apigenina .....	22
4.3 Stabilnost apigenina u 95% etanolu .....	23
4.4 Utjecaj količine etanola na masu ekstrahiranog apigenina po tableti pripravka Apigenin Swanson .....	24
4.5 Polimerizacija apigenina .....	25
4.5.1. Kotlasti reaktor .....	25
4.5.2 Cijevni mikroreaktor .....	27
4.6 FTIR, UV-Vis i HPLC analize uzorka polimeriziranog apigenina .....	28
4.6.1 UV-Vis i FTIR analize uzorka polimeriziranog apigenina .....	28
4.6.2 HPLC analiza uzorka polimeriziranog apigenina .....	30
5. ZAKLJUČAK.....	33
6. LITERATURA .....	34
7. PRILOZI.....	36

## 1. UVOD

Polifenoli nastaju kao sekundarni metaboliti biljnih metaboličkih procesa. Glavna uloga polifenola u biljci je zaštita od nametnika i UV zračenja, a istraživanja pokazuju kako u ljudskom tijelu preuzimaju ulogu antioksidansa.<sup>1</sup>

Flavonoidi spadaju u skupinu polifenola složenije molekulske strukture. Naime, molekula flavonoida sastoji se od dviju benzenskih jezgara povezanih propanskim lancem. Zanimljivo je da se ova skupina polifenola pokazala korisnom u farmakološkoj primjeni, ponajprije radi pozitivnih protuupalnih, antimikrobnih, kardioprotektivnih i antioksidativnih svojstava.<sup>2</sup> Flavonoidi se dijele na sljedeće skupine: flavoni, flavanoni, flavani, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini.<sup>3</sup>

Flavoni u biljkama pridonose stvaranju boje i okusa. Flavon apigenin u medicini je poznat još od 1950-ih godina, ali se zbog svojih antioksidativnih svojstava počinje istraživati tek krajem 20. stoljeća.<sup>4</sup> U nekim vrstama biljaka moguće je pronaći flavonoidne dimere – biflavonoide. Biflavonoid bi-apigenin pokazuje neuroprotektivna svojstva i to na način da djeluje antioksidativno.<sup>5</sup> Postoje različiti načini spajanja flavonidnih jedinica, a najčešće kombinacije su: flavon-flavon, flavon-flavonon, flavonon-flavonon.<sup>1</sup> Jedan od načina kojim se iz flavonoida dobivaju stabilnije molekule bolje topljivosti je enzimatska polimerizacija flavonoida u biflavonoide.

Enzimi su biološke molekule, a osnovna uloga im je kataliziranje biokemijskih reakcija u organizmima te se stoga često nazivaju i biokatalizatorima. S obzirom na mjesto gdje nastaju enzime dijelimo na unutarstanične i izvanstanične, pa stoga enzimi mogu biti aktivni u i izvan stanice. Enzim lakaza korišten u ovom radu dobiven je iz gljive *Trametes versicolor*. Ostali poznati izvori tog enzima su biljke, insekti i mikroorganizmi. Ipak, enzim lakaza se u najvećim koncentracijama može naći u gljivama.<sup>6</sup> U industriji se lakaza pokazala ekološki povoljna jer u procesu biokatalize kao supstrat zahtijeva samo molekulu kisika.<sup>7</sup>

U ovom radu je provedena polimerizacija apigenina koji pripada skupini flavona. Apigenin je ekstrahirano pomoću 95 % etanola iz prehrambenog dodatka te je s tako dobivenim supstratom provedena polimerizacija u kotlastom reaktoru i protočnom mikroreaktoru u svrhu dobivanja polifenola.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 Polifenoli

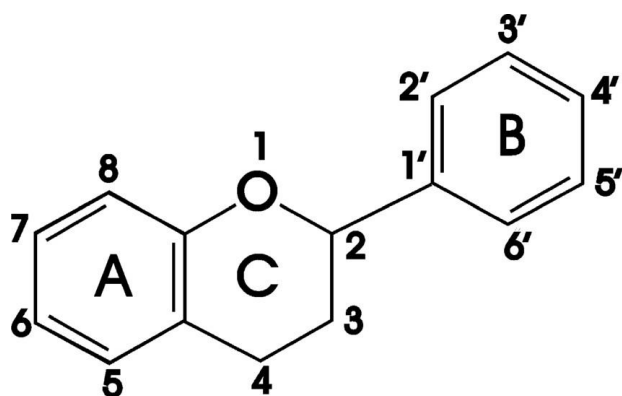
Kao posljedica metaboličkih procesa koji se odvijaju u biljkama nastaju primarni i sekundarni metaboliti. Biljke proizvode širok raspon različitih sekundarnih metabolita kojima je osnovna uloga zaštita biljke od stresova kao što su UV zračenje, te napadi parazita i životinja.<sup>8</sup> Polifenoli su jedna od najvažnijih klasa prirodnih antioksidansa te jedna od najrasprostranjenijih grupa sekundarnih metabolita u biljaka. Obuhvaćaju tisuće spojeva različitih kemijskih struktura, od jednostavnijih poput hidroksimetilnih kiselina i biljnih pigmentata do složenijih flavonoida. Klasifikacija polifenola se zbog velike raznovrsnosti zasniva na njihovoj kemijskoj strukturi i biosintetskom podrijetlu (Tablica 2.1).<sup>9</sup>

Tablica 2.1 Strukturne klase fenola

Redni broj	Broj C atoma	C - skelet	Klase biljnih fenola
1.	6	C <sub>6</sub>	jednostavni fenoli
2.	7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	hidroksibenzoati
3.	8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	acetofenoni i fenilacetati
4.	9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	hidroksicinamati, fenilpropeni,
5.	10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	kumarini i hromoni
6.	13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	naftokinoni
7.	14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	ksantoni
8.	15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	stilbeni i antrahinoni
9.	18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	flavonoidi
10.	30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	lignani
11.	n	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	bioflavonoidi i katehol melanini
12.	n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	lignini
13.	n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	kondenzirani tanini

#### 2.1.1 Flavonoidi

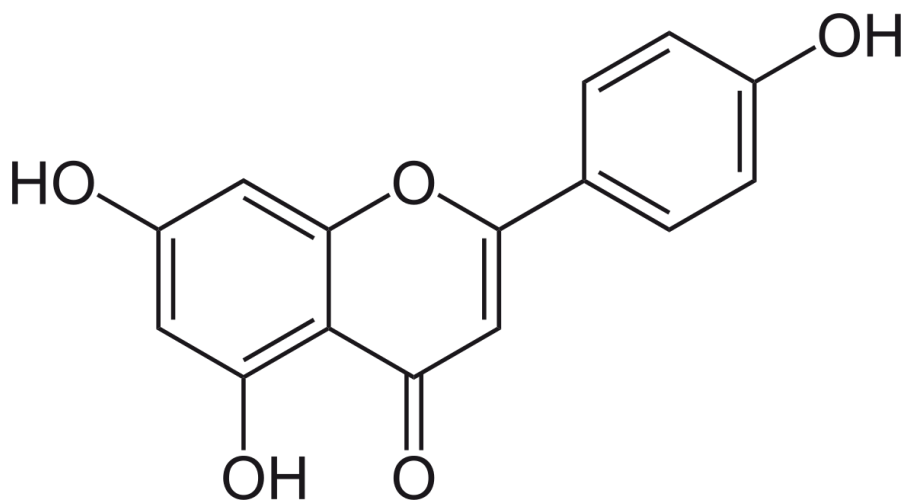
Flavonoidi su polifenolni spojevi koje nalazimo u biljkama. Sastavljeni su od dviju benzenskih jezgara povezanih propanskim lancem (Slika 2.1), odnosno čine ih petnaest ugljikovih atoma te se pojednostavljeno mogu prikazati strukturom tipa C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> – C<sub>6</sub>. Glavne skupine flavonoida su: flavoni, flavanoni, flavani, flavonoli, izoflavoni i antocijanidini.<sup>3</sup> Flavonoidi posjeduju sljedeća farmakološka svojstva: protuupalna, antioksidacijska, antimikrobna i kardioprotektivna.<sup>2</sup>



Slika 2.1 Osnovna struktura flavonoida

### 2.1.1.1 Apigenin

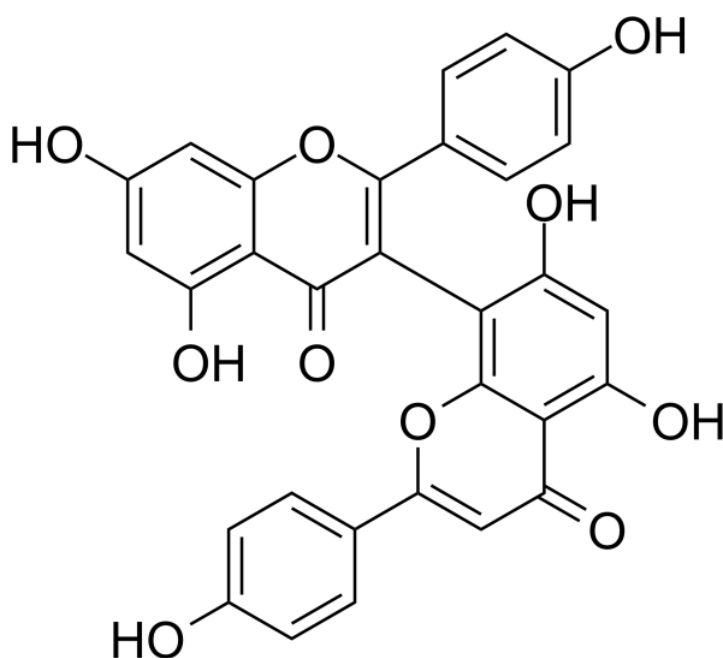
Flavonoid apigenin, poznat i kao 4',5,7-trihidroksiflavon, svrstavamo na temelju njegove strukture u skupinu flavona (Slika 2.2). Flavoni imaju ključnu ulogu u stvaranju okusa i boje u biljaka, a najveće količine primijećene su u peršinu, celeru, timijanu i ružmarinu.<sup>3,10</sup> Aktualna medicinska istraživanja flavonima dodjeljuju antioksidativna, protuupalna, antikancerogena, antimikrobna i brojna druga svojstva korisna za ljudsko zdravlje.<sup>11</sup> Apigenin se u biljkama javlja kao sekundarni metabolit, a u prirodi se najčešće nalazi u glikoziliranom obliku u kojem je stabilniji no u onom pročišćenom. Prvi spomen apigenina u znanstvenoj literaturi datira još iz 1950-ih godina kada se istraživao njegov učinak na oslobađanje histamina, a tek je 1980-ih povezan s procesom karcinogeneze u kojem se ističu njegova antimutagena svojstva.<sup>4</sup>



Slika 2.2 Molekularna struktura apigenina

### 2.1.1.2 Biflavonoidi

U prirodi se kod određenih vrsta biljaka mogu javiti flavonoidni dimeri, poznatiji kao biflavonoidi. Oni se mogu sastojati od dvije identične ili pak dvije različite flavonoidne jedinice, koje mogu biti spojene simetrično ili asimetrično. Većina takvih spojeva nalazi se u kombinacijama flavon-flavon, flavon-flavonon te flavonon-flavonon.<sup>1</sup> Enzimatskom polimerizacijom flavonoida u biflavonoide dobiva se stabilnija molekula veće topljivosti, čime se stvaraju bolji preduvjeti za korištenje u farmakološke i industrijske svrhe. Konkretno, pokazalo se kako bi-apigenin (Slika 2.3) pokazuje neuroprotektivna svojstva i to na način da smanjuje lipidnu peroksidaciju (koja uzrokuje oštećenje membrane mitohondrija) uzrokovanu oksidativnim stresom.<sup>5</sup>

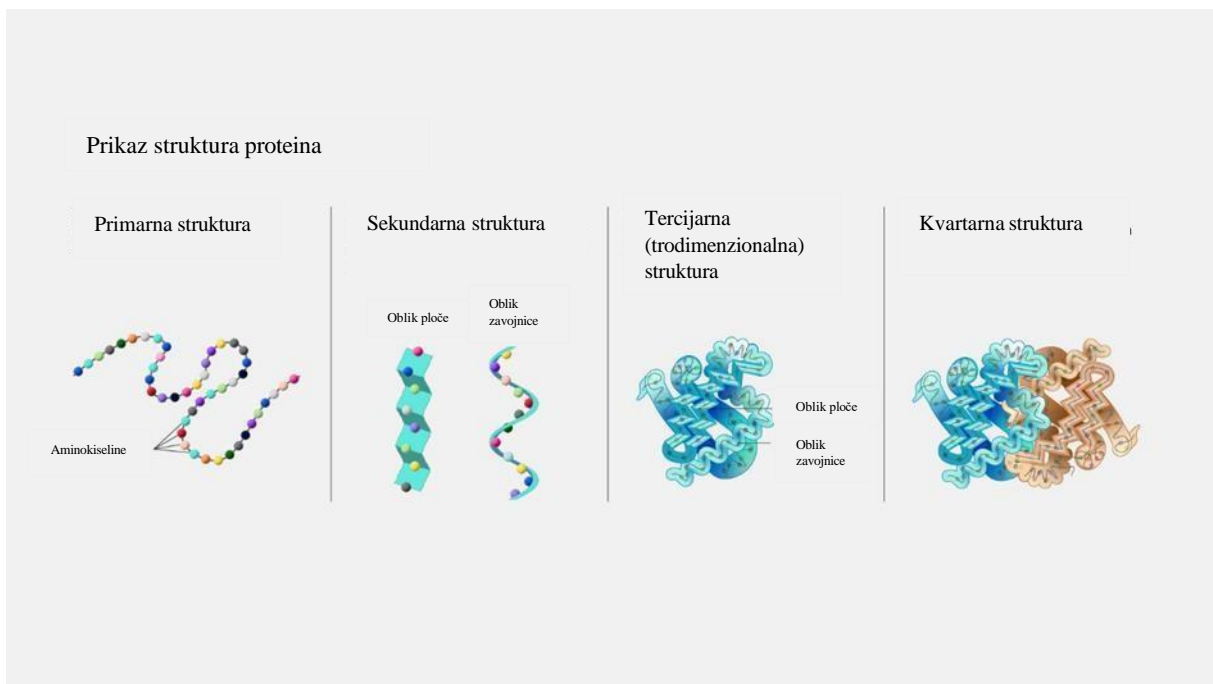


Slika 2.3 Molekularna struktura bi-apigenina<sup>19</sup>

## 2.2 Enzimi

Enzimi su biološke molekule, proteini, koji služe kao katalizatori u gotovo svim biokemijskim reakcijama u živim organizmima, zbog čega ih se još naziva i biokatalizatorima<sup>12</sup>. Kataliziraju biokemijske reakcije, ubrzavajući ih i za nekoliko milijuna puta, a iz istih izlaze nepromijenjeni.<sup>13</sup> Primarno se sastoje od velikog broja aminokiselina povezanih u polipeptidne lance peptidnim vezama.

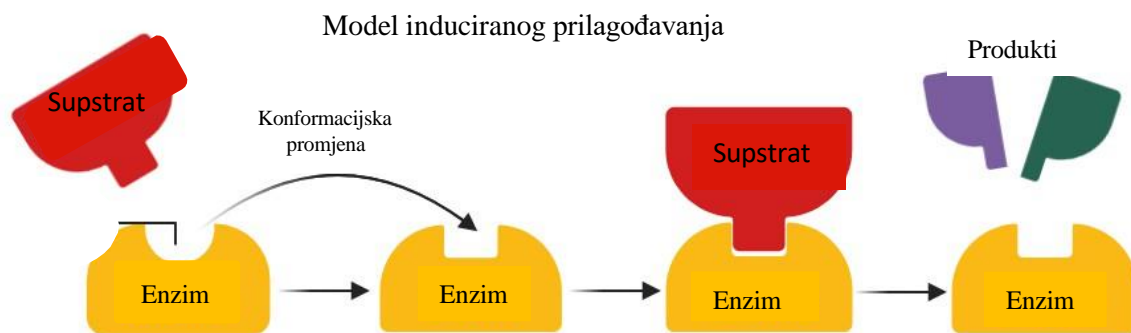
Postoji nekoliko načina pojednostavljenog prikaza strukture proteina: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna (Slika 2.4). Povezanost aminokiselina peptidnim vezama prikazuje se primarnom strukturom, dok sekundarna struktura predstavlja oblik koji aminokiseline zauzimaju u prostoru. Na temelju toga može se zaključiti kako aminokiseline nisu samo povezane u duge lančane molekule, već da su polipeptidni lanci koji nastaju međusobno povezani paralelno i mrežasto. Tercijarna struktura proteina njegova je trodimenzionalna struktura, a predstavlja način na koji su oblici sekundarne strukture povezani u prostoru.<sup>14</sup> Kvartarna struktura proteina proizlazi iz spoja višestrukih polipeptidnih lanaca.<sup>15</sup>



Slika 2.4 Pojednostavljen prikaz različitih struktura proteina<sup>15</sup>

### 2.2.1 Mehanizam djelovanja enzima

Još od 1890. godine poznat je model vezanja molekula na enzim na principu ključ-brava. Dodatno, Daniel Koshland 1958. godine predstavlja teoriju koja vjerno opisuje mehanizam djelovanja enzima prilikom biokatalitičkih reakcija. Modifikacija modela ključ-brava rezultirala je hipotezom induciranog prilagođavanja (Slika 2.5). Prema novom modelu, spajanje enzima s molekulom može se usporediti sa stavljanjem ruke u rukavicu. Ruka predstavlja supstrat odnosno molekulu, a rukavica, koja se deformira i prilagođava prema ruci, enzim. Na primjeru supstrata i enzima model objašnjava promjenu oblika enzima kako bi se supstrat bolje uklopio na njegovo aktivno mjesto.<sup>16</sup>



### 2.2.2 Podjela enzima

Enzime dijelimo na unutarstanične i izvanstanične. Kao što se prema nazivu da zaključiti, unutarstanični enzimi nalaze se unutar stanica, a mogu biti i samo vezani za staničnu stjenku. Oni enzimi koje stanice izlučuju u vanjski medij nazivamo izvanstaničnim. Izvanstanični enzimi pokazuju bolju stabilnost te ih je zbog odsutnosti stanične stijenke lakše izolirati.

Prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju enzimi se dijele na šest skupina s obzirom na specifičnu vrstu reakcije koju kataliziraju:

E.C.1. Oksidoreduktaze – kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije;

E.C.2. Tranferaze – kataliziraju prijenos funkcionalnih grupa s jedne molekule na drugu;

E.C.3. Hidrolaze – kataliziraju reakcije razbijanja veza adicijom vode;

E.C.4. Liaze – kataliziraju reakcije eliminacije funkcionalnih grupa pri čemu nastaju dvostruke veze;

E.C.5. Izomeraze – kataliziraju reakcije u kojima dolazi do promjene mjesta funkcionalnih grupa unutar molekule;

E.C.6. Ligaze – kataliziraju reakcije u kojima se uklanja voda iz dvije funkcionalne skupine i pritom nastaje jednostruka veza.

## 2.3 Enzim lakaza

Hikorokuro Yoshida u devetnaestom stoljeću prvi otkriva enzim lakazu u drvetu. Lakaza (također poznata kao E.C.1.10.3.2, *p*-difenol oksidaza, kisikova oksidoreduktaza,...) je enzim koji pripada skupini oksidaza koje sadrže bakar. U reakciji kataliziranoj enzimom lakaza dolazi do oksidacije različitih supstrata uz usporednu redukciju molekule kisika u vodu.

Lakaza se u prirodi nalazi u raznim oblicima kao što su monomerni, homoteramerni, heterodimerni i multimerni pri čemu oblik ovisi o izvoru enzima.<sup>17</sup>

### 2.3.1. Izvori enzima lakaza

Enzim lakaza se može pronaći u mnogobrojnim biljkama, insektima i mikroorganizmima, međutim daleko najučinkovitiji i najzastupljeniji proizvođači enzima lakaza su gljive. Gljive poput puranovog repa (*Trametes versicolor*, Slika 2.6, *Trametes hirsuta*, *Phanerochaete cryosporium*) spadaju u skupinu gljiva bijelog truljenja koje su najučinkovitije u proizvodnji enzima lakaza.<sup>6</sup>





## Slika 2.6 Šarena tvrdoška (*Trametes versicolor*) – gljiva bijelog truljenja

### 2.3.2 Upotreba enzima lakaza

S obzirom na to da u procesu biokatalize enzim lakaza kao supstrat zahtijeva samo molekulu kisika prozvan je “zelenim alatom”. Zbog svoje male specifičnosti za supstrate i visoke katalitičke učinkovitosti lakaza se u industriji koristi za poboljšanje proizvoda (poboljšanje svojstava vlakana, biosinteza, zaštita okoliša,...). Enzim lakaza prisutan je i u proizvodima široke potrošnje kao što su deterdženti, sapuni, paste za zube, dezodoransi, a u farmaceutskoj industriji se koristi kao anestetik, antibiotik i sedativ.<sup>7</sup>

Najveća prednost, ali ujedno i nedostatak enzima lakaze su uvjeti pri kojima postiže najveću aktivnost. Naime, enzim najveću stabilnost i aktivnost postiže u vodenim otopinama pH-vrijednosti 5,0 – 7,0 te u temperaturnom rasponu 25 – 30 °C,<sup>18</sup> a ovakve je uvjete u industrijskim procesima vrlo lako postići. Međutim, upravo je iz ovog razloga enzim nemoguće koristiti u procesima koji zahtjevaju vrijednosti pH i temperature van raspona koji je za lakazu optimalan. Daljnja istraživanja različitih izvora enzima lakaze potrebna su kako bi se našao onaj izvor koji će osigurati dostatnu količinu enzima čija bi aktivnost bila zadovoljavajuća i pri većim temperaturama te u širem rasponu pH-vrijednosti.

## 2.4 Kemijski reaktori

### 2.4.1. Kotlasti reaktor

Kotlasti (šaržni) reaktor je najstarija i najjednostavnija vrsta reaktora (Slika 2.7), identificirana još u antičkom Egiptu gdje se koristio za proizvodnju piva.<sup>19</sup> Danas se kotlasti reaktor koristi u mnogim proizvodnim procesima, prvenstveno radi njegove prilagodljivosti promjenjivim uvjetima procesa te zbog jednostavnosti izvedbe. Diskontinuiranost rada u kotlastom reaktoru omogućuje proizvodnju malih količina širokog spektra različitih produkata pa se tako koristi u farmaceutskoj industriji, proizvodnji polimernih materijala te u biokemijskim procesima. Najjednostavnija izvedba kotlastog reaktora je posuda s dvostrukim stjenkama oblika kotla s miješalom i otvorima kroz koje se uvodi odnosno odvodi reakcijska smjesa, pri čemu dvostruke stjenke omogućavaju izmjenu topline s okolinom, odnosno kontrolu

temperature. Izvedba kotlastog reaktora se u realnim uvjetima prilagođava specifičnostima reakcije koja se u njemu odvija.<sup>20</sup>

Reakcije koje se provode u kotlastom reaktoru karakterizira nestacionarnost karakterističnih veličina procesa. Tako su tijekom provedbe reakcije u kotlastom reaktoru brzina reakcije, sastav reakcijske smjese i količina topline koju sustav izmijenjuje s okolinom promjenjive veličine. Važna značajka ovog reaktora je zatvorenost sustava, što znači da nema izmjene tvari s okolinom tijekom procesa. Cjelokupna reakcijska smjesa se u reaktor uvodi na početku procesa pri čemu se početak reakcije u pravilu aproksimira dodatkom katalizatora. Nakon toga reakcija traje izvjesno vrijeme ovisno o svojstvima reakcijskog sustava, a po završetku reakcije se reaktor prazni. Pojam “idealnog” kotlastog reaktora uključuje i pretpostavku o konstantnosti volumena reakcijske smjese koja je povezana s pretpostavkom o konstantnosti gustoće reakcijske smjese tijekom provedbe reakcije koja je prihvatljiva kada se proces provodi pri konstantnoj temperaturi.<sup>20</sup>

Matematički model kotlastog reaktora čine bilance množine tvari i energije. U slučaju jednostavne reakcije gdje iz reaktanta A nastaje produkt P, odnosno kada se odvija samo jedna jednostavna reakcija, tada će matematički model procesa sadržavati bilancu množine tvari za reaktant A i za produkt P.

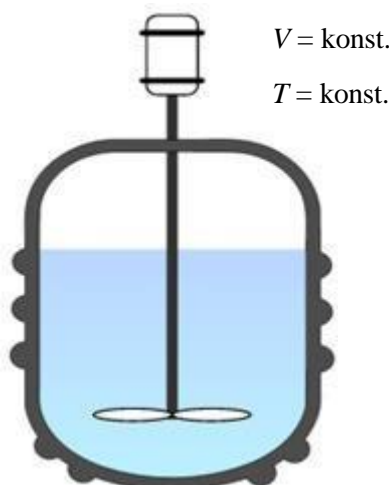
Bilanca množine tvari za reaktant A može se pojednostavljeno prikazati na sljedeći način:

MNOŽINA TVARI A NASTALA KEMIJSKOM REAKCIJOM U REAKTORSKOM VOLUMENU	=	BRZINA AKUMULACIJE TVARI A U REAKTORSKOM VOLUMENU
--------------------------------------------------------------------------	---	------------------------------------------------------

Matematički model kotlastog reaktora za reaktant A u tom slučaju glasi (jednadžba 2.1):

$$r_A \cdot V = - \frac{dn_A}{dt} \qquad 2.1$$

gdje su  $r_A$  brzina kemijske reakcije,  $V$  volumen,  $n_A$  množina tvari A potrošena reakcijom i  $t$  vrijeme. Negativan predznak u izrazu 2.1 ukazuje na to da se u procesu troši reaktant A.

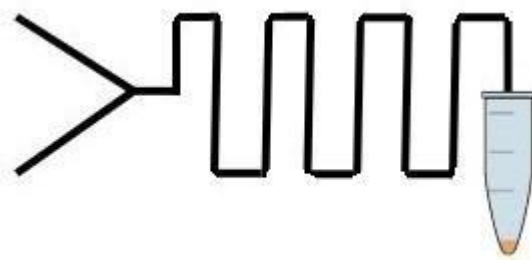


Slika 2.7 Pojednostavljeni prikaz kotlastog reaktora

#### 2.4.2 Mikroreaktor

Mikroreaktor je procesni uređaj koji je svoj naziv dobio zbog dimenzija njegove osnovne strukturne jedinice, mikrokanala, koje se kreću u rasponu od 10 do 500  $\mu\text{m}$  (Slika 2.8). Upravo zbog svojih malih dimenzija, mikroreaktori u odnosu na ostale reaktore karakteriziraju intenzivniji prijenos tvari i topline, laminaran tok te relativno jednostavan prijenos u veće mjerilo. Najopćenitija podjela mikroreaktora jest ona na mikroreaktore u kojima se odvijaju kemijske ili biokemijske reakcije. U slučaju biokemijskih reakcija najčešće se koriste enzimatski mikroreaktori kod kojih enzimi mogu biti slobodni ili imobilizirani.

Kako je prethodno navedeno, osnovna strukturna jedinica mikroreaktora je mikrokanal, koji može biti kružnog ili pravokutnog poprečnog presjeka. Kao materijal za izradu mikroreaktora se zbog inertnosti i prozirnosti najčešće koristi staklo, ali se primjenjuju i drugi materijali poput kvarca, silikona, metala i polimera. Mikrokanali mogu biti opremljeni s jednim ili više ulaznih to jest izlaznih procesnih tokova (najčešće do tri) koje se spajaju ili razdvajaju pomoću “Y”, “T” ili “ $\psi$ ” spojnice.<sup>21</sup> Duljina i širina mikroreaktora u pravilu se prilagođavaju svojstvima komponenata koje sudjeluju u procesu.<sup>22</sup>



Slika 2.8 Pojednostavljeni prikaz mikroreaktora

### 3. MATERIJALI I METODE

Kao izvor apigenina je u okviru rada korišten apigenin iz komercijalnog pripravka Apigenin Swanson. Kako bi se apigenin iz ovog izvora mogao koristiti u reakciji polimerizacije, bilo ga je potrebno ekstrahirati. Stoga su prvo određeni optimalno otapalo i njegova količina, te vrijeme provedbe ekstrakcije apigenina iz komercijalnog pripravka. Uz to, ispitana je stabilnost apigenina otopljenog u odabranom otapalu te je s na taj način pripremljenim apigeninom provedena polimerizacija u kotlastom reaktoru i cijevnom mikroreaktoru. Uzorci su se analizirali UV-Vis spektroskopijom, infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) te kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

#### 3.1 Materijali

##### 3.1.1 Kemikalije

Za provedbu eksperimenata korištene su sljedeće kemikalije:

- ABTS (2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolon-6-sulfonska kiselina), SIGMA ALDRICH, Njemačka
- Aluminijski klorid, KEMIKA, Hrvatska
- Apigenin iz kapsule, SWANSON, SAD
- Bojilo Commassie brilliant Blue G-250, FLUKA, SAD
- Bradford reagens, BIORAD, Njemačka
- Čisti apigenin, SIGMA ALDRICH, Njemačka
- Enzim lakaza porijeklom iz *T. versicolor*, SIGMA ALDRICH, Njemačka
- Etanol, GRAM-MOL D.O.O, Hrvatska
- Glicin, SIGMA ALDRICH, Švicarska
- Goveđi serum albumin (BSA), SIGMA, Švicarska
- Kalij dihidrogenfosfat, LACHNER D.O.O, Češka
- Kalij hidrogenfosfat, MERCK, Njemačka
- Katehin, FLUKA, SAD
- Klorovodična kiselina, VWR-CHEMICALS, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Metanol, VWR CHEMICALS, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Natrijev hidroksid, GRAM-MOL D.O.O, Hrvatska
- Natrijev klorid, LACHNER, Češka

- Natrijev nitrit, LAPHOMA, Sjeverna Makedonija
- Ortofosfatna kiselina, VWR-CHEMICALS, Njemačka

### 3.1.2 Oprema

Za provedbu eksperimenata korištena je sljedeća oprema:

- 1260 Infinity II HPLC, AGILENT, SAD
- Analitička vaga, SHIMADZU AUW120, Japan
- Centrifuga, HETTICH, UNIVERSAL 320 R, SAD
- Digestor, FLORES WALLEES VA090810ADST, Španjolska
- Filtar Chromafil Xtra RC-20/25 0,45  $\mu\text{m}$ , MACHEREY-NAGER, Njemačka
- FT-IR spektrometar, PERKIN ELMER INSTRUMENTS, SAD
- Homogenizator, DLAB MX-S, Kina
- Magnetska miješalica, DLAB MS-H-S, Kina
- Mikroreaktor širine kanala 1000  $\mu\text{m}$ , MICRONIT, Nizozemska
- pH elektroda SI ANALYTICS, BLUELINE 16 PH, Njemačka
- pH metar SCHOTT INSTRUMENTS, LAB 860, Njemačka
- Klipna pumpa PHD 4400, HARVARD APPARATUS, SAD
- Klipna pumpa Pump 33, HARVARS APPARATUS, SAD
- Spektrofotometar, SHIMADZU UV-1800, Japan
- Tehnička vaga, KERN EW1500-2M, Njemačka
- Tresilica Vibromix 313 EVT, TECHNICA, Slovenija

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije flavonoida

Za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida koristi se metoda po Zhishenu i suradnicima.<sup>23</sup> Metoda se temelji na stvaranju flavonoid-aluminij kompleksa koji su crvene boje i imaju maksimum apsorbancije pri 510 nm.

Za provedbu metode potrebno je pripremiti vodene otopine natrijevog nitrita ( $\text{NaNO}_2$ )  $\gamma = 0,05$  g/mL, aluminijevog klorida ( $\text{AlCl}_3$ )  $\gamma = 0,18$  g/mL i natrijeve lužine ( $\text{NaOH}$ )  $c = 1$

mol/L. Vodena otopina NaNO<sub>2</sub> dobivena je otapanjem 1,25 g NaNO<sub>2</sub> u 25 mL ultračiste vode. Vodena otopina AlCl<sub>3</sub> dobivena je otapanjem 4,48 g AlCl<sub>3</sub> uz polagano dodavanje 25 mL ultračiste vode. Ta otopina je pripravljena u digestoru jer je otapanje AlCl<sub>3</sub> egzotermna reakcija. Otopina NaOH pripravljena je otapanjem 2 g granula NaOH u 50 mL ultračiste vode.

U plastične kivete od 2 mL otpipetirano je 400 µL ultračiste vode, 100 µL ekstrakta ili standarda (razrjeđenja temeljne otopine katehina za baždarni pravac) ili otapala (75% etanol) te 30 µL vodene otopine NaNO<sub>2</sub>. Sadržaj u kivetama je homogeniziran pomoću vorteksa te je nakon 5 minuta dodano 30 µL vodene otopine AlCl<sub>3</sub>. Nakon 6 minuta je dodano 200 µL otopine NaOH za zaustavljanje reakcije i 240 µL ultračiste vode. Sadržaj u kivetama je dobro promiješan te je na spektrofotometru izmjerena absorbancija na taj način pripremljenog uzorka pri 510 nm.

Za određivanje baždarnog pravca pripravljena je otopina katehina koncentracije  $\gamma = 1$  mg/mL u 75 %-tnom etanolu. Budući da se katehin sporo otapa, otopina je miješana 30 min na mješalici. Iz na taj način dobivene otopine pripravljena su razrijeđene otopine katehina koncentracija 50, 100, 150, 200 i 250 µg/mL. Sadržaj ukupnih flavonoida izračuna se na temelju baždarnog pravca te se izražava u mikrogramima katehin ekvivalenta (engl. *catechin equivalents*) po miligramu suhe tvari (ST) uzorka (µg CE/mg ST).

### 3.2.2 Bradford test za određivanje koncentracije proteina

Bradford test temelji se na vezanju boje Commassie Brilliant Blue G-250 sadržane u reagensu te je vrlo brz, jednostavan i osjetljiv, zbog čega je često korišten za određivanje koncentracije proteina. Međutim, linearno područje ovisnosti absorbancije o koncentraciji proteina u baždarnom se dijagramu odnosi na vrlo usko područje koncentracija, najčešće 2-10 mg/L, što može predstavljati problem pri analizi.

Iz tog razloga korišten je modificirani Bradford test, odnosno test lineariziran prema metodi opisanoj u radu Ernst i suradnici.<sup>24</sup> U plastičnu kivetu dodano je 500 µL uzorka i 500 µL Bradford reagensa te je na taj način dobivena otopina kratko homogenizirana. Nakon točno 5 minuta, spektrofotometrijski je izmjerena absorbancija tako dobivenog uzorka pri  $\lambda = 595$  nm i  $\lambda = 450$  nm na UV-VIS spektrofotometru. Prethodno je pri valnim duljinama  $\lambda = 595$  i  $\lambda = 450$  nm bilo potrebno izmjeriti absorbanciju plastičnih kiveta koje su sadržavale 1 mL deionizirane

vode. Svi uzorci analizirani su u tri paralele. Koncentracija proteina u uzorku dobiva se iz baždarnog dijagrama pri čemu je korišten omjer absorbancija izmjerenih pri  $\lambda = 595 \text{ nm}$  i  $\lambda = 450 \text{ nm}$ . Baždarni dijagram izrađen je korištenjem otopine goveđeg serumskog albumina koncentracije  $0,1 \text{ mg/mL}$ , što odgovara absorbanciji od  $0,66$  pri  $\lambda = 280 \text{ nm}$  u kvarcnoj kivetu. Tako dobivena otopina razrjeđivana je u rasponu koncentracija  $0,5 - 100 \text{ mg/L}$ . Pritom je linearno područje ovisnosti absorbancije o koncentraciji proteina u baždarnom dijagramu postignuto za koncentracije  $0 - 50 \text{ mg/L}$ .

Bradford reagens pripremljen je otapanjem  $100 \text{ mg}$  bojila Commassie Brilliant Blue G-250 u smjesi  $50 \text{ mL}$  etanola i  $100 \text{ mL}$  ortofosfatne kiseline te dopunjen ultračistom vodom do volumena od  $1 \text{ L}$ . Tako dobivena otopina potom je filtrirana, a reagens je čuvan pri temperaturi  $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$  u boci koja sprječava prodiranje svjetlosti. Bradford reagens je prije upotrebe potrebno termostatirati na sobnoj temperaturi.

### 3.2.3 Izrada baždarnog pravca za čisti apigenin

Baždarni pravac čistog apigenina određivao se na način da je otopina čistog apigenina u  $95\%$ -tnom etanolu koncentracije  $10 \text{ mg/mL}$  razrjeđivana dodavanjem otapala do koncentracija  $0, 0,31, 0,63, 1,25, 2,5$  i  $5 \text{ mg/mL}$ . Ovako pripremljeni uzorci analizirani su na spektrofotometru pri valnoj duljini od  $335 \text{ nm}$  te je očitana absorbancija uzoraka uključujući onaj od  $10 \text{ mg/mL}$ . Iz grafičkog prikaza ovisnosti absorbancije o koncentraciji otopine dobiva se jednadžba pravca koja se kasnije koristi za računanje koncentracije.

### 3.2.4 Određivanje aktivnosti enzima lakaza

Određivanje aktivnosti enzima lakaza temelji se na oksidacijskoj ABTS metodi u kojoj enzim lakaza nafenolnu boju,  $2,2'$ -Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS), oksidira do stabilnijeg stanja kationskog radikala. Koncentracija radikala utječe na intenzitet obojenja plavo-zelene boje smjese što je proporcionalno aktivnosti enzima lakaza.

Kako bi se odredila aktivnost enzima lakaza, u kvarcnu kivetu volumena  $1 \text{ mL}$  dodano je  $0,1 \text{ mL}$  uzorka i  $0,9 \text{ mL}$  otopine ABTS-a. Mjerenje je provedeno na spektrofotometru u vremenu od  $60$  sekundi pri valnoj duljini od  $420 \text{ nm}$ . Iz dobivene dinamičke promjene



absorbancije uzorka, izračunata je vrijednost volumne aktivnosti (V.A.) enzima lakaza prema jednadžbi 3.1.

$$V. A. = \frac{V_R}{\epsilon_{420} \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3.1)$$

gdje su:

$V_R$  – ukupni volumen uzorka u kiveti, mL,

$V_E$  – volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim, mL,

$\epsilon_{420}$  – ekstincijski koeficijent,  $\epsilon_{420} = 0,036 \text{ L}/\mu\text{mol}/\text{cm}$ ,

$d$  – širina kivete,  $d = 1 \text{ cm}$ ,

$\Delta A/\Delta t$  – promjena absorbancije u vremenu (nagib pravca), 1/min,

V. A. – volumna aktivnost enzima, U/cm, pri čemu 1 U predstavlja jedinicu enzimatske aktivnosti, odnosno onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oksidira 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  supstrata u minuti.

0,1 mol/L NaCl-glicin pufer pH 4,5 pripremljen je otapanjem 0,75 g glicina i 0,59 g natrijeva klorida u 100 mL destilirane vode. pH-vrijednost otopine podešena je na 4,5 zakiseljavanjem otopine s vodenom otopinom klorovodične kiseline ( $c = 1 \text{ mol}/\text{L}$ ).

Otopina ABTS-a pripremljena je otapanjem 0,16 g ABTS-a u 100 mL 0,1 mol/L NaCl-glicin pufera pH 4,5. Pripremljena otopina ABTS-a stabilna je nekoliko dana ako je skladištena na temperaturi od  $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Prije upotrebe, otopinu ju potrebno zagrijati na temperaturu od  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.5 Analiza uzorka infracrvenom spektroskopijom s Fourireovom transformacijom (FTIR)

Mjerenje infracrvenog spektra čistog apigenina te apigenina nakon polimerizacije provedeno je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) na instrumentu FTIR PerkinElmer Spectrum One, SAD u području valnih brojeva od 4000 do 450  $\text{cm}^{-1}$  uz korištenje ATR (engl. *Attenuated Total Reflectance*) komore zbog čega prethodna priprema uzorka nije bila potrebna.

### 3.2.6 Analiza uzorka kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC)

Kako bi se odredila koncentracija apigenina nakon ekstrakcije korištena je kapljevinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) s DAD detektorom (engl. *Diode Array Detector*). Korišten je uređaj Agilent 1260 Infinity II HPLC koji je opremljen sa sustavom kvaterne pumpe, automatskim uzorkovanjem, dijelom za kolonu i navedenim DAD detektorom. Prikupljanje i obrada podataka provedena je korištenjem softvera Agilent OpenLAB CDS. Kromatografsko odvajanje provedeno je pomoću Zorbax 300Extend-C18 kolone, dimenzija  $150 \times 4,6, 3,5 \mu\text{m}$  na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Mobilna faza A je bila 0,1 % mravlja kiselina, a mobilna faza B acetonitril. Tijekom 42 min trajanja analize ukupni protok obje mobilne faze je bio konstantan i iznosio 1,0 mL/min. Višestupanjski linearni gradijent otapala je bio: 0 min 98% A, 5 min 90% A, 15 min 70% A, 20 min 50% A, 25 min 50% A, 30 min 20% A, 32 min 2% A, 40 min 98% A. Za analizu je uzorkovano 10  $\mu\text{L}$  svakog standarda i uzorka. UV/Vis spektri su snimljeni u rasponu od 190 – 400 nm, a kromatogrami su snimljeni na 330 nm.

Prije analiza bilo je potrebno izraditi standardnu otopinu čistog apigenina. Standardna otopina koncentracije 1000  $\mu\text{g/mL}$  pripravljena je u DMSO. Odgovarajuća količina osnovne otopine razrijeđena je s 80% metanola kako bi se dobilo sedam radnih standardnih otopina (koncentracije 1, 2, 5, 10, 20, 50 i 100  $\text{g/mL}$ ) za izradu relevantne kalibracijske krivulje.

### 3.2.7 Ekstrakcija apigenina iz komercijalnog pripravka Apigenin Swanson

U okviru eksperimenta napravljene su 24 odvage pripravka Apigenin Swanson prosječne mase 0,3380 g (za ekstrakciju s metanolom) i 0,3388 g (za ekstrakciju s etanolom). Odvage su zatim prebačene u epruvete te im je dodano 1 mL otapala, metanola ili etanola. Epruvete su potom stavljene na tresilicu pri 600 1/min u trajanju 5-40 minuta. Prve četiri probe uzoraka skinute su s tresilice nakon 5 minuta te su centrifugirane kako bi se uklonilo zamućenje koje bi uzrokovalo pogrešku prilikom mjerenja na spektrofotometru. Uzorak je centrifugiran 5 minuta pri 14.000 okretaja, te je nakon dekantiranja na valnoj duljini 335 nm određena absorbancija uzorka pomoću spektrofotometra. Postupak se ponavlja za preostale odvage, koje se u grupama od četiri probe skidaju s tresilice nakon 10, 15, 20, 30 i 40 minuta. Iz vrijednosti

apsorbancije se pomoću baždarnog pravca za čisti apigenin je izračunata koncentracija apigenina u uzorcima.

### 3.2.8 Utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju ekstrahiranog apigenina

Za određivanje utjecaja vremena ekstrakcije na koncentraciju ekstrahiranog apigenina napravljene su 24 odvage pripravka Apigenin Swanson prosječne mase 0,3388 g u kojima se nalazi apigenin. Odvage su zatim prebačene u epruvete te im je dodano 1 mL 95%-tnog etanola. Epruvete s na taj način pripremljenom otopinom su stavljene na tresilicu pri 600 1/min u trajanju 5-40 minuta. Prve četiri probe uzoraka skinute su s tresilice nakon 5 minuta, te su se prije analize morale obraditi u centrifugi zbog zamućenosti uzorka. Uzorak je centrifugiran 5 minuta na 14.000 okretaja, te je kapljevinskom ostatku nakon dekantiranja spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od 510 nm. Postupak je ponavljen za vremena ekstrakcije 10, 15, 20, 30 i 40 minuta. Iz vrijednosti apsorbancije se pomoću baždarnog pravca za čisti apigenin izračunavala koncentracija apigenina u uzorcima.

### 3.2.9 Stabilnost apigenina u 95%-tnom etanolu

Stabilnost apigenina ispitivala se kroz razdoblje od 6 dana. Napravljeno je dvadeset uzoraka apigenina ekstrahiranog u etanolu srednje koncentracije 1,1681 mg/mL te je odmah očitana apsorbancija četiri probe uzoraka dok su se ostali uzorci pohranili u hladnjak na temperaturu 4 °C. Svaki dan su izuzeta četiri uorka u kojima je spektrofotometrijski izmjerena apsorbancija na valnoj duljini 335 nm. Iz vrijednosti apsorbancije se pomoću baždarnog pravca za čisti apigenin izračunavala koncentracija apigenina u uzorcima.

### 3.2.10 Utjecaj količine etanola na učinkovitost ekstrakcije apigenina

Ispitivanje utjecaja količine etanola na učinkovitost ekstrakcije apigenina provodilo se na način da je pripremljeno 40 odvaga pripravka Apigenin Swanson prosječne mase 0,3387 g. Različiti volumeni etanola, 1 mL, 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL, 10 mL, 25 mL, 40 mL, 60 mL i 100 mL dodavani su u odvage, a za svaki od volumena pripremljena su četiri uzorka. Na taj

način pripremljenim uzorcima je izmjerena absorbanacija na valnoj duljini 335 nm te je pomoću baždarnog pravca za čisti apigenin određena njegova koncentracija.

### 3.2.11 Polimerizacija flavonoida-apigenina u šaržnom reaktoru

Proces polimerizacije flavonoida proveden je u šaržnom reaktoru volumena 40 mL, a reakcija se provodila u razdoblju od 24 sata. U bioreaktor je odvagano 0,2 g flavonoida koncentracije 0,56 mg/mL te dodano 13 mL 95%-tnog etanola i 28 mL 0,1 mol/L fosfatnog pufera pH 7,4. 0,1 mol/L fosfatni pufer pH 7,4 pripremljen je otapanjem kalijevog hidrogenfosfata ( $K_2HPO_4$ ,  $m = 6,06$  g) i kalijevog dihidrogenfosfata ( $KH_2PO_4$ ,  $m = 2,07$  g) u 500 mL destilirane vode.

Smjesa je miješana na magnetnoj miješalici pri temperaturi  $T = 25$  °C dok se flavonoid nije u potpunosti otopio. Reakcija je pokrenuta dodatkom 1000 U enzima lakaza. Početna aktivnost enzima u reaktoru iznosila je 4,78 U/mL, a proces je proveden uz miješanje na magnetskoj mješalici 64 sata na temperaturi  $T = 25$  °C.

Dinamička promjena koncentracije flavonoida praćena je pomoću HPLC-a. Uzorci su se uzimali za ukupna vremena od 1 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2 h, 3,5 h te 24 h. Promjena koncentracije flavonoida je praćena tijekom provedbe reakcije i spektrofotometrijski jer se boja reakcijske smjese mijenja sa stupnjem polimerizacije flavonoida (od mliječne do smeđe). Osim toga, tijekom provedbe reakcije praćena je i aktivnost enzima lakaza.

### 3.2.12 Polimerizacija flavonoida apigenina u cijevnom mikroreaktoru

Polimerizacija flavonoida-apigenina provedena je u mikroreaktoru opremljenom s dva ulaza "T" oblika i jednim izlazom. Kao mikroreaktor korištena je PFTE (teflonska) cijev duljine 30 cm i radijusa 1 mm ukupnog volumena od  $V = 235,62$   $\mu$ L. Dvije klipne pumpe spojene su na reaktor silikatnim cjevčicama pomoću "T" spojnice pri čemu je pomoću jedne pumpe dovođena otopina apigenina u etanolu koncentracije 1,12 mg/mL, dok je drugom pumpom u mikroreaktor dovođena otopina enzima lakaze početne aktivnosti 17,22 U/mL u 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH 7,4. Početna koncentracija flavonoida iznosila je 0,56 mg/mL. Uzorak na izlazu iz reaktora je skupljan u epruvetu postavljenu u ledenu kupelj kako bi se zaustavila reakcija, a prikupljeni uzorci analizirani su na spektrofotometru i HPLC-u.

Protoci etanola i pufera bili su u omjeru 1:2,3, a određeni su prema vremenima zadržavanja prema sljedećoj jednadžbi (jednadžba 3.2):

$$q_V = \frac{V}{\tau} \quad (3.2)$$

gdje su:

$q_V$  – ukupni volumni protok ulaznih procesnih tokova [ $\mu\text{L min}^{-1}$ ],

$\tau$  – vrijeme zadržavanja [min],

$V$  – volumen mikroreaktora [ $\mu\text{L}$ ].

Prije početka sakupljanja svakog od uzoraka reakcija je provođena do uspostave ravnotežnog stanja, odnosno u trajanju od četiri vremena zadržavanja ( $4 \cdot \tau$ ). Za svako vrijeme zadržavanja – 0,71, 1,42, 3,56, 7,12, 30,92 i 14,24 min, sakupljeno je po 100  $\mu\text{L}$  uzorka.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1 Utjecaj otapala na ekstrakciju apigenina iz pripravka Apigenin Swanson

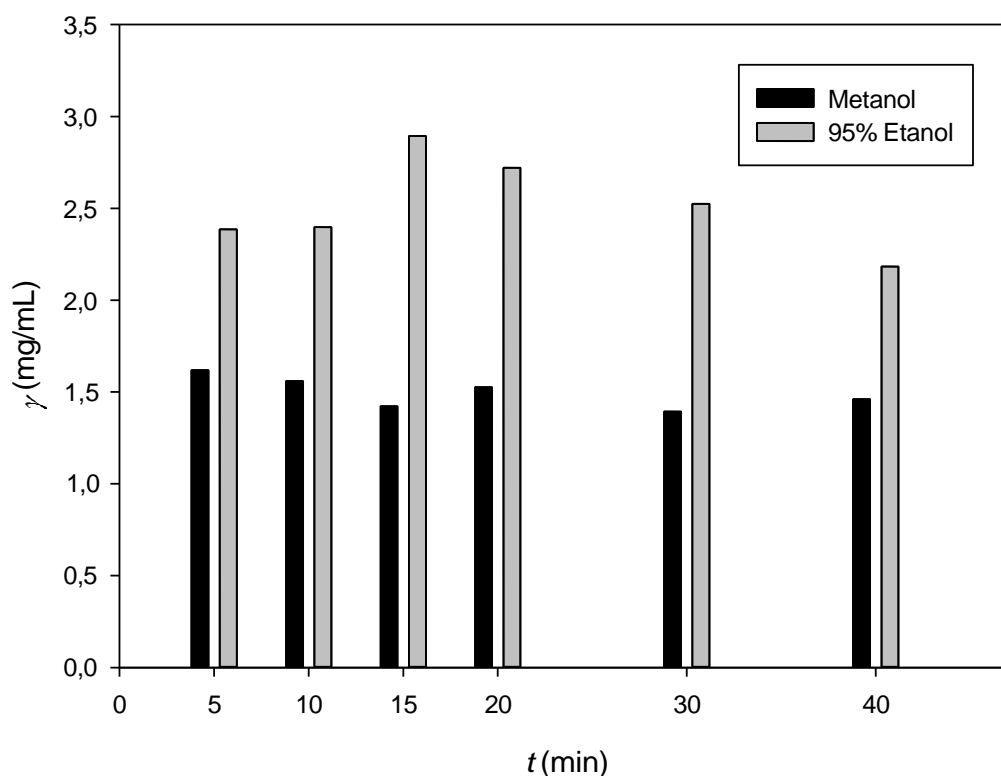
Određivanje utjecaja otapala na koncentraciju ekstrahiranog apigenina iz pripravka Apigenin Swanson provodilo se s dva otapala, metanolom i etanolom. Praćen je utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju ekstrahiranog apigenina, a rezultati su prikazani u Tablicama 4.1 i 4.2 te na Slici 4.1.

Tablica 4.1 Utjecaj vremena provedbe ekstrakcije na koncentraciju apigenina ekstrahiranog u etanolu

$t$ [min]	$\gamma$ [mg/mL]
5	$2,39 \pm 0,18$
10	$2,40 \pm 0,10$
15	$2,89 \pm 0,21$
20	$2,72 \pm 0,10$
30	$2,52 \pm 0,01$
40	$2,18 \pm 0,23$

Tablica 4.2 Utjecaj vremena provedbe ekstrakcije na koncentraciju apigenina ekstrahiranog u metanolu

$t$ [min]	$\gamma$ [mg/mL]
5	$1,62 \pm 0,33$
10	$1,56 \pm 0,23$
15	$1,42 \pm 0,28$
20	$1,39 \pm 0,28$
30	$1,39 \pm 0,29$
40	$1,46 \pm 0,10$

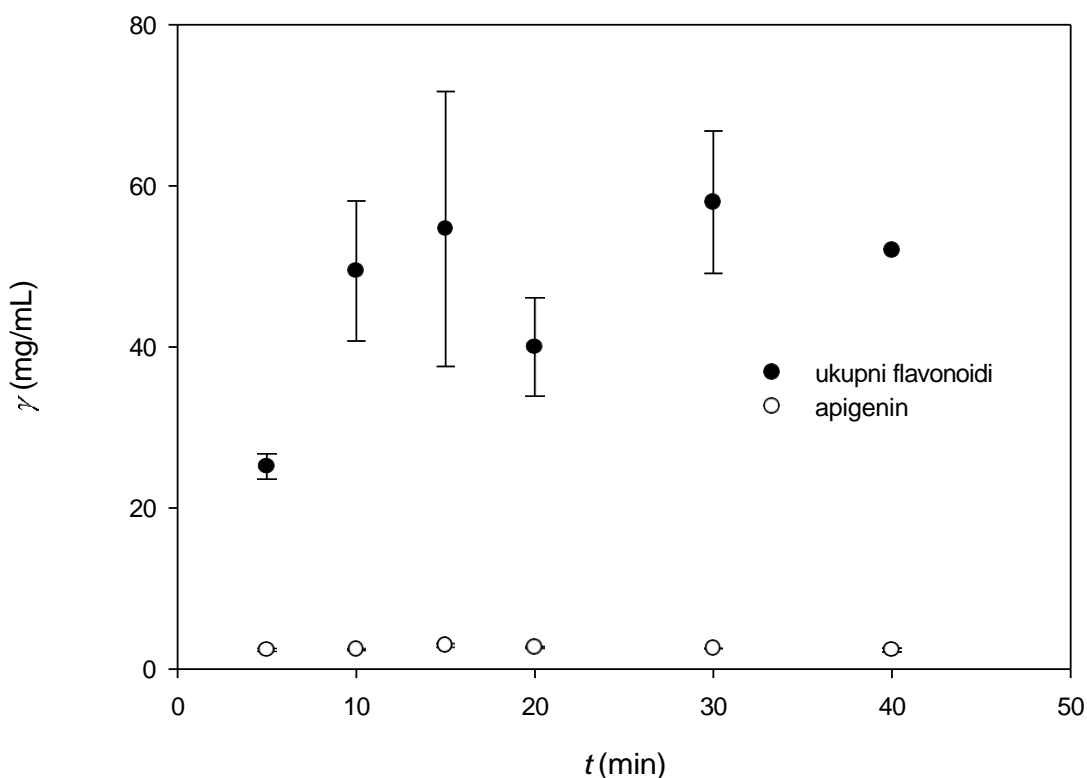


Slika 4.1 Prikaz utjecaja trajanja procese ekstrakcije i vrste otapala na koncentraciju ekstrahiranog apigenina

Iako se prema literaturnim podacima<sup>25</sup> prilikom ekstrakcije apigenina iz praha i listova bilja kao otapalo koristi metanol, u slučaju apigenina porijeklom iz pripravka Apigenin Swanson koji je korišten u ovom radu može se zaključiti kako je za provedbu procesa ekstrakcije kao otapalo povoljniji etanol (Slika 4.1).

#### 4.2 Utjecaj vremena ekstrakcije na koncentraciju ekstrahiranog apigenina

Utjecaj vremena ekstrakcije na uspješnost izolacije apigenina iz pripravka Apigenin Swanson analizirana je iz podataka dobivenih ekstrakcijom u etanolu. Usporedba koncentracija ukupnih flavonoida i apigenina prikazana je na Slici 4.2. Za prikaz odnosa koncentracije apigenina u odnosu na koncentraciju ukupnih flavonoida u uzorku korišteni su podaci dobiveni testom za ukupne flavonoide (3.2.1).



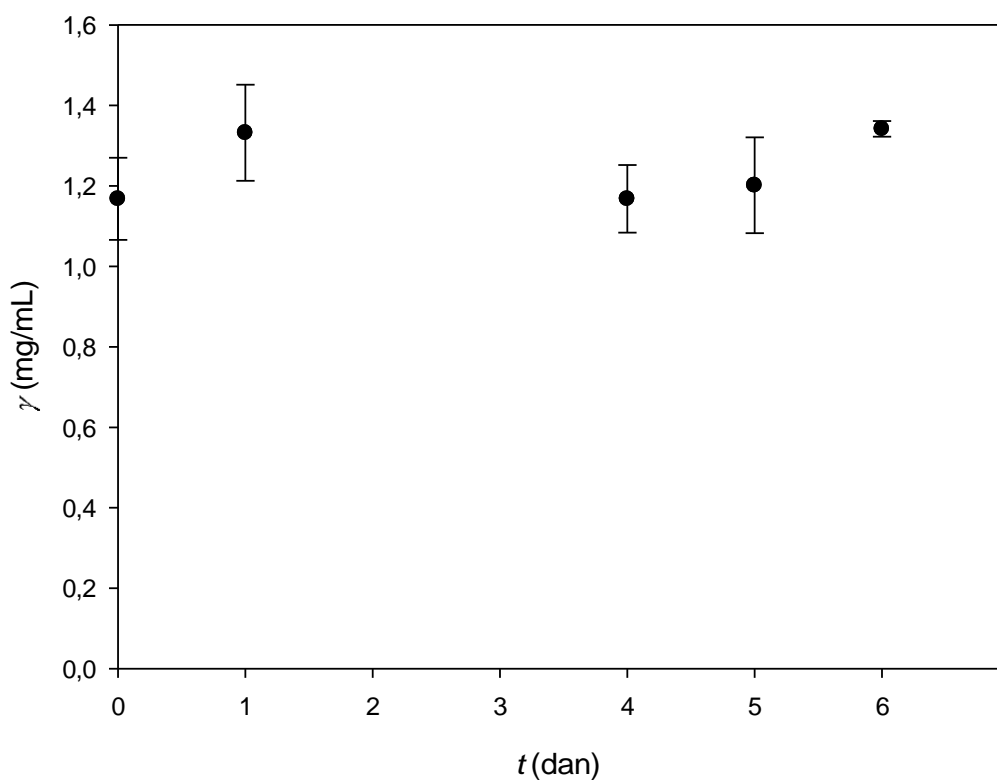
Slika 4.2 Utjecaj trajanja procesa ekstrakcije na koncentraciju ekstrahiranog apigenina i ukupnih flavonoida

Proces je najučinkovitiji za vrijeme ekstrakcije od 15 minuta pri kojem koncentracija ekstrahiranog apigenina iznosi 2,89 mg/mL. Prudženjem trajanja procesa ekstrakcije koncentracija apigenina ne mijenja se značajno. Za ukupne flavonoide je najveća koncentracija dobivena za 30 minuta trajanja procesa te je iznosila  $\gamma = 57,98$  mg/mL.

#### 4.3 Stabilnost apigenina u 95% etanolu

Može se zaključiti kako je apigenin u 95%-tnom etanolu stabilan jer je njegova koncentracija praktički konstantna kroz šest dana trajanja pokusa (Slika 4.3).

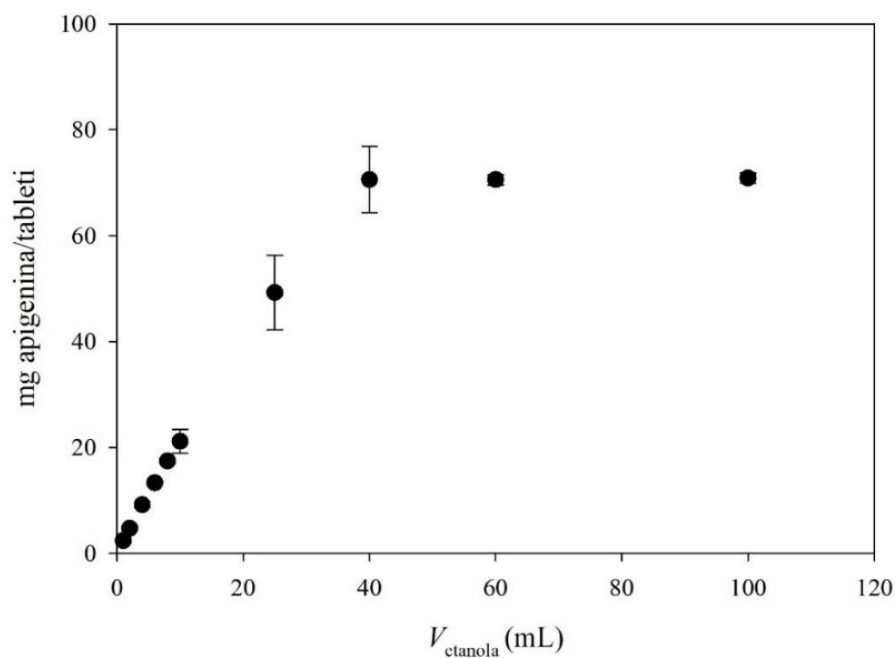




Slika 4.3 Stabilnost ekstrahiranog apigenina u 95% etanolu

#### 4.4 Utjecaj količine etanola na masu ekstrahiranog apigenina po tableti pripravka Apigenin Swanson

Masa ekstrahiranog apigenina se povećava proporcionalno s povećanjem količine/volumena etanola (Slika 4.4). Trend je vidljiv sve do volumena otapala od 40 mL nakon čega daljnjim povećanjem volumena otapala ne dolazi do povećanja mase ekstrahiranog apigenina. Iz navedenog se može zaključiti da je optimalan volumen otapala za provedbu procesa ekstrakcije apigenina 40 mL/tableti.

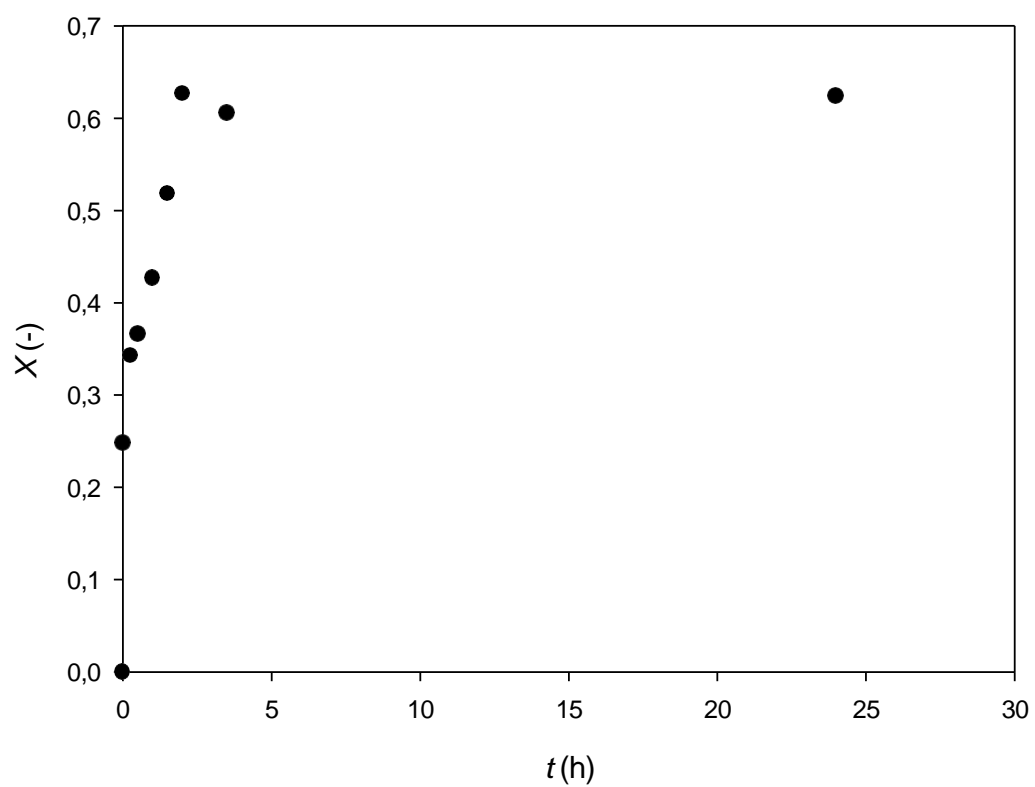


Slika 4.4 Utjecaj volumena etanola na masu ekstrahiranog apigenina

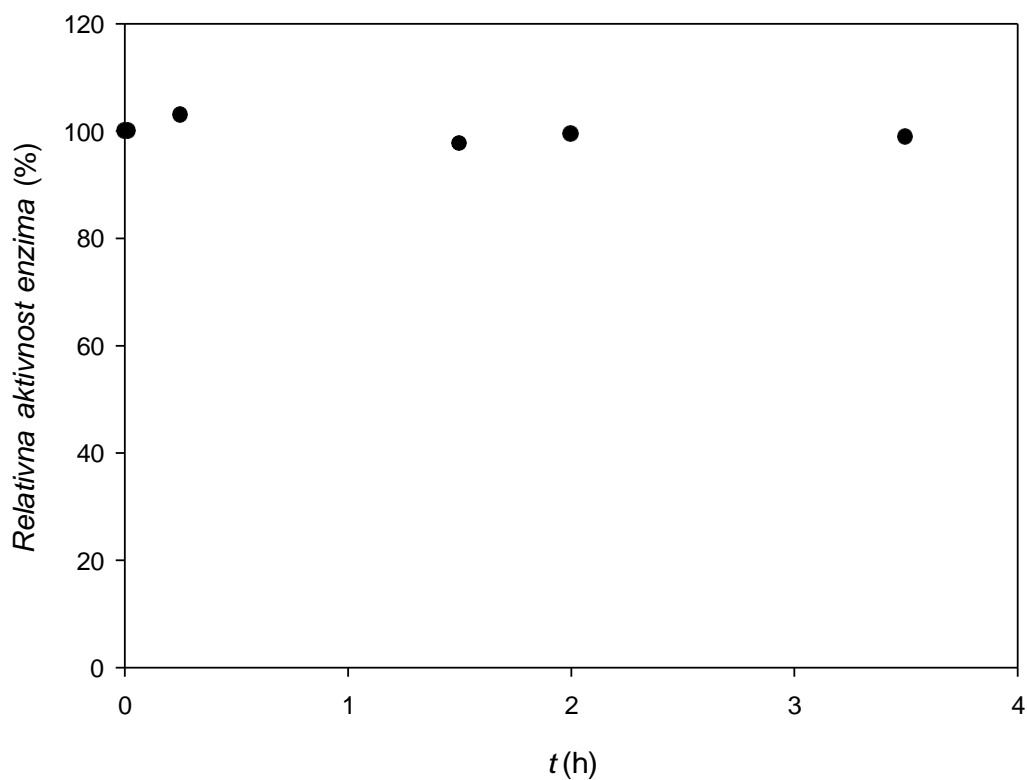
## 4.5 Polimerizacija apigenina

### 4.5.1. Kotlasti reaktor

Na Slici 4.5 prikazani su rezultati polimerizacije apigenina za pokus proveden u kotlastom reaktoru. Maksimalna konverzija postignuta je za vrijeme reakcije od 2 sata te je iznosila 62,6 %. Konverzija je daljnjom provedbom procesa praktički konstantna te se može zaključiti kako je optimalno vrijeme provedbe reakcije 2 sata. Aktivnost enzima praćena je samo u prvih četiri sata provedbe procesa, nakon čega je zaustavljeno mjerenje jer se aktivnost nije značajno mijenjala (Slika 4.6).



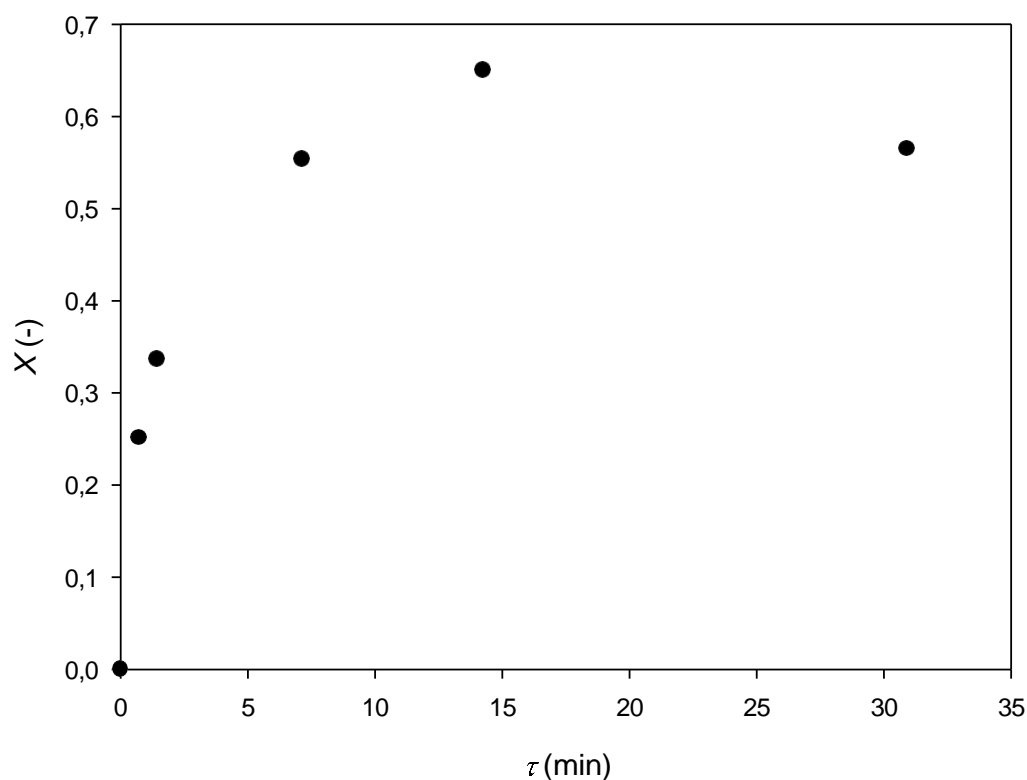
Slika 4.5 Promjena konverzije tijekom provedbe reakcije polimerizacije apigenina u kotlastom reaktoru



Slika 4.6 Promjena relativne aktivnosti enzima lakaza tijekom provedbe reakcije polimerizacije apigenina u kotlastom reaktoru

#### 4.5.2 Cijevni mikroreaktor

Reakcija polimerizacije apigenina se u mikroreaktoru provodila pri različitim vremenima zadržavanja. Na Slici 4.7 prikazani su rezultati polimerizacije apigenina uz enzim lakaza pri čemu je maksimalna konverzija od 65,0 % postignuta pri vremenu zadržavanja  $\tau = 14,24$  min. Vidljivo je da se daljnim povećanjem vremena zadržavanja konverzija neznatno smanjuje što može biti povezano sa smanjenjem aktivnosti enzima u ulaznom procesnom toku.



Slika 4.7 Utjecaj vremena zadržavanja na konverziju za reakciju polimerizacije apigenina u mikroreaktoru

#### 4.6 FTIR, UV-Vis i HPLC analize uzorka polimeriziranog apigenina

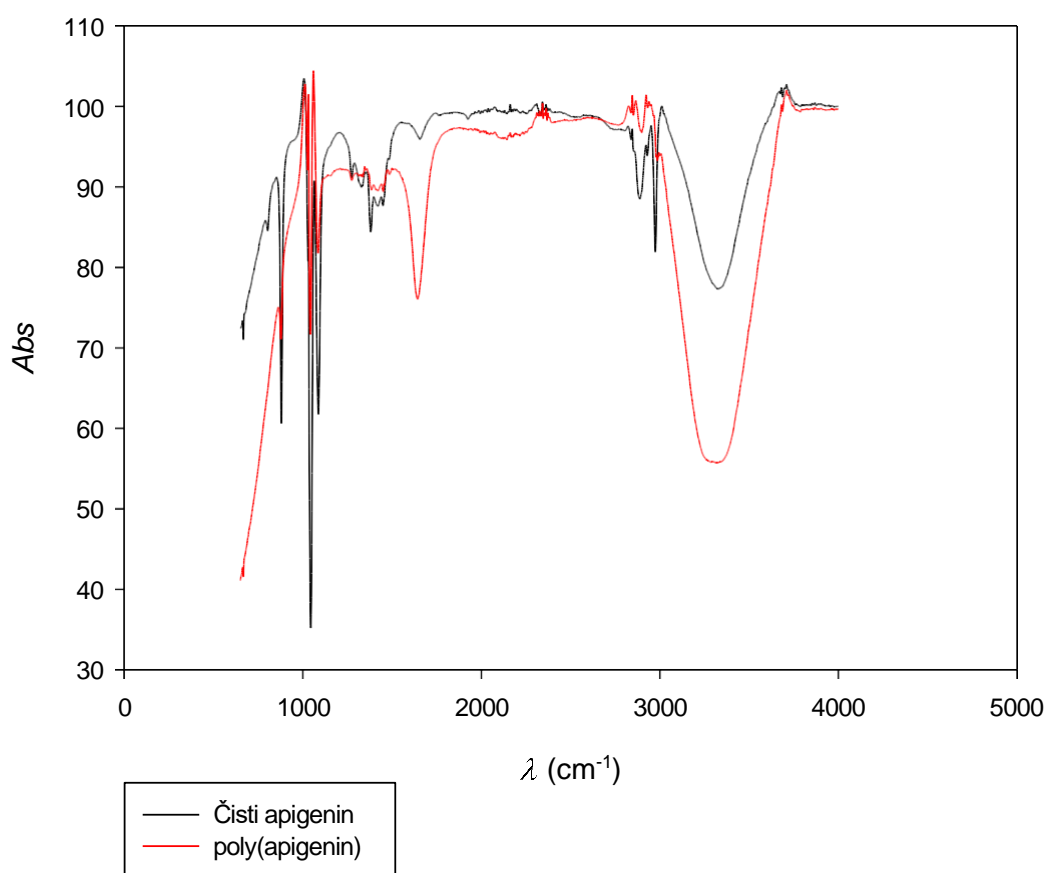
##### 4.6.1 UV-Vis i FTIR analize uzorka polimeriziranog apigenina

Spektar uzorka snimljen na UV-Vis spektrofotometru i FTIR-u potvrđuje prisutnost karakterističnih funkcionalnih grupa u poliflavonoidima. Iz literature je poznato kako se valne duljine karakteristične za poliflavonoide nalaze u rasponu  $3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$  te ukazuju na prisutnost OH grupa vezanih vodikovim vezama.<sup>26</sup> Velika prisutnost OH grupa pridonosi topljivosti polimera, što ukazuje na to da se polimerizacijom dobio proizvod veće topljivosti. Na FTIR spektru također je moguće primijetiti maksimum apsorbancije oko  $1060\text{ cm}^{-1}$  koji odgovara C-CO-C grupama u ketonima (Slika 4.8).<sup>27</sup>

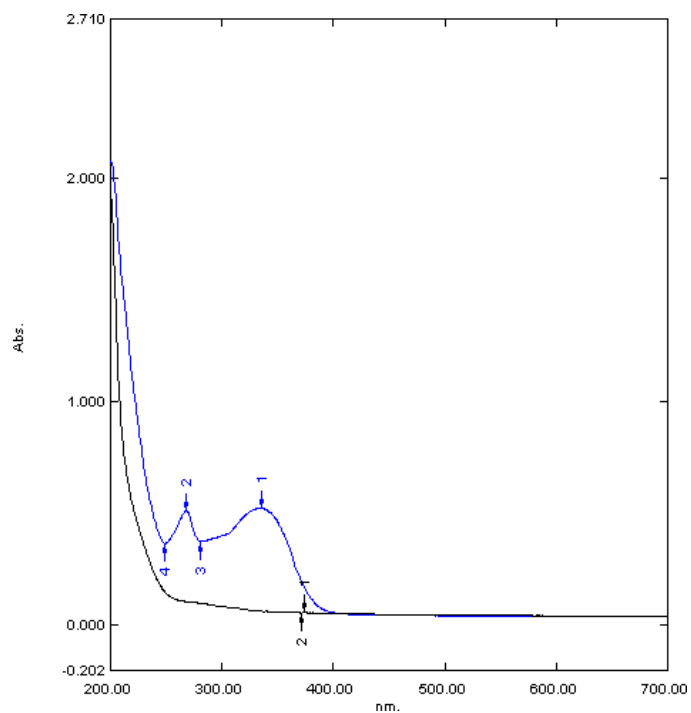
Kako bi se mogla potvrditi prisutnost apigenina u ekstrahiranom uzorku potrebno je napraviti spektar čistog apigenina. Dobiveni spektar daje informaciju o valnim duljinama na

kojima se očekuju maksimumi absorpcije ukoliko se u ispitivanom uzorku nalazi apigenin (Slika 4.9).

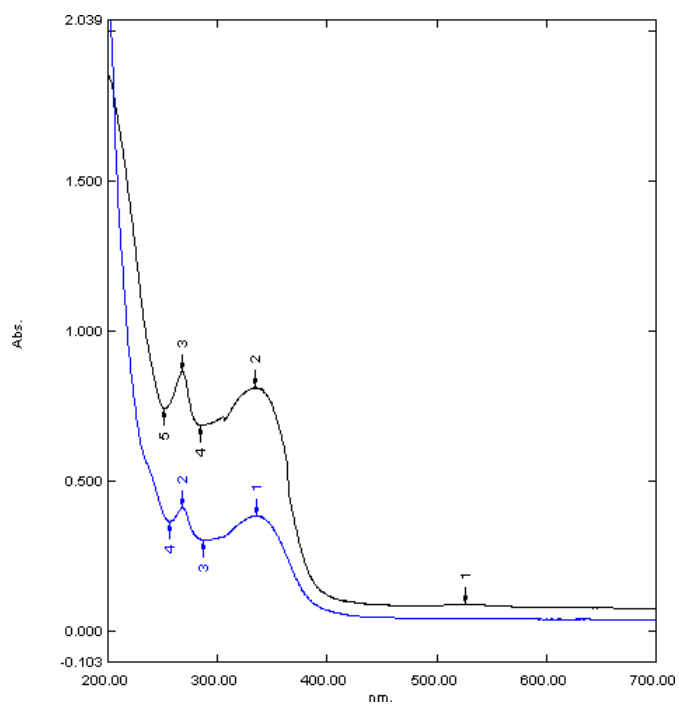
UV-Vis spektar pokazuje maksimum absorpcije na 268 nm, karakterističan za apigenin. Međutim, usporedbom spektra čistog apigenina i onog iz pripravka Apigenin Swanson može se primijetiti da je vrijednost maksimuma kod apigenina iz pripravka Apigenin Swanson puno veća, iako pokazuju maksimume absorpcije na gotovo istim valnim duljinama. Iz navedenog se može zaključiti da je uzorak pripravka Apigenin Swanson bio ili prekoncentriran ili pak da su se u uzorku nalazile nečistoće (Slika 4.10).



Slika 4.8 FTIR spektar čistog apigenina i produkta polimerizacije



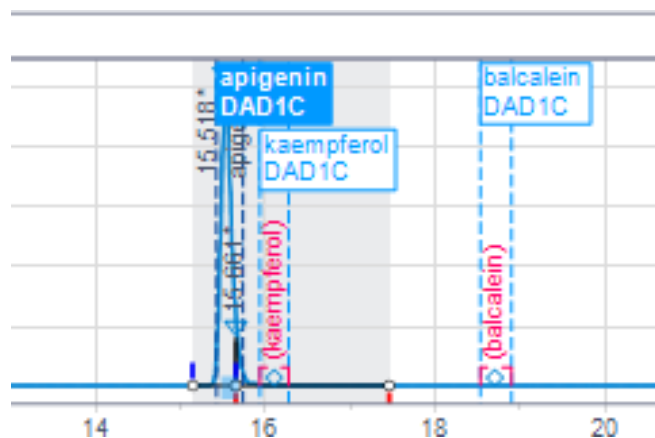
Slika 4.9 UV-Vis spektar čistog etanola (crno) i čistog apigenina (plavo)



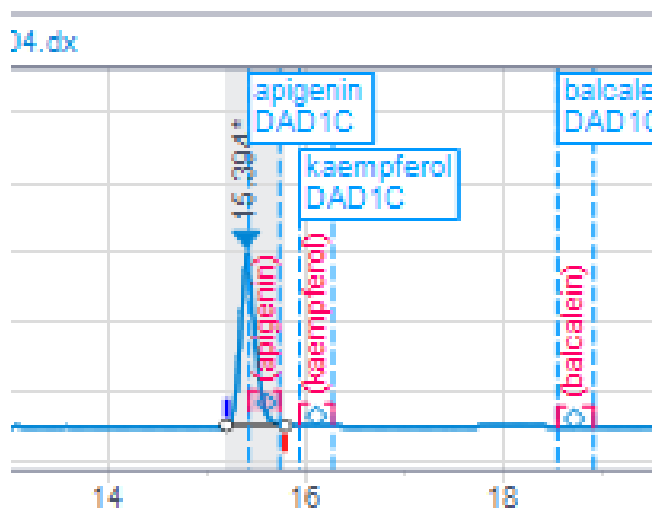
Slika 4.10 UV-Vis spektar čistog apigenina (plavo) i apigenina iz pripravka Apigenin Swanson (crno)

#### 4.6.2 HPLC analiza uzorka polimeriziranog apigenina

Čisti apigenin i produkt dobiven polimerizacijom analizirani su pomoću HPLC-DAD analize kako bi se potvrdila enzimatska polimerizacija flavonoida. Maksimumi su dobiveni na vremenima zadržavanja 15,518 minuta (za čisti apigenin, Slika 4.11) i 15,394 minuta (za apigenin iz pripravka Apigenin Swanson, Slika 4.12). Na temelju dobivenih rezultata analize može se zaključiti kako se radi o istoj komponenti.



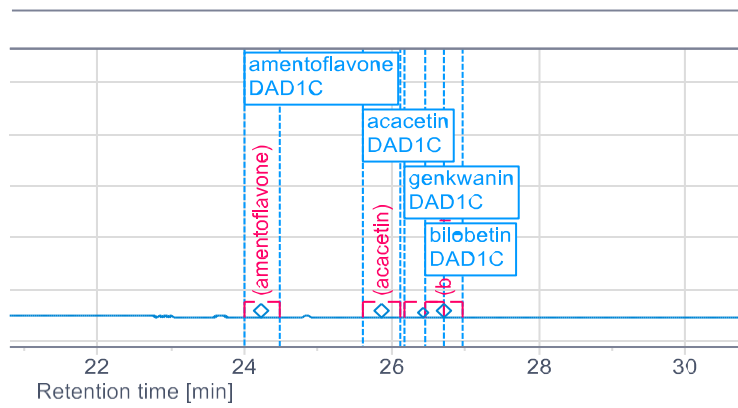
Slika 4.11 Isječak rezultata HPLC-DAD analize za čisti apigenin



Slika 4.12 Isječak rezultata HPLC-DAD analize za produkt polimerizacije

Nadalje, HPLC-DAD analizom utvrđeno je nastajanje biflavonoida čiji se maksimum na grafičkom prikazu može primjetiti između vremena zadržavanja od 24 i 25 minuta (Slika 4.13). Međutim, na temelju dobivenih rezultata analize može se zaključiti kako je količina dobivenih biflavonoida u odnosu na ostale polimere veće molekulske mase mala (Prilog 4.).





Slika 4.13 Isječak rezultata HPLC-DAD analize za produkt polimerizacije

## 5. ZAKLJUČAK

- Ekstrakcija apigenina iz komercijalnog pripravka Apigenin Swanson uspješno je provedena uz etanol kao otapalo, pri čemu je optimalan volumen etanola za provedbu procesa ekstrakcije bio 40 mL/tableta.
- Za volumen otapala od 1 mL/tableti komercijalnog pripravka Apigenin Swanson najveća učinkovitost ekstrakcije postiže se u vremenu od 15 minuta.
- Proces proveden u kotlastom reaktoru rezultirao je maksimalnom konverzijom od 62,6% za 2 sata provedbe reakcije.
- Maksimalna konverzija pri provedbi reakcije u mikroreaktoru postignuta je za vrijeme zadržavanja  $\tau = 14,24$  minute i iznosila je 65,0%. Daljnjim povećanjem vremena zadržavanja dolazi do smanjenja konverzije što je vjerojatno posljedica deaktivacije enzima.
- UV-Vis i FTIR analize uzorka nakon polimerizacije ukazuju na stvaranje polimernih oblika flavonoida veće topljivosti, a oni HPLC-DAD analize na činjenicu da je količina dobivenih biflavonoida u odnosu na ostale polimere dobivene reakcijom mala.

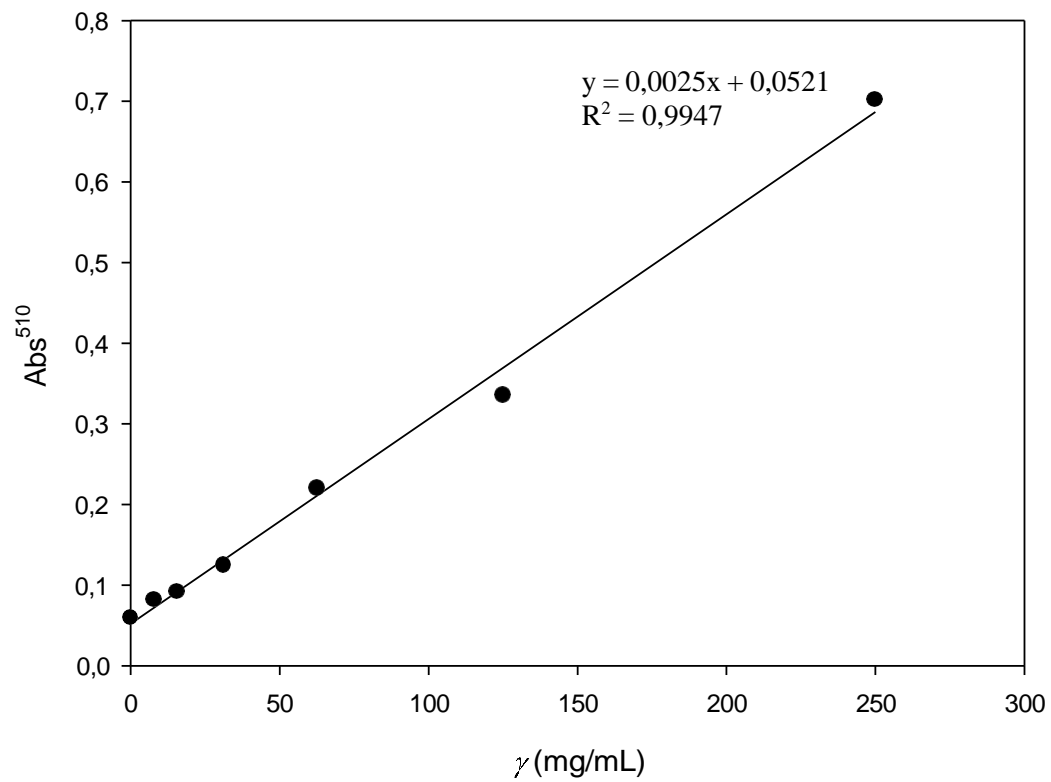
## 6. LITERATURA

1. Gontijo V.S., dos Santos M.H., Viegas C. Biological and chemical aspects of natural biflavonoids from plants: A brief review, *Mini Rev. Med. Chem.* 17 (2017) 834-862.
2. Iriti M., Varoni E.M. Chemopreventive potential of flavonoids in oral squamous cell carcinoma in human studies, *Nutrients* 5 (2013) 2564-2576.
3. Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J.P., Tongnolini M., Borges G., Crozier A. Dietary (poly)phenolic in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases, *Antioxid. Redox Signal.* 18 (2013) 1818-1892.
4. O'Prey J., Brown J., Fleming J., Harrison P.R. Effects of dietary flavonoids on major signal transduction pathways in human epithelial cells, *Biochem. Pharmacol.* 66 (2003) 2075-2088.
5. Abreu R.M.V., Santos D., Moreno A. Effects of carvedilol and its analog BM-910228 on mitochondrial function and oxidative stress, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 295 (2000) 1022-1030.
6. Sigoillot J.C., Berrin J.G., Bey M., Lesage-Meessen L., Levasseur A., Lomascolo A., Record E., UzanBoukhris E. Fungal strategies for lignin degradation, *Adv. Bot. Res.* 61 (2012) 263-308.
7. Agrawal K., Chaturvedi V., Verma P. Fungal laccase discovered but yet undiscovered, *Bioresour. Bioprocess.* 5 (2018) 4.
8. Rasoli I. Phytochemicals – Bioactives and Bioavailability and Impact of Health, u Yan L., Paxton J.W. (ur.), *Oral Bioavailability and Disposition of Phytochemicals*, IntechOpen, Shanghai, 2011, str. 117-129.
9. Herken E. N., Erel O., Guzel S., Celik H., Ibanoglu S. Total antioxidant, phenolic compounds, and total oxidant status of certified and uncertified turkey, *Int. J. Food Prop.* 12 (2009) 461-468.
10. Barbarić M., Mišković K., Bojić M., Baus Lončar M., Smolčić-Bubalo A., Debeljak Ž., Medić-Šarić M. Chemical composition of the ethanolic propolis extracts and its effect on HeLa cells, *J. Ethnopharmac.* 135 (2011) 772-778.
11. Catarino D.M., Alves-Silva J., Pereira R.O., Cardoso M.S. Antioxidant capacities of flavones and benefits in oxidative-stress related diseases, *Curr. Top. Med. Chem.* 15 (2015) 105–119.

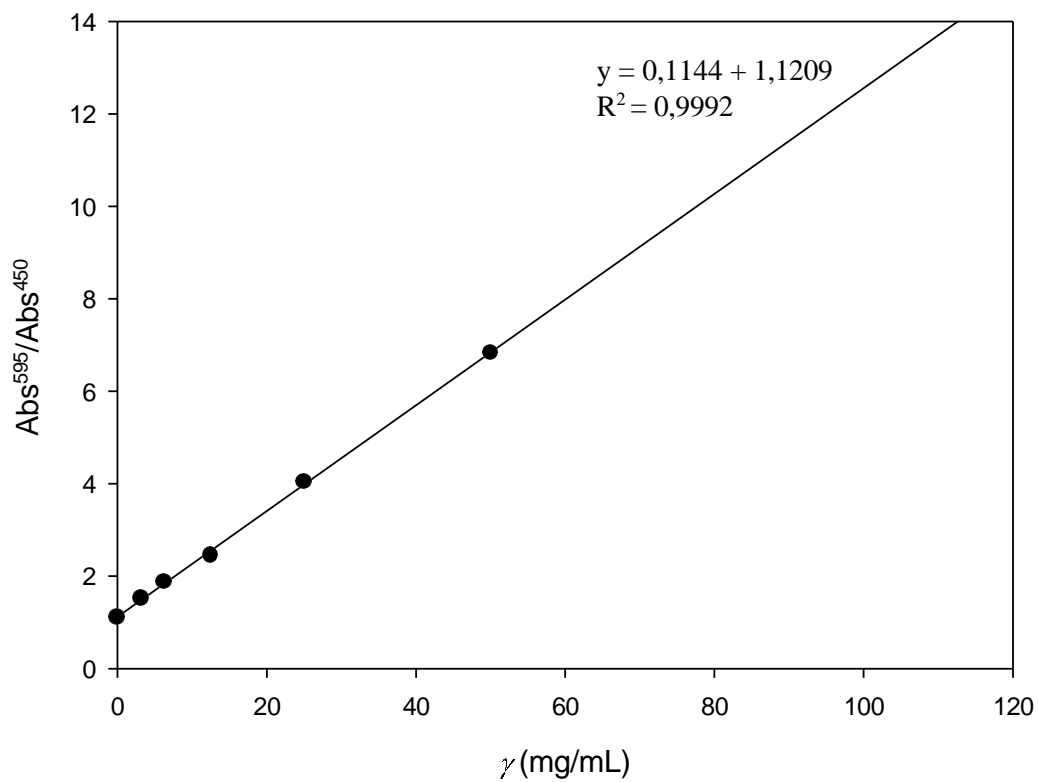
12. Upadek H., Kottwitz B. Einsatz und Nutzen von Enzymen in Waschmitteln, *J. Seif. Oele Fette Wachse* 120 (1994) 794-800.
13. Patel A. K., Singhania R.R., Pandey A. Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes, u Brahmachari G. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, Elsevier, Cambridge, 2017, str. 13-41.
14. Podhorski R., Sentić A. Tehnička enciklopedija 2. svezak, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 1966, str. 50-54.
15. URL: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Protein> (Pristup: 6.6.2024.)
16. Tompsett S. L. Medical biochemistry, *Nature* 199 (1963) 943.
17. Yoshida Y. Chemistry of lacquer (Urushi) Part I: Communication from the Chemical Society of Tokio, *J. Chem. Soc. Trans.* 43 (1883) 472-486.
18. Jin X., Yu X., Zhu G., Zheng Z., Feng F., Zhang Z. Conditions optimizing and application of laccase-mediator system (LMS) for the laccase-catalyzed pesticide degradation, *Sci. Rep.* 6 (2016) 35787.
19. Nicholson P.T., Shaw I. *Ancient Egyptian materials and technology*, Cambridge University Press, Cambridge, 2000, str. 557.
20. Gomzi Z., Kemijski reaktori, *Hinus*, Zagreb, 1998., str. 27-35., 48-61.
21. Šalić A., Tušek A., Kurtanjek T., Zelić B. *Mikroreaktori*, *Kem. Ind.* 59 (2010) 227-248.
22. Pennemann H., Kolb G. Microstructured reactors as efficient tool for the operation of selective oxidation reactions, *Catal. Today* 278 (2016) 3-21.
23. Zhishen J., Mengcheng T., Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chem.* 64 (1999) 555-559.
24. Ernst O., Zor T. Linearization of the Bradford protein assay, *J. Visualized Exp.* 38 (2010) 1918.
25. Chaves J.O., Lachos-Perez D., Torres-Mayanga P.C., Machado F., Forster-Carneiro T., Vázquez-Espinosa M., Barbero G. F., Rostagno M.A. Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques, *Front. Chem.* 8 (2020) 1-25.
26. Bruno F.F., Trotta A., Fossey S., Nagarajan S., Nagarajan R., Samuelson L.A., Kumar J. Enzymatic synthesis and characterization of polyquercetin, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* 47 (2010) 1191-1196.
27. Latos-Brozio M., Masek A., Piotrowska M. Polymeric forms of plant flavonoids obtained by enzymatic reactions, *Molecules* 27 (2022) 3702.

## 7. PRILOZI

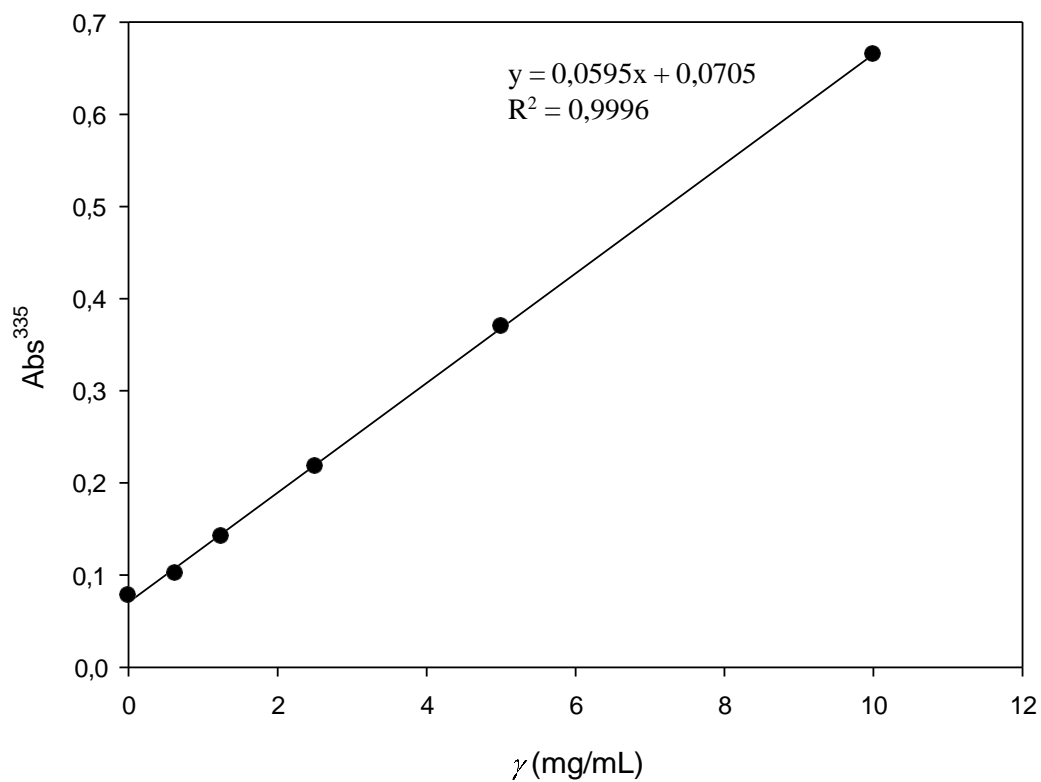
### Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje ukupne koncentracije flavonoida



Prilog 2. Baždarni pravac za određivanje ukupne koncentracije proteina



Prilog 3. Baždarni pravac čistog apigenina



#### Prilog 4. HPLC-DAD analiza produkta dobivenog polimerizacijom

