

# Razvoj integriranog mikrosustava za kontinuiranu ekstrakciju enzima lakaza

---

**Božinović, Marko**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:149:829500>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Marko Božinović**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, veljača 2023.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marko Božinović

RAZVOJ INTEGRIRANOG MIKROSUSTAVA ZA KONTINUIRANU EKSTRAKCIJU  
ENZIMA LAKAZA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Anita Šalić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Anita Šalić
2. prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko
3. doc. dr. sc. Martina Sudar

Zagreb, veljača 2023.

## SAŽETAK

Pročišćavanje enzima dugotrajan je, skup i zahtjevan proces koji najčešće rezultira s niskim prinosom i gubitkom aktivnosti enzima. Ekstrakcijske metode su među najraširenijim metodama pročišćavanja različitih molekula, međutim upotreba konvencionalnih otapala, kao što su organska otapala, dovodi do denaturacije enzima. Upotreba vodenih dvofaznih sustava u svrhu pročišćavanja biomolekula, pokazala se učinkovitim i ekološki prihvatljivom metodom. Između različitih vodenih dvofaznih sustava, posebnu pažnju privlače vodeni dvofazni sustavi na bazi eutekličnih otapala (*engl.* Deep Eutectic Solvents, DES) zbog svoje niske toksičnosti, visoke biorazgradivosti i ekonomičnosti. Posljednjih godina, pozornost se usmjerava i na upotrebi mikroekstraktora u svrhu pročišćavanje biomolekula zbog intenzifikacije procesa i manje vjerojatnosti narušavanje strukture biomolekula.

U ovom radu razvijen je integrirani sustav serijski povezanog mikroekstraktora i mikroseparatora za kontinuiranu mikroekstrakciju proteina, odnosno ekstrakciju enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi DES-a. Ukupno je sintetizirano i karakterizirano 15 DES-ova. U seriji šaržnih ekstrakcija ispitan je utjecaj sastava DES-ova i koncentracije soli ( $K_2HPO_4$ ) na učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza. Sustav koji se sastojao od eutekličnog otapala kolin-klorid:propilen-glikol:cinkov diklorid 1:4:0,02 ( $ChCl:PG:ZnCl_2$  1:4:0,02) i vodene otopine  $K_2HPO_4$  koncentracije  $\gamma = 0,5$  g/mL pokazao se najučinkovitijim sustavom za ekstrakciju enzima lakaza. U sljedećem koraku, korištenjem odabranog sustava, ispitan je utjecaj koncentracije enzima na učinkovitost ekstrakcije, a dobiveni rezultati pokazali su da povećanje koncentracije enzima pozitivno utječe na učinkovitost ekstrakcije. U svrhu intenzifikacije procesa, ekstrakcija je provedena u mikroekstraktoru gdje su ispitani utjecaj promjera kanala i vremena zadržavanja na učinkovitost ekstrakcije. Najveća učinkovitost ekstrakcije enzima u mikroekstraktoru ( $d = 500$   $\mu m$ ) iznosila je  $E = 88,34 \pm 1,04$  %, a ostvarena je za vrijeme zadržavanja od  $\tau = 12$  s. Proces ekstrakcije u mikroekstraktoru uspješno je opisan 2D matematičkim modelom. Nakon optimizacije procesa ekstrakcije, mikroekstraktor je serijski spojen s mikroseparatorom u kojem je provedena uspješna separacija ekstraktne i rafinatne faze. Na samom kraju, razvijena metoda ispitana je na sirovom enzimu lakaza proizvedenog fermentacijom *Trametes versicolor*, a ekstrahirani enzim upotrijebljen je za uklanjanje tekstilne boje na bazi anilina.

*Ključne riječi:* enzim lakaza, ekstrakcija, euteklična otapala, mikroekstraktor, mikroseparator, integrirani sustav

## SUMMARY

Enzyme purification is a lengthy, expensive, and demanding process that usually results in low yield and loss of enzyme activity. Extraction procedures are among the most widely used methods for purifying various molecules. However, the use of conventional solvents, such as organic solvents, leads to denaturation of enzymes. The use of aqueous two-phase systems (ATPS) to purify biomolecules has been shown to be an effective and environmentally friendly method. Among the various ATPS, ATPS based on deep eutectic solvents (DES) are attracting special attention due to their low toxicity, high biodegradability, and cost-effectiveness. In recent years, attention has also focused on the use of microextractors for biomolecule purification because they intensify the process and are less likely to disrupt the structure of biomolecules.

In this work, an integrated system of microextractor and microseparator connected in series was developed for continuous microextraction of proteins, i.e., extraction of the enzyme laccase from *Trametes versicolor*, using an ATPS based on DES. A total of 15 DESs were synthesized and characterized. In a series of batch extractions, the influence of DES composition and salt concentration ( $K_2HPO_4$ ) on the efficiency of laccase enzyme extraction was investigated. The system consisting of the eutectic solvent choline-chloride:propylene glycol:zinc dichloride 1:4:0.02 (ChCl:PG:ZnCl<sub>2</sub> 1:4:0.02) and an aqueous solution of  $K_2HPO_4$  with a concentration of  $\gamma = 0.5$  g/mL proved to be the most efficient system for laccase enzyme extraction. In the next step, the influence of enzyme concentration on extraction efficiency was tested using the selected system. The obtained results showed that increasing the enzyme concentration positively affected the extraction efficiency. To intensify the process, the extraction was performed in a microextractor, and the influence of the channel diameter and residence time on the extraction efficiency was studied. The highest efficiency of enzyme extraction in the microextractor ( $d = 500$   $\mu$ m) was  $E = 88.34 \pm 1.04$  % and it was achieved at a residence time of  $\tau = 12$  s. The extraction process in the microextractor was successfully described by a 2D mathematical model. After optimization of the extraction process, the microextractor was connected in series with a microseparator, in which the extract and raffinate phases were successfully separated. At the very end, the developed method was tested on the crude laccase enzyme produced by the fermentation of *Trametes versicolor*, and the extracted enzyme was used to remove the aniline-based textile dye.

**Keywords:** enzyme laccase, extraction, deep eutectic solvents, microextractor, microseparator, integrated system

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Enzimi i proteini .....	3
2.2. Enzim lakaza.....	5
2.2.1. Izvori enzima lakaza .....	6
2.2.2. Upotreba enzima lakaza.....	8
2.3. Pročišćavanje enzima.....	10
2.3.1. Vodeni dvofazni sustavi.....	11
2.3.2. Eutektična otapala.....	14
2.4. Mikrostrukturirani uređaji.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	19
3.1. Materijali.....	19
3.1.1. Kemikalije.....	19
3.1.1.1. Sirovi enzim .....	20
3.1.2. Oprema.....	21
3.1.3. Priprema otopina i reagensa.....	22
3.2. Metode .....	24
3.2.1. Bradfordov test za mjerenje koncentracije proteina u uzorku .....	24
3.2.2. Priprava i karakterizacija eutektičnih otapala .....	25
3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima lakaza .....	28
3.2.4. Šaržna ekstrakcija enzima lakaza.....	29
3.2.4.1. Odabir vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnog otapala za provedbu ekstrakcije enzima lakaza .....	29
3.2.4.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije enzima lakaza u vodenoj otopini $K_2HPO_4$ na učinkovitost ekstrakcije enzima u šaržnom ekstraktoru .....	31
3.2.4.3. Ispitivanje ponovne upotrebe odabranog eutektičnog otapala za ekstrakciju enzima lakaza.....	31
3.2.5. Kontinuirana ekstrakcija enzima lakaza korištenjem mikroekstraktora .....	32
3.2.6. Razvoj integriranog sustava serijski povezanog mikroekstraktora i mikroseparatora .....	34

3.2.7. Izrada 2D matematičkog modela procesa ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru .....	35
3.2.7.1. Statističke analize za ispitivanje ispravnosti dobivenog 2D modela .....	37
3.2.8. Elektroforeza (SDS-Page).....	38
3.2.9. Razgradnja ljubičasta anilinske tekstile boje u šaržnom reaktoru .....	40
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	42
4.1. Odabir i karakterizacija eutektnih otapala .....	42
4.2. Utjecaj eutektnog otapala na aktivnost enzima lakaza.....	45
4.3. Šaržna ekstrakcija enzima lakaza u vodenim dvofaznim sustavima na bazi eutektnih otapala .....	46
4.4. Utjecaj koncentracije enzima lakaza na učinkovitost ekstrakcije enzima u šaržnom reaktoru .....	50
4.5. Ekstrakcija enzima lakaza u mikroekstraktoru .....	51
4.6. Razvoj integriranog sustava serijski povezanog mikroekstraktora i mikroseparatora...56	
4.7. Ponovna upotreba eutektnog otapala u šaržnom ekstraktoru, mikroekstraktoru i integriranom sustavu .....	58
4.9. Provedba ekstrakcije sirovog enzima lakaza porijeklom iz <i>Trametes versicolor</i> pri optimalnim uvjetima .....	60
4.10. Razgradnja anilinske tekstilne boje enzimom lakaza u šaržnom reaktoru .....	63
5. ZAKLJUČAK .....	65
6. LITERATURA .....	67
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....	74
7.1. Simboli.....	74
7.2. Grčka slova .....	75
7.3. Indeksi.....	75
7.4. Skraćenice .....	75
8. PRILOZI .....	77
Prilog 1. Baždarni pravac za metodu po Bradfordu.....	77
Prilog 2. 2D matematički model za opis procesa ekstrakcije u mikroekstraktoru izrađen u programskom paketu Mathematica 13.0.....	78
9. ŽIVOTOPIS.....	81

## 1. UVOD

Zadnjih 200 godina, područje kemije je obilježeno kao vrijeme kreativnosti, inovacija i mnogobrojnih otkrića. Znanstvenike se poticalo da unaprijede postojeće te razviju nove metode i procese, a pritom da koriste sve dostupne resurse, ne obazirući se koliko razvoj utječe na okoliš i živa bića. Takvo stajalište dominiralo je zbog slabog interesa o utjecaju kemikalija na zdravlje živih bića i okoliša. Ideja „Zelene kemije“ javila se tek 1990. godine objavom „Zakon od sprječavanju onečišćenja“ u SAD-u, a koji se temelji na uklanjanju onečišćenja tokom same proizvodnje, a ne na odlaganju i zbrinjavanju otpada. Osam godina nakon donošenja spomenutog Zakona, objavljena su 12 načela zelene kemije kojima je cilj bio dati jasne smjernice o razvoju održivih i ekološki prihvatljivih procesa koji se temelje na smanjenju stvaranja otpada, osmišljavanju novih sintetskih procesa prilikom čega treba smanjiti količinu upotrijebljenih ili proizvedenih štetnih tvari, minimizirati upotrebu štetnih otapala i zamijeniti ih s ekološki prihvatljivim alternativama, kemijski procesi moraju biti osmišljeni tako da minimiziraju zahtjeve za energijom, što pridonosi i minimizaciji okolišnih i ekonomskih učinaka itd. [1].

Danas, 80% otpada kemijske industrije čine otapala te se stoga pridaje velika pozornost razvoju i primjeni održivih otapala. Vodeći se načelima zelene kemije, nova otapala moraju biti ekološki prihvatljiva sa što manjim negativnim utjecajem na okoliš [2]. Obzirom da se velike količine otapala u kemijskoj industriji koriste u procesu ekstrakcije, intenzivno se radi na razvoju čistih, održivih i učinkovitih procesa ekstrakcije.

Kada se govori o ekstrakciji enzima, primjenom konvencionalnih organskih otapala, osim negativnog okolišnog utjecaja, dolazi i do nepovratnog gubitka enzimatske aktivnosti. S druge strane, konvencionalne metode izolacije kao što su iseljavanje, kromatografske metode itd. su dugotrajne i skupe metode, a u konačnici često rezultiraju s niskim prinosom enzima. Stoga, kako bi se poboljšao proces ekstrakcije potrebno je pronaći novu metodu ili nova otapala, a pritom poštujući 12 načela zelene kemije i pazeći da enzimatska aktivnost bude što više očuvana. Jedna od metoda koja zadovoljava sva tražena svojstva, tj. brza je, učinkovita i najvažnije ekološki prihvatljiva za ekstrakciju biomolekula je vodeni dvofazni sustav (*engl.* Aqueous Two-Phase System, ATPS) [2, 3]. Osim novih metoda, intenzivno se radi i na razvoju novih izvedbi ekstraktora.

Primjena mikrostrukturiranih uređaja, tj. mikroekstraktora i mikroseparatora je novo, slabo istraženo područje kada govorimo o procesima ekstrakcije. Njihovom primjenom



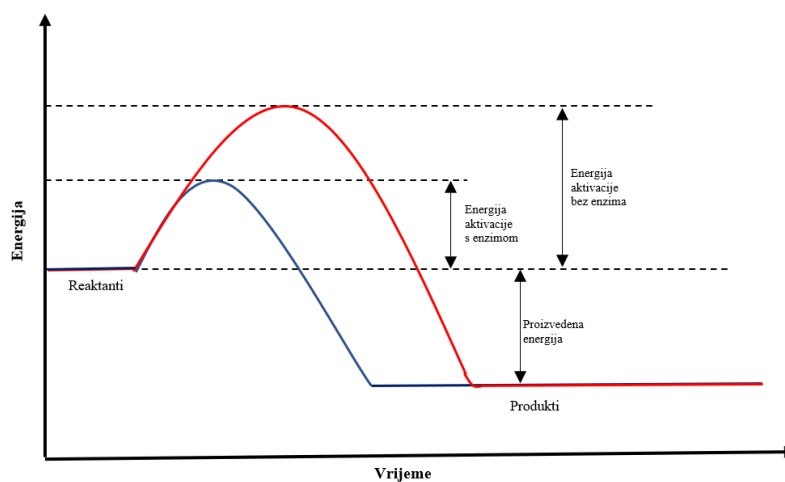
moгуće je ostvariti brži prijenos tvari i energije zbog vrlo velikog omjera površine i volumena, proces je lakše kontrolirati, a uvećanje u veće mjerilo (*engl.* Numbering-up) je vrlo jednostavno u usporedbi s tradicionalni šaržnim ekstraktorima [4]. Sve to, mikroekstraktore čini dobrim sustavom za provedbu ekstrakcije, a mikroseparatora za odvajanje ekstraktne i rafinatne faze.

Cilj ovog rada je razviti integrirani sustav serijski povezanog mikroekstraktora i mikroseparatora za kontinuiranu ekstrakciju proteina, odnosno ekstrakciju enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi DES-a. Nakon sinteze i karakterizacije 15 DES-ova, ispitan je utjecaj otapala na aktivnost enzima. Iz daljnje analize isključeni su oni DES-ovi u kojima enzim nije bio aktivan. U nizu šaržnih ekstrakcija ispitan je utjecaj različitih koncentracija soli  $K_2HPO_4$  i pripremljenih odabranih eutektnih otapala na učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza te su određene optimalne značajke sustava. U svrhu intenzifikacije procesa, ekstrakcija je provedena u mikroekstraktoru gdje je ispitan utjecaj promjera kanala i vremena zadržavanja na učinkovitost ekstrakcije. Nakon optimizacije procesa ekstrakcije, mikroekstraktor je serijski spojen s mikroseparatorom u kojemu je provedena uspješna separacija ekstraktne i rafinatne faze. Proces ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru opisan je 2D matematičkim modelom. Razvijena metoda potvrđena je ekstrakcijom enzima i sirovog enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor*. Na samom kraju, ekstrahirani enzima lakaza upotrijebljen je za uklanjanje tekstile boje na bazi anilina.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Enzimi i proteini

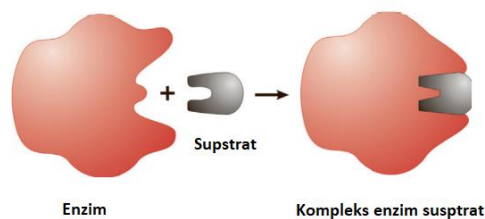
Enzimi su aktivni proteini velike molekulske mase (od 15.000 do nekoliko milijuna Daltona) koji kataliziraju biokemijske reakcije. Nastaju spajanjem velikog broja aminokiselina preko peptidnih veza. Enzimi ubrzavaju reakciju na način da smanjuju aktivacijsku energiju reakcije (Slika 1.) na isti način kao i kemijski katalizatori. Reakcija koja je ubrzana enzimom može biti brža i za nekoliko milijuna puta nego što je to nekatalizirana reakcija. Primjer na kojemu se vidi jasna razlika između katalizirane i ne katalizirane reakcije enzimom je reakciju u kojoj se primjenjuje enzim orotidin 5'-fosfat dekarboksilaza. U reakciji, enzim ubrzava reakciju na svega par milisekundi, dok bi bez prisutnosti enzima ta ista reakcija trajala i do nekoliko milijuna godina [5 – 7]. Prednost enzima naspram klasičnih kemijskih katalizatora je ta što ubrzavaju reakcije i do  $10^{10}$  puta, a pri njihovoj upotrebi potrebni su blagi reakcijski uvjeti. Enzimatski katalizirane reakcije najčešće se provode u vodenim medijima što ih čini ekološki prihvatljivim jer se njihovom upotrebom izbjegavaju organska otapala i druge kemikalije koje mogu predstavljati veliko opterećenje za okoliš [8]. Nedostatak korištenja enzima je njihova visoka cijena i nestabilnosti u usporedbi s kemijskim katalizatorima, kao i činjenica da neke molekule mogu djelovati inhibirajuće na enzim.



**Slika 1.** Razlika u energije aktivacije biokatalitičke reakcije uz i bez prisutnosti enzima

Teorija koja danas vjernije opisuje mehanizam djelovanja enzima prilikom biokatalitičke reakcije, predstavio je Daniel Koshland 1958. godine. Model je usporedio s rukom i rukavicom gdje ruka predstavlja supstrat, a rukavica predstavlja enzim. Pretpostavio

je da se rukavica deformira pod utjecajem ruke, odnosno da dolazi do promjene oblika rukavice. Na primjeru enzima i supstrata to izgleda kao da enzim mijenja svoj oblik kako bi se supstrat bolje uklopio na aktivno mjesto enzima (Slika 2.). Teorija po Danielu Koshlandu bolje opisuje mehanizam djelovanja enzima nego što to opisuje teorija pod nazivom „ključ i brava“. Teorija „ključ i brava“ temelji se na krutosti aktivnog mjesta na enzimu što se protivi trenutnim saznanjima o molekulskoj strukturi i konformaciji molekula [9].



**Slika 2.** Model inducirane prilagodbe, metoda po Danielu Koshlandu

Enzime možemo podijeliti na dvije grupe, a to su izvanstanični i unutarstanični. Kao što i samo ime kaže, unutarstanični enzimi nalaze se unutar stanica ili su vezani za staničnu stjenku, dok izvanstanične enzime stanice izlučuju u vanjski medij. Za razliku od unutarstaničnih, izvanstanični enzimi stabilniji su te ih je lakše izolirati jer nema potrebe za razbijanjem stanične stjenke. Međutim, brojnost izvanstaničnih enzima daleko je manja od onih unutarstaničnih.

Enzimi su podijeljeni u šest skupina prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju, a podijeljeni su ovisno o specifičnoj vrsti 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 eliminacija 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 [10].

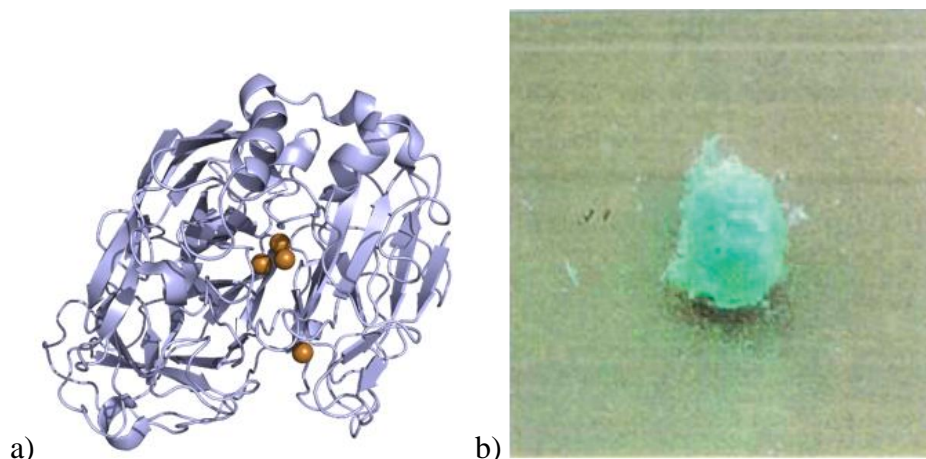
Danas, enzimi su u širokoj upotrebi u industrijskim procesima. Njihova upotreba poznata je još iz davnih vremena kada su se enzimi koristili u pekarstvu, pivarstvu, proizvodnji sireva, itd. Posljednjih nekoliko desetljeća, razvojem rekombinantne DNA i naprednih bioprocasa, omogućili su proizvodnju i pročišćavanje enzima u velikim razmjerima te omogućili široku primjenu u svim granama industrije. Razvojem grane proteinskog inženjerstva, omogućeno je stvaranje novih enzima koji su specifični za nove supstrate, a na taj način se povećala i njihova primjena [5, 6].

Tržišna vrijednost industrijskih enzima u 2008. godini procijenjena je na 2,1 milijardu američkih dolara [6], a 2021. godine je porasla na 6,6 milijardi američkih dolara. Predviđanja su da će do 2026. godine ta vrijednost porasti na 9,1 milijardi što je 6,6 % prosječne godišnje stope rasta. Korištenjem enzima u industriji dobiva se bolja kvaliteta proizvoda uz niže troškove proizvodnje, potrošnje energije i nastajanje manjih količina otpada [11].

## **2.2. Enzim lakaza**

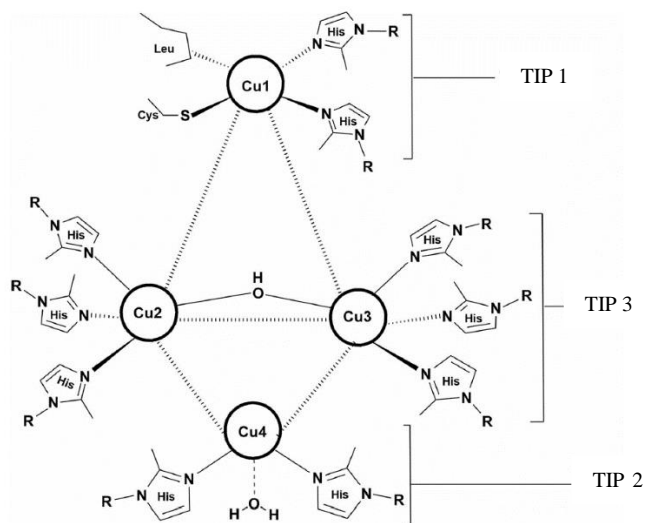
Lakaza, ili benzendiol: kisikova oksidoreduktaza, ili E.C.1.10.3.2., ili 80498-15-3, ili urishiol oksidaza, ili p-difenol oksidaza, je enzim koji pripada oksidazama koji sadrže bakar. Enzim lakaza katalizira reakciju na način da oksidira različite supstrate uz istovremenu redukciju molekule kisika u vodu. Godine 1883., H. Yoshida [12] prvi je otkrio enzim lakaza u drvetu ruj (*lat. Toxicodendron vernicifluum*), a 1893. godine Bertrand je prvi puta djelomično izolirao enzim lakaza.

Analizom strukture enzima lakaza (Slika 3.) pokazalo se da strukturu enzima lakaza čini 55% molekula aminokiselina, što odgovara niskoj koncentraciji dušika od 10,4 %, a koncentracija bakra je oko 0,23 %, što odgovara četiri atoma bakra po molekuli proteina [13]. Molekulska masa enzima varira ovisno o izvoru enzima te iznosi između 59 kDa i 110 kDa [14]. Lakazu je moguće pronaći u raznim oblicima (monomerni, homotramerni, heterodimerni i multimerni enzim), a oblik ovisi o izvoru iz kojega dolazi sam enzim. Enzim lakaza ima široku primjenu (o čemu će više biti rečeno u poglavlju 2.2.2.) te stoga ne čudi što je jedan od enzima koji se proučavaju još od kraja prošlog stoljeća [15, 16].



**Slika 3.** a) Kristalna struktura enzima [17], b) enzim lakaza [18]

Kao što je već ranije navedeno, enzim lakaza sadrži četiri iona bakra po molekuli proteina, a svaki od iona bakra ima značajnu ulogu u aktivnosti enzima lakaza. Četiri atom bakra svrstavaju se u 3 tipa bakrenih iona (Slika 4.): tip 1 (plavi bakreni centar karakteristične spektralne značajke), tip 2 (mononuklearni bakreni centar s normalnom spektralnom značajkom) i tip 3 (binuklearni bakar koji je antiferomagnetski) [15].



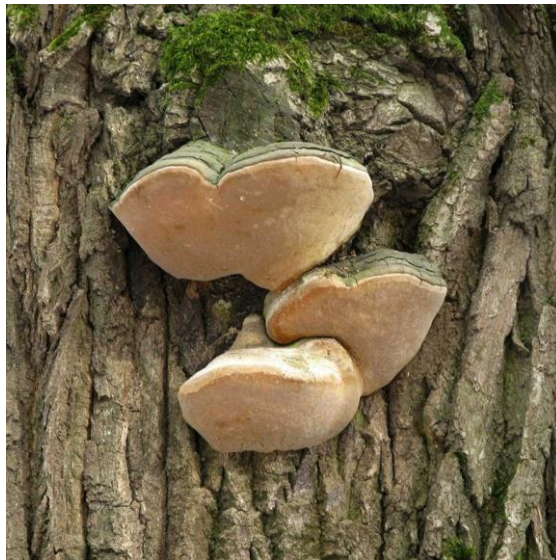
**Slika 4.** Struktura enzima lakaza s 4 karakteristična iona bakra

### 2.2.1. Izvori enzima lakaza

Lakaza se danas može pronaći u mnogim vrstama biljaka, insekata i mikroorganizama, ali najveći i najbolji proizvođači enzima lakaza su gljive. Kalra i sur. [19] pronašli su enzim lakaza u biljkama (sjemenke kukuruza, mango, grah, breskva i bor), a

Arora i sur. [20] pronašli su enzim lakaza u drvu platana i suhe šljiva. Osim u biljkama, Kalra i sur. [19] dokazali su i prisutnosti enzima lakaza u insektima, *Bombyx* i *Calliphora*, a Arora i sur. [20] u insektima *Drosophila*, *Lucilia*, *Manduca*, *Musca*, *Oryctes*, *Papilio*, *Phormia*, *Rhodnius*, *Sarcophaga*, *Schistocerca*, i *Tenebrio*. Najučinkovitiji i najčešći proizvođači enzima lakaza su gljive bijelog truljenja (Slika 5.) [21]. Aktivnosti lakaze pronađene u različitim sojevima gljiva se razlikuju kao što je prikazano u Tablici 1.

Drugi mikrobnj izvori gdje se može pronaći enzim lakaza su bakterije. Prva baterija u kojoj je otkrivena lakaza je *Azospirillum lipoferum*, a danas se još može pronaći i u *Bacillus subtilis*, *Bordetella sp.*, *Escherichia coli*, i *Pseudomonas syringae* [19, 20].



**Slika 5.** Gljiva bijelog truljenja [22]

**Tablica 1.** Vrijednosti aktivnosti enzima lakaza dobivenih iz različitih vrsta gljiva [23]

<b>Gljive</b>	<b>Aktivnost enzima</b>
<i>Coriolopsis polyzona</i>	148 g/L
<i>Coriolopsis rigida</i>	$3 \cdot 10^5$ nkat/L
<i>Grifola frondosa</i>	16000 nkat/L
<i>Lentinula edodes</i>	22,2 U/mL
<i>Phlebia rufa</i>	2593 U/mL
<i>Pleurotus florida</i>	3,8 U/mL
<i>Pleurotus ostreatus</i>	56,0 U/g
<i>Pleurotus ostreatus</i>	22,5 U/mL
<i>Pleurotus pulmonarius</i>	180 U/mL
<i>Pleurotus sajor-caju</i>	16 U/L
<i>Pleurotus sp.</i>	3,52 U/L
<i>Pleurotus tailandia</i>	1,63 U/L
<i>Trametes hirsuta</i>	929895 nkat/L
<i>Trametes versicolor</i>	5500 U/L

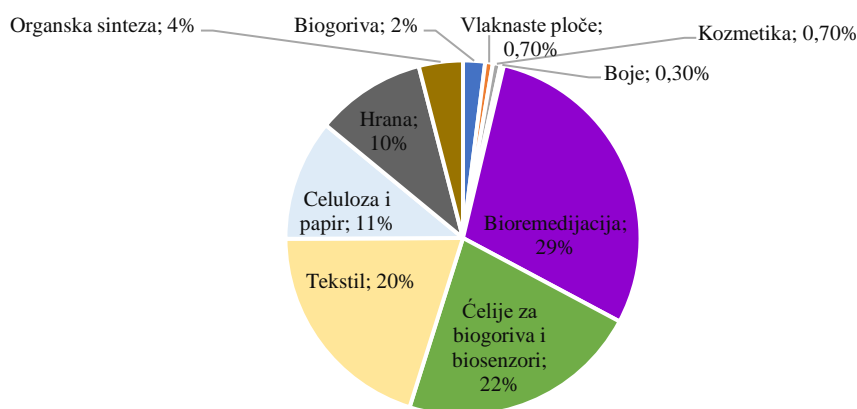
### 2.2.2. Upotreba enzima lakaza

Enzim lakaza ima sposobnost oksidacije širokog raspona aromatskih i nearomatskih spojeve koji sadrže supstituirane fenole, neke anorganske ione i niz nefenolnih spojeva. Unatoč svojoj niskoj specifičnosti za supstrate, enzim lakaza može se upotrebljavati za široki raspon supstrata što ga čini vrlo zanimljivim enzimom te je iz tog razloga privukao veliku pažnju u različitim područjima kao što su ekologija, industrija i biotehnologija. Lakaza se smatra „zelenim alatom“ iz razloga što zahtijeva samo molekulu kisika kao supstrat za biokatalizu [24]. Dokaz velike zainteresiranosti za enzimom lakaza pokazuje činjenica da je u zadnjih 5 godina objavljeno više od 4.000 znanstvenih radova na temu enzima lakaza [25].

Zbog niske specifičnosti za supstrate i visoke katalitičke učinkovitost, enzima lakaza koristi se u raznim industrijama za poboljšanje proizvoda, a kao što su poboljšanje svojstava vlakana, biosinteza, iskorištavanje energije, zaštita okoliša, biodetekcija, razgradnja sintetičkih boja, industrija tiskanja i bojanja, uklanjanja pulpe u industriji papira, pretvorba

aromatskih spojeva i uklanjanje fenola koji uzrokuje rak i teratogenost kada je prisutan u otpadnoj vodi. Također se koristi u proizvodima široke potrošnje kao što su pasta za zube, vodica za ispiranje usta, deterdžent, sapun i pelene, u kozmetici kao dezodoransi; u industriji pića i hrane za stabilizaciju vina i sokova; u tijestu ili pečenim proizvodima za povećanje čvrstoće glutenskih struktura; u farmaceutskoj industriji kao anestetici, protuupalni lijekovi, antibiotici i sedativi i u nanobiotehnologiji kao biosenzori temeljeni na nanočesticama [26].

Moderne biorafinerije fokusirane su na proizvodnju biokemikalija i agrogoriva iz lignocelulozne biomase. Najčešći sastav lignocelulozne biomase je celuloza (40-45 %), hemiceluloza (15-30 %) i lignin (16-33 %). Danas, lignoceluloznu masu pronalazimo svugdje oko nas kao na primjer u ostacima iz poljoprivrede, šumarstva i otpade hrane (otpad od voća i povrća). Obzirom da enzim lakaza ima sposobnost razgradnje lignina intenzivno se istražuje njezina primjena u preradi biomase u svrhu dobivanja vrijednih produkata. Enzim lakaza također se pokazala i dobrom za detoksikaciju hidrolizata biomase uklanjanjem fenola oksidativnom eliminacijom koji inhibiraju hidrolitičke enzime i koji su toksični za mikroorganizme [27, 28].



**Slika 6.** Zastupljenost enzima lakaza u biotehnologiji [29]

Kao što je prikazano na Slici 6., enzim lakaza najviše se koristi za bioremedijaciju. Bioremedijacija označava proces u kojemu se koristi biološki sustav (živi ili mrtav) kako bi se uklonili onečišćivača iz zraka, vode, tla, dimnih plinova i industrijskih otpadnih tokova. Ksenobiotski spojevi, kao što su policiklički aromatski ugljikovodici, fenoli i organofosforni insekticidi, jedni su od glavnih zagađivača današnjice. Njihova prisutnost u okolišu ima



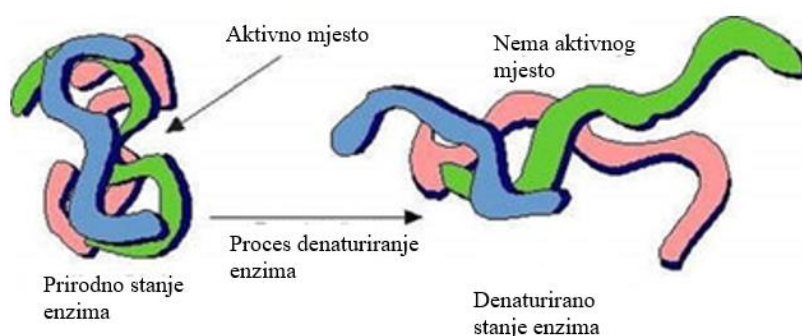
teratogeni i kancerogeni učinak. Enzim lakaza pokazala se vrlo zanimljivim u ovom području iz razloga što može oksidirati ksenobiotike u manje štetne produkte koji se dalje mogu lakše ukloniti iz okoliša [30, 31]. Neki od primjera uspješno uklonjenih ksenobiotika iz okoliša korištenjem enzima lakaza su uklanjanje policikličkog aromatskog ugljikovodika antracena [32], otpornih boja kao što je kristalna ljubičasta [33] i organofosforni spoj ruski VX [34].

Unatoč širokoj primjeni enzima lakaza u mnogim granama, mana enzima lakaza je ta što mu je najveća aktivnost u blagim uvjetima rada koje je jako teško postići u industriji. Najveću aktivnost i stabilnost strukture postiže u otopinama pH vrijednosti od 5,0 do 7,0 i u temperaturnom rasponu od 25 °C do 30 °C [35]. Zbog toga je potrebno pronaći nove izvore enzima lakaza koji će proizvesti enzim koji bi bio djelotvoran i u agresivnim uvjetima rada.

### 2.3. Pročišćavanje enzima

Kao što je već rečeno, enzime možemo podijeliti na dvije grupe, a to su izvanstanični i unutarstanični enzimi. Unutarstanični enzimi se nalaze u *in vivo* obliku gdje obavljaju svoju funkciju zajedno s drugim proteinima, ugljikohidratima, lipidima, nukleinskim kiselinama, solima i drugim metabolitima. Izvanstanični enzimi su enzimi koji se izlučuju izvan stanice, ili su komponenta proteinskog kompleksa, adsorbirani na staničnu stjenku ili kao sastavni dio stanične stjenke. Da bi se odredila fizikalna, kemijska i/ili katalitička svojstva određenog enzima, enzim je potrebno izolirati od ostalih metabolita [36].

Pročišćavanje enzima često je složen proces, a sastoji se od niza koraka koje je potrebno primijeniti pazeći pri tome na procesne uvjete pri kojima se provodi pročišćavanje kako bi se izbjegao gubitak aktivnosti enzima (Slika 7.).



**Slika 7.** Prikaz gubitka konformacije aktivnog mjesta enzima uslijed čega enzim gubi svoju aktivnost

Metode koje se danas primjenjuju za pročišćavanje enzima u industriji i laboratorijima su: filtracija, centrifugiranje, elektroforeza, precipitacija, kromatografija i kombinacije navedenih metoda kako bi se postigla zadovoljavajuća čistoća enzima. Glavna strategija pročišćavanja enzima je koristiti jeftine i jednostavne metode (filtracija, centrifugiranje, precipitacija) u ranim fazama pročišćavanja dok je u sirovom uzorku prisutna velika količina različitih enzima. Na taj način može se brzo ukloniti velika količina neželjenih enzima na temelju njihovih različitih svojstava. Kada u uzorku zaostanu enzimi sličnih svojstava (npr. slične veličine ili slične ionske jakosti) potrebno je upotrijebiti neke od skupljih metoda pročišćavanja (kromatografija i elektroforeza) [37]. Prethodno navedeni procesi su dugotrajni, skupi (i do 80% ukupnih troškova procesa) i kompleksni te ih je nemoguće provoditi kontinuirano, nego ih je potrebno provoditi šaržno [38]. Zbog svih navedenih nedostataka konvencionalnih metoda, kontinuirano se traga za učinkovitim rješenjima. Upotreba vodenih dvofaznih sustava u svrhu pročišćavanja biomolekula (proteina, virusa, nukleinskih kiselina i drugih biomolekula u industriji) pokazala se učinkovitim i ekološki prihvatljivom metodom. Osim toga prednosti metoda su visoki prinosi oporabe i lagano uvećanje procesa [3].

### **2.3.1. Vodeni dvofazni sustavi**

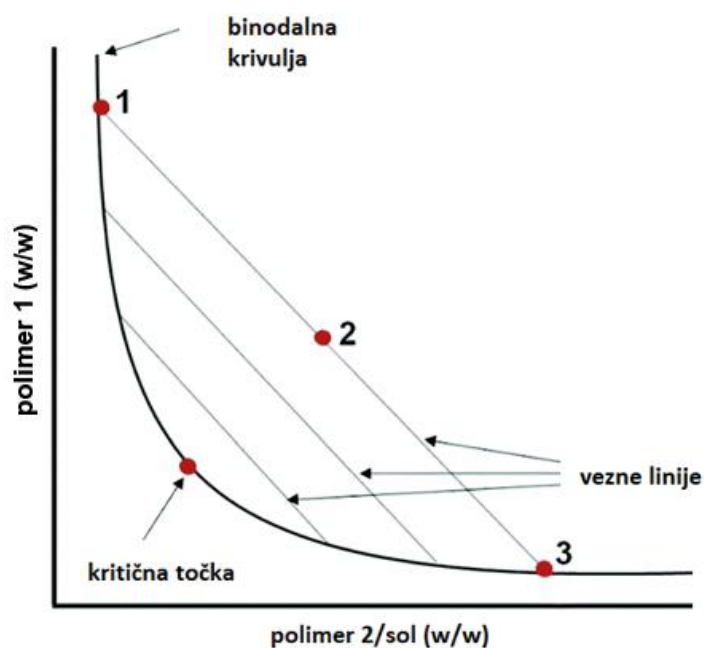
Konvencionalne tehnike ekstrakcije kapljevina-kapljevina koje se temelje na ekstrakciji organskim otapalima nisu primjenjive u velikoj mjeri za pročišćavanje enzima zbog toga što uzrokuju nepovratni gubitak enzimatske aktivnosti. Osim navedenog, pročišćavanje ima i niski prinos [39]. Kako bi se prevladala ograničenja konvencionalnih tehnika ekstrakcije kapljevina-kapljevina, razvijena je metoda za pročišćavanje pod nazivom vodeni dvofazni sustavi. Vodeni dvofazni sustav slučajno je otkrio Martinus Willem Beijerinck dok je miješao vodenu otopinu škroba i želatine, a njegovu pravu primjenu demonstrirao je Per-Åke Albertsson. Od tada se vodeni dvofazni sustavi koriste u razne svrhe kao na primjer za ekstrakciju metalnih iona kao što su živa i kobalt, u metalurgiji i kao reakcijski medij. Prednosti ATPS-a je u tome da daje visoki prinos oporabe i lako se uvećava u veće mjerilo. ATPS se pokazao puno boljom metodom nego što su konvencionalne metode za pročišćavanje biomolekula jer je metoda ekološki prihvatljivija, jeftina, ima mogućnost primjene u kontinuiranim sustavima, mala potrošnja energije, niska cijena ekstrakcijskih sredstva i veliki kapacitet ekstrakcijskog procesa. Voda kao glavna komponenta obje faze u

ATPS-u tvori blago okruženje za ekstrakciju biomolekula, a polimeri stabiliziraju njihovu strukturu i biološku aktivnost [3, 40 – 42].

Sustav ATPS-a nastaje miješanjem raznih komponenti u vodi ( $w_{H_2O} = 65 - 90 \%$  ( $w/w$ )). Najčešće su u primjeni sustavi pripremljeni od različita polimera (kao na primjer polietilen-glikol (PEG)) ili polimera i soli pri čemu su obje komponente topljive samo u određenim koncentracijama (područje iznad binodalne krivulje) [39, 40, 43]. U novijim istraživanjima pokazalo se da se i DES-ovi mogu upotrebljavati u ATPS-u. Zbog mnogobrojnih prednosti vodenih dvofaznih sustava naspram konvencionalnih načina, vodeni dvofazni sustavi smatraju se novim zelenim ekstrakcijskim metodama koje je potrebno još istražiti i početi ih primjenjivati u širokoj mjeri u mnogim granama [39].

Ravnotežni sastav ATPS se prikazuje faznim dijagramom (Slika 8.), a iz faznog dijagrama je moguće odrediti potrebnu koncentraciju komponenta da bi se stvorile dvije faze u sustavu te koncentracije pojedine komponente u gornjoj i donjoj fazi. Na dijagramu se nalazi binodalna krivulja koja označava granično područje između područja mješljivosti (izvan krivulje) i nemješljivosti (unutar krivulje). U području nemješljivosti (točka 2 na Slici 8.) sustav se razdvaja na dvije faze, a to su rafinatna faza (točka 3 na Slici 8.) i ekstraktna faza (točka 1 na Slici 8.). Području izvan krivulje je homogeno područje, odnosno to je područje u kojemu postoji samo jedna faza. U faznom dijagramu nalaze se i vezne linije koje povezuju rafinatnu i ekstraktnu fazu, a prolaze kroz točku koja predstavlja ukupni sastav otopine koja se razdvaja na dvije faze. Sve točke na istoj veznoj liniji imaju jednak sastav rafinatne i ekstraktne faze, ali različitog omjera količine faza. Odnos ravnoteže između koncentracije ( $c_{A,EKS}$ ) tvari (A) u gornjoj ekstraktnoj fazi (E) i koncentracije ( $c_{A,RAF}$ ) tvari u donjoj rafinatnoj (R) fazi definiran je koeficijentom raspodjele ( $K$ ), a odnos je prikazan Jednadžbom (1). Glavni čimbenici koji utječu na razdvajanje faza u vodenom dvofaznom sustavu su molekularna masa i koncentracija polimera, hidrofobnost, pH vrijednost i temperatura.

$$K = \frac{c_{A,EKS}}{c_{A,RAF}} \quad (1)$$



**Slika 8.** Fazni dijagram ATPS sustava

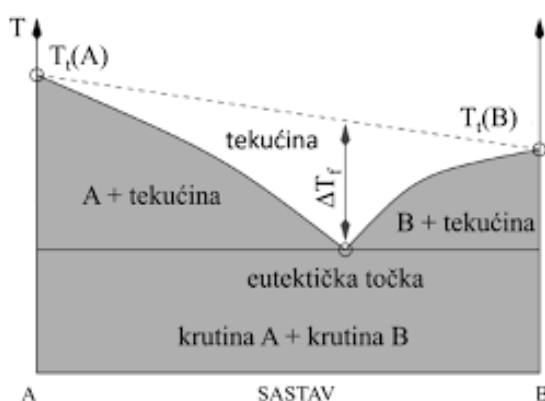
Do danas nije razvijena teorija kojim bi se moglo predvidjeti ponašanje vodenih dvofaznih sustava te se iz tog razloga za predikciju koriste različiti empirijski modeli. Najčešće korišteni model je Albertssonov model koji govori da postoje šest vrsta čimbenika koji utječu na stvaranje ATPS-a i od kojih svaki čimbenik predstavlja različitu pokretačku silu. Model je prikazan logaritamskim izrazom (Jednadžba (2)).

$$\ln K = \ln K^{\circ} + \ln K_{elec} + \ln K_{hfob} + \ln K_{affinity} + \ln K_{size} + \ln K_{conf} \quad (2)$$

gdje *elec*, *hfob*, *affinity*, *size* and *conf* predstavljaju redom elektokemijski, hidrofobne, biosferičke, veličinske i kofomacijske čimbenike.  $K^{\circ}$  predstavlja ostale čimbenike koji utječu na vodeni dvofazni sustav (npr. okolišne faktore). Prema modelu, elektrokemijski čimbenik javlja se unatoč odvajanja faza zbog električnog potencijala, hidrofobni zbog hidrofilnih svojstva molekula i faza koji se razdvajaju, biosferički čimbenik javlja se kada se molekule vežu na specifičnu površinu drugih molekula, veličinski čimbenik zbog veličine molekula i površine molekula, a konformacijski tamo gdje podjela ovisi o konformaciji molekula [3].

### 2.3.2. Eutektična otapala

Abbott i sur. prvi su primijetili i opisali u svom radu kako se mješavina kolin-klorida i uree nalazi u tekućem stanju pri sobnoj temperaturi dok je temperatura taljenja svake od komponente ( $T_{\text{taljenja kolin-klorid}} = 302 \text{ }^{\circ}\text{C}$  i  $T_{\text{taljenja urea}} = 133 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) veća nego od same mješavine ( $T_{\text{taljena kolin-klorid:urea}} = 12 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Uzrok pada temperature taljenja smjese (Slika 9.) je delokalizacija naboja kroz vodikovu vezu između donora vodikove veze i akceptora vodikove veze i do nastanka Van der Waalsovih sila. Danas najkorištenija komponenta koja je akceptor vodikove veze je kolin-klorid zbog svoje niske toksičnosti.



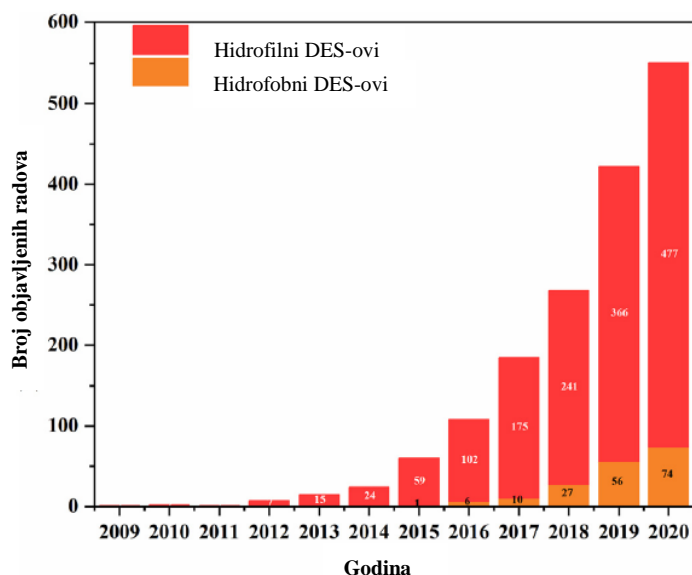
**Slika 9.** Fazni dijagram dvokomponentnog sustava

Svojstva tako dobivenih otopina (nezapaljivost, niska hlapljivost, visoka kemijska i toplinska stabilnost, mogućnost recikliranja i mogućnost otapanja organskih i anorganskih komponenata) vrlo su sličnim otopinama ionskih kapljevina, a kako bi se razlikovale od njih otopine su dobile naziv eutektična otapala (*engl.* Deep Eutectic Solvent, DES). Zanimljivo je da su fizikalna svojstva eutektičnih otapala i ionskih kapljevina podesiva zbog mogućnosti mijenjanja sastava komponenata i njihovih molarnih omjera. Prednost eutektičnih otapala naspram ionskih kapljevina je u tome da su eutektična otapala jeftinija za proizvesti (niža cijena komponenata, lakša priprava i nisu potrebna daljnja pročišćavanja) i ekološki su prihvatljivija (niža toksičnost i veća biorazgradivost).

Kao što je rečeno, 2003. Abbott i sur. prvi put su puta otkrili eutektična otapala, a 2008. godine Gorke i sur. [44] prvi su u svom istraživanju koristili eutektično otapalo za enzimatsku reakciju. Korištenjem DES-a u enzimatskim reakcijama postiže se veća čistoća konačnih proizvoda i enantioselektivnost, a enzim je stabilniji. DES-ovi su pronašli i

primjenu u industrijski jer olakšavaju recikliranje enzima u uzastopnim katalitičkim procesima i poboljšava aktivnost i stabilnost enzima. Pokazalo se da je stabilizacija enzima u prisutnosti eutektičnog otapala povezana s vodikovim vezama između komponenti eutektičnog otapala (donora vodikove veze i akceptora vodikove veze) i površinskih dijelova enzima. Novonastale veze štite enzime od vanjskih interakcija i održavajući njihovu izvornu konformaciju što rezultira povećanje stabilnosti i otpornost na recikliranje [2, 45].

Danas, eutektična otapala smatraju se novom generacijom otopina („zelenim otopinama“) s kojima se provode mnogobrojna istraživanja kako bi se otkrila njihova široka primjena. Dokaz razvoja i otkrivanja novih eutektičnih otapala vidljiv je na Slici 10. koja prikazuje broj objavljenih radova u razdoblju od 2009. do 2020. godine na temu eutektičnih otapala [2].



**Slika 10.** Broj objavljenih radova u razdoblju od 2009. do 2020. godine na temu hidrofobna i hidrofilna eutektična otapala na stranici Web Science [2]

#### 2.4. Mikrostrukturirani uređaji

Posljednjih nekoliko desetljeća intenzivno se radi na proučavanju i razvoju mikrostrukturiranih uređaja. Pojava mikrostrukturiranih uređaja omogućila je pružanje novih mogućnosti i funkcionalnosti koje nadilaze dosadašnje uvjete rada u makrostrukturiranim uređajima pa ne čudi što je primjena mikrostrukturiranih uređaja strahovito ubrzana u usporedbi sa šaržnim i kontinuiranim makrostrukturiranim uređajima. Pod pojmom

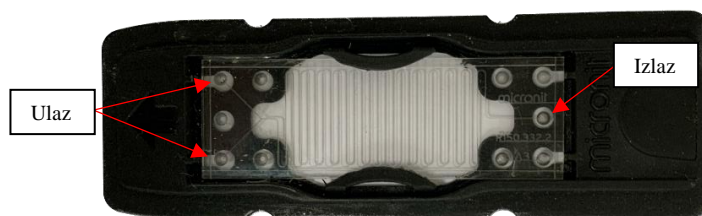
mikrostrukturirani uređaji podrazumijevaju se reakcijski i separacijski uređaji čija je barem jedna karakteristična dimenzija manja od milimetra pa se tako može govoriti o mikroreaktoru ili mikroseparatoru, odnosno ovisno o procesu koji se odvija u mikrostrukturiranom uređaju [46 – 48].

Primjena makrostrukturiranih uređaja ima nekoliko nedostataka kao što su stvaranje koncentracijskih i temperaturnih gradijenata koji u konačnosti dovode do smanjenja učinkovitosti i ekonomičnosti cijelog procesa. Zbog postojanja gradijenata u procesnom sustavu, također može posljedično doći i do nastajanja lokalnih područja s povišenom temperaturom ili koncentracijom reaktanta koja može prouzročiti havariju ili trovanje katalizatora. Uslijed toga može doći do povećanje cijene ukupnog procesa, smanjenja produktivnosti procesa, nastajanje neželjenih produkata i slično. Kako bi se zaobišli nedostaci makrostrukturiranih uređaja i postigli povoljniji procesni uvjeti rada u kojima će troškovi proizvodnje biti minimalni, a cijena konačnog proizvoda visoka, počinju se primjenjivati mikrostrukturirani uređaji.

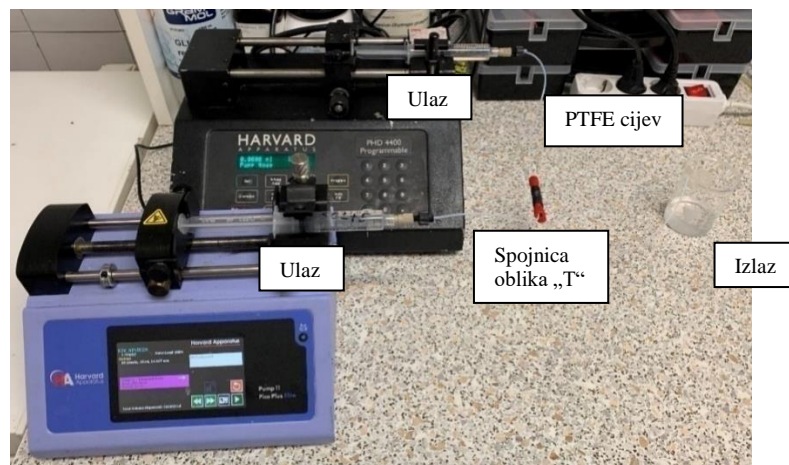
Glavna karakteristika mikrostrukturiranih uređaja je mala dimenzija kanala u kojem se odvija proces, a veličine je od 10  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$  ( $V = 10 \text{ nL} - 1 \text{ mL}$ ). Posljedica male dimenzije mikrokanala je veliki omjer površine i ukupnog volumena. Za usporedbu, u makrostrukturiranim uređajima taj omjer je oko  $10^2 \text{ m}^2/\text{m}^3$ , dok je za mikrostrukturirani uređaj taj omjer između  $10^3$  i  $10^5 \text{ m}^2/\text{m}^3$ . Važno je još istaknuti da je tok dvaju fluida u mikrostrukturiranim uređajima laminaran.

Primjena mikrostrukturiranih uređaja dovela je do povećanja učinkovitosti procesa, produktivnosti, boljeg prijenosa tvari i energije, manje proizvodnje neželjenih otpadnih produkata i najvažnije do sigurnijih procesnih uvjeta rada. Zbog svega navedenog, mikrostrukturirani uređaji su pronašli svoju široku primjenu u medicini i farmaceutskoj industriji. Zbog malih dimenzija, precizne i lagane regulacije procesa, mikrostrukturirani uređaji su pogodni za provođenje izrazito egzotermnih/endotermnih reakcija, eksplozivnih reakcija i reakcija u kojima je potrebna primjena opasnih kemikalija. Još jedna od prednosti mikrostrukturiranih uređaja je i lagano uvećanje sustava. Uvećanje sustava provodi se povezivanjem procesnih jedinica čime se dolazi do smanjenih troškova projektiranja. Unatoč mnogobrojnim prednostima mikrostrukturiranih uređaja naspram makrostrukturiranih, potpuna zamjena još nije moguća te su potrebna još mnogobrojna istraživanja. Mana mikrostrukturiranih uređaja je mali promjer kanala što otežava način rada ukoliko je prisutna

viskozna ili čvrsta tvar velikih dimenzija koja može dovesti do začepljenja mikrokanala. Prilikom izrade mikrostrukturiranih uređaja potrebno je voditi i brigu o materijalu i tehnici izrade jer prilikom laminarnog toka u mikrostrukturiranom uređaju, hrapavost stjenki kanala ima značajan utjecaj na karakteristike procesa [4, 46, 49]. Najčešće korišteni materijal izrade je staklo zbog svoje inertnosti (Slika 11.). Najjednostavniji oblik mikrostrukturiranih uređaja je kapilarna cijev koja se izrađuje od politetrafluoretilenskog (PTFE) materijala (Slika 12.). Još neki od materijala koji su u širokoj upotrebi za proizvodnju su keramika, perfluoroalkoksi, silicij, polimeri i čelik. Mikrostrukturirani uređaji mogu sadržavati nekoliko ulaznih i izlaznih struja koji se spajaju odnosno razdvajaju pomoću spojnika u obliku „Y“, „T“, „ψ“ ili „+“. Procesni tokovi se uvode pomoću korištenjem vanjskih pumpi i cijev.



**Slika 11.** Mikrostrukturirani uređaj s dva ulaza, spojnicom oblika „Y“ i s jednim izlazom



**Slika 12.** Mikrostrukturirani uređaj izrađenog od PTFE cijevi s dvije pumpe i dva ulaza, spojnicom oblika „T“ i jednim izlazom

Izbor materijala od kojeg je izrađen mikrostrukturirani uređaj ovisi o radnim uvjetima pri kojima se odvija proces (tlak i temperatura), fizikalnim svojstvima reakcijske smjese (pH, viskoznost, agregatno stanje i reaktivnost), cijeni, mogućnosti masovne proizvodnje i



jednostavne izrade. U Tablici 2. prikazane su neke prednosti i neki nedostaci materijala koji se koriste za izradu mikrostrukturiranih uređaja [47].

**Tablica 2.** Prednosti i nedostaci tipičnih materijala za izradu mikrostrukturiranih uređaja [47]

<b>Materijal</b>	<b>Prednosti</b>	<b>Nedostaci</b>
Silikon	<ul style="list-style-type: none"> <li>● jeftin</li> <li>● dobro okarakteriziran materijal</li> <li>● izrada visoke preciznost</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● skupa izrada</li> <li>● potrebna proizvodnja u čistoj sobi</li> </ul>
Staklo	<ul style="list-style-type: none"> <li>● moguća vizualizacija reaktora i protoka</li> <li>● elektroosmotski tok</li> <li>● može podnijeti visoki radni tlak</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● poteškoće u stvaranju struktura s visokim omjerom širine i dužine</li> </ul>
Polimer	<ul style="list-style-type: none"> <li>● niska cijena</li> <li>● razne tehnike izrade</li> <li>● podesiva svojstva</li> <li>● moguća izvedbe jednokratnih mikrostrukturiranih uređaja</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● kemijska kompatibilnost</li> <li>● termička stabilnost</li> </ul>
Metal	<ul style="list-style-type: none"> <li>● nije potrebna proizvodnja u čistoj sobi</li> <li>● izdržljiv materijal</li> <li>● dobro utvrđene tehnike izrade</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● moguća zamjena plemenitim metalnima</li> <li>● problemi s promjenjivim padom tlaka</li> </ul>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U svrhu razvoja integriranog sustava serijski povezanog mikroekstraktora i mikroseparatora korištenjem ATPS-a na bazi DES-a za kontinuiranu ekstrakciju enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor*, pripravljeno je i karakterizirano 15 različitih eutektnih otapala. Proveden je niz šaržnih ekstrakcija miješanjem komercijalnog enzima lakaza, vode, kalijev hidrogenfosfata i eutektnog otapala. U navedenim eksperimentima ispitan je utjecaj koncentracije soli na učinkovitost procesa ekstrakcije enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor*. Nakon odabira sustava u kojemu je postignuta najveća učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza, ispitan je utjecaj koncentracije proteina u početnoj otopini na učinkovitost ekstrakcije. Sustav s najvećom učinkovitošću ekstrakcije prenesen je u mikroekstraktor gdje je ispitan utjecaj promjene promjera kanala i vremena zadržavanja u svrhu intenzifikacije procesa. Sustav za ekstrakciju u mikroekstraktoru opisan je 2D matematičkim modelom. Nakon optimizacije procesa ekstrakcije, mikroekstraktor je serijski spojen s mikroseparatorom u kojem je provedena uspješna separacija ekstraktne i rafinatne faze. Kao konačni korak razvoja metode, provedena je i reupotreba eutektnog otapala u svim navedenim sustavima kako bi se proces učinio što ekonomičnijim i ekološki prihvatljivijim. Nakon razvijanja metode za ekstrakciju enzima lakaza, provedena je ekstrakcija enzima na sirovom uzorku dobiven iz *Trametes versicolor*. Na kraju ispitano je ponašanje enzima lakaza prije i nakon ekstrakcije na razgradnju anilinske tekstilne boje.

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Kemikalije

U eksperimentima su korištene sljedeće kemikalije:

- 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) diamonijeva sol (ABTS), Sigma-Aldrich, Austrija
- akrilamid, Acros Organics, Belgija
- amonijevog perkoksidsulfata (APS), Alfa Aesar, Njemačka
- anilinska (Mauvein) ljubičasta boja, Fidokolor, Hrvatska
- betain bezvodni, Alfa Aesar GmbH&Co, Njemačka
- bromfenol plavo (BPB), Fisher Scientific, Belgija
- cinkov diklorid, Acros Organics, Belgija
- Commassie Brilliant Blue G-250, Fluka, Njemačka

- D(+)-glukoza bezvodna, Gram Mol, Hrvatska
- D-fruktoza, Gram Mol, Hrvatska
- dikalijev hidrogenfosfat, Merck, Njemačka
- etanol, Gram Mol, Hrvatska
- etilen-glikol, Lach-Ner, Češka
- glicin, Sigma-Aldrich, Austrija
- goveđi serumski albumin (BSA), Sigma-Aldrich, Austrija
- klorovodična kiselina, Lach-Ner, Češka
- kolin klorid, VWR Amresco Life Science, Sjedinjene Američke Države
- komercijalni enzim lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor*, Sigma-Aldrich, Austrija
- metanol, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- N,N,N',N'-tetrametil-etilendiamin, TCI Europe N.V., Belgija
- N,N'-metilbisakrilamid, TCI Europe N.V., Belgija
- natrijev dodecil sulfat (SDS), Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države
- natrijev klorid, Lach-Ner, Češka
- octena kiselina, Kemika, Hrvatska
- ortofosforna kiselina, Merck, Njemačka
- Pageruler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, Thermo Scientific, Sjedinjene Američke Države
- propilenglikol, T.T.T. doo, Hrvatska
- TRIS (hidroksimetil) aminometan, VWR Chemicals, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- urea, Gram Mol, Hrvatska
- β-merkaptioetanol, Sigma-Aldrich, Sjedinjene Američke Države

### 3.1.1.1. Sirovi enzim

Sirovi enzim lakaza proizveden je na Prehrambeno-tehnološki fakultet u Osijeku uzgojem *Trametes versicolor* na čvrstoj podlozi ječmene ljuske ( $t = 10$  dana,  $T = 27$  °C). 80 g uzorka nakon fermentacije ekstrahirano je u 800 mL vode tokom 30 min na 150 okr/min na

laboratorijskoj tresilici [50]. Korištenjem Bradfordovog testa, izmjerena je koncentracija proteina u sirovom uzroku  $\gamma = 0,0057 \pm 0,0018$  mg/mL, a V.A. = 45,92 U/mL.

### 3.1.2. Oprema

Za provedbu eksperimenata korištena je sljedeća oprema:

- analitička vaga, AUW120, Shimadzu, Japan
- centrifuga, Universal 320 R, Hettich, Sjedinjene Američke Države
- digestor, PC150960, Flores Valles, Španjolska
- digitalna vaga, EW1500-2M, Kern, Njemačka
- homogenizator, Vibromix 10, Tehtnica, Slovenija
- klipne pumpe, PHD 4400 Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, Sjedinjene Američke Države
- magnetska miješalica, MS-3000, Biosan, Latvija
- magnetska miješalica, Rotamix S-10, Tehtnica, Slovenija
- orbitalna tresilica PSU-10i, Orbital shaker, Biosan, Sjedinjene Američke Države
- pH elektroda, BlueLine 16 pH, SI Analytics, Njemačka
- pH metar, Lab 860, Schott Instruments, Njemačka
- rotacijski reometar, Rheolab QC C-PTD 180/AIR/QC, Anton Paar, Austrija
- svjetlosni mikroskop, B serija, Motic, Njemačka
- termoblok Digital Heating Shaking Drybath, Thermo Fisher Scientific, Sjedinjene Američke Države
- tresilica Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, Sjedinjene Američke Države
- uređaj za ultračistu vodu, NIRO-VV-UV-UF, Nirosta, Hrvatska
- UV-VIS spektrofotometar, UV-1601, Shimadzu, Japan
- UV-VIS spektrofotometar, UV-1800, Shimadzu, Japan
- vertikalna jedinica za elektroforezu, SE260 Mighty Small II Deluxe, Hoefer, Sjedinjene Američke Države

### 3.1.3. Priprema otopina i reagensa

- **Bradfordov reagens**

Za pripremu Bradfordovog reagensa pripravljena je otopina koja se sastojala od 50 mL etanola i 100 mL ortofosforne kiseline u odmjerne tikvici od 1 L. Nakon miješanja u pripremljenoj otopini je otopljeno 100 mg bojila Commassie Brilliant Blue G-250 te je reagens nadopunjen ultračistom vodom do ukupnog volumena od 1 L. Takvo pripremljeni reagens filtriran je (nesterilni PTFE Syringe filter, pora: 0,45  $\mu\text{m}$ , promjer: 25 mm, Macherey-Nagel GmbH and Co., Njemačka) te skladišten na temperaturi od  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  u tamnoj boci koja sprječava prodiranje svjetlosti. Prije upotrebe reagens je potrebno zagrijati na  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici.

- **0,1 mol/L NaCl-glicin pufer pH 4,5**

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. Vrijednost pH otopine podešena je na 4,5 zakiseljavanjem otopine s 1 mol/L otopinom klorovodične kiseline.

- **Otopina ABTS-a**

Otopina ABTS-a priprema se 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  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **30%-tna vodena otopina akrilamida**

Vodena otopina akrilamida je pripravljena otapanjem 8,7 g akrilamida i 0,3 g *N,N'*-metilbisakrilamida u 30 mL ultračiste vode uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici pri 400 okr/min i zagrijavanje do  $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$  u digestoru. Pripremljena otopina profiltrirana je korištenjem RC-45 filtera (nesterilni CHROMAFIL Xtra jednokratni filter, pora: 0,45  $\mu\text{m}$ , promjer: 13 mm, Macherey-Nagel GmbH and Co., Njemačka). Pripremljena otopina skladištena je u zatvorenoj boci u hladnjaku na temperaturi od  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  do 30 dana.

- **10%-tna vodena otopina SDS**

Vodena otopina SDS je pripravljena otapanjem 0,1 g SDS-a u 1 mL ultračiste vode. Prilikom pripreme otopine potrebno je dodavati vodu u SDS u malim količinama jer dolazi do pjenjenja otopine. Pripravljena otopina čuva se u hladnjaku pri temperaturi od  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **10%-tna vodena otopina APS**

Vodena otopina APS pripravljena je otapanjem 0,1 g APS-a u 1 mL ultračiste vode neposredno prije upotrebe jer je otopina vrlo nestabilna pri temperaturi od  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Iznimno, otopina se može pripremiti do 12 h prije upotrebe, ali ju je u tom slučaju potrebno čuvati u hladnjaku pri temperaturi od  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

- **1,5 mol/L TRIS pufer pH 8,8**

Otopina pufera pripravljena je otapanjem 9,09 g TRIS-a u 50 mL ultračiste vode, a pH otopine podešena dodatkom 1 mol/L otopine HCl uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici.

- **0,5 mol/L TRIS pufer pH 6,8**

Otopina pufera pripravljena je otapanjem 3,03 g TRIS-a u 50 mL ultračiste vode te je pH otopine podešena dodatkom 1 mol/L otopine HCl uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici.

- **10%-tna vodena otopina BPB**

Vodena otopina je pripravljena otapanjem 0,1 g BPB u 1 mL ultračiste vode.

- **Gelovi za elektroforezu**

Za provedbu elektroforeze potrebno je pripremiti gel za razdvajanje i gel za sabijanje. Gelovi se pripremaju miješanjem otopina kako je navedeno u Tablici 3. neposredno prije korištenja.

**Tablica 3.** Volumeni i volumni udjeli komponenti potrebni za izradu gela za razdvajanje i gela za sabijanje

Otopina	Gel za razdvajanje		Gel za sabijanje	
	$\varphi$ , -	V, mL	$\varphi$ , -	V, mL
H <sub>2</sub> O	0,3348	3,350	0,6019	3,050
1,5 mol/L TRIS pH 8,8	0,2498	2,500	0,2467	1,250
Akrilamid 30 %	0,3997	4,000	0,1303	0,660
10% SDS	0,0100	0,100	0,0099	0,050
10% APS	0,0050	0,050	0,0099	0,050
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-etilendiamin	0,0007	0,007	0,0014	0,007

- **Pufer za provedbu elektroforezu**

Otopina pufera za elektroforezu je pripravljena dodavanjem 144,13 g glicina, 30,25 g TRIS-a i 10,00 g natrijevog dodecil sulfata u 1 L ultračiste vode uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici pri 400 okr/min i sobnoj temperaturi ( $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Nakon otapanja svih komponenti u vodi, dobivana temeljna otopina pufera razrijeđena je 10 puta prije samog korištenja.

- **Pufer za uzorke**

Otopina pufera za uzorke pripravljena je miješanjem 1,25 mL 0,5 mol/L TRIS pufer pH 6,8, 2,50 mL glicerola, 2,00 mL 10%-tne vodene otopine SDS, 0,20 mL 10%-tne vodene otopine BPB i 3,55 mL ultračiste vode.

- **Otopina za bojanje**

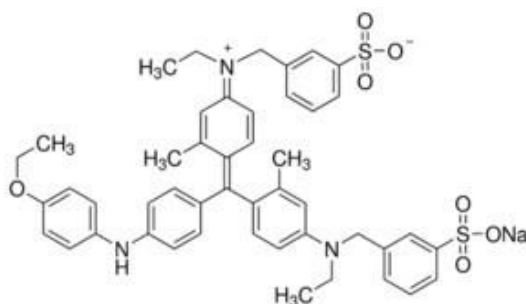
Otopina za bojanje pripravljena je otapanjem 0,1 g Commaisic Brilliant Blue G-250 bojila u 50 mL metanola, 7 mL 10%-tne otopine octene kiseline i 43 mL ultračiste vode.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Bradfordov test za mjerenje koncentracije proteina u uzorku

Danas jedna od najkorištenijih metoda za utvrđivanje količine proteina u uzorku je metoda po Bradfordu iz razloga jer se pokazala brzom, jednostavnom i osjetljivom metodom. Originalna metoda po Bradfordu ima vrlo uski raspon u linearnom području pri kojemu se

može odrediti koncentracija proteina (2 – 10 mg/L), stoga danas se koristi modificirana metoda po Bradfordu koja ima šire linearno područje za koje se može odrediti koncentracija proteina (0,5 do 50 mg/L). Metoda se temelji na vezanju bojila Coomassie Brilliant Blue G-250 (Slika 13.) za protein. Koncentracija se određuje spektrofotometrijski na način da se mjeri apsorbanacija pri valnim duljinama od 450 nm i 595 nm.



**Slika 13.** Kemijska struktura bojila *Coomassie Blue G-250*

Za izradu baždarnog dijagrama potrebno je pripremiti otopinu BSA koncentracije 1,0 mg/mL. Koncentracija otopine odgovara apsorbanaciji od 0,660 pri valnoj duljini  $\lambda = 280$  nm. Apsorbancija se određuje u kvarcnoj kivetu. Tako pripravljena otopina razrjeđuje se u rasponu koncentracija 0,5 – 50 mg/L jer to područje odgovara linearnom području ovisnosti omjera apsorbanacija (595 nm/450 nm) o koncentraciji proteina [51].

Prije početka ispitivanja koncentracije proteina u uzorku, potrebno je odrediti vrijednosti apsorbanacije kiveta napunjenih deioniziranom vodom ( $V = 1$  mL) pri valnim duljinama  $\lambda = 595$  nm i  $\lambda = 450$  nm na UV-Vis spektrofotometru. Za mjerenje koncentracije proteina u uzorku potrebno je u plastične kivete dodati 500  $\mu$ L ispitivanog uzorka i 500  $\mu$ L Bradford reagensa. Nakon dodavanja uzorka i reagensa, otopinu je potrebno kratko homogenizirati. Nakon točno 5 minuta inkubacije u mraku, potrebno je spektrofotometrijski izmjeriti apsorbanacije pri valnim duljinama  $\lambda = 595$  nm i  $\lambda = 450$  nm. Svi uzorci su analizirani u tri paralele. Iz dobivenih apsorbanacija određuje se koncentracija proteina korištenjem baždarnog dijagrama (Prilog 1.).

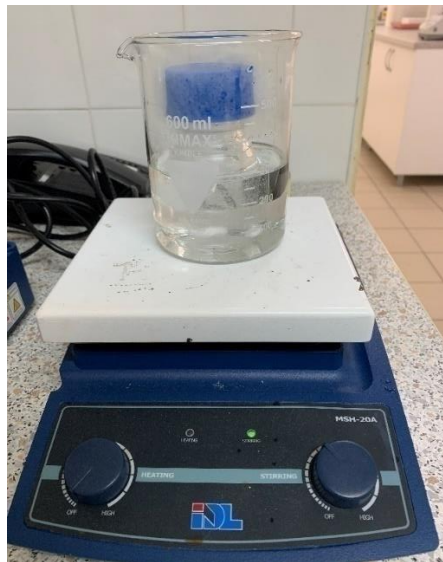
### 3.2.2. Priprava i karakterizacija eutektičnih otopala

Eutektična otopala pripravljena su na način da su odabrane komponente pomiješane u potrebnom molarnom omjeru prikazanom u Tablici 4. Nakon vaganja komponentni sadržaj je



miješan na magnetskoj miješalici pri temperaturi od  $T = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  do  $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Slika 14.) tokom 2 h, odnosno do formiranja prozirne homogene kapljevine [52].

Nakon pripreve eutektičnih otapala, korištenjem pH metra izmjerena je pH vrijednost otopina. Gustoća otopina određena je korištenjem piknometra, a viskoznost je izmjerena korištenjem rotacijskog reometra.



**Slika 14.** Priprema eutektičnog otapala na magnetskoj miješalici i u vodenoj kupelji

**Tablica 4.** Korištena/pripravljena eutektična otapala

<b>Naziv eutektičnog otapalo</b>	<b>Kratica</b>	<b>Molarni omjer komponenti</b>	<b>Udio vode, % mas.</b>
kolin-klorid:glicerol	ChCl:Gly	1:3,25	-
kolin-klorid:propilen-glikol:cinkov diklorid	ChCl:PG:ZnCl <sub>2</sub>	1:4:0,02	-
kolin-klorid:propilen-glikol	ChCl:PG	1:4	-
kolin-klorid:etilen-glikol	ChCl:EG	1:3	-
betain:glicerol	B:Gly	1:4	-
betain:propilen-glikol	B:PG	1:3,5	-
betain:glicerol:cinkov diklorid	B:Gly:ZnCl <sub>2</sub>	1:4:0,02	-
betain:etilen-glikol	B:EG	1:3	-
betain:urea	B:U	1:3	40
kolin-klorid:urea	ChCl:U	1:2	5
kolin-klorid:glukoza	ChCl:Glc	1:1	25
kolin-klorid:glicerol	ChCl:Gly	1:1,5	-
kolin-klorid:fruktoza	ChCl:Fru	2,5:1	30
kolin-klorid:fruktoza	ChCl:Fru	2,5:1	15
kolin klorid:fruktoza	ChCl:Fru	2,5:1	40

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima lakaza

Određivanje aktivnosti enzima lakaza temelji se na oksidacijskoj ABTS metodi u kojoj enzim lakaza nefenolnu boju, ABTS, oksidira do stabilnijeg stanja kationskog radikala. Koncentracija radikala utječe na intenzitet obojenja smjese, plavo-zelena boja, te se povezuje s aktivnosti enzima lakaza.

Metoda za određivanje aktivnosti enzima lakaza je spektrofotometrijska metoda. Kako bi odredila aktivnost enzima lakaza u eutektnim otapalima, 1 mg/mL enzima otopljen je u eutektnom otapalu i inkubiran 10 min na temperaturi od  $T = 25$  °C. Nakon inkubacije, aktivnosti enzima lakaza u eutektnim otapalima određena na način da je u kvarcnu kivetu volumena 1 mL dodan 0,1 mL uzorka enzima i 0,9 mL otopine ABTS-a. Mjerenje je provedeno u vremenu od 60 s pri valnoj duljini od  $\lambda = 420$  nm. Iz dobivenih dinamičkih promjena apsorbancije uzorka, izračunate su vrijednosti volumena aktivnosti enzima lakaza prema Jednadžbi (3) [53].

$$V.A. = \frac{V_R}{\varepsilon_{420} \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3)$$

gdje su:

$V_R$	ukupni volumen uzorka u kiveti, mL
$V_E$	volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim, mL
$\varepsilon_{420}$	ekstinkcijski koeficijent, $\varepsilon_{420} = 0,036$ L/ $\mu$ mol/cm
$d$	širina kivete, $d = 1$ cm
$\Delta A/\Delta t$	promjena apsorbancije 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 $\mu$ mol/L supstrata u minuti

Kao referenta vrijednost aktivnosti enzima lakaza u eutektnim otapalima uzeta je vrijednost aktivnosti enzima dobivene na način da je enzim otopljen u 0,1 mol/L NaCl-glicin puferu pH vrijednosti 4,5.

### 3.2.4. Šaržna ekstrakcija enzima lakaza

#### 3.2.4.1. Odabir vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnog otapala za provedbu ekstrakcije enzima lakaza

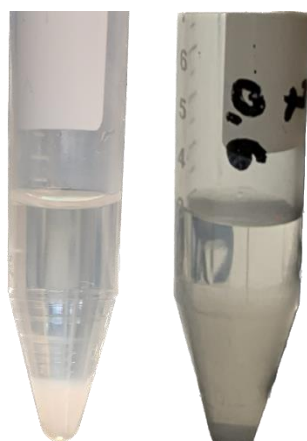
U svrhu pronalaska najučinkovitije metode za ekstrakciju komercijalnog enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* ispitana je učinkovitost ekstrakcije korištenjem različitih koncentracija  $K_2HPO_4$  u vodenoj otopini enzima lakaza i korištenjem različitih eutektičnih otapala (Tablica 4.). Najprije je pripremljena vodena otopina enzima koncentracije 0,01 mg/mL i soli  $K_2HPO_4$  koncentracija u rasponu 0,3 – 0,9 g/mL. U svim pripremljenim otopinama izmjerena je koncentracija proteina korištenjem Bradfordovog testa za mjerenje koncentracije proteina u uzorku (3.2.1.)

Šaržna ekstrakcija provedena je u Falcon epruветama miješanjem 2 mL vodene otopine enzima i 1,3 g eutektičnog otapala. Tako pripremljena smjesa homogenizirana je na laboratorijskoj miješalici 30 min pri 400 okr/min i pri temperaturi od  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Slika 15.). Nakon završetka homogenizacije, smjesa je centrifugirana 5 min pri 4.000 okr/min i  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



**Slika 15.** Provedba šaržne ekstrakcije komercijalnog enzima lakaza korištenjem laboratorijske miješalice

Nakon centrifugiranja smjese, izmjereni su volumeni rafinatne i ekstraktne faze ukoliko je došlo do odvajanja faza u smjesi (Slika 16.).



**Slika 16.** Jednofazni sustav u kojemu nije došlo do odvajanja faza (lijevo) i dvofazni sustav u kojemu je došlo do odvajanja faza (desno) nakon šaržne ekstrakcije

U dvofaznom sustavu u rafinatnoj fazi nalazi se vodena otopina  $K_2HPO_4$  i zaostali enzim lakaza (donja faza), a u ekstraktnoj fazi nalazi se eutektično otapalo i ekstrahirani komercijalni enzim lakaza (gornja faza). Kako ne bi došlo do miješanja slojeva prilikom uzorkovanja, slojevi su međusobno odvojeni korištenjem šprice i igle te je za svaku fazu određena koncentracija proteina Bradford metodom. Iz dobivenih volumena faza i koncentracija enzima u rafinatnoj i ekstraktnoj fazi izračunate su učinkovitost ekstrakcije proteina,  $E$ , (Jednadžba (4)) i koeficijent raspodjele,  $K_p$ , (Jednadžba (5)).

$$E = \frac{\gamma_{P,EKS} \cdot V_{EKS}}{\gamma_{P,RAF} \cdot V_{EKS} + \gamma_{P,RAF} \cdot V_{RAF}} \cdot 100 \% \quad (4)$$

$$K_p = \frac{\gamma_{P,EKS}}{\gamma_{P,RAF}} \quad (5)$$

gdje su:

$\gamma_{P,EKS}$	masena koncentracija proteina (P) u ekstraktnoj fazi (EKS), mg/mL
$\gamma_{P,RAF}$	masena koncentracija proteina (P) u rafinatnoj fazi (RAF), mg/mL
$V_{EKS}$	volumen ekstraktne faze, mL
$V_{RAF}$	volumen rafinatne faze, mL

Na temelju izračunatih vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije enzima lakaza za sva testirana euteklična otapala, određen je optimalni sustav za provedbu ekstrakcije enzima lakaza. Optimalnim sustavom se smatra onaj u kojemu je dobivena najveća vrijednost učinkovitosti ekstrakcije.

#### **3.2.4.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije enzima lakaza u vodenoj otopini K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> na učinkovitost ekstrakcije enzima u šaržnom ekstraktoru**

Kako bi se ispitaio utjecaj koncentracije enzima na učinkovitost ekstrakcije u šaržnom ekstraktoru, u vodenoj otopini K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, masene koncentracije  $\gamma = 0,5$  g/mL, otopljen je komercijalni enzim lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* u rasponu masene koncentracije od  $\gamma = 0,01$  do  $\gamma = 0,089$  mg/mL. Šaržna ekstrakcije provedene ja na način opisan u poglavlju 3.2.6.1. te je izračunata učinkovitost ekstrakcije enzima i koeficijenti raspodjele korištenjem Jednadžbe (4) i Jednadžbe (5).

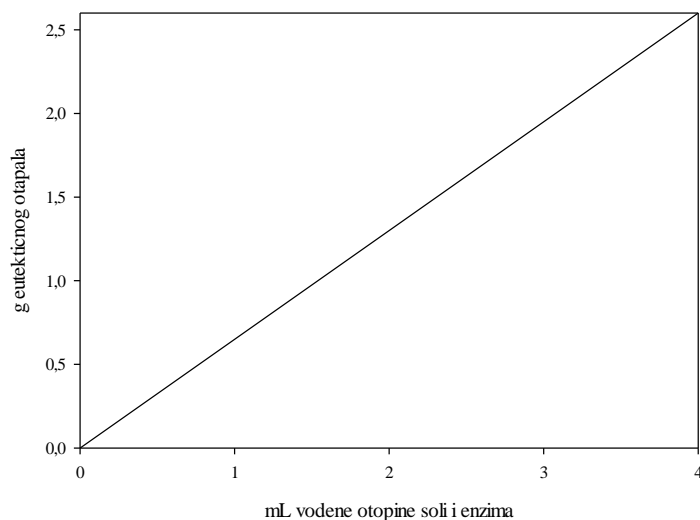
#### **3.2.4.3. Ispitivanje ponovne upotrebe odabranog eutekličnog otapala za ekstrakciju enzima lakaza**

Kako bi proces ekstrakcije enzima lakaza bio što ekonomičniji i ekološki prihvatljiviji, ispitana je mogućnost ponovne upotrebe eutekličnog otapala za ekstrakciju enzima lakaza. Postupak ekstrakcije proveden je kako je opisano u poglavlju 3.2.6.1. Nakon provedbe prvog ciklusa ekstrakcije, određena je koncentracija enzima u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi kao i volumeni faza. Ekstraktna faza izdvojena je iz dvofaznog sustava te je ponovno korištena za ekstrakciju. Na temelju odvojenog volumena eutekličnog otapala izračunata je nova količina vodene otopina K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i enzima koju je trebalo dodati kako bi se postigli isti uvjeti kao u prvom ciklusu ekstrakcije (Slika 17.). Opisani postupak ponovljen je onoliko puta, tj. sve dok nije došlo do zasićenja eutekličnog otapala. Učinkovitost ekstrakcije za svaki pojedini ciklus izračunat je se na temelju Jednadžbe (6), a koja je dobivena modifikacijom Jednadžbe (4).

$$E = \frac{\gamma_{P,P.O} \cdot V_{P.O.} - \gamma_{P,RAF} \cdot V_{RAF.}}{\gamma_{P,P.O} \cdot V_{P.O.}} \cdot 100 \% \quad (6)$$

gdje su:

$\gamma_{P,P.O.}$	masena koncentracija proteina (P) u početnoj otopini (P. O.), mg/mL
$\gamma_{P,RAF}$	masena koncentracija proteina (P) u rafinatnoj fazi (RAF), mg/mL
$V_{P.O.}$	volumen početne otopine (P. O.), mL
$V_{RAF}$	volumen rafinatne faze, mL



**Slika 17.** Odnos između mase eutektičnog otapala i volumena vodene otopine  $K_2HPO_4$  i enzim lakaza tokom šaržne ekstrakcije

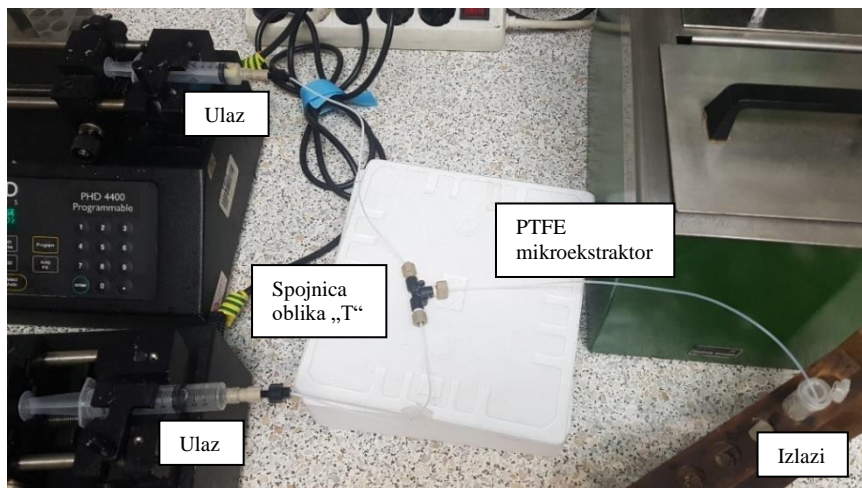
### 3.2.5. Kontinuirana ekstrakcija enzima lakaza korištenjem mikroekstraktora

U svrhu intenzifikacije procesa ekstrakcije enzima lakaza, ekstrakcija je provedena u mikroekstraktorima izrađenim od teflonske cijevi s dva ulaza „T“ oblika, a različitih značajki prikazanih u Tablici 5.

**Tablica 5.** Karakteristike mikroekstraktora korištenih u procesu ekstrakcije

Promjer kanala, $2W, \mu m$	Dužina cijevi, $L, cm$	Volumen, $V, \mu L$
500	120	235,62
1000	30	235,62
2000	7,5	235,62

Dvije plastične šprice prethodno su napunjene eutekničnim otapalom, odnosno početnom otopinom komercijalnog enzima lakaza i  $K_2HPO_4$  te su pomoću klipnih pumpi ove otopine uvedene u mikroekstraktor (Slika 18.).



**Slika 18.** Prikaz aparatura za provedbu kontinuirane ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru

Kako bi se mogla usporediti učinkovitost ekstrakcije u mikroekstraktoru s učinkovitošću ekstrakcije u šaržnom ekstraktoru, prethodno je potrebno odrediti omjere volumnih protoka otopina pri kojima pojedine otopine ulaze u mikroekstraktor koje su rezultirale istim volumnim omjerom faza (1:1,22) u uzorku na izlazu iz mikroekstraktora kakav je bio i u šaržnom procesu. U Tablici 6. prikazani su dobiveni potrebni volumni protoci, odnosno vremena zadržavanja korištena u pokusima ekstrakcije mikroekstraktorima.



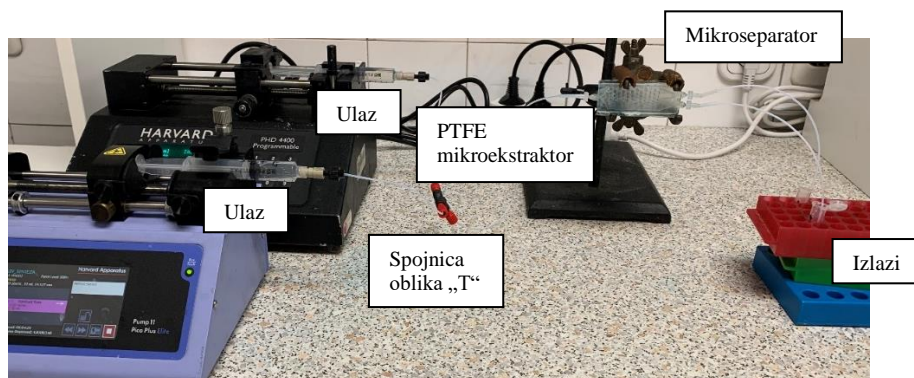
**Tablica 6.** Vremena zadržavanja i pripadajući protoci korišteni u ekstrakciji u mikroekstraktoru

$\tau$ , min	$q_v$ (eutektično otapalo), $\mu\text{L}/\text{min}$	$q_v$ (vodena otopina soli i enzima), $\mu\text{L}/\text{min}$
0,07	1476,00	1800,00
0,12	902,00	1100,00
0,16	656,00	800,00
0,52	205,00	250,00
1,04	102,50	125,00
1,99	53,30	65,00

Na izlazu iz mikroekstraktora prikupljen je 1 mL uzorka koji je centrifugiran 5 min pri 4.000 okr/min i temperaturi od  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon centrifugiranja, izmjereni su volumeni rafinatne i ekstraktne faze. U svakoj fazi izmjerena je i koncentracija proteina korištenjem Bradford testa te je izračunata učinkovitost ekstrakcije pomoću Jednadžbe (4) i koeficijent raspodjele pomoću Jednadžbe (5).

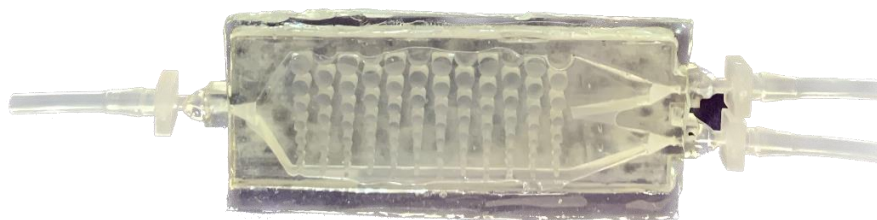
### 3.2.6. Razvoj integriranog sustava serijski povezanog mikroekstraktora i mikroseparatora

Nakon optimizacije procesa ekstrakcije u mikroekstraktoru, mikroekstraktor je serijski spojen s mikroseparatorom s ciljem kontinuirane separacije ekstraktne i rafinatne faze (Slika 19).



**Slika 19.** Aparatura za provedbu kontinuirane ekstrakcije i separacije rafinatne i ekstraktne faze

Izvedba separatora je prikazana na Slici 20., a izrađen je u Laboratoriju za aditivnu proizvodnju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu [54]. Mikroseparator je izveden na način da ima jedan ulaz i dva izlaza trokutnog oblika (dimenzije mikroseparatora su: duljina:visina:širina = 7:2,5:0,5 cm i volumen  $V = 4300 \mu\text{L}$ ). Zadaća takve izvedbe je da usmjerava izlazne tokove omogućujući tako odvajanja faza. Unutar separatora nalazi se niz stupova koji su poslagani u ravninu te se razlikuju u oplošju pri čemu kapljevina veće površinske napetosti i viskoznosti (kao što je DES) teži da struji uz stupove većeg oplošja.



**Slika 20.** Mikroseparator

Integrirani sustav razvijen je tako da je izlaz iz mikroekstraktora spojen na ulaz separatora. U mikroseparatoru postignuto je odvajanje rafinatne i ekstraktne faze od kojih je svaka izlazila na drugom izlazu. Svaka faza skupljena je zasebno te je u svakoj fazi izmjerena koncentracija proteina korištenjem Bradford testa. Vrijeme zadržavanja pri kojemu je provedena integrirana ekstrakcija enzima lakaza bilo je 0,12 min ( $q_v$  (eutektično otapalo) = 902  $\mu\text{L}/\text{min}$  i  $q_v$  (vodena otopina soli i enzima) = 1100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ).

### **3.2.7. Izrada 2D matematičkog modela procesa ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru**

Kako bi se lakše opisao i razumio proces ekstrakcije te kako bi se predvidjelo ponašanje procesa promjenom početnih uvjeta, ekstrakcija enzima lakaza u mikroekstraktoru opisana je 2D matematičkim modelom. U ovom radu korišten je model koji su predložili Žnidaršič-Plazl i Plazl [55], a koji je prilagođen i opisan u radu Jurinjak Tušek i sur. [56]. Matematički model procesa ekstrakcije opisan je 2D modelom koji uzima u obzir konvekciju u smjeru gibanja fluida ( $x$ ) i difuziju u dva smjera ( $x$  i  $y$ ).

Pretpostavljeni su stacionarni uvjeti u mikroekstraktoru, a matematički model je opisan bezdimenzijskim parcijalnim diferencijalnim jednadžbama za koncentraciju proteina u fazi vodene otopine soli –  $K_2HPO_4$  (Jednadžba (7))

$$\begin{aligned}
 v \cdot \frac{\partial \gamma_{P,sol}}{\partial \xi} &= \frac{D_{P,sol}}{W} \cdot \left( \frac{\partial^2 \gamma_{P,sol}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \gamma_{P,sol}}{\partial \psi^2} \right) \\
 \gamma_{P,sol}(0, \psi) &= \gamma_{P,sol,i} & 0 \leq \psi \leq 1 \\
 \frac{\partial \gamma_{P,sol}\left(\frac{L}{W}, \psi\right)}{\partial \xi} &= 0 & 0 \leq \psi \leq 1 \quad (7) \\
 \gamma_{P,sol}(\xi, 0) &= K_P \cdot \gamma_{P,DES}(\xi, 0) & 0 < \xi < \frac{L}{W} \\
 \frac{\partial \gamma_{P,sol}(\xi, 1)}{\partial \psi} &= 0 & 0 < \xi < \frac{L}{W}
 \end{aligned}$$

i fazi eutektičnog otapala (Jednadžba (8)) uz odgovarajuće početne i granične uvjete.

$$\begin{aligned}
 v \cdot \frac{\partial \gamma_{P,DES}}{\partial \xi} &= \frac{D_{P,DES}}{W} \cdot \left( \frac{\partial^2 \gamma_{P,DES}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \gamma_{P,DES}}{\partial \psi^2} \right) \\
 \gamma_{P,DES}(0, \psi) &= 0 & 0 \leq \psi \leq 1 \\
 \frac{\partial \gamma_{P,DES}\left(\frac{L}{W}, \psi\right)}{\partial \xi} &= 0 & 0 \leq \psi \leq 1 \quad (8) \\
 \gamma_{P,DES}(\xi, 0) &= \frac{D_{P/SOL}}{D_{P/DES}} \cdot \frac{\gamma_{P,sol}(\xi, 0)}{\partial \psi} & 0 < \xi < \frac{L}{W} \\
 \frac{\partial \gamma_{P,DES}(\xi, 1)}{\partial \psi} &= 0 & 0 < \xi < \frac{L}{W}
 \end{aligned}$$

gdje su:

$v$	linearna brzina, m/s
$\xi$ i $\psi$	nezavisne dimenzijske varijable ( $\xi=x/W$ i $\psi=y/W$ )
$x$ i $y$	koordinate u duljini ( $L$ ) i širini mikrokanala ( $2W$ )
$D_{P/sol(DES)}$	difuzijski koeficijent, $cm^2/s$ .

Difuzijski koeficijenti su izračunati korištenjem He-Niemeyerove korelacije [57] koja je prikazana Jednadžbom (9).

$$D_{P/sol(DES)} = \frac{6,85 \cdot 10^{-8} \cdot T}{\eta \cdot \sqrt{M^{\frac{1}{3}} \cdot R_G}} \quad (9)$$

gdje su:

$D_{P/sol(DES)}$	difuzijski koeficijent, $\text{cm}^2/\text{s}$
$T$	temperatura, K
$\eta$	kinematička viskoznost, $\text{mPa s}$
$M$	molarna masa, $\text{g/mol}$
$R_G$	kut zakretanja proteina, $\text{Å}$

Konstanta  $6,85 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ mPa g}^{1/6} \text{ mol}^{1/6} \text{ Å}^{1/2} / \text{s K}$  preuzeta je iz rada Tušek [58].

Sustav parcijalnih diferencijalnih jednadžbi riješen je korištenjem metode konačnih razlika uz diskretizaciju na statičkoj mreži s jednakim udaljenostima pomoću programskog paketa Mathematica 10.0 (Wolfram Research, SAD). Korišteni kod prikazan je u Prilogu 2.

### 3.2.7.1. Statističke analize za ispitivanje ispravnosti dobivenog 2D modela

Kako bi se ispitala ispravnost dobivenog modela ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru, potrebno je provesti i statističke analize podataka dobivenih eksperimentom i proračunatih modelom. Formule koje su se koristile za procjenu ispravnosti modela prikazane su Jednadžbama (10 – 13).

- Koeficijent određivanja ( $R^2$ ):

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_{i,p} - Y_{i,e})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_{i,p} - Y_e)^2} \quad (10)$$

- Korijen kvadratne pogreške (RMSE):

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{i,p} - Y_{i,e})^2}{n}} \quad (11)$$

- Standardna pogreška predviđanja (SEP):

$$SEP = \frac{RMSE}{Y_e} \cdot 100 \quad (12)$$

- Apsolutno prosječno odstupanje (AAD):

$$AAD = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{|Y_{i,p} - Y_{i,e}|}{|Y_{i,e}|} \quad (13)$$

gdje su:

$Y_{i,e}$	eksperimentalni podataka
$Y_{i,p}$	odgovarajuća predviđena vrijednost dobivena modelom
$n$	broj podataka
$Y_e$	srednja vrijednost eksperimentalnih podataka [59].

### 3.2.8. Elektroforeza (SDS-Page)

Nakon pripreme otopina (3.1.3.) sastavljena je jedinica za elektroforezu. Između prozirnog stakla i bijelog stakla koji predstavljaju držač za gel, kao sendvič, prvo je izliven gel za razdvajanje do približno 3 cm ispod ruba stakla. Gel je ostavljen oko 30 minuta da polimerizira, nakon čega se izlijeva gel za sabijanje. Gel za sabijanje se puni do vrha stakla te se u njega uranja češljic koji stvara jažice u gelu u koje se kasnije nanose uzorci proteina. Prostor iznad gela, uključujući jažice, napunjen je puferom za provedbu elektroforeze pomoću pipete. Pufer za provedbu elektroforeze nanosi se i u komoru za pufer i to približno 75 mL po jednoj komori

Nakon pripreme gelova za provedbu elektroforeze u digestoru je pripremljena otopina za pripremu uzorka. Otopina je dobivena miješanjem 950  $\mu\text{L}$  pufera za uzorke i 5  $\mu\text{L}$   $\beta$ -merkaptoetanol. Uzorak koji sadrži enzim pomiješan je s pripremljenom otopinom u omjeru 1:1 (10  $\mu\text{L}$  uzorka + 10  $\mu\text{L}$  otopine) u Eppendorf epruveti. Tako pripremljeni uzorci enzima

centrifugirani su 1 min, a zatim su stavljeni 10 min u termoblok na 95 °C, te ponovno centrifugirani 1 min. Nakon drugog centrifugiranja uzorci su spremni za punjenje jažica.

Prva jažica napunjena je s 5  $\mu$ L Pageruler™, a ostale s 10  $\mu$ L uzorka pomoću injekcijske igle. Nakon što su jažice napunjene sa svim uzorcima, donja komora za pufer napunjena je s približno 250 mL pufera za provedbu elektroforeze (Slika 21.). Jedinica za elektroforezu zatvorena je poklopcem i priključena na izvor istosmjerne struje. Prvih 10 minuta elektroforeza se provodi pri konstantnom naponu od 100 V, a nakon toga pri naponu od 200 V. Elektroforeza se provodi približno 60 minuta, odnosno sve dok se crta s uzorcima nije spustila skoro do dna stakalaca. Nakon završetka elektroforeze, gel se odvaja od stakalaca te se provodi bojanje.

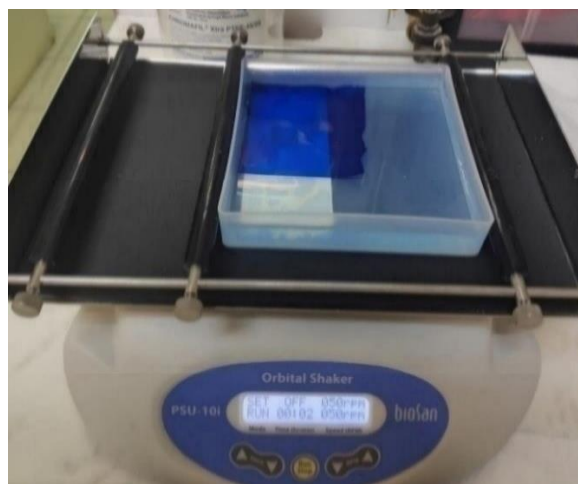


**Slika 21.** Napunjene jažice s uzorcima

Bojanje se provodi u digestoru u orbitalnoj tresilici pri 100 okr/min. Gel se uroni u otopinu za bojanje u kojoj se boji 1 h (Slika 22. a)). Kada je bojanje završeno, gel se odbojava uranjanjem u tekućinu za odbojavanje (10%-tna otopina octene kiseline) na način da prekrije cjelokupnu površinu gela. Pri istim uvjetima korištenim za bojanje, uzorak je ostavljen na tresilici da se odbojava 1 h (Slika 22. b)).



a)



b)

**Slika 22.** a) Bojanje gela na orbitalnoj tresilici u digestoru, b) odbojavanje gela na orbitalnoj tresilici u digestoru

### 3.2.9. Razgradnja ljubičasta anilinske tekstile boje u šaržnom reaktoru

U pet šaržnih reaktora volumena 100 mL provedena je razgradnje anilinske tekstilne boje. U svaki reaktor dodano je 45 mL anilinske boje koncentracije 75 mg/L otopljene u 0,1 mol/L NaCl-glicin pufer pH 4,5 (Slika 23). Reakcija je započeta dodatkom:

- reaktor 1: 5 mL odabranog DES
- reaktor 2: 5 mL komercijalnog enzima lakaza porijeklom *Trametes versicolor*
- reaktor 3: 5 mL dobivenog ekstrakta nakon ekstrakcije komercijalnog enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor*
- reaktor 4: 5 mL sirovog uzorka porijeklom iz *Trametes versicolor*
- reaktor 5: 5 mL dobivenog ekstrakta nakon ekstrakcije sirovog uzorka porijeklom iz *Trametes versicolor*.

U svim uzorcima, osim uzorka čistog DES, koncentracija enzima iznosila je 0,05 mg/mL. Reakcija je provedena na magnetskoj miješalici pri 200 okr/min i temperaturi od  $T = 25$  °C. Promjena koncentracije anilinske boje u reakcijskoj smjesi praćena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini  $\lambda = 548$  nm mjerenjem intenziteta obojenja [50].



**Slika 23.** Razgradnja anilinske tekstilne boje u šaržnom reaktoru

Učinkovitost uklanjanja boja izračunata je upotrebom Jednadžbe (14).

$$E_{\text{BOJE},t} = \frac{\text{ABS}_0 - \text{ABS}_t}{\text{ABS}_0} \cdot 100\% \quad (14)$$

gdje su:

- |                     |   |
|---------------------|---|
| $E_{\text{BOJE},t}$ | učinkovitost uklanjanje boje u vremenu, % |
| $\text{ABS}_0$      | apsorbancija početne otopine, -           |
| $\text{ABS}_t$      | apsorbancija otopine u vremenu $t$ , -    |



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu razvijen je integrirani sustav serijski povezanog mikroekstraktora i mikroseparatora korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnog otapala i vodene otopine soli  $K_2HPO_4$  za kontinuiranu ekstrakciju komercijalnog enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor*. Odabir vodenog dvofaznog sustava proveden je šaržnom ekstrakcijom pri čemu je glavni kriterija za odabir najboljeg sustava bila ostvarena učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza. Nakon odabira najboljeg sustava, sustav je prenesen u mikroekstraktor radi dodatne intenzifikacije procesa. U mikroekstraktorima različitih fizikalnih značajki ispitan je utjecaj promjera cijevi i vremena zadržavanja na učinkovitost ekstrakcije kako bi se odredili optimalni uvjet za kontinuiranu ekstrakciju enzima lakaza. Ispitan je i kapacitet eutektičnog otapala, tj. mogućnost njegove ponovne upotrebe u šaržnom načinu rada i u mikroekstraktoru. Nakon optimizacije procesa u mikroekstraktoru, mikroekstraktor je serijski spojen s mikroseparatorom kako bi se ispitala mogućnost kontinuiranog odvajanja faza nakon ekstrakcije enzima u mikroekstraktoru. Za sve ispitane promjere cijevi mikroekstraktora, izrađeni su matematički modeli koji opisuju proces ekstrakcije. Nakon dobivenih optimalnih uvjeta za provedbu ekstrakcije enzima lakaza, metoda je primijenjena na sirovom uzorku dobivenom iz *Trametes versicolor*. Na kraju, korištenjem ekstrahiranog enzima lakaza, provedena je razgradnja anilinske tekstilne boje.

### 4.1. Odabir i karakterizacija eutektičnih otapala

Eutektična otapala povećavaju stabilnost enzima zbog formiranja vodikovih veza između komponenti eutektičnog otapala i površine enzima, a osim toga, korištenjem eutektičnih otapala mogu se uspješno ekstrahirati i pročišćavati različiti proteini [60]. Stabilizacijom enzim postaje otporniji na negativne utjecaje (npr. organska otapala) koji mogu utjecati na njegovu konformaciju [45]. Khodaverdian i sur. [61] pokazali su kako prisutnost eutektičnog otapala na bazi betaina (akceptor vodikove veze) poboljšava svojstva enzima lakaza, tj. u prisutnosti eutektičnog otapala enzim je aktivniji i stabilniji u odnosu na sustave u kojima je enzim lakaza otopljen u puferu. Dobivene rezultate također su potvrdili i Toledo i sur. [62]. U svom istraživanju Toledo i sur. [62] također su ispitali aktivnost enzima lakaza u prisutnosti eutektičnog otapala na bazi kolin-klorida. Dobiveni rezultati pokazali su da to otapalo umanjuje aktivnost enzima lakaza od 19 do 98 % u odnosu na referentnu vrijednost (enzim lakaza u puferu), a pad aktivnosti ovisio je o odabiru donora vodikove veze

i masenog udjela eutektičnog otapala u sustavu. Na temelju navedenih literaturnih rezultata, u ovom istraživanju kolin-klorid i betain odabrani su kao akceptori vodikove veze.

Pretraživanjem literature [44, 62 – 65] odabrani su i različiti donori vodikove veze, tj. glukoza, etilen-glikol, glicerol, urea, propilen-glikol i fruktoza. U spomenutom radu Toleda i sur. [62] ispitano je šest različitih donora vodikove veze, a najboljim su se pokazali glicerol i etilen-glikola. U radu Zeng i sur. [63] autori su postigli učinkovitost ekstrakcije goveđeg seruma albumina od 99,94 % primjenom eutektičnog otapala na bazi kolin-klorida i uree u vodenom dvofaznom sustavu te je zbog toga i urea korištena kao jedan od donora vodikove veze u ovom radu. Glukoza je odabrana u ovom istraživanju jer enzim lipaza [44] zadržava vrlo visoku aktivnost u eutektičnom otapalu na bazi glukoze. Propilen-glikol odabran je jer njegovim korištenjem postignuta velika učinkovitost ekstrakcije proteina iz ostataka nakon prerade sardina [64], a fruktoza jer se njenim korištenjem mogu pripremiti eutektična otapala koja imaju pH vrijednost u rasponu 6,41 – 7,10 što odgovara optimalnom pH enzima lakaza. Osim toga, za pripremu DES-ova na bazi fruktoze potrebno je u smjese dodati više vode ( $w_{H_2O} > 15\%$  (w/w)) pri čemu se stvaraju uvjeti slični onima u vodenim otopinama [65].

Na temelju odabranih akceptora i donora vodikove veze, sintetizirano je 15 različitih eutektičnih otapala prikazanih u Tablici 4. Za pripremu nekih eutektičnih otapala potrebno je bilo dodati i vodu jer u protivnome nije bilo moguće sintetizirati eutektično otapalo. Nakon pripreme eutektičnih otapala, istima su određene gustoća, pH vrijednost, dinamička i kinematička viskoznost. Dobivene vrijednosti prikazane su u Tablici 7. pH vrijednost bitna je zbog aktivnosti enzima lakaza, koja je, kako je već rečeno, najveća u rasponu pH od 6 do 7 [50]. Kao što je vidljivo, sintetizirano je nekoliko DES-ova (ChCl:Gly, ChCl:PG:ZnCl<sub>2</sub>, ChCl:PG, B:Gly:ZnCl<sub>2</sub>, ChCl:Glc, ChCl:Fru) čiji je pH vrlo blizak optimalnom pH enzima lakaza te je za očekivati da bi aktivnost enzima lakaza u njima trebala biti najviša.

Viskoznost je vrlo važan podatak kada je u pitanju ekstrakcija u mikroekstraktorima jer je izravno povezana s ponašanjem kapljevina u mikrokanalu. Također, ako su kapljevine tj. DES-ovi previše viskozni, ne mogu se koristiti u mikroekstraktorima [66].

Što se tiče gustoće, ona određuje separaciju slojeva ekstraktne i rafinatne faze nakon ekstrakcije u makroekstraktorima. Bez razlike u gustoći, dvije kapljevine se neće razdvojiti u gravitacijskom polju. Ovo svojstvo je važno za makroekstraktore međutim, u mikroekstraktoru čak i dvije kapljevine iste gustoće struje jedna pored druge s jasno definiranom granicom ako se kapljevine uvode u mikrokanal pomoću dva zasebna ulaza [67].

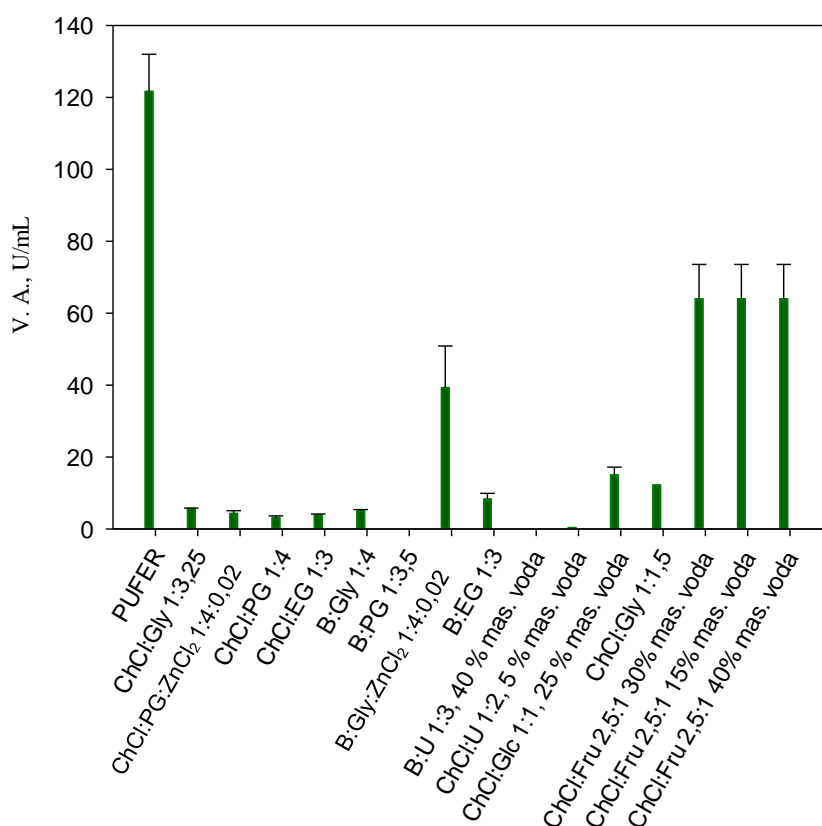
**Tablica 7.** Određena svojstva pripremljenih eutektičnih otopala

Eutektično otopalo	Molarni omjer komponenti	$\rho$ , g/mL	pH, -	$\eta$ (25 °C), mPa s	$\nu$ (25 °C), mm <sup>2</sup> /s
	Udio vode, % mas				
ChCl:Gly	1:3,25	1,172	6,00	53,10 ± 0,89	45,29 ± 0,78
	-				
ChCl:PG:ZnCl <sub>2</sub>	1:4:0,02	1,026	5,58	53,70 ± 2,00	52,33 ± 1,95
	-				
ChCl:PG	1:4	1,075	5,21	48,60 ± 0,00	45,20 ± 0,00
	-				
ChCl:EG	1:3	1,138	3,83	27,90 ± 0,00	24,51 ± 0,00
	-				
B:Gly	1:4	1,196	9,25	212,19 ± 4,18	177,49 ± 3,54
	-				
B:PG	1:3,5	1,074	8,50	138,70 ± 3,00	129,10 ± 2,79
	-				
B:Gly:ZnCl <sub>2</sub>	1:4:0,02	1,233	6,92	1456,00 ± 0,00	1140,34 ± 0,00
	-				
B:EG	1:3	1,154	8,54	62,30 ± 2,00	53,99 ± 1,74
	-				
B:U	1:3	1,190	10,24	3,47 ± 0,02	2,92 ± 0,02
	40				
ChCl:U	1:2	1,192	9,32	30,69 ± 0,71	25,75 ± 0,19
	5				
ChCl:Glc	1:1	1,265	5,91	38,79 ± 0,22	30,66 ± 0,17
	25				
ChCl:Gly	1:1,5	1,178	5,32	53,10 ± 0,89	46,17 ± 0,78
	-				
ChCl:Fru	2,5:1	1,162	6,95	47,99 ± 1,46	41,30 ± 1,26
	30				
ChCl:Fru	2,5:1	1,234	6,88	749,6 ± 29,59	607,46 ± 23,98
	15				
ChCl:Fru	2,5:1	1,158	7,00	24,45 ± 0,54	21,11 ± 0,47
	40				

Da bi se vodeni dvofazni sustav na bazi eutektičnog otapala mogao formirati, potrebno je pripremiti i vodene otopine soli u visokim masenim koncentracijama kako bi razlika gustoće ekstraktne i rafinatne faze bila što veća. U radu Li i sur. [39] ispitano je formiranje vodenog dvofaznog sustava s  $K_2HPO_4$ ,  $Na_2HPO_4$  i  $KH_2PO_4$  i eutektičnog otapala na bazi betaina. Dobiveni rezultati pokazali su kako jedino upotrebom soli  $K_2HPO_4$  dolazi do formiranja faza te je iz tog razloga odabrana ta sol i u ovom istraživanju.

#### 4.2. Utjecaj eutektičnog otapala na aktivnost enzima lakaza

Da bi ekstrakcije bila što bolja, ekološki prihvatljivija i jeftinija potrebno je pronaći sustav u kojemu je učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* najveća, ali da pritom i aktivnost enzima lakaza ostane čim veća. Zbog toga je prije same ekstrakcije ispitana aktivnost enzima u pripremljenim eutektičnim otapalima. Kao referentna vrijednost uzeta je aktivnost enzima lakaza otopljenog u 0,1 mol/L NaCl-glicin puferu pH 4,5. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 24.



**Slika 24.** Volumna aktivnost enzima lakaza u različitim medijima

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da sva odabrana euteklična otapala smanjuju aktivnost enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor*, dok u nekim eutekličnim otapalima poput B:PG 1:3, B:U 1:3 i ChCl:U 1:2 nije zabilježena nikakva aktivnost enzima lakaza. Najveća volumna aktivnost enzima lakaza postignuta je u eutekličnim otapalima u kojima je fruktoza donor vodika, ChCl:Fru 2,5:1 s 30 % vode (w/w), ChCl:Fru 2,5:1 s 15 % vode (w/w) i ChCl:Fru 2,5:1 s 40 % vode (w/w). Kao što je već rečeno, za pripremu DES-ova na bazi fruktoze, potrebno je dodati vodu kako bi došlo do otapanja komponenata. U radu Li i sur. [39] navode kako je voda važan faktor za aktivnost enzima jer održava aktivnost i strukturu molekule stvaranjem vodikovih veza. Osim udjela vode, spomenuti DES-ovi imaju pH vrijednost (Tablica 7.) vrlo blisku pH optimumu enzima lakaza koji je u rasponu od 6 do 7. [50]. Kada se betain koristi kao akceptor, postiže se značajnije veća aktivnost enzima lakaza, nego kada je korišten akceptor kolin-klorid. Usporedbom eutekličnog otapala ChCl:Gly 1:3,25 i eutekličnog otapala ChCl:Gly 1:1,5 možemo primijetiti da je enzimatska aktivnost enzima lakaza veća u eutekličnom otapalu s manjom količinom glicerola, odnosno da smanjenje glicerola pozitivno utječe na aktivnost enzima. Zanimljiv rezultat može se primijeti i usporedbom DES-ova koji su sadržavali ureu. Naime, bez obzira na akceptor, u DES-ovima kojima je urea korištena kao donor vodikove veze, enzim lakaza nije pokazao aktivnosti.

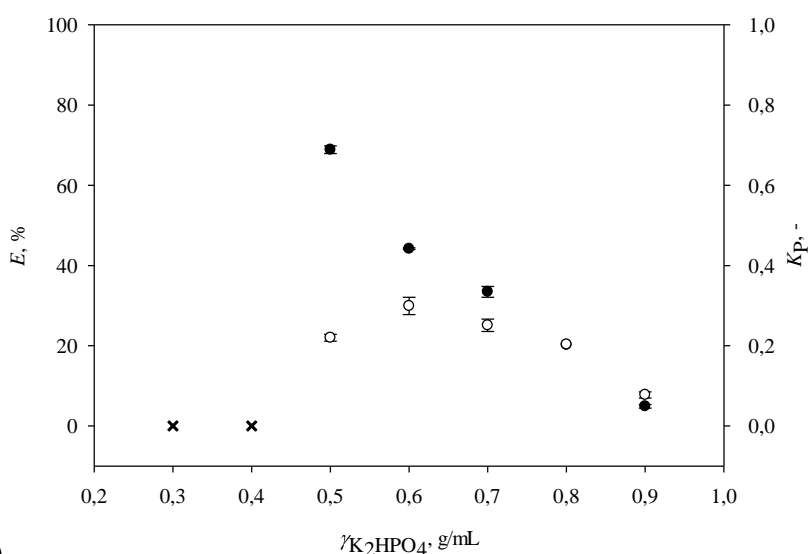
Dobiveni rezultati u ovom istraživanju poklapaju se s rezultatima i zaključcima iz radova Toleda i sur. [62] te Delorme i sur. [68] koji navode kako relativna aktivnost enzima lakaza u eutekličnim otapalima na bazi ChCl imaju relativno nisku aktivnost, a razlog tomu je prisutnost kloridnih iona koji vjerojatno uzrokuju denaturaciju enzima.

#### **4.3. Šaržna ekstrakcija enzima lakaza u vodenim dvofaznim sustavima na bazi eutekličnih otapala**

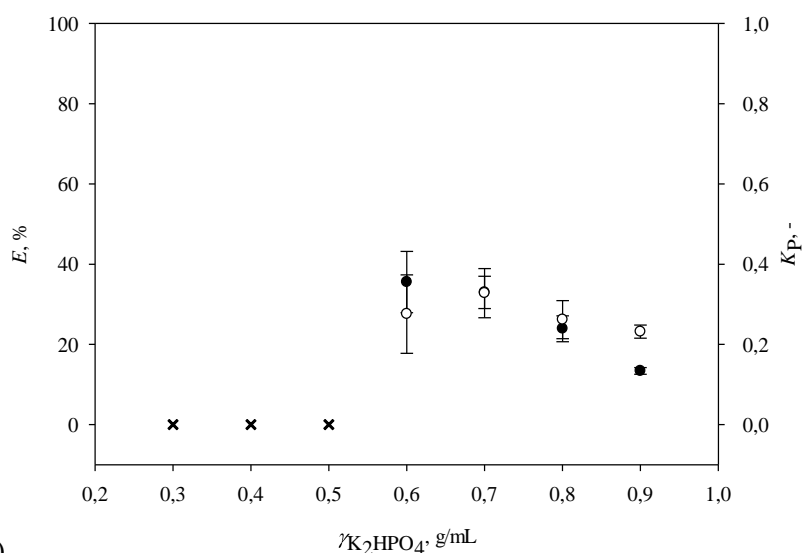
Kako bi se odredio najbolji vodeni dvofazni sustav na bazi eutekličnog otapala za ekstrakciju enzima lakaza, provedena je ekstrakcija u šaržnim ekstraktorima. Šaržna ekstrakcija provedena je kombinacijom odabranih eutekličnih otapala i otopine komercijalnog enzima lakaza s određenim masenim koncentracijama  $K_2HPO_4$  ( $\gamma = 0,3 - 0,9$  g/mL). Najniža ispitana koncentracija soli iznosila je  $\gamma = 0,3$  g/mL. Naime, u radu Miličević i sur. [59] u kojem je provedena ekstrakcija polifenola vodenim dvofaznim sustavom na bazi

eutektičnog otapala i vodene otopine  $K_2HPO_4$ , korištenjem otopine soli koncentracije manje od  $\gamma = 0,3$  g/mL nije dovelo do formiranja dvofaznog sustava.

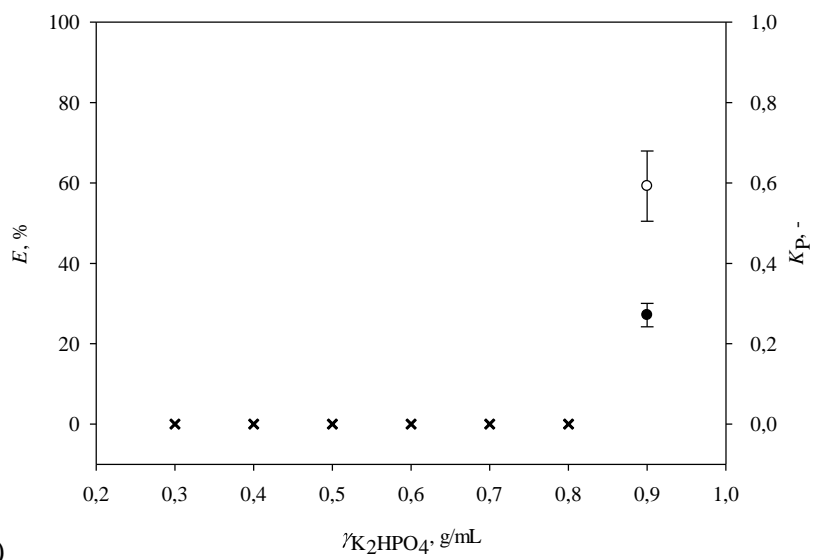
U sustavima u kojima je došlo do odvajanja faza (donja, rafinatna faza – vodena otopina soli i gornja, ekstraktna faza – eutektično otapalo), određena je koncentracija proteina korištenjem Bradford testa te je izračunata učinkovitost ekstrakcije enzima,  $E$ , (Jednadžba (4)) i koeficijent raspodjele,  $K_P$ , (Jednadžba (5)). Rezultati dobiveni nakon provedbe pokusa prikazani su na Slici 25. samo za one sustave u kojima je došlo do stvaranja faza.



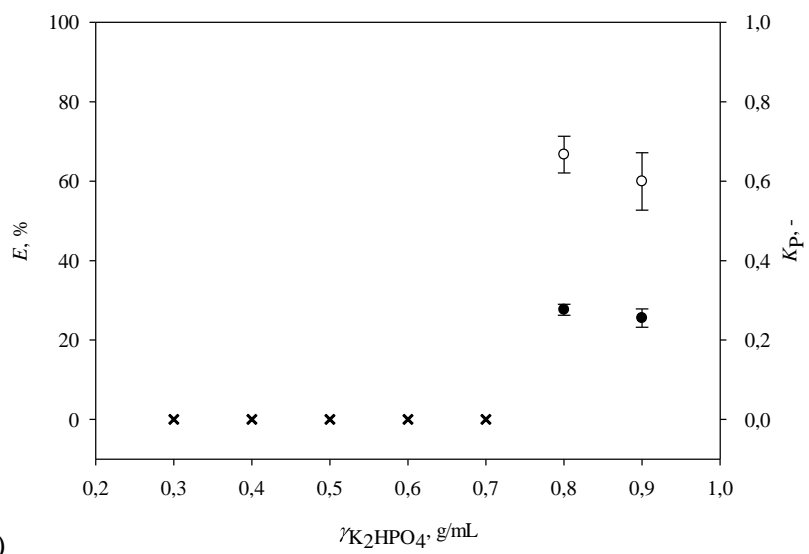
a)



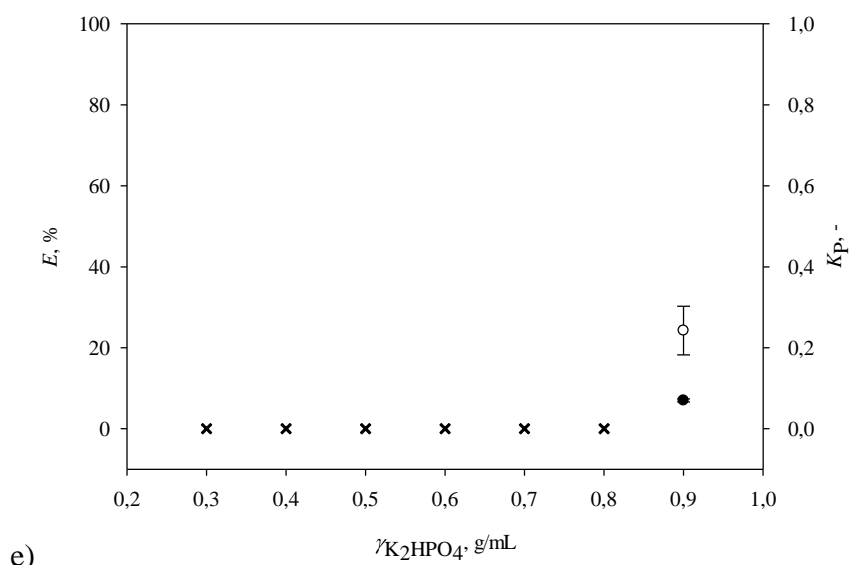
b)



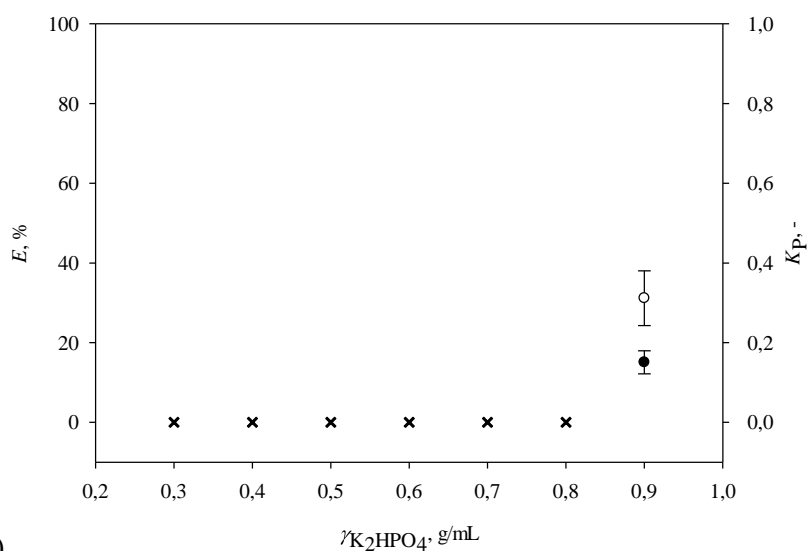
c)



d)



e)



f)

**Slika 25.** Utjecaj koncentracije vodene otopine  $K_2HPO_4$  na učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza u vodenom dvofaznom sustavu na bazi eutektičnih otapala: a) ChCl:PG:ZnCl<sub>2</sub> 1:4:0,02, b) ChCl:PG 1:4, c) ChCl:EG 1:3, d) B:EG 1:3, e) ChCl:Glc 1:1 i f) ChCl:Gly 1:1,5 (x – nije došlo do formiranja faza, ● učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza ( $E$ ), ○ koeficijent raspodjele ( $K_p$ ))

Kao što je vidljivo na Slici 25. prikazani su rezultati samo za šest eutektičnih otapala od ispitanih 15. Naime, primjenom eutektičnih otapala ChCl:Gly 1:3,25, B:Gly 1:4, B:Gly:ZnCl<sub>2</sub> 1:4:0,02, ChCl:Fru 2,5:1 s 15% vode ( $w/w$ ), ChCl:Fru 2,5:1 s 30% voda ( $w/w$ ) i ChCl:Fru 2,5:1 s 40% vode ( $w/w$ ) nije došlo do odvajanja faza stoga ti rezultati nisu ni



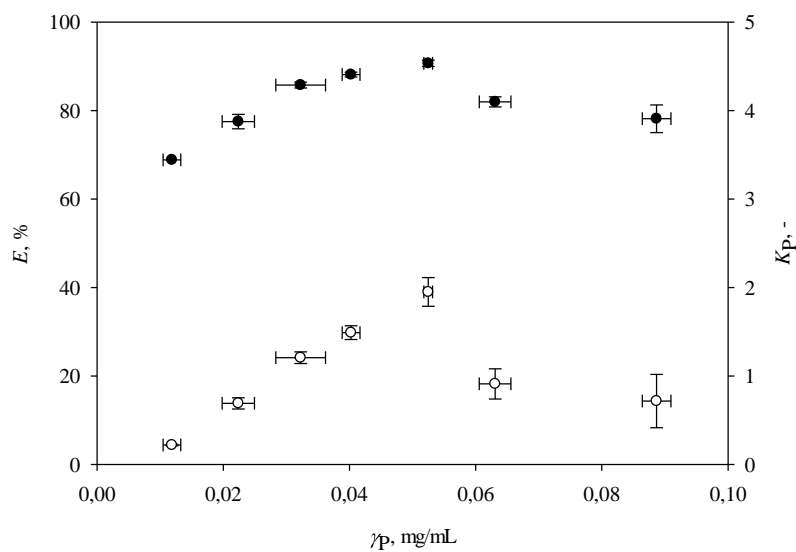
prikazani. Da bi se postigao dvofazni sustav bilo je potrebno postići kritične koncentracije eutektičnog otapala i vodene otopine  $K_2HPO_4$ , što u spomenutim sustavima nije postignuto. Osim toga, spomenuti DES-ovi su i izrazito hidrofilni, a što je eutektično otapalo hidrofilnije potrebna je veća količina soli u vodenoj otopini  $K_2HPO_4$  kako bi se faze razdvojile [39].

Iz dobivenih rezultata također možemo vidjeti kako koncentracija soli ima važnu ulogu u učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza i na formiranje vodenog dvofaznog sustava. Vidljivo je kako u svim navedenim slučajevima (Slika 25.) prvo dolazi do povećanja učinkovitosti ekstrakcije, a nakon određene vrijednosti koncentracije soli, dolazi do smanjenja koncentracije proteina u ekstraktnoj fazi, odnosno do smanjenja učinkovitosti ekstrakcija. Povećavanjem koncentracije soli u vodenoj otopini  $K_2HPO_4$ , smanjuje se udio vode u ekstraktnoj fazi što dovodi do slabijeg otapanja proteina u njoj i prelaska proteina u ekstraktnu fazu. Ovo je pokazatelj da voda igra važnu ulogu u otapanju proteina te da je potreba u određenoj količini u procesu ekstrakcije. Voda nije samo važna za otapanje enzima, važna je i zbog očuvanja aktivnosti i strukture molekule proteina zbog stvaranja vodikovih veza [39].

Na Slici 25. vidljivo je da je najbolja učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza postignuta u sustavu u kojem se nalazilo eutektično otapalo  $ChCl:PG:ZnCl_2$  1:4:0,02. Najveća učinkovitost ekstrakcije postignuta u tom sustavu iznosila je  $E = 68,88 \pm 0,95 \%$ , pri čemu je koeficijent raspodjele iznosio  $K_P = 0,22 \pm 0,01$ , uz vodenu otopinu  $K_2HPO_4$  koncentracije  $\gamma = 0,5$  g/mL Na temelju dobivenih rezultata za daljnji rad je odabran sustav eutektično otapalo  $ChCl:PG:ZnCl_2$  1:4:0,02 i vodene otopine  $K_2HPO_4$  koncentracije  $\gamma = 0,5$  g/mL.

#### **4.4. Utjecaj koncentracije enzima lakaza na učinkovitost ekstrakcije enzima u šaržnom reaktoru**

U radu Li i sur. [39] autori navode kako je koncentracija proteina jedan od faktora koji također utječu na učinkovitost ekstrakcije enzima. Naime, povećanjem količine proteina u vodenom dvofaznom sustavu može se postići i veća učinkovitost ekstrakcije enzima. Na temelju navedenoga ispitan je i utjecaj koncentracije enzima lakaza u vodenoj otopini  $K_2HPO_4$  na učinkovitost ekstrakcije. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 26.



**Slika 26.** Ovisnost učinkovitosti ekstrakcije enzima i koeficijenta raspodjele o koncentraciji enzima u početnoj vodenoj otopini  $K_2HPO_4$  (● učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza ( $E$ ), ○ koeficijent raspodjele ( $K_P$ ))

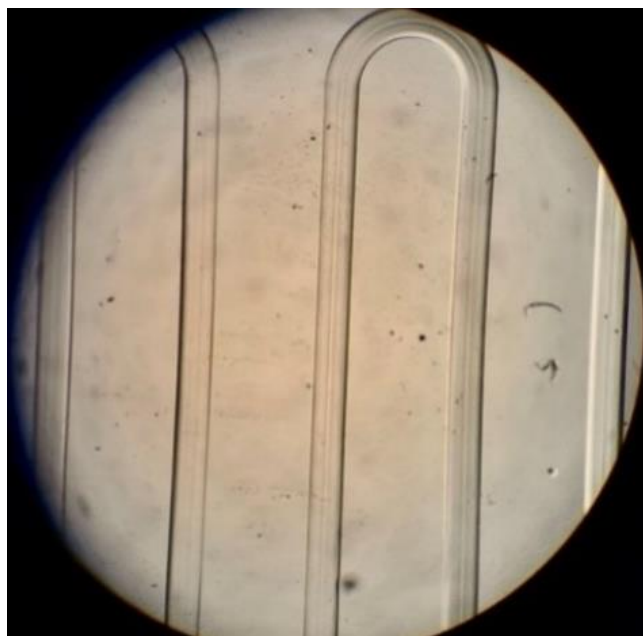
Iz dobivenih rezultata možemo vidjeti da porastom koncentracije enzima lakaza u početnoj vodenoj otopini  $K_2HPO_4$  dolazi do porasta učinkovitosti ekstrakcije enzima. Pri koncentraciji enzima od  $\gamma = 0,052 \pm 0,001$  mg/mL postignuta je najveća učinkovitost ekstrakcije od  $E = 90,70 \pm 0,71$  %. Daljnjim povećanjem koncentracije enzima lakaza u početnoj otopini dolazi do pada učinkovitosti ekstrakcije enzima lakaza te ona iznosi  $E = 81,99 \pm 1,14$  % za koncentraciji enzima  $\gamma = 0,063 \pm 0,001$  mg/mL u početnoj otopini soli i  $E = 78,17 \pm 3,12$  % za koncentraciji enzima  $\gamma = 0,089 \pm 0,002$  mg/mL u početnoj otopini soli. Do pada učinkovitosti ekstrakcije dolazi zbog zasićenja eutektičnog otapala. Ista pojava uočena je u radu Li i sur. [39] koji su ispitali utjecaj koncentracije goveđeg seruma albumin (BSA) na učinkovitost ekstrakcije u eutektičnom otapalu B:U. Na temelju dobivenih rezultata za daljnji rad je odabran sustav eutektično otapalo  $ChCl:PG:ZnCl_2$  1:4:0,02 i koncentracija enzima lakaza  $\gamma = 0,052$  mg/mL u vodenoj otopini  $K_2HPO_4$ .

#### 4.5. Ekstrakcija enzima lakaza u mikroekstraktoru

Nakon odabira sustava u kojemu je postignuta najbolja učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* proces ekstrakcije je prenesen u mikrostrukturirani uređaj, odnosno u mikroekstraktor. Primjena mikrostrukturiranih uređaja u

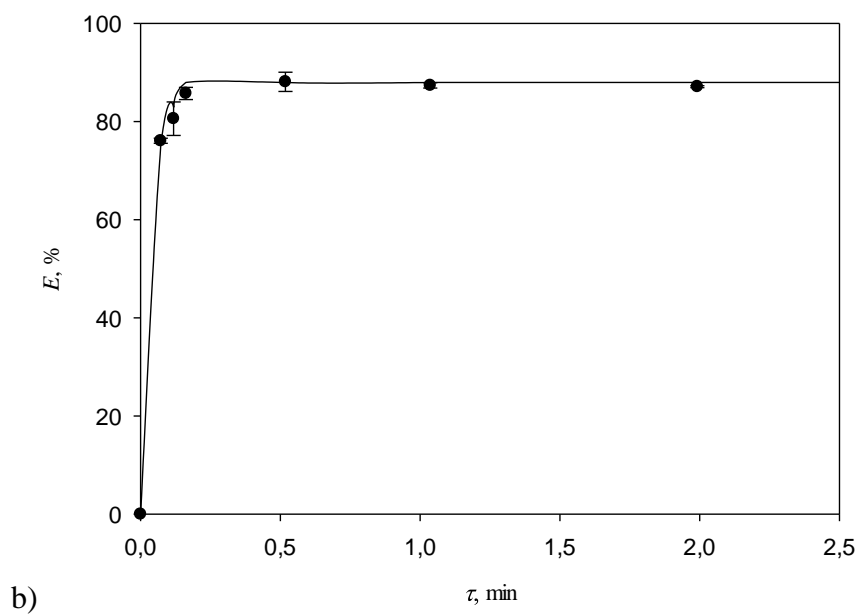
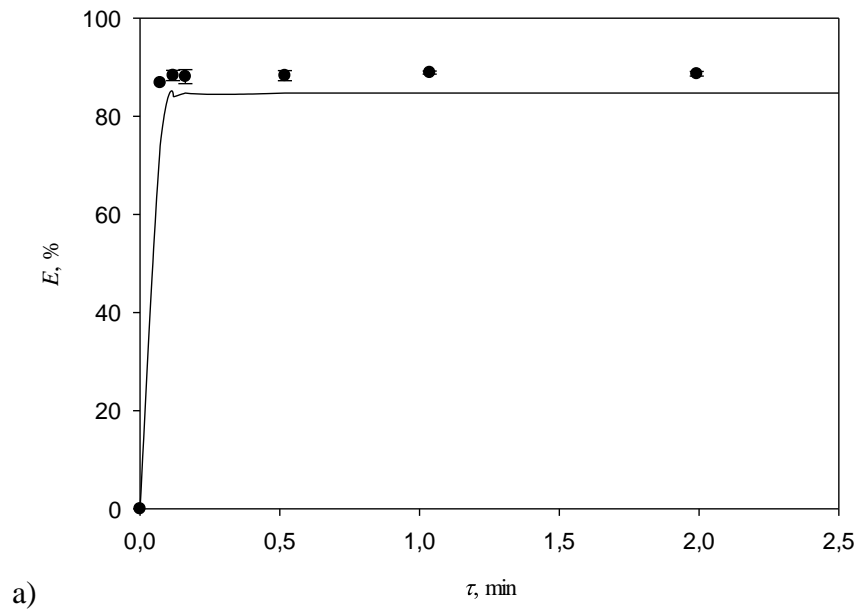
procesima donijela je mnogobrojna poboljšanja, a neka od njih su smanjenje veličine opreme, poboljšani i vrlo učinkoviti prijenos tvari i energije, lakša kontrola procesnih uvjeta itd. Kao posljedica navedenih poboljšanja, mnogi procesi su intenzificirani u mikrostrukturiranim uređajima, a potrošnja energije kao i proizvodnja otpada je smanjena u odnosu na procese provedene u konvencionalnim uređajima [69, 70]. Vicente i sur. [70] navode kako se primjenom mikroekstraktora za pročišćavanje enzima može se izbjeći i denaturacija enzima, a sam proces učiniti učinkovitijim, jeftinijim i ekološki prihvatljivijim. Zbog svega navedenog, u sljedećem koraku istraživanja proces ekstrakcije prenesen je iz šaržnog ekstraktora u kontinuirani mikroekstraktor.

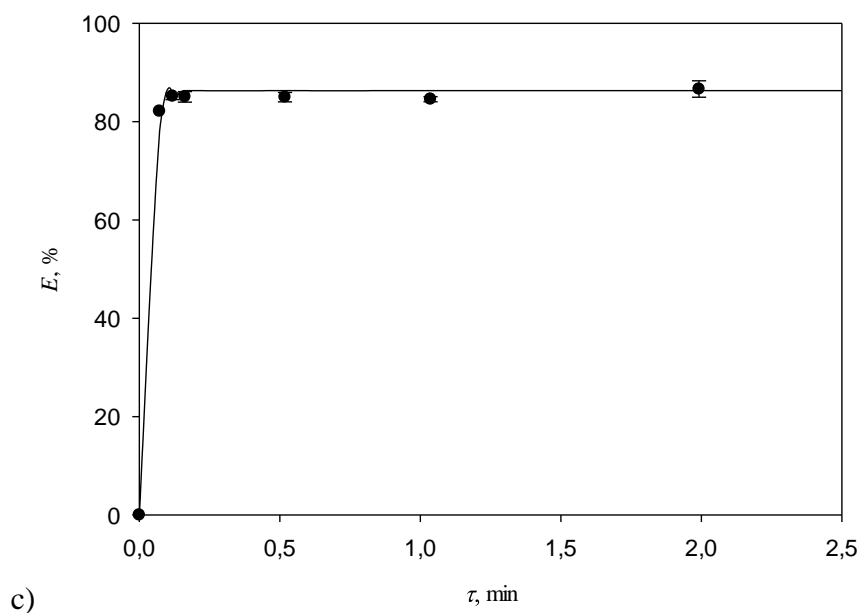
Kako bi se sustav u mikroekstraktoru mogao usporediti s prethodno provedenim pokusima u šaržnom ekstraktoru, bilo je potrebno odrediti omjer volumnih protoka enzima lakaza u vodenoj otopini  $K_2HPO_4$  i eutektičnog otapala kako bi volumeni faza bili jednaki u oba sustava. Korištenjem staklenog mikroekstraktora i promatranjem strujanja korištenjem svjetlosnog mikroskopa (Slika 27.) utvrđeno je da omjer volumnih protoka enzima lakaza u vodenoj otopini  $K_2HPO_4$  i eutektičnog otapala mora biti 1:1,22. Dobiveni omjer korišten je u svim daljnjim pokusima.



**Slika 27.** Profili strujanja za volumni omjer protoka enzima lakaza u vodenoj otopini  $K_2HPO_4$  i eutektičnog otapala 1:1,22

U pokusima provedenim u mikroekstratoru ispitan je utjecaj promjera mikrokanala mikroekstratora (2000  $\mu\text{m}$ , 1000  $\mu\text{m}$  i 500  $\mu\text{m}$ ) i vremena zadržavanja (od 0 do 1,99 min) na učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza. Rezultati dobiveni prikazani su na Slici 28.





**Slika 28.** Utjecaj vremena zadržavanja na učinkovitosti ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru za promjere mikrokanala: a) 500  $\mu\text{m}$ , b) 1000  $\mu\text{m}$  i c) 2000  $\mu\text{m}$  (● eksperimentalni podaci, — matematički model procesa)

Iz dobivenih rezultata možemo vidjeti da porastom vremena zadržavanja raste i učinkovitost ekstrakcije enzima lakaza. Nadalje, smanjene promjera mikrokanala mikroekstraktora također ima pozitivan učinak na ekstrakciju, tj. korištenjem mikroekstraktora manjih promjera mikrokanala maksimalna učinkovitost se postiže za kraća vremena zadržavanja u odnosu na mikroekstraktore većih dimenzija. U Tablici 8. prikazani su uvjeti pri kojima su postignute najveće vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije u različitim izvedbama mikroekstraktora i šaržnom ekstraktoru.

**Tablica 8.** Usporedba učinkovitosti ekstrakcije i koeficijenata raspodjele postignutih u mikroekstraktorima i šaržnom ekstraktoru

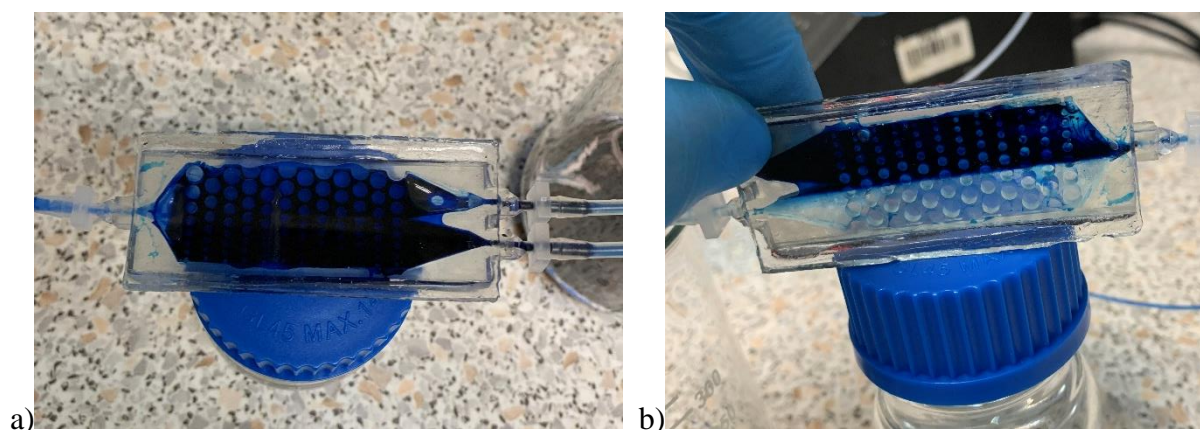
<b>MIKROEKSTRAKTOR</b>			
<b>IZVEDBA MIKROEKSTRAKTORA</b>	<b><math>\tau</math>, min</b>	<b><math>E</math>, %</b>	<b><math>K_P</math>, -</b>
<b><math>2W = 500 \mu\text{m}</math> <math>L = 120 \text{ cm}</math> <math>V = 235,62 \mu\text{L}</math></b>	0,12	$88,34 \pm 1,04$	$2,52 \pm 0,24$
<b><math>2W = 1000 \mu\text{m}</math> <math>L = 30 \text{ cm}</math> <math>V = 235,62 \mu\text{L}</math></b>	0,52	$88,11 \pm 1,96$	$2,47 \pm 0,30$
<b><math>2W = 2000 \mu\text{m}</math> <math>L = 7,5 \text{ cm}</math> <math>V = 235,62 \mu\text{L}</math></b>	1,04	$85,00 \pm 0,95$	$2,44 \pm 0,19$
<b>ŠARŽNI EKSTREKTOR</b>			
<b><math>t</math>, min</b>	<b><math>V</math>, mL</b>	<b><math>E</math>, %</b>	<b><math>K_P</math>, -</b>
30	15 mL – reaktor 5 mL – reakcijska smjesa	$90,70 \pm 0,71$	$1,95 \pm 0,16$

Iz Tablice 8. možemo vidjeti da je primjenom mikroekstraktora s promjerom mikrokanala  $500 \mu\text{m}$  postignuta učinkovitost ekstrakcije od  $E = 88,34 \pm 1,04 \%$  za vrijeme zadržavanja  $\tau = 0,12 \text{ min}$ . Primjenom mikroekstraktora s mikrokanalom duplo većeg promjera, vrijeme zadržavanja za postizanje iste učinkovitosti je produljeno za 4,33 puta. Primjenom mikroekstraktora s najvećim promjerom mikrokanala od  $2000 \mu\text{m}$  bilo je potrebno još dulje vrijeme zadržavanja za postizanje približne učinkovitosti ekstrakcije. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je u slučaju manjeg promjera kanala mikroekstraktora prijenos tvari brži zbog kraćeg difuzijskog puta.

Usporedbom rezultata dobivenih u šaržnom ekstraktoru s rezultatima dobivenim u kontinuiranom mikroekstraktoru vidljiva je značajna intenzifikacija procesa. U šaržnom ekstraktoru maksimalna učinkovitost ekstrakcije od  $E = 90,70 \pm 0,71 \%$  postignuta je nakon  $t = 30 \text{ min}$  provedbe procesa dok je u mikroekstraktoru za vrijeme zadržavanja  $\tau = 0,12 \text{ min}$  postignuta učinkovitost ekstrakcije od  $E = 88,34 \pm 1,04 \%$ . Obzirom na dobivene rezultate, kao najbolji sustav za ekstrakciju enzima lakaza odabran je mikroekstraktor promjera mikrokanala  $1000 \mu\text{m}$  i dužine  $30 \text{ cm}$ . Naime, i u ovom mikroekstraktoru i mikroekstraktoru promjera kanala  $500 \mu\text{m}$  postignuta su ista iskorištenja za vrlo kratka vremena zadržavanja, međutim mogućnost začepljenja šireg mikrokanala značajno je manja.

#### 4.6. Razvoj integriranog sustava serijski povezanog mikroekstraktora i mikroseparatora

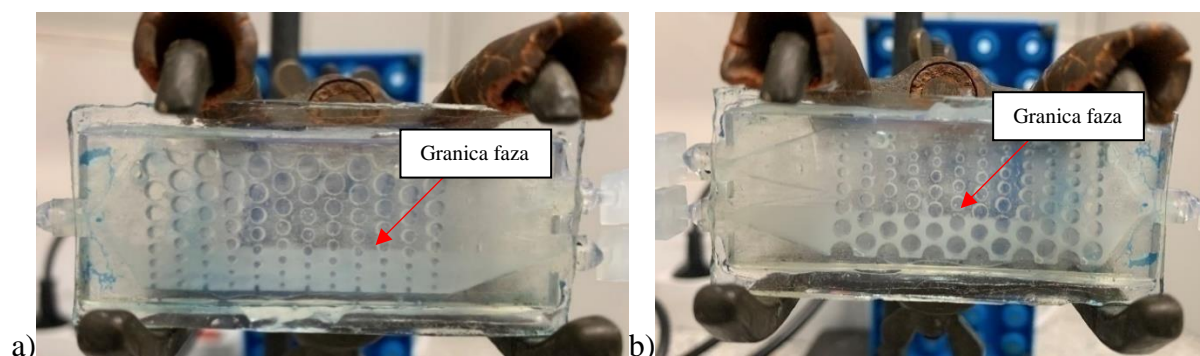
Nakon ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru, sakupljeni uzorak potrebno je centrifugirati kako bi se jasno odvojila ekstraktna faza od rafinatne faze. U ovom istraživanju, ispitana je mogućnost razvoja integriranog sustava serijskim spajanjem mikroekstraktora i mikroseparatora kako bi se proces ekstrakcije u potpunosti učinio kontinuiranim. Naime, kao što je već spomenuto unutar separatora nalazi se niz stupova koji su poslagani u ravninu te se razlikuju u oplošju pri čemu kapljevina veće površinske napetosti i viskoznosti (kao što je DES) teži da struji uz stupove većeg oplošja. Osim toga stupovi usporavaju protok kapljevina i povećavaju vrijeme zadržavanja što uzrokuje duži kontakt faza i njihovu bolju separaciju. Kako bi bolje proučili odvajanje faza u mikroseparatoru provedena su preliminarna istraživanja u kojima je vodena otopina  $K_2HPO_4$  bez enzima obojana bojom Commassie Brilliant Blue G-250 te je simulirana provedba ekstrakcija korištenjem odabranog DES-a. Ispitana su tri načina položaja separatora, jedan horizontalni (Slika 29a.) i dva vertikalna položaja koji se razlikovao po položaju stupova, tj. u jednoj varijanti oplošje stupova povećavalo se od vrha prema dnu (Slika 29. b)), a u drugoj smanjivalo.



**Slika 29.** Profili strujanja za mikroseparator u dva položaja tokom procesa ekstrakcije a) horizontalni položaj i b) vertikalni položaj sa stupovima većeg oplošja prema dolje

Kao što je vidljivo kada je mikroseparator položen u horizontalni položaj ne dolazi do odvajanja faza dok u vertikalnom položaju mikroseparatora dolazi do potpunog odvajanja faza. Dobiveni rezultati pokazuju da je moguća primjena vertikalno postavljenog mikroseparatora za odvajanje dvaju faza tokom procesa ekstrakcije u mikroekstraktoru.

Kao što je rečeno, vertikalni mikroseparator može biti postavljen u dva položaja. Prvi u kojem se oplošje stupova u svakom sljedećem redu smanjuje od vrha prema dnu (Slika 30. a)), te u položaju u kojem se oplošje stupova povećava u svakom sljedećem redu od vrha prema dnu (Slika 30 b)). Oba položaja ispitana su tokom procesa ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru.



**Slika 30.** Različiti položaji vertikalnog mikroseparatora a) položaj u kojem se oplošje stupova u svakom sljedećem redu smanjuje od vrha prema dnu, b) položaju u kojem se oplošje stupova povećava u svakom sljedećem redu od vrha prema dnu

Provedbom procesa ekstrakcije enzima lakaza, bez obzira na vertikalni položaj mikroseparatora na izlazu uspješno je separirano 1 mL ekstraktne faze i 1,3 mL rafinatne faze. Mjerenjem koncentracije proteina u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi u sustavu serijski spojenog mikroekstraktora i mikroseparatora, bez obzira na položaj separatora zabilježena je učinkovitost ekstrakcije od  $E = 84,22 \pm 1,15$  %. U usporedbi, ekstrakcijom enzima lakaza u mikroekstraktoru bez protočnog separatora postignuta je nešto veća učinkovitost ekstrakcije od  $E = 88,11 \pm 1,96$  %, međutim sam proces provedbe trajao je značajnije duže jer je bilo potrebno provesti i naknadnu separaciju faza centrifugiranjem.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je uspješno razvijen integrirani sustav serijski spojenog mikroekstraktora i mikroseparatora u kojem je moguće kontinuirano prevesti ekstrakciju enzima lakaza i separaciju ekstraktne i rafinatne faze.



#### **4.7. Ponovna upotreba eutektičnog otapala u šaržnom ekstraktoru, mikroekstraktoru i integriranom sustavu**

Kako bi proces ekstrakcije enzima lakaza bio što jeftiniji i ekološki prihvatljiviji, te kako bi se povećala i količina enzima lakaza u odabranom eutektičnom otapalu, a posljedično i aktivnost, ispitan je kapacitet eutektičnog otapala  $\text{ChCl:PG:ZnCl}_2$  1:4:0,02 u šaržnom ekstraktoru, mikroekstraktoru i integriranom sustavu. Ispitivanje je provedeno ponovnim korištenjem DES-a, odnosno njegovim ponovnim vraćanjem u sustav nakon svakog provedenog ciklusa ekstrakcije uz dodatak svježije otopine enzima i soli u svakom novom ciklusu.

Na žalost, nakon provedenog prvog ciklusa ekstrakcije enzima lakaza u sva tri sustava došlo je narušavanja strukture DES-a. Naime, uočeno je da je nakon prvog ciklusa volumen eutektičnog otapala značajno porasla što bi značilo da je dio vode iz vodene otopine  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  prešla u eutektično otapalo. Narušavanjem strukture DES-a zbog vode, dovelo je do promjene svojstava, a i smanjenja gustoće zbog čega nakon drugog ciklusa ekstrakcije nije došlo do odvajanja faza. Dobiveni rezultati ukazuju na to da  $\text{ChCl:PG:ZnCl}_2$  1:4:0,02 DES nije moguće reupotrijebiti za proces ekstrakcije enzima lakaza.

#### **4.8. Matematički model procesa ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru**

Na samom kraju razvoja metode za ekstrakciju komercijalnog enzima lakaza, razvijen je 2D matematički model za svaki od eksperimenata provedenih u mikroekstraktoru. Da bi se razvio matematički model koji opisuje proces ekstrakcije enzima lakaza, bilo je potrebno izračunati difuzijske koeficijente otopljene tvari (enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor*) kroz otapala (vodena otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i eutektično otapalo) te viskoznosti otapala (Tablica 7.). Difuzijski koeficijenti (Tablica 9.) izračunati su korištenjem He-Niemeyerove korelacije [57] (Jed. (9.)).

**Tablica 9.** Izračunati difuzijski koeficijenti za enzima lakaza primjenom He-Niemeyerove korelacije u vodenoj otopini  $K_2HPO_4$  i u eutektnom otapalu

Otopljena tvar (A)	Otapalo (B)	$M$ (A), kg/kmol	$R_G$ (A), Å	$T$ , K	$D_{P/sol(DES)}$ , $cm^2/s$
enzim lakaza	ChCl:PG:ZnCl <sub>2</sub>	97000 [71]	32,1 [72]	298,15	$9,90 \cdot 10^{-9}$
enzim lakaza	0,5 g/mL $K_2HPO_4$	97000 [71]	32,1 [72]		$3,10 \cdot 10^{-7}$

Dobiveni rezultati 2D matematičkog modela prikazani su na Slici 28. Vidljivo je dobro slaganje matematičkog modela i eksperimentalnih rezultata ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktorima različitih fizikalnih značajki. Kako bi se ispitala ispravnost matematičkog modela te provela ocjena valjanosti modela, provedena je i statistička analiza korištenjem Jednadžbi (10. – 13), a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 10.

**Tablica 10.** Koeficijenti određivanja, korijeni kvadratne pogreške, standardne pogreške predviđanja i apsolutna prosječna odstupanja za eksperimentalne podatke i podatke dobivene simulacijom matematičkog modela za proces ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru

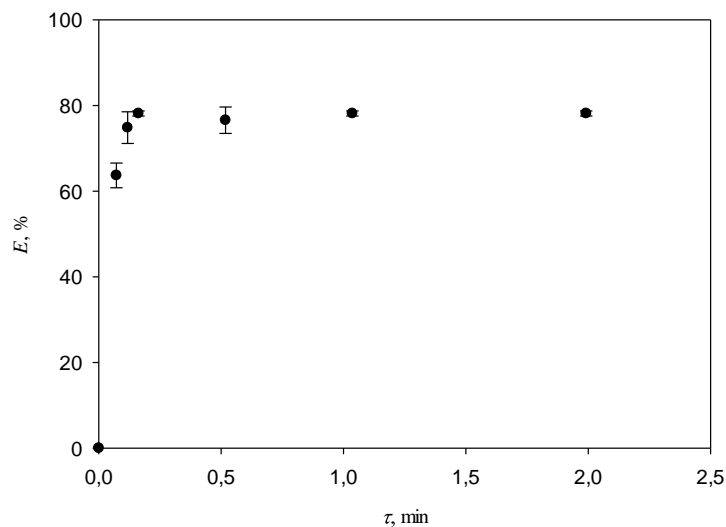
STATISTIČKE ANALIZE				
UVJETI	$R^2$	$RMSE$ , %	$SEP$ , %	$AAD$ , %
$W = 500 \mu m$ $L = 120 cm$	1,000	3,774	4,264	4,246
$W = 1000 \mu m$ $L = 30 cm$	1,000	1,229	1,411	1,097
$W = 2000 \mu m$ $L = 7,5 cm$	0,998	1,286	1,508	1,380

Iz izračunatih vrijednosti možemo vidjeti da je najmanja vrijednost koeficijenta određivanja ( $R^2$ ) 0,998, a najveća vrijednost korijena kvadratne pogreške ( $RMSE$ ) 3,774 %. Matematički model se smatra pouzdanim kada je vrijednost koeficijenta određivanja veći od 0,750 [73], a vrijednosti korijena kvadratne pogreške, standardne pogreške predviđanje i apsolutnog prosječnog odstupanja što manja. Iz svega navedenoga možemo zaključiti da

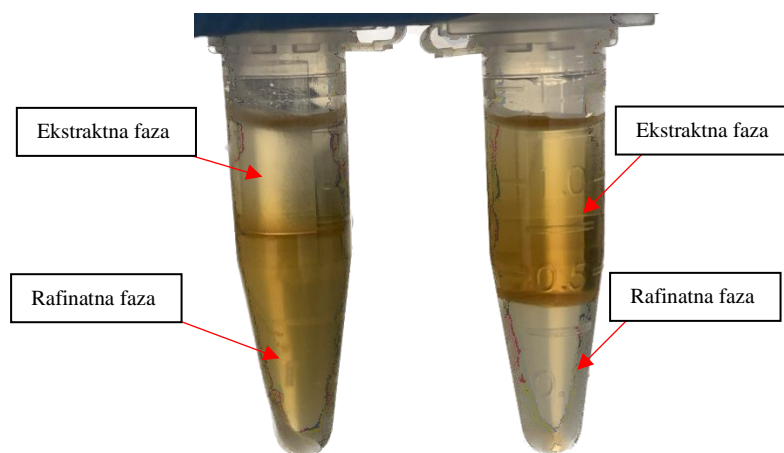
matematički model dobro opisuje eksperimentalne podatke te da se može primjenjivati u daljnjoj optimizaciji procesa.

#### **4.9. Provedba ekstrakcije sirovog enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* pri optimalnim uvjetima**

Nakon određivanja optimalnih uvjeta provedbe ekstrakcije na komercijalnom enzimu lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor*, razvijena metoda primijenjena je na sirovi ekstrakt enzima dobivenog uzgojem *Trametes versicolor* na čvrstoj podlozi ječmene ljuske. Uzgojem *Trametes versicolor* na kompleksnim podlogama kao što je ječmena ljuska pri optimalnim uvjetima rasta ( $t = 10$  dana,  $T = 27$  °C) osim enzima lakaza proizvode se i drugi enzim kao što su mangan peroksidaza, lignin peroksidaza, i celulaza [74] koje treba odvojiti od lakaze. Rezultati ovog istraživanja pokazali su kako koncentracija enzima ima značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije te je stoga kao prvi korak u ekstrakciji enzima lakaza iz sirovog uzorka određena koncentracija ukupnih proteina u sirovim uzorku. Korištenjem Bradfordovog testa, dobiveno je da je koncentracija proteina u sirovom uzorku  $\gamma = 0,0057 \pm 0,0018$  mg/mL. Obzirom da je koncentracija enzima bila niska, uzorak je bilo potrebno ugustiti i to do koncentracije ukupnih enzima od  $\gamma = 0,05$  mg/mL (poglavlje 4.4.). Ugušćivanje sirovog uzorka provedeno je pomoću filtera za ugušćivanje (Amicon® Ultra-0,5 mL filter za ugušćivanje, Merck KGaA, Njemačka). Nakon što je dobiven sirovi uzorak željene koncentracije proteina, ekstrakcija enzima lakaza je provedena u mikroekstrктору pri prethodno definiranim optimalnim uvjetima ( $\gamma_{K_2HPO_4} = 0,5$  g/mL,  $2W = 1000$   $\mu$ m,  $L = 30$  cm). Na Slici 31. su prikazani dobiveni rezultati.



**Slika 31.** Utjecaj vremena zadržavanja na učinkovitosti ekstrakcije enzima u sirovom uzorku dobiven iz *Trametes versicolor* u mikroekstraktoru (● eksperimentalni podaci)

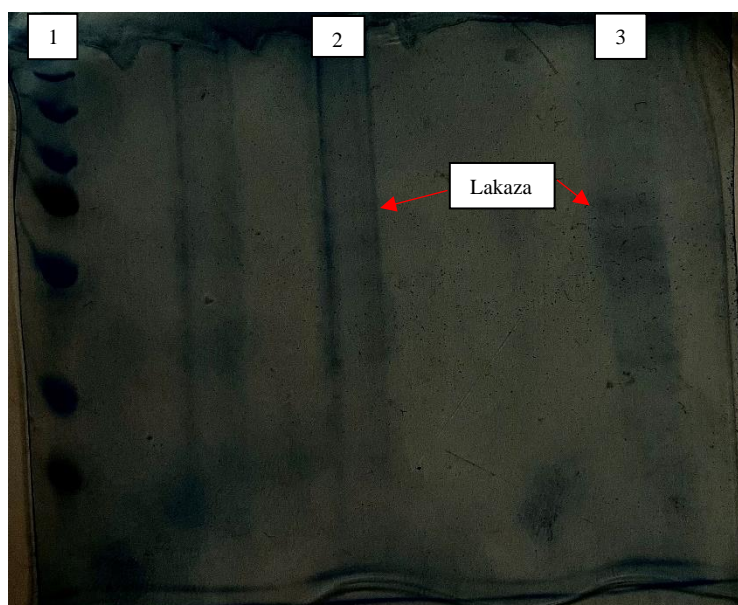


**Slika 32.** Dobiveni uzorci nakon ekstrakcije enzima iz sirovog uzorka enzima dobiven iz *Trametes versicolor* u mikroekstraktoru za različita vremena zadržavanja (lijevo:  $\tau = 0,07$  min, desno:  $\tau = 0,12$  min)

Prilikom provedbe pokusa primijećeno je da pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,07$  min dolazi do ekstrakcije enzima, a daljnjim povećanjem vremena zadržavanja ( $\tau > 0,12$  min) dolazi i do ekstrakcije drugih komponenti iz podloge što rezultira u promjeni boje ekstraktne faze (Slika 32). Nadalje iz dobivenih rezultata možemo vidjeti da porastom vremena zadržavanja raste i učinkovitost ekstrakcije enzima iz sirovog uzorka. Pri vremenu zadržavanja od  $\tau = 0,16$  min postiže se najveća učinkovitost ekstrakcije od  $E = 78,16 \pm 0,60$

%, a u usporedbi s komercijalnim enzimom lakaza ostvarena je manja učinkovitost ekstrakcije enzima što možemo prepisati tome što su u sirovom uzorku enzima prisutne i druge tvari kao što su ugljikohidrati i drugi enzimi.

Nakon provedbe ekstrakcije, dobiveni uzorak analiziran je gel elektroforezom, a dobiveni rezultati prikazani su na Slici 33.



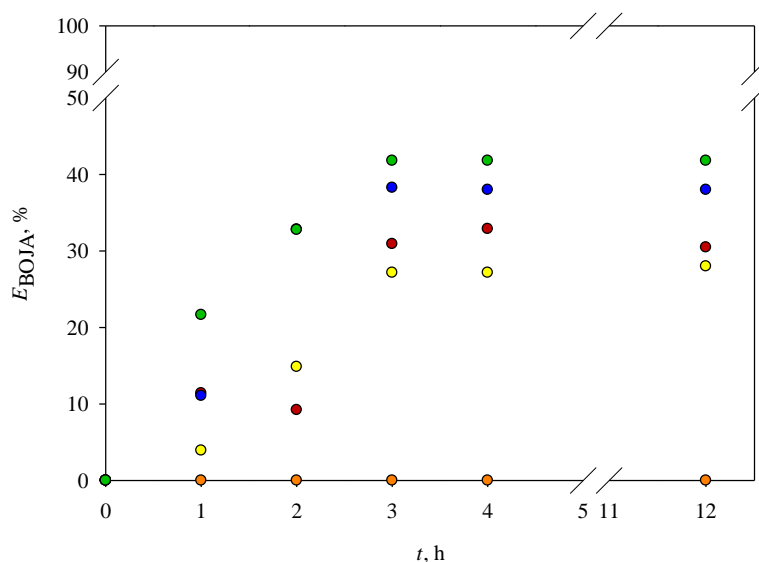
**Slika 33.** SDS gel nakon elektroforeze početne otopine (sirovi uzorak) i ekstraktne faze dobivenog nakon ekstrakcije sirovog uzorka enzima porijeklom iz *Trametes versicolor*; linija 1: 5  $\mu$ L Pageruler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa, linija 2: 10  $\mu$ L sirovog uzorka dobivenog iz *Trametes versicolor*, linija 3: ekstraktna faza

Prvi stupac na gelu prikazuje raspored proteinskih markera na gelu u rasponu od 10 to 180 kDa. Na temelju poznatih molekularnih masa vrpce standarda i vrpce dobivenih na uzorka moguće je odrediti molekularne mase proteina u uzorku. U stupcima 2 i 3 prikazane su vrpce za sirovi uzorak i ekstrakt sirovog uzorka. Kao što je vidljivo, sirovi uzorak (stupac 2) pokazuje četiri vrpce što ukazuje na to da je u sirovom uzorku prisutno najmanje četiri različita enzima. I to onih čije su molekularne mase 95 kDa, 58 kDa, 53 kDa i 43 kDa. Iz literaturnih podataka molarnih masa enzima može se pretpostaviti da sirovi uzorak porijeklom iz *Trametes versicolor* sadrži enzim lakaza (97 kDa [71]), enzim mangan peroksidaza (43 – 46,3 kDa [75]) ili enzim lignin peroksidaza (41 – 43 kDa [76]). U stupcu 3 mogu se uočiti iste četiri vrpce iz čega se može zaključiti da odabrani DES ne ekstrahira

selektivno samo enzim lakaza, nego i preostale prisutne enzime iz sirovog uzorka dobivenog iz *Trametes versicolor*.

#### 4.10. Razgradnja anilinske tekstilne boje enzimom lakaza u šaržnom reaktoru

Na samom kraju istraživanja ispitana je mogućnost uklanjanja tekstilne boje na bazi anilina upotrebom komercijalnog enzima lakaza i sirovog enzima suspendiranih u vodenoj otopini ili ekstrahiranih u DES-u. U svim eksperimentima koncentracija enzima bila je oko  $\gamma = 0,05$  mg/mL, a koncentracija boje  $\gamma = 75$  mg/L. Koncentracija boje odabrana je na temelju literaturnih podataka prema kojima je koncentracija boje u otpadnim vodenim tokovima nakon proizvodnje u tekstilnoj industriji između 10 i 500 mg/L [77 – 79]. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 34.



**Slika 34.** Učinkovitost razgradnje anilinske ljubičaste boje u vremenu (● otopina DES-a, ● komercijalni enzim lakaza otopljen u vodenoj otopini, ● ekstrakt komercijalnog enzima lakaza, ● sirovi enzim ● ekstrakt sirovog enzima)

Kao što je vidljivo, u svim pokusima, već nakon 3 h, podignuta je maksimalna učinkovitost razgradnje anilinske tekstilne boje. Usporedbom komercijalnog enzima lakaza i sirovog enzima, bolji rezultati zabilježeni su korištenjem sirovog enzima. Razlog tome je vjerojatno prisutnost drugih enzima u smjesi sirovog enzima koji također imaju mogućnost razgradnje anilinske tekstilne boje. Nadalje, međusobnom usporedbom rezultata koji su dobiveni korištenjem enzima koji su ekstrahirani u DES i enzima suspendiranih u vodenoj

otopini, bolji rezultati su zabilježeni korištenjem ekstrahiranog enzima. Iz navedenoga može se zaključiti da prisutnost DES-a vjerojatno stabilizira enzim i štiti ga od inhibirajućeg utjecaja reaktanata i produkata reakcije. Kako bi dokazali da samo eutektično otapalo nema katalitički utjecaj na uklanjanje boje proveden je i dodatni eksperiment u kojem je u otopinu anilinske tekstilne boje dodan samo DES (Slika 34). Kao što je vidljivo, korištenjem čistog DES-a, nije došlo do uklanjanja boje.

## 5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata provedbom ekstrakcije enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnog otapala može se zaključiti sljedeće:

- Preliminarnim ispitivanjem aktivnosti enzima lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* u različitim eutektičnim otapalima pokazano je da enzim lakaza nije aktivan u eutektičnim otapalima B:PG 1:3, B:U 1:3 i ChCl:U 1:2 dok je najveća volumna aktivnost enzima lakaza zabilježena je u eutektičnim otapalima ChCl:Fru 2,5:1 s 30 % vode (*w/w*), ChCl:Fru 2,5:1 s 15 % vode (*w/w*) i ChCl:Fru 2,5:1 s 40 % vode (*w/w*).
- Primjenom nekih eutektičnih otapala (ChCl:Gly 1:3,25, B:Gly 1:4, B:Gly:ZnCl<sub>2</sub> 1:4:0,02, ChCl:Fru 2,5:1 s 15% vode (*w/w*), ChCl:Fru 2,5:1 s 30 % voda (*w/w*) i ChCl:Fru 2,5:1 s 40% vode (*w/w*)) za razvoj vodenih dvofaznih sustava na bazi eutektičnih otapala nije došlo do stvaranja dvofaznog sustava.
- Najboljim sustavom za ekstrakciju enzima lakaza pokazao se onaj u kojemu se koristilo eutektično otapalo ChCl:PG:ZnCl<sub>2</sub> 1:4:0,02 i vodena otopine K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> koncentracije  $\gamma = 0,5$  g/mL. U tom sustavu postignuta je učinkovitost ekstrakcije  $E = 68,88 \pm 0,95$  %, uz koeficijent raspodjele  $K_P = 0,22 \pm 0,01$  za vrijeme od  $t = 30$  min.
- Porastom koncentracije enzima lakaza u početnoj vodenoj otopini K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, koncentracije  $\gamma = 0,5$  g/mL, dolazi do porasta učinkovitosti ekstrakcije enzima lakaza. Maksimalna učinkovitost ekstrakcije iznosila je  $E = 90,70 \pm 0,71$  % pri koncentraciji enzima lakaza  $\gamma = 0,052 \pm 0,001$  mg/mL u početnoj otopini soli.
- Primjenom mikroekstraktora postignuta je značajna intenzifikacija procesa, tj. upotrebom mikroekstraktora promjera kanala 1000  $\mu\text{m}$  postignuta je maksimalna učinkovitost ekstrakcije od  $E = 88,34 \pm 1,04$  % za vrijeme zadržavanja od  $\tau = 0,12$  min.
- Uspješno je razvijen integrirani sustav serijski spojenog mikroekstraktora i mikroseparatora u kojem je moguće kontinuirano prevesti ekstrakciju enzima lakaza i separaciju ekstraktne i rafinatne faze.



- Ispitan je kapacitet odabranog eutektičnog otapala za ekstrakciju enzima lakaza u šaržnom ekstraktoru, mikroekstraktoru i integriranom sustavu. U niti jednom od sustava nije bilo moguće reupotrijebiti odabrano eutektično otapalo.
- Razvijen je 2D matematički model procesa ekstrakcije enzima lakaza u mikroekstraktoru te je provedena ocjena valjanosti modela koja je pokazala da je model prikladan za daljnju optimizaciju procesa kontinuirane ekstrakcije enzima lakaza u mikrosustavu.
- Ekstrakcijom enzima iz sirovog uzorka dobivenog uzgojem *Trametes versicolor* postignuta je maksimalna učinkovitost ekstrakcije enzima od  $E = 78,16 \pm 0,60$  % pri vremenu zadržavanja od  $\tau = 0,16$  min.
- Eutektično otapalo  $\text{ChCl:PG:ZnCl}_2$  1:4:0,02 kao ekstrakcijski medij nije selektivan samo za enzim lakaza, nego ekstrahira sve prisutne enzime iz sirovog uzorka dobivenog uzgojem *Trametes versicolor*.
- U procesu uklanjanja anilinske tekstilne boje, nakon 3 h provedbe reakcije, uspješno je uklonjeno preko između 25 % i 41,81 % ovisno o korištenom enzimu.
- Sirovi enzim lakaza ekstrahiran u eutektično otapalo pokazuje najbolju učinkovitost uklanjanja anilinske tekstilne boje.

## 6. LITERATURA

- [1] Anastas, P. T., Beach, E. S., Changing the course of chemistry, *ACS Symp. Ser.*, **1011** (2009) 1–18.
- [2] Tang, W., An, Y., Row, K. H., Emerging applications of (micro) extraction phase from hydrophilic to hydrophobic deep eutectic solvents: opportunities and trends, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, **136** (2021) 116187, 2021.
- [3] Iqbal, M., Tao, Y., Xie, S., Zhu, Y., Chen, D., Wang, X., Huang, L., Peng, D., Sattar, A., Shabbir, M. a. B., Hussain, H. I., Ahmed, S., & Yuan, Z., Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol. Proced. Online*, **18** (2016) 1–18.
- [4] Žnidaršič-Plazl, P., Plazl, I., Modelling and experimental studies on lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a microreactor, *Process Biochem.*, **44** (2009) 1115–1121.
- [5] Zhu, D., Wu, Q., Wang, N., Industrial enzymes, u: Moo-Young, M., *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, 2019, str. 1–13.
- [6] Patel, A. K., Singhanian, R. R., Pandey, A., Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes, u: Brahmachari, G., *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, Cambridge, 2017, str. 13–41.
- [7] Radzicka, A., Wolfenden, R., A proficient enzyme, *Science (80-. )*, **267** (1995) 90–93.
- [8] Zimmerman, J. Biochemistry: A short course, *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, **37** (2009) 384–384.
- [9] Tompsett, S. L., Medical Biochemistry, *Nature*, **199** (1963) 943.
- [10] Najafpour, G. D., *Biochemical Engineering and Biotechnology: Second Edition*, Elsevier, 2015, str. 28–30.
- [11] <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html> (pristup 07. rujna 2022.)
- [12] Yoshida, Y., LXIII. - Chemistry of lacquer (Urushi) Part I: Communication from the Chemical Society of Tokio, *J. Chem. Soc. Trans.*, **43**, (1883) 472–486.
- [13] Reinhammar, B., Purification and properties of laccase and stellacyanin from *Rhus vernicifera*, *Biochim. Biophys. Acta*, **205** (1970) 35–47.
- [14] Aslam, M. S., Aishy, A., Samra, Z. Q., Gull, I., Athar, M. A., Identification, purification and characterization of a novel extracellular laccase from *Cladosporium cladosporioides*, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **26** (2012) 3345–3350.
- [15] Thurston, C. F., The structure and function of fungal laccases, *Microbiology*, **140**

- (1994) 19–26.
- [16] Nunes, C. S., Kunamneni, A., Laccases-properties and applications, u: Nunes, C. S., Kumar, V., *Enzymes in Human and Animal Nutrition: Principles and Perspectives*, 2018, str. 133–161.
- [17] [https://www.creative-enzymes.com/similar/laccase\\_388.html](https://www.creative-enzymes.com/similar/laccase_388.html) (pristup 07. rujna 2022.)
- [18] Lu, R., Miyakoshi, T., *Laccase, Lacquer Chemistry and Applications*, Elsevier, 2015, str. 95–104.
- [19] Kalra, K., Chauhan, R., Shavez, M., Sachdeva, S., Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. and effect of PH and temperature on its activity, *Int. J. ChemTech Res.*, **5** (2013) 2229–2235.
- [20] Singh Arora, D., Kumar Sharma, R., Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **160** (2010) 1760–1788.
- [21] Rodríguez Couto, S., Toca Herrera, J. L., Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnol. Adv.*, **24** (2006) 500–513.
- [22] [https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/gljive\\_truleznice](https://stetnici.sumins.hr/SumskiStetnici/gljive_truleznice) (pristup 07. rujana 2022.)
- [23] Guimarães, L. R. C., Woiciechowski, A. L., Karp, S. G., Coral, J. D., Zandoná Filho, A., Soccol, C. R. , Laccases, u: Pandey, A., Negi, S., Soccol, C. R., *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Production, Isolation and Purification of Industrial Products*, 2016, str. 199–216.
- [24] Surwase, S. V., Patil, S. A., Srinivas, S., Jadhav, J. P., Interaction of small molecules with fungal laccase: A Surface Plasmon Resonance based study, *Enzyme Microb. Technol.*, **82** (2016) 110–114.
- [25] Backes, E., Kato, C. G., Corrêa, R. C. G., Peralta Muniz Moreira, R. D. F., Peralta, R. A., Barros, L., Ferreira, I. C., Zanin, G. M., Bracht, A., Peralta, R. M., Laccases in food processing: Current status, bottlenecks and perspectives, *Trends Food Sci. Technol.*, **115** (2021) 445–460.
- [26] Agrawal, K., Chaturvedi, V., Verma, P., Fungal laccase discovered but yet undiscovered, *Bioresour. Bioprocess.*, **5** (2018) 4.
- [27] Roth, S., Spiess, A. C., Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **38** (2015) 2285–2313.
- [28] Youn, H.-D., Hah, Y. C., Kang, S.-O., Role of laccase in lignin degradation by white-rot fungi, *FEMS Microbiol. Lett.*, **132** (2006) 183–188.
- [29] Mate, D. M., Alcalde, M., Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of

- biotechnology, *Microb. Biotechnol.*, **10** (2017) 1457–1467.
- [30] Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F. J., Ballesteros, A., Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends Biotechnol.*, **24** (2006) 281–287.
- [31] Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P. Narasimha, G., Fungal laccases and their applications in bioremediation, *Enzyme Res.*, **2014** (2014).
- [32] Zeng, J., Zhu, Q., Wu, Y., Lin, X., Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons using *Bacillus subtilis* CotA with high laccase activity and copper independence, *Chemosphere*, **148** (2016) 1–7.
- [33] Wang, B., Yan, Y., Tian, Y., Zhao, W., Li, Z., Gao, J., Peng, R., Yao, Q., Heterologous expression and characterisation of a laccase from *Colletotrichum lagenarium* and decolourisation of different synthetic dyes, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **32** (2016) 1–9.
- [34] Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I., Vincze, A., Leader, H., Chefetz, B., Leibovitz-Persky, L., Friesem, D., Hadar, Y., Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase, *FEBS Lett.*, **438** (1998) 195–200, str. 1998.
- [35] 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.
- [36] Grant, G. A., Isolation/Purification of Proteins, u: Encyclopedia of Cell Biology, 2016, str. 66–74.
- [37] Bajpai, P., Purification of Xylanases, u: Xylanolytic Enzymes, 2014, str. 53–61.
- [38] Bajpai, P., Xylanolytic Enzymes, u: Xylanolytic Enzym., 2014, str. 53–61.
- [39] Li, N., Wang, Y., Xu, K., Huang, Y., Wen, Q., Ding, X., Development of green betaine-based deep eutectic solvent aqueous two-phase system for the extraction of protein, *Talanta*, **152** (2016) 23–32.
- [40] Grilo, A. L., Aires-Barros, M. R., Azevedo, A. M., Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends, *Sep. Purif. Rev.*, **45** (2016) 68–80.
- [41] Van Berlo, M., Luyben, K. C. A. M., Van Der Wielen, L. A. M., Poly(ethylene glycol)-salt aqueous two-phase systems with easily recyclable volatile salts, *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, **711** (1998) 61–68.
- [42] Freire, M. G., Cláudio, A. F. M., Araújo, J. M. M., Coutinho, J. A. P., Marrucho, I. M., Lopes, J. N. C., Rebelo, L. P. N., Aqueous biphasic systems: a boost brought about by

- using ionic liquids, *Chem. Soc. Rev.*, **41** (2012) 4966–4995.
- [43] Ruiz-Ruiz, F., Benavides, J., Aguilar, O., Rito-Palomares, M., Aqueous two-phase affinity partitioning systems: Current applications and trends, *J. Chromatogr. A*, **1244** (2012) 1–13.
- [44] Gorke, J. T., Srienc, F., Kazlauskas, R. J., Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents, *Chem. Commun.*, (2008) 1235–1237.
- [45] Arriaga, S., Aizpuru, A., Innovative non-aqueous phases and partitioning bioreactor configurations, *Adv. Chem. Eng.*, **54** (2019) 299–348.
- [46] Šalić, A., Tušek, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B., Mikroreaktori, *Kem. u Ind.*, **59** (2010) 227–248.
- [47] Suryawanshi, P. L., Gumfekar, S. P., Bhanvase, B. A., Sonawane, S. H., Pimplapure, M. S., A review on microreactors: Reactor fabrication, design, and cutting-edge applications, *Chem. Eng. Sci.*, **189** (2018) 431–448.
- [48] Wohlgemuth, R., Plazl, I., Žnidaršič-Plazl, P., Gernaey, K. V., Woodley, J. M., Microscale technology and biocatalytic processes: Opportunities and challenges for synthesis, *Trends Biotechnol.*, **33** (2015) 302–314.
- [49] Jurinjak Tušek, A., Šalić, A., Valinger, D., Jurina, T., Benković, M., Kljusurić, J.G. Zelić, B., The power of microsystem technology in the food industry – Going small makes it better, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, **68** (2021).
- [50] Tišma, M., Šalić, A., Planinić, M., Zelić, B., Potočnik, M., Šelo, G., Bucić-Kojić, A. Production, characterisation and immobilization of laccase for an efficient aniline-based dye decolourization, *J. Water Process Eng.*, **36** (2020) 101327.
- [51] Kruger, N. J., The Bradford Method for Protein Quantitation, u: Protein Protocols Handbook, New Jersey, 2003, str. 15–22.
- [52] Ji, Q., Yu, X., Yagoub, A.E.-G.A., Chen, L., Zhou, C., Efficient removal of lignin from vegetable wastes by ultrasonic and microwave-assisted treatment with ternary deep eutectic solvent, *Ind. Crops Prod.*, **149** (2020) 112357.
- [53] More, S. S., Renuka, P. S., Pruthvi, K., Swetha., M., Malini, S., Veena, S. M., Isolation, Purification, and Characterization of Fungal Laccase from *Pleurotus* sp., *Enzyme Res.*, **2011** (2011) 248735.
- [54] Cingesar, I. K. (Vrsaljko, D. - mentor), Istraživanje i razvoj protočnog separatora izrađenog 3D-ispisom, rad za Rektorovu nagradu, 2019 (<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&u>

- act=8&ved=2ahUKEwiV4P6WpJX9AhWMxosKHeLGAvgQFnoECBUQAQ&url=https%3A%2F%2Fapps.unizg.hr%2Frektorova-nagrada%2Fjavno%2Fradovi%2F495%2Fpreuzmi&usg=AOvVaw0Q2xtWspIX9uckAXgwntR7).
- [55] Žnidaršič-Plazl, P., Plazl, I., Steroid extraction in a microchannel system - Mathematical modelling and experiments, *Lab Chip*, **7** (2007) 883–889.
- [56] Jurinjak Tušek, A., Šalić, A., Zelić, B., Mathematical modelling of polyphenol extraction by aqueous two-phase system in continuously operated macro- and micro-extractors, *Sep. Sci. Technol.*, **52** (2017) 864–875.
- [57] He, L., Niemeier, B., A novel correlation for protein diffusion coefficients based on molecular weight and radius of gyration, *Biotechnol. Prog.*, **19** (2003) 544–548.
- [58] Jurinjak Tušek, A., Razvoj procesa biotransformacije katehola u mikroreaktoru, Doktorska disertacija, Zagreb, 2013.
- [59] Miličević, N., Panić, M., Valinger, D., Bubalo, M. C., Benković, M., Jurina, T., Gajdoš Kljusurić, J., Radojčić Redovniković, I., Jurinjak Tušek, A. , Development of continuously operated aqueous two-phase microextraction process using natural deep eutectic solvents“, *Sep. Purif. Technol.*, **244** (2020) 116746.
- [60] Bowen, H., Durrani, R., Delavault, A., Durand, E., Chenyu, J., Yiyang, L., Lili, S., Jian, S., Weiwei, H., Fei, G., Application of deep eutectic solvents in protein extraction and purification, *Front. Chem.*, **10** ( 2022).
- [61] Khodaverdian, S., Dabirmanesh, B., Heydari, A., Dashtban-Moghadam, E., Khajeh, K., Ghazi, F., Activity, stability and structure of laccase in betaine based natural deep eutectic solvents, *Int. J. Biol. Macromol.*, **107** (2018) 2574–2579.
- [62] Toledo, M. L., Pereira, M. M., Freire, M. G., Silva, J. P., Coutinho, J. A., Tavares, A. P., Laccase Activation in Deep Eutectic Solvents, *ACS Sustain. Chem. Eng.*, **7** (2019) 11806–11814.
- [63] Zeng, Q., Wang, Y., Huang, Y., Ding, X., Chen, J., Xu, K., Deep eutectic solvents as novel extraction media for protein partitioning, *Analyst*, **139** (2014) 2565–2573.
- [64] Rodrigues, L. A., Leonardo, I. C., Gaspar, F. B., Roseiro, L. C., Duarte, A. R. C., Matias, A. A., Paiva, A., Unveiling the potential of betaine/polyol-based deep eutectic systems for the recovery of bioactive protein derivative-rich extracts from sardine processing residues, *Sep. Purif. Technol.*, **276** (2021) 119267.
- [65] Skulcova, A., Russ, A., Jablonsky, M., Sima, J., The pH behavior of seventeen deep

- eutectic solvents, *BioResources*, **13** (2019) 5042–5051.
- [66] Perry, S., Higdon, J., Kenis, P. J. A., Microfluidic Strategies to Mix Highly Viscous and/or Non-Newtonian Fluids, 2009.
- [67] Tišma, M., Zelić, B., Vasić-Rački, Đ., Žnidaršič-Plazl, P., Plazl, I., Modelling of laccase-catalyzed l-DOPA oxidation in a microreactor, *Chem. Eng. J.*, **149** (2009) 383–388.
- [68] Delorme, A. E., Andanson, J. M., Verney, V., Improving laccase thermostability with aqueous natural deep eutectic solvents, *Int. J. Biol. Macromol.*, **163** (2020) 919–926.
- [69] Shirai, K., Mawatari, K., Ohta, R., Shimizu, H., Kitamori, T., A single-molecule ELISA device utilizing nanofluidics, *Analyst*, **143** (2018) 943–948.
- [70] Vicente, F. A., Plazl, I., Ventura, S. P. M., Žnidaršič-Plazl, P., Separation and purification of biomacromolecules based on microfluidics, *Green Chem.*, **22** (2020) 4391–4410.
- [71] Han, M. J., Choi, H. T., Song, H. G., Purification and characterization of laccase from the white rot fungus *Trametes versicolor*, *J. Microbiol.*, **43** (2005) 555–560.
- [72] Ribeiro, L. F., Furtado, G. P., Lourenzoni, M. R., Costa-Filho, A. J., Santos, C. R., Nogueira, S. C. P., Betini, J. A., Polizeli, M. D. L. T. M., Murakami, M. T., Ward, R. J., Engineering bifunctional laccase-xylanase chimeras for improved catalytic performance, *J. Biol. Chem.*, **286** (2011) 43026–43038.
- [73] Chauhan B., Gupta, R., Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14, *Process Biochem.*, **39** (2004) 2115–2122.
- [74] Malherbe, S., Cloete, T. E., Lignocellulose biodegradation: Fundamentals and applications, *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, **1** (2002) 105–114.
- [75] Zhang, L. H., Yang, X. Q., Ge, K. S., Qian, S. J., Purification and properties of manganese peroxidase from *Trametes versicolor*, *Wei Sheng Wu Xue Bao*, **45** (2005) 711–715.
- [76] Johansson, T., Nyman, P. O., Isozymes of Lignin Peroxidase and Manganese(II) Peroxidase from the White-Rot Basidiomycete *Trametes versicolor*. I. Isolation of Enzyme Forms and Characterization of Physical and Catalytic Properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, **300** (1993) 49–56.
- [77] Robinson, T., Chandran, B., Nigam, P., Removal of dyes from a synthetic textile dye effluent by biosorption on apple pomace and wheat straw, *Water Res.*, **36** (2002)

2824–2830.

- [78] Moilanen, U., Osma, J. F., Winqvist, E., Leisola, M., Couto, S. R., Decolorization of simulated textile dye baths by crude laccases from *Trametes hirsuta* and *Cerrena unicolor*, *Eng. Life Sci.*, **10** (2010) 242–247.
- [79] Yaseen, D. A., Scholz, M., Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, **16** (2019) 1193–1226.



## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

### 7.1. Simboli

$AAD$	apsolutno prosječno odstupanje
$d$	širina kivete, cm
$D_{A/B}$	difuzijski koeficijent otopljene tvari kroz otapalo, $\text{cm}^2/\text{s}$
$E$	učinkovitost ekstrakcije proteina, %
$E_{\text{BOJA}}$	učinkovitost uklanjanja boje, %
$K_P$	koeficijent raspodjele proteina, -
$L$	dužina kanala u mikroreaktoru, cm
$M$	molarna masa, g/mol
$q_V$	volumni protok, $\mu\text{L}/\text{min}$
$R^2$	koeficijent određivanja
$R_G$	kut zakretanja proteina, $\text{Å}$
$RMSE$	korijen kvadratne pogreške
$SEP$	standardna pogreška predviđanja
$T$	temperatura, $^{\circ}\text{C}$ ili $\text{K}$
$t$	vrijeme, min
$u$	linearna brzina, m/s
$\nu$	kinematička viskoznost, $\text{mm}^2/\text{s}$
$V$	volumen, mL
$V. A.$	volumna aktivnost enzima, $\text{U}/\text{mL}$ , 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
$V_E$	volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim, mL
$V_R$	ukupni volumen uzorka u kiveti, mL
$W$	radijus mikrokanala, $\mu\text{m}$
$x$	dužina mikrokanala, mm
$y$	širina mikrokanala, mm
$\gamma$	masena koncentracija, g/mL
$\Delta A/\Delta t$	promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca), 1/min

## 7.2. Grčka slova

$\varepsilon_{420}$	ekstinkcijski koeficijent, $\varepsilon_{420} = 0,036 \text{ L}/(\mu\text{mol cm})$
$\eta$	dinamička viskoznost, mPas
$\xi$	bezdimenzijska nezavisna varijabla, $x/W$ , -
$\rho$	gustoća, g/mL
$\tau$	vrijeme zadržavanja, min
$\varphi$	volumni udio, -
$\psi$	bezdimenzijska nezavisna varijabla, $y/W$ , -

## 7.3. Indeksi

0	početna vrijednost
A	otopljena tvar
B	otapalo
EKS	ekstraktna faza
P	protein
P. O.	početna otopina
RAF	rafinatna faza
$t$	vrijeme

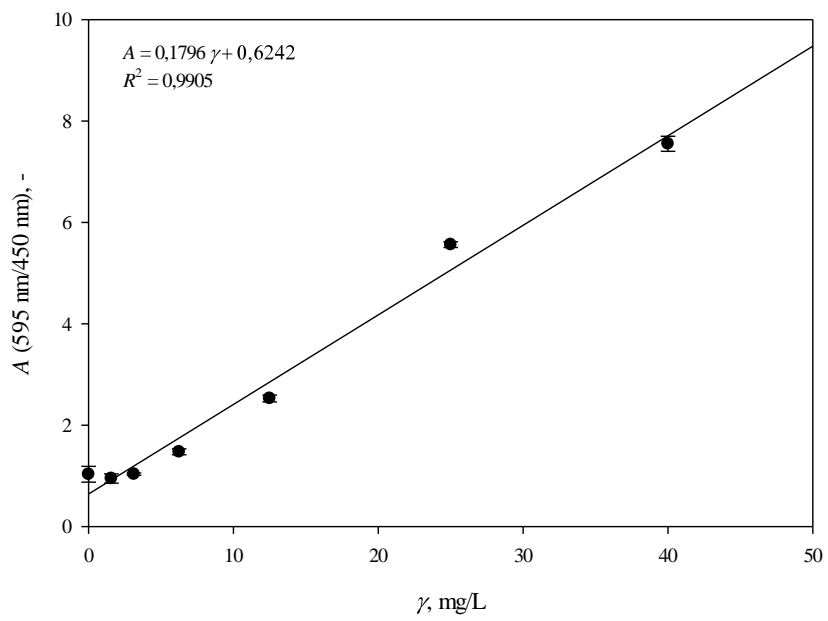
## 7.4. Skraćenice

ABS	apsorbancija otopine
B:EG	eutektično otapalo betain:etilen-glikol
B:Gly	eutektično otapalo betain:glicerol
B:Gly:ZnCl <sub>2</sub>	eutektično otapalo betain:glicerol:cink diklorid
B:PG	eutektično otapalo betain:propilen-glikol
B:U	eutektično otapalo betain:urea
ChCl:EG	eutektično otapalo kolin-klorid:etilen-glikol
ChCl:Fru	eutektično otapalo kolin-klorid:fruktoza
ChCl:Glc	eutektično otapalo kolin-klorid:glukoza
ChCl:Gly	eutektično otapalo kolin-klorid:glicerol

ChCl:PG	eutektično otapalo kolin-klorid:propilen-glikol
ChCl:PG:ZnCl <sub>2</sub>	eutektično otapalo kolin-klorid:propilen-glikol:cink diklorid
ChCl:U	eutektično otapalo kolin-klorid:urea
DES	eutektično otapalo

## 8. PRILOZI

### Prilog 1. Baždarni pravac za metodu po Bradfordu



**Prilog 2.** 2D matematički model za opis procesa ekstrakcije u mikroekstrктору izrađen u programskom paketu Mathematica 13.0

```
(*za protein*)

(*faza sol*) dprotein1 = 3.10 * 10^(-7);
(*faza des*) dprotein2 = 9.10 * 10^(-9);
length = 1.2;
Kp = 2.5;
width = 500 / 1 000 000;
emax = N[length / width];
v1 = 0.0000364;
v2 = 0.0000444;

(*za fazu1*)
x0 = 0;
x1 = emax;
y0 = -1;
y1 = 0;
nx = 10;
ny = 10;

(*konstrukcija mreze*)
hx = N[(x1 - x0) / nx];
hy = N[(y1 - y0) / (ny)];
Do[ξi = x0 + i hx, {i, 0, nx}]
Do[ηj = y0 + j hy, {j, 0, ny}]

varsprotein1 = Table[cprotein1i,j, {i, 0, nx}, {j, 0, ny / 2}];
Table[{cprotein1i,j, 0}, {i, 0, nx}, {j, 0, ny / 2}];
Aprotein1 = v1 / hx;
Bprotein1 = dprotein1 / (width * hx * hx);
Gprotein1 = dprotein1 / (width * hy * hy);

(*za fazu2*)
x01 = 0;
x11 = emax;
y01 = 0;
y11 = 1;
nx1 = 10;
ny1 = 10;
hx1 = N[(x11 - x01) / nx1];
hy1 = N[(y11 - y01) / (ny1)];
Do[ξi1 = x01 + i hx1, {i, 0, nx1}]
Do[ηj1 = y01 + j hy1, {j, 0, ny1}]

varsprotein2 = Table[cprotein2i,j, {i, 0, nx1}, {j, ny1 / 2, ny1}];
Table[{cprotein2i,j, 0}, {i, 0, nx1}, {j, ny1 / 2, ny1}];
Aprotein2 = v2 / hx1;
Bprotein2 = dprotein2 / (width * hx1 * hx1);
Gprotein2 = dprotein2 / (width * hy1 * hy1);
cprotein1ulaz = 0;
cprotein2ulaz = 0.503;
```



```
uappr1 = ListInterpolation[solfaza1, {{0, emax}, {-1, 0}}]
uappr2 = ListInterpolation[solfaza2, {{0, emax}, {0, 1}}]
```

```
Plot3D[uappr1[x, y], {x, 0, emax}, {y, -1, 0}, ViewPoint -> {2.0, -2.4, 0.9}, Mesh -> All]
Plot3D[uappr2[x, y], {x, 0, emax}, {y, 0, 1}, ViewPoint -> {2.0, -2.4, 0.9}, Mesh -> All]
(*koncnetracija rafinat na izlazu iz jedne cijevi*)
```

$$\frac{\text{uappr1}[\text{emax}, -1] + \text{uappr1}[\text{emax}, -0.5] + \text{uappr1}[\text{emax}, 0]}{3}$$

(\*koncnetracija ekstrakt na izlazu iz druge cijevi\*)

$$0.109651524 - \frac{\text{uappr1}[\text{emax}, -1] + \text{uappr1}[\text{emax}, -0.5] + \text{uappr1}[\text{emax}, 0]}{3}$$

(\*provjera zakona očuvanja tvari\*)

$$\frac{\text{uappr1}[\text{emax}, -1] + \text{uappr1}[\text{emax}, -0.5] + \text{uappr1}[\text{emax}, 0]}{3} + 0.891922713686127 - \frac{\text{uappr1}[\text{emax}, -1] + \text{uappr1}[\text{emax}, -0.5] + \text{uappr1}[\text{emax}, 0]}{3}$$

## 9. ŽIVOTOPIS

Marko Božinović [REDACTED] U prvom razredu srednje škole osvojio je 3. mjesto na državnom natjecanju iz biologije u istraživačkim radovima s temom rada Bio-Mars. Godine 2017. upisuje preddiplomski studij kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, a 2021. godine završava ga i stječe titulu univ. bacc. ing. cheming. Nakon završetka preddiplomskog studija, upisuje diplomski studij na istom Fakultetu. Za vrijeme studiranja sudjelovao je na međunarodnim i nacionalnim konferencijama gdje je prezentirao svoje radove putem posterskih priopćenja i to na *1st International Conference on Micromachines and Applications (ICMA2021)* s radom pod nazivom „Purification of biodiesel produced by lipase catalysed transesterification by two-phase systems based on deep eutectic solvents in a microextractor: Selection of solvents and process optimization“, doi: 10.3390/Micromachines2021-09592, *XIV. susret mladih kemijskih inženjera* s radom pod nazivom „Ekstrakcija enzima endo-1,4-ksilanaza vodenim dvofaznim sustavima“, *2. međunarodna studentska GREEN konferencija* s radom pod nazivom „Liquid-liquid extraction of endo-1,4-xylanase in a microextractor“ te na *The 4th International Congress on “Green Extraction of Natural Products (GENP2022)* s radom pod nazivom „Deep eutectic solvents aqueous two-phase system based protein extraction in a microextractor“ 2022. godine zajedno s koautorima objavio je znanstveni rad Anđelović, S., Božinović, M., Ćurić, Ž., Šalić, A., Jurinjak Tušek, A., Zagajski Kučan, K., Rogošić, M., Radović, M., Cvjetko Bubalo, M., Zelić, B. Deep eutectic solvents for biodiesel purification in a microextractor: solvent preparation, selection and process optimization, *Bioengineering*, **9** (2022), 665, 22. 2023. godine zajedno s koautorima objavio je znanstveni rad Božinović, M., Vičević, R., Zekić, N., Šalić, A., Jurinjak Tušek, A., Zelić, B. Intensification of endo-1,4-xylanase extraction by coupling microextractors and aqueous two-phase system, *Processes*, **11** (2023), 2; 447, 16. Marko Božinović radio je kao stručni suradnik u rješavanju problemskih zadataka za tvrtku Quizlet na područjima opće kemije, fizikalne kemije, analitičke kemije i organske kemije u razdoblju od veljače 2021. do veljače 2022. Za vrijeme rada, nagrađen je kao najbolji stručni suradnik u području kemije za godinu 2021. Stručnu praksu odradio je u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ u Zagrebu. U akademskoj godini 2021./2022. nagrađen je Rektorovom nagradom za grupni istraživački rad pod nazivom „Proizvodnja bioetanola iz enzimskog i kiselinog hidrolizata pivskog tropa“.