

Razvoj vodenog dvofaznog sustava na bazi eutekličnih otapala za kontinuiranu ekstrakciju proteina u mikroekstrктору

Ljubić, Anabela

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:149:874756>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Anabela Ljubić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2021.

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

Kandidatkinja **Anabela Ljubić**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 06. srpnja 2021.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Bruno Zelić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Dr. sc. Anita Šalić, znan. sur., Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Prof. dr. sc. Irena Škorić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Prof. dr. sc. Gordana Matijašić, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 9. srpnja 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Anabela Ljubić

RAZVOJ VODENOG DVOFAZNOG SUSTAVA NA BAZI EUTEKTIČNIH
OTAPALA ZA KONTINUIRANU EKSTRAKCIJU PROTEINA U
MIKROEKSTRAKTORU

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

Neposredni voditelj: dr. sc. Anita Šalić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Bruno Zelić
2. dr. sc. Anita Šalić, znanstveni suradnik
3. prof. dr. sc. Irena Škorić

Zagreb, srpanj 2021.

Hvala mom mentoru prof. dr. sc. Bruni Zeliću na vodstvu, strpljenju, razumijevanju i uvijek brzim odgovorima. Hvala Vam na prilici za sudjelovanje u brojnim znanstvenim radovima, kao i na svakom ispravku, komentaru i savjetu jer sam time stekla korisna i nezamjenjiva znanja!

Veliko hvala dr. sc. Aniti Šalić na neposrednom vodstvu, prenesenom znanju i pomoći kada god je bilo potrebno, kako pri izradi eksperimentalnog rada, tako i pri pisanju. Hvala što ste imali strpljenja za sva pitanja i objašnjenja, i to uvijek u vedroj i ugodnoj atmosferi zbog čega mi je bilo posebno zadovoljstvo raditi s Vama!

Hvala i Martinu Gojunu, mag ing. oecoing. na svom prenesenom znanju i dobrom društvu kroz rad u laboratoriju, a pogotovo jer je uvijek bio spreman priskočiti u pomoć.

Veliko hvala mojim prijateljicama i prijateljima na podršci, svim lijepim trenutcima koje smo zajedno proveli te posebice na olakšavanju onih manje lijepih, a zahvaljujem i svim članovima obitelji na konstantnoj potpori.

I na kraju, veliko hvala mojim roditeljima na neizmjerne podršci, razumijevanju i ljubavi tijekom svih godina. Hvala što ste mi uvijek nesebično pružali sve što sam trebala, pa i više od toga, i znajte da mi je činjenica da ste ponosni na mene uvijek bila najveća nagrada za bilo koje postignuće.

SAŽETAK

U posljednje vrijeme sve više raste interes za upotrebom enzima kao katalizatora. Pri tome se posebno ističe enzim lipaza kojega karakteriziraju velika aktivnost u blagim reakcijskim uvjetima i širok spektar reakcija koje katalizira. Zbog toga je od presudne važnosti proizvesti enzim lipaza velike katalitičke aktivnosti za što je neophodno provesti njegovo pročišćavanje. Pročišćavanje enzima je vrlo često skup i spor postupak ako se koriste konvencionalne metode pa se u današnje vrijeme teži razvoju alternativnih, održivih i učinkovitih metoda. Velik interes u kontekstu pročišćavanja proteina i drugih biomolekula privlači upotreba vodenih dvofaznih sustava koji su prepoznati kao zelena i jeftina ekstrakcijska sredstva, a dodatna prednost im je izražena fleksibilnost. Vodeni dvofazni sustavi na bazi eutektičnih otapala zbog svoje netoksičnosti i biorazgradivosti odgovaraju svim zahtjevima i principima zelene kemije. Za procese pročišćavanja osjetljivih biomolekula kao što su proteini i enzimi često se primjenjuju i mikrosustavi jer omogućuju intenzifikaciju procesa uz vrlo malu vjerojatnost narušavanja strukture molekula te provedbu kontinuiranog procesa.

U ovom radu razvijena je metoda za kontinuiranu mikroekstrakciju proteina, odnosno pročišćavanje enzima lipaza korištenjem vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnog otapala. Nakon ispitivanja utjecaja sastava eutektičnog otapala i koncentracije soli na učinkovitost ekstrakcije u šaržnom sustavu, optimalnim se pokazao sustav s eutektičnim otapalom betain: urea i koncentracijom K_2HPO_4 od 0,7 g/mL. Odabrani vodeni dvofazni sustav korišten je za ekstrakciju proteina u mikroekstraktor u gdje je ispitan utjecaj vremena zadržavanja, ultrazvuka, temperature i promjera kanala na učinkovitost procesa ekstrakcije. Optimalna učinkovitost ekstrakcije iznosila je 98,50 %, a ostvarena je za vrijeme zadržavanja od 30 s u mikrosustavu promjera kanala 1000 μm i pri temperaturi 25 °C. S obzirom na učinkovitost ekstrakcije u šaržnom sustavu koja je iznosila 94,70 % za vrijeme od 30 min primjena mikroekstraktora rezultirala je intenzifikacijom procesa. Ispitana je i mogućnost ponovne uporabe eutektičnog otapala te je ono uspješno korišteno u nekoliko ekstrakcijskih ciklusa u šaržnom sustavu i u mikrosustavu. Razvijena metoda mikroekstrakcije i kapacitet eutektičnog otapala dodatno su ispitani korištenjem sirovog enzima lipaza proizvedenog fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče. Uz to, proces mikroekstrakcije je uspješno opisan 2D matematičkim modelom.

Ključne riječi: ekstrakcija, mikrosustavi, eutektična otapala, enzim lipaza, *Thermomyces lanuginosus*

SUMMARY

Recently, there has been a growing interest in the use of enzymes as catalysts. Lipases thereby especially stand out while they are characterized by high activity in mild reaction conditions and a wide spectrum of reactions they catalyse. Therefore, it is crucial to produce the lipase of high catalytic activity which is commonly achieved by its purification. Enzyme purification is very often an expensive and slow procedure when conventional methods are used, so nowadays alternative, sustainable, and effective methods are being developed. The use of aqueous two-phase systems, that are recognized as green and cheap extraction agents, attracts a great interest in the purification of proteins and other molecules. An additional advantage is their significant flexibility, while aqueous two-phase systems can also be based on deep eutectic solvents which meet all the requirements and green chemistry principles due to their non-toxicity and biodegradability. For purification of sensitive biomolecules, such as proteins and enzymes, microsystems often stand out because they enable process intensification with a negligible disruption of molecule structures and carrying out a continuous process.

In this paper, a method for continuous protein microextraction, namely lipase purification using a deep eutectic solvent based aqueous two-phase system was developed. After analysing the influence of deep eutectic solvent composition and salt concentration on extraction efficiency in the batch system, the system with betaine: urea deep eutectic solvent and K_2HPO_4 concentration of 0,7 g/mL proved to be optimal. The selected aqueous two-phase system was used for protein extraction in a microextractor where the influence of retention time, ultrasound, temperature, and channel diameter on the extraction process efficiency was examined. The optimal extraction efficiency achieved was 98,50 % for 30 s in a microsystem with a channel diameter of 1000 μm at 25 °C. The process was significantly intensified using a microextractor considering the extraction efficiency in a batch system which was 94,70 % for 30 min. The deep eutectic solvent reuse was also investigated, and it was successfully used in several extraction cycles in the batch system as well as in the microsystem. The developed microextraction method and the deep eutectic solvent capacity were further analysed using crude lipase produced by fermentation of *Thermomyces lanuginosus* on pumpkin oil pomace. Additionally, the microextraction process was successfully described by a 2D mathematical model.

Keywords: extraction, microsystems, deep eutectic solvents, lipase, *Thermomyces lanuginosus*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. Zelena kemija	3
2.2. Proces ekstrakcije	4
2.2.1. Vodeni dvofazni sustavi.....	7
2.2.2. Eutektična otapala	8
2.3. Proteini i enzimi.....	10
2.3.1. Enzim lipaza.....	11
2.3.2. Pročišćavanje enzima.....	13
2.4. Mikroekstraktor	14
2.4.1. Struktura i značajke mikroekstraktora	14
2.4.2. Matematički modeli procesa ekstrakcije	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. Materijali	18
3.1.1. Kemikalije	18
3.1.2. Oprema.....	19
3.1.3. Priprema otopina i reagensa.....	20
3.2. Metode	20
3.2.1. Bradford test za mjerenje koncentracije proteina	20
3.2.2. Mjerenje koncentracije metilnih estera masnih kiselina i glicerola plinskom kromatografijom.....	21
3.2.3. Priprava i karakterizacija eutektičnih otapala	21
3.2.4. Određivanje aktivnosti komercijalnog enzima lipaza u eutektičnim otapalima .	23
3.2.5. Određivanje učinkovitosti ekstrakcije glicerola iz sintetiziranog biodizela primjenom eutektičnih otapala	24
3.2.6. Ispitivanje interakcije komercijalnog enzima lipaza i eutektičnih otapala	25
3.2.7. Šaržna ekstrakcija enzima lipaza	25

3.2.7.1. Odabir vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektnog otapala za provedbu ekstrakcije enzima lipaza	25
3.2.7.2. Ispitivanje ponovne upotrebe eutektnog otapala.....	27
3.2.8. Kontinuirana ekstrakcija enzima lipaza u mikroekstratoru.....	27
3.2.8.1. Odabir značajki mikrosustava.....	27
3.2.8.2. Ispitivanje ponovne upotrebe eutektnog otapala.....	29
3.2.9. Matematičko modeliranje procesa ekstrakcije enzima lipaza u mikroekstratoru	30
4. REZULTATI I RASPRAVA	32
4.1. Odabir i karakterizacija eutektnih otapala	32
4.2. Šaržna ekstrakcija enzima lipaza u različitim vodenim dvofaznim sustavima na bazi eutektnih otapala.....	33
4.3. Reakcija transesterifikacije katalizirane enzimom lipaza u sustavu s eutektnim otapalom	38
4.4. Međudjelovanje eutektnih otapala i enzima lipaza.....	40
4.5. Ponovna upotreba eutektnog otapala u šaržnom sustavu	45
4.6. Ekstrakcija enzima lipaza u mikrosustavu.....	47
4.7. Ponovna upotreba eutektnog otapala u mikrosustavu	49
4.8. Ekstrakcija sirovog enzima lipaza proizvedenog fermentacijom <i>Thermomyces lanuginosus</i> na pogači buče.....	50
4.9. Matematički model procesa mikroekstrakcije enzima lipaza.....	52
5. ZAKLJUČAK	54
6. LITERATURA.....	55
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA	60
8. PRILOZI.....	62
9. ŽIVOTOPIS	72

1. UVOD

Ekstrakcija se kao separacijska metoda spominje već u doba ranih civilizacija, prije više od 4000 godina, a s razvojem društva njezina je važnost znatno porasla pa je tako danas gotovo nemoguće pronaći proces unutar kemijske, farmaceutske, kozmetičke, prehrambene, i sličnih industrija u kojem se ne koristi ekstrakcija. S obzirom na izrazitu zastupljenost ekstrakcije u proizvodnim procesima te uz činjenicu da se njome troše znatne količine energenata, rashladnih medija i toksičnih otapala, na što otpada preko 70 % troškova u proizvodnom procesu, smanjenje utjecaja na okoliš i povećanje ekonomičnosti ekstrakcijskih procesa velik su izazov. Također, inovacije u procesu ekstrakcije su prijeko potrebne za osiguravanje održivosti takvih industrijskih procesa budući da su zakonske regulative vezane za emisije, sigurnost i kontrolu procesa te sigurnost proizvoda sve strože.¹

Kapljevinska ekstrakcija uz korištenje vodenih dvofaznih sustava prepoznata je kao jedna od obećavajućih zelenih tehnologija za poboljšanje industrijskih procesa, prvenstveno zbog fleksibilnosti u provedbi procesa i odabiru otapala.² Time je omogućena jednostavna implementacija principa zelene kemije koje je važno razmotriti za postizanje održivog procesa, a osim fleksibilnosti, prednosti vodenih dvofaznih sustava su i niska cijena te jednostavno uvećanje procesa.^{1,2} Jedna od komponenti vodenih dvofaznih sustava može biti eutektično otapalo koje je sve popularnija alternativa uobičajenim, vrlo često toksičnim otapalima, a zbog jednostavne sinteze, biorazgradivosti i netoksičnosti eutektična otapala pronalaze primjenu u mnogim separacijskim procesima.³

Također, vodeni dvofazni sustavi na bazi eutektičnih otapala pokazuju znatan potencijal za uspješnu ekstrakciju i pročišćavanje brojnih biomolekula pa tako i za pročišćavanje proteina te enzima.² Naime, uslijed rastuće upotrebe enzima u proizvodima te kao ekološki prihvatljivijih katalizatora u industrijskim procesima, posebice lipaza koje su pogodne za razne supstrate, raste potreba za čistim enzimima visoke katalitičke aktivnosti.⁴ Korištenjem vodenih dvofaznih sustava na bazi eutektičnih otapala otvara se mogućnost eliminacije konvencionalnih postupaka pročišćavanja enzima koji su skupi, dugotrajni i izazovni kod uvećanja mjerila.⁵ Dodatno se proces ekstrakcije može poboljšati upotrebom procesne opreme koja nudi kontinuiran rad i intenzifikaciju procesa kao što su primjerice mikroekstraktori. Mikroekstraktori su tehnologija u sponu koja uslijed mikrometarskih dimenzija donosi brojne prednosti u odnosu na konvencionalne protočne sustave od kojih treba izdvojiti brz prijenos tvari i topline te olakšano uvećanje i vođenje procesa.⁶

U ovom su radu objedinjene prednosti vodenih dvofaznih sustava, eutektičnih otapala i mikrotehnologije u svrhu razvoja kontinuiranog i ekološki prihvatljivog sustava za ekstrakciju proteina, odnosno pročišćavanje enzima lipaza. Nakon pripreve i karakterizacije šest različitih eutektičnih otapala, u nizu šaržnih eksperimenata ispitan je utjecaj koncentracije soli i sastava eutektičnog otapala u vodenom dvofaznom sustavu na učinkovitost ekstrakcije proteina te su određene optimalne značajke sustava koji je potom prenesen u mikroekstraktor. Ispitivanjem utjecaja vremena zadržavanja, djelovanja ultrazvuka, temperature i promjera kanala na učinkovitost kontinuirane ekstrakcije proteina u mikroekstraktoru, određeni su optimalni procesni uvjeti. Tako razvijena metoda ekstrakcije proteina potvrđena je upotrebom uzorka sirovog enzima lipaza proizvedenog fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče. Uz to je za odabrano eutektično otapalo ispitana mogućnost ponovne uporabe u šaržnom sustavu i u mikrosustavu. Proces ekstrakcije proteina u mikroekstraktoru je opisan 2D matematičkim modelom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Zelena kemija

Uslijed sve izraženijeg onečišćenja okoliša, zelena kemija kao grana kemije ubrzano dobiva na važnosti u posljednjih dvadesetak godina te se polako počinje primjenjivati u svim sektorima industrije.⁷ Definira se kao dizajn kemijskih procesa i produkata kojima se smanjuje ili eliminira korištenje i generiranje opasnih tvari, a temelji se na dvanaest principa koji predstavljaju pravila, odnosno smjernice za jednostavnije postizanje održivosti pri dizajnu procesa (Slika 1.).⁸



Slika 1. Principi zelene kemije

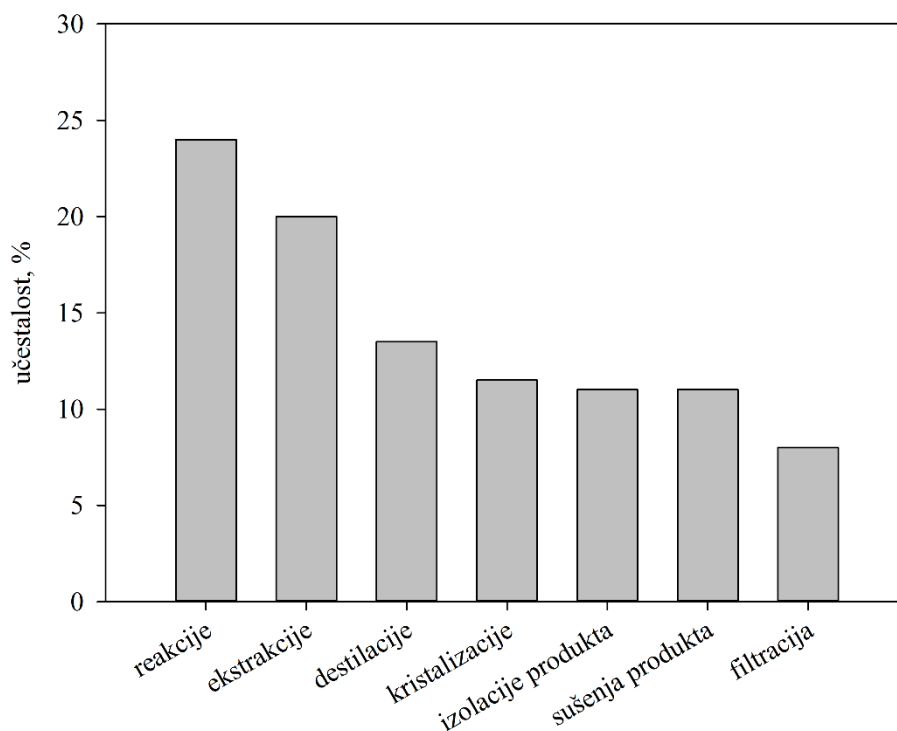
Principi zelene kemije odnose se na cjelovit procesni ciklus, počevši od sirovina, koje moraju biti obnovljive, preko njihove sigurne i učinkovite pretvorbe selektivnim katalizatorima do netoksičnih i biorazgradivih, ali djelotvornih produkata uz istovremeno izbjegavanje nepotrebnih proširenja procesa i generiranja malih količina otpada.^{7,8} Također, važno je pratiti cijeli proces analitičkim metodama te kroz sve dijelove procesa koristiti tvari koje su netoksične uz minimalnu upotrebu pomoćnih tvari i minimalni utrošak energije. Praćenjem i primjenom što većeg broja smjernica zelene kemije razvijaju se procesi i proizvodi koji su profitabilni, a osim toga i neškodljivi za okoliš i ljude pa stoga ne čudi sve šira primjena principa zelene kemije.^{7,8}

Na temelju principa zelene kemije razvijeni su principi zelenog inženjerstva sa sličnom svrhom, a to je razvoj održivih procesa i proizvoda koji nisu štetni za ljude i okoliš. Principima zelenog inženjerstva također se uvjetuje potreba za korištenjem netoksičnih tvari i obnovljivih sirovina, uz povećanje učinkovitosti svih aspekata procesa te smanjenje nastanka otpada. Osim toga, naglašava se važnost pažljivog dizajna procesa separacije, integracije tokova tvari i energije unutar postojećih kapaciteta, otklanjanja viška kapaciteta te dizajna proizvoda koji mora sadržavati što manje različitih materijala. Isto tako, proizvodi moraju biti izdržljivi, no ne i vječni kako ne bi stvarali probleme u okolišu akumulacijom, a proizvodi i njihove komponente, ovisno o kompleksnosti, moraju biti pogodni za recikliranje ili ponovnu upotrebu.⁹

Također, kako bi se ubrzala primjena principa zelene kemije i zelenog inženjerstva, posebice unutar farmaceutske industrije i industrije finih kemikalija, definirana su ključna područja istraživanja unutar kojih je uočen najveći potencijal za poboljšanja procesa. Tako su kao prioritetna područja za razvoj, kojima se posljedično bavi sve veći broj istraživača, istaknuti kontinuirani procesi, bioprocesi, separacijske i reakcijske tehnologije, odabir otapala i intenzifikacija procesa. Važno je istaknuti kako su pri istraživanju tih područja, integracija kemije i inženjerstva te suradnja s ostalim stručnjacima prijeko potrebni kako bi se što uspješnije savladali svi izazovi dizajna zelenih i održivih procesa koji neminovno donose dobrobit za okoliš, ekonomiju i društvo u cjelini.¹⁰

2.2. Proces ekstrakcije

Velik potencijal za inovacije i rast održivosti implementacijom principa zelene kemije i zelenog inženjerstva uočen je u procesu ekstrakcije budući da je kao proces vrlo čest, ali ga odlikuju veliki troškovi i znatan utjecaj na okoliš. Naime, osim što se ekstrakcijom troši preko 70 % ukupne procesne energije, otapala i pomoćnih medija, ona također čini preko 50 % troškova procesne opreme pri ulaganju u novo postrojenje.¹ O važnosti ekstrakcije u industrijskim procesima govori podatak da se u farmaceutskoj industriji u oko 20 % operacijskih jedinica provodi upravo ekstrakcija što znači da je to najčešća separacijska metoda budući da su reaktori na prvom mjestu po zastupljenosti (Slika 2.).¹⁰ Situacija je slična i u ostalim granama kemijske industrije kao što su kozmetička, industrija goriva i finih kemikalija te u prehrambenoj industriji, što daje dodatni značaj potrebi za poboljšanjima procesa ekstrakcije.¹¹

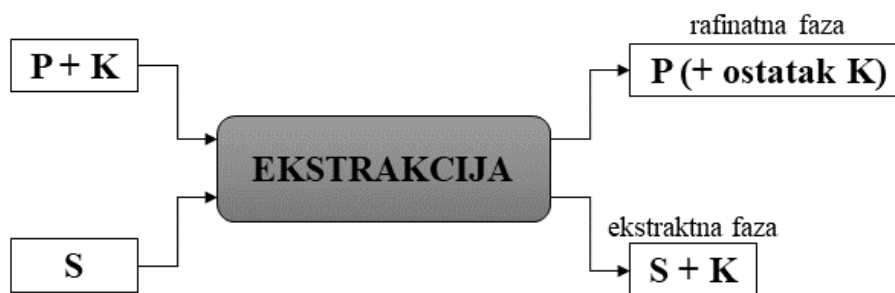


Slika 2. Zastupljenost procesa korištenih u farmaceutskoj industriji¹⁰

Ekstrakcija se u najširem smislu može definirati kao separacijska tehnika kojom se tvar izdvaja iz jedne faze i prelazi u drugu kontaktom tih dviju faza, a s obzirom na agregatna stanja faza, najčešće su ekstrakcija kruto-kapljevito i ekstrakcija kapljevito-kapljevito.¹²

Ekstrakcija kruto-kapljevito, poznata još i kao izluživanje, provodi se kontaktom krute smjese s prikladnim kapljevitim otapalom koje otapa i izdvaja odabranu tvar iz krutine. U industriji se često koristi pri dobivanju estera iz biljnog materijala ili metala iz ruda, a može se pronaći i u svakodnevnom životu u postupcima kao što su kuhanje kave ili čaja.

Ekstrakcija kapljevito-kapljevito, odnosno kapljevinska ekstrakcija jest odjeljivanje ključne komponente iz otopine kontaktom sa sekundarnim otapalom, a temelji se na raspodjeli odabrane tvari između dvije nemješljive kapljevine.^{13,14} Pri kontaktu dviju kapljevina, odnosno faza, odvija se prijenos ključne tvari (K) difuzijom iz primarnog otapala (P) u sekundarno (S) preko granice faza do uspostavljanja ravnoteže. Zatim se dvije faze separiraju na rafinatnu, koja sadrži preostalu količinu ključne komponente, i ekstraktnu fazu obogaćenu ključnom komponentom (Slika 3.).^{14,15}



Slika 3. Shematski prikaz kapljevine ekstrakcije

Postizanje fazne ravnoteže podrazumijeva raspodjelu ključne komponente između ekstraktne i rafinatne faze ovisno o njenoj topljivosti u svakoj od njih, a kada je ona pri određenoj temperaturi postignuta, koncentracija ključne komponente u jednoj i drugoj fazi je u stalnom odnosu. Stoga je moguće definirati koeficijent raspodjele (Jednadžba (1)), koji često ukazuje i na učinkovitost postupka ekstrakcije, kao:

$$K = \frac{\gamma_E}{\gamma_R} \quad (1)$$

gdje su γ_E masena koncentracija ključne komponente u ekstraktnoj fazi, a γ_R u rafinatnoj fazi.¹⁵ Što su veće vrijednosti koeficijenta raspodjele to je uspješnija ekstrakcija ključne komponente sekundarnim otapalom te je za provedbu procesa potrebno manje ekstrakcijskih ciklusa, a manji je i utrošak otapala.¹³

Za provedbu učinkovite ekstrakcije važno je odabrati prikladno sekundarno otapalo koje prvenstveno mora biti selektivno s obzirom na ključnu komponentu, a uz to ga mora biti moguće regenerirati. Poželjna svojstva sekundarnog otapala su i kemijska stabilnost i inertnost prema ostalim komponentama sustava, niska cijena, neotrovnost i nezapaljivost te što je moguće veća razlika gustoća kapljevitih faza kako bi se nakon provedbe procesa faze lakše razdvojile. Najčešće korištena otapala u industriji i laboratorijskim istraživanjima su razna organska otapala poput dietil-etera, butilnih alkohola i slična. Osim odabira otapala, na učinkovitost procesa ekstrakcije može se utjecati i promjenom raznih čimbenika kao što su temperatura, pH, vrijeme kontakta faza, volumni omjer faza te vrsta i koncentracija ostalih komponenti sustava.^{14,15}

2.2.1. Vodeni dvofazni sustavi

Konvencionalne kapljevite ekstrakcije često su nepovoljne za biomolekule kao što su proteini, enzimi i nukleinske kiseline pa se stoga pri radu s takvim tvarima sve više koriste vodeni dvofazni sustavi (engl. *aqueous two-phase systems*, ATPSs) a sve kako bi se izbjeglo narušavanje strukture ovih komponenti i njihove aktivnosti.² Vodeni dvofazni sustavi formiraju se miješanjem raznih komponenti u vodi, a najčešće su ovakvi sustavi pripremljeni iz dva različita polimera ili polimera i soli pri čemu su obje komponente topljive samo u određenim koncentracijama.^{2,16} U slučaju sustava kojeg čine polimer i sol bitno je da su obje komponente u koncentracijama većima od kritične jer se tada odvija spontana separacija faza koja rezultira dvjema fazama u ravnoteži pri čemu je koncentracija soli veća u donjoj fazi, dok je gornja faza bogata polimerom.¹⁷ U vodenim dvofaznim sustavima moguće je koristiti i druge tvari umjesto polimera te se u tu svrhu obično koriste ionske kapljevine i kratkolančani alkoholi, a sve češće i eutektična otapala.^{2,18}

Kako bi se moglo predvidjeti ponašanje vodenih dvofaznih sustava postavljeni su brojni modeli, no oni su uglavnom empirijski budući da su takvi sustavi vrlo složeni te ne postoji sveobuhvatna teorija koja bi ih opisala.¹⁹ Budući da je koeficijent raspodjele jedna od najvažnijih veličina za dizajn procesa ekstrakcije, pa tako i za ekstrakciju vodenim dvofaznim sustavima, za postavljanje modela koji povezuju fizikalno-kemijska svojstva komponenti s koeficijentom raspodjele koriste se razni pristupi.^{19,20} Pritom je najčešće korišten Albertssonov model (Jednadžba (2)) koji uzima u obzir utjecaj šest različitih čimbenika na ponašanje sustava, a koeficijent raspodjele se računa kao:

$$\ln K = \ln K^0 + \ln K_{\text{elek}} + \ln K_{\text{hfob}} + \ln K_{\text{afin}} + \ln K_{\text{vel}} + \ln K_{\text{konf}} \quad (2)$$

pri čemu K_{elek} , K_{hfob} , K_{afin} , K_{vel} i K_{konf} redom označavaju doprinos elektrokemijskog čimbenika, hidrofobnog čimbenika, biospecifičnog čimbenika, veličine i konformacijski ovisnog čimbenika, dok K^0 označava ostale čimbenike. Elektrokemijski čimbenik odnosi se na odvajanje koje je potaknuto električnim potencijalom, dok je kod hidrofobnog čimbenika odvajanje određeno hidrofobnim svojstvima molekula. Nadalje, biospecifični afinitet odnosi se na vezanje određenih molekula na specifična mjesta na drugim molekulama, veličina na veličinu samih molekula ili njihove specifične površine, a konformacijski ovisan čimbenik na konformacije pojedinih molekula.² Od ostalih čimbenika može se uzeti u obzir primjerice okolinski čimbenik koji ovisi o vrsti i koncentraciji soli, pH, temperaturi i mnogim drugim

parametrima, a ovisno o komponentama koje čine vodeni dvofazni sustav i njihovim svojstvima, neki od navedenih čimbenika mogu dominirati i odrediti ponašanje sustava.^{2,20}

S obzirom da vodeni dvofazni sustavi uglavnom sadrže vodu u udjelu 65-90 % te ne zahtijevaju upotrebu konvencionalnih, često toksičnih organskih otapala, vodena dvofazna ekstrakcija je sigurna i ekološki prihvatljiva. Osim toga, ova vrsta ekstrakcije se provodi u blagim uvjetima što, uz spomenutu netoksičnost, omogućuje da biomolekule zadrže svoju inicijalnu konformaciju i aktivnost.²¹ Još jedna važna značajka vodenih dvofaznih sustava jest mogućnost jednostavne modifikacije njihovih svojstva odabirom različitih komponenti i promjenom njihovih koncentracija čime se postiže znatna fleksibilnost sustava, kao i željena selektivnost te učinkovitost ekstrakcije.^{21,22} Brojne prednosti vodenih dvofaznih sustava čine ih jednom od obećavajućih tehnologija zelene ekstrakcije te su uvjetovale njihovu primjenu u sve većem broju procesa. Neki od tih procesa su uklanjanje štetnih tvari iz okoliša te izolacija i pročišćavanje različitih biomolekula, stanica mikroorganizama i virusa što pridonosi znatnim postignućima u aktualnim područjima biomolekula kao što su biokataliza, genska terapija, terapija antitijelima i razvoj novih cjepiva.^{2,23,24}

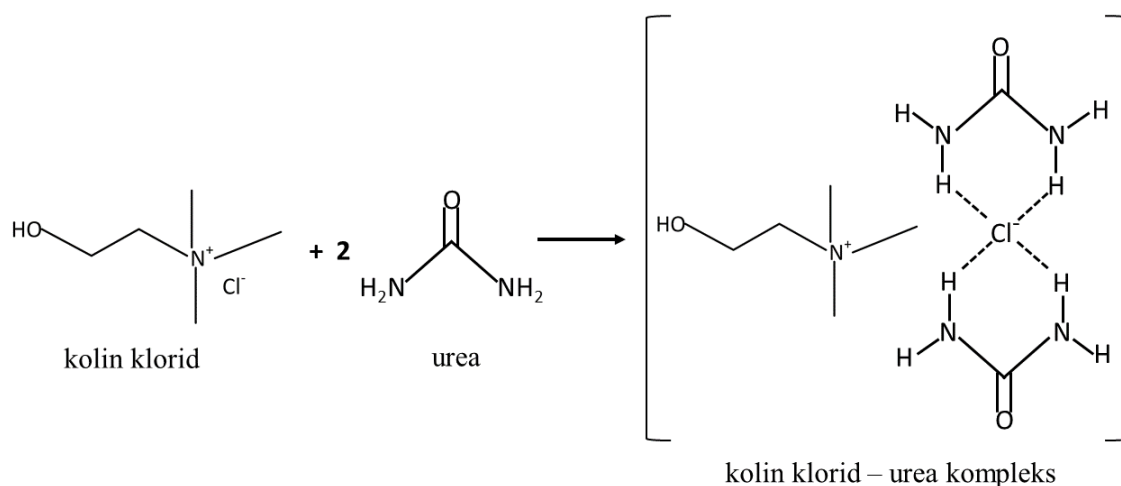
2.2.2. Eutektična otapala

U procesima ekstrakcije, shodno principima zelene kemije, važno je koristiti otapala koja su stabilna, jednostavna za upotrebu, nehlapljiva te pogodna za recikliranje i ponovnu upotrebu.²⁵ Uzevši te zahtjeve u obzir, mnogo pažnje privukle su ionske kapljevine koje se definiraju kao organske soli s talištem ispod 100 °C, a karakterizira ih i jednostavna prilagodba svojstava zbog gotovo beskonačnog broja mogućih kombinacija kationa i aniona od kojih se sastoje.²⁶ Unatoč brojnim prednostima, sve se više preispituje ekološka prihvatljivost ionskih kapljevina zbog indikacija da su često toksične i vrlo slabo biorazgradive, a njihova priprava je skupa i ekološki neprihvatljiva zbog upotrebe velikih količina soli i otapala. Tako su se pojavila sve popularnija eutektična otapala kao nova generacija zelenih otapala koja su ujedno jeftinija i prihvatljivija alternativa ionskim kapljevinama.²⁷

Eutektična otapala (engl. *deep eutectic solvents*, DESs) definiraju se kao smjese dviju ili više komponenti pri čemu je talište smjese niže od tališta svake pojedine komponente uslijed formiranja vodikove veze između njih. Kako bi se formirala vodikova veza, smjesa mora sadržavati tvar koja je akceptor vodikove veze (engl. *hydrogen bond acceptor*, HBA) te tvar koja je donor vodikove veze (engl. *hydrogen bond donor*, HBD).²⁸ S obzirom na sirovine koje čine eutektična otapala, njihova je biorazgradivost i netoksičnost neupitna što ih čini poželjnima za primjenu u sve većem broju područja.²⁷ Naime, najčešće se kao akceptori vodikove veze

koriste kvaterne amonijeve soli, posebice kolin klorid koji se može dobiti jednostavnom sintezom ili ekstrakcijom iz biomase, no sve se više istražuje i betain kao jeftinija i dostupnija opcija budući da se može ekstrahirati iz šećerne repe.^{5,27} Također, donori vodikove veze mogu biti mnoge jeftine molekule prirodnog porijekla poput raznih šećera, karboksilnih kiselina, amida i alkohola.^{6,27} Ukoliko su komponente eutektičnog otapala primarni metaboliti, odnosno tvari neophodne za razvoj živih organizama, što su mnoge od navedenih, otapalo se može smatrati prirodnim eutektičnim otapalom (engl. *natural deep eutectic solvent*, NADES).²⁹

Nadalje, osim sirovina, priprema eutektičnih otapala također je jeftina i jednostavna budući da nije potrebna nikakva kemijska reakcija za njihovo formiranje, već samo nastanak vodikove veze između komponenti (Slika 4.). To se može postići već blagim zagrijavanjem i miješanjem smjese željenih količina komponenti do nastanka bistre kapljevine što može trajati od pola sata do nekoliko sati, ovisno o strukturi komponenti.²⁵



Slika 4. Priprema eutektičnog otapala na primjeru kolin klorida i uree²⁵

Osim toga, važno je naglasiti da se raznim kombinacijama donora i akceptora vodikove veze, kao i promjenama omjera njihovih količina, može utjecati na svojstva eutektičnih otapala i tako ih prilagoditi primjeni u raznim područjima.³⁰ Eutektična otapala karakterizira i iznimna kemijska i termička stabilnost, nehlapljivost te nezapaljivost što su vrlo važne značajke zelenih otapala. Sve ovo otvara mogućnost njihove ponovne upotrebe, a također se sve više istražuje mogućnost izdvajanja i recikliranja pojedinih komponenti eutektičnih otapala.³⁰⁻³²

2.3. Proteini i enzimi

S obzirom da su bioprocesi jedno od područja koje je ključno za razvoj održivih procesa, biomakromolekule poput proteina i enzima privukle su mnogo pažnje jer su sve češće korištene u brojnim istraživanjima, proizvodima i granama industrije.^{10,18} Proteini su lanci od najmanje 50 aminokiselina koje su njihove temeljne građevne jedinice i sadržavaju bazičnu aminoskupinu te kiselu karboksilnu skupinu koje se međusobno povezuju peptidnim vezama. Struktura proteina je mnogo kompleksnija u odnosu na neke druge organske molekule pa se stoga pri njihovom opisu razlikuju četiri strukturne razine pri čemu primarna struktura podrazumijeva redoslijed aminokiselina u lancu. Sekundarna struktura tiče se prostornog usmjeravanja pojedinih dijelova u ponavljajuću strukturu te se razlikuju α -uzvojnica, odnosno spiralni oblik i β -nabrana ploča gdje je lanac istegnut. Tercijarna struktura opisuje svijanje cjelokupne molekule u određeni trodimenzionalni oblik koji je stabiliziran molekulskim interakcijama poput primjerice vodikove veze, dok kvaterna struktura prikazuje spajanje dviju ili više molekula proteina u veće strukture.³³ Osim što su ključne komponente živih organizama uz važnu ulogu u metabolizmu, ekspresiji gena te unutar- i izvanstaničnim strukturama, mnogi proteini mogu se koristiti u terapijske ili dijagnostičke svrhe, kao i u kozmetici, prehrambenoj industriji i mnogim drugim područjima.^{21,34}

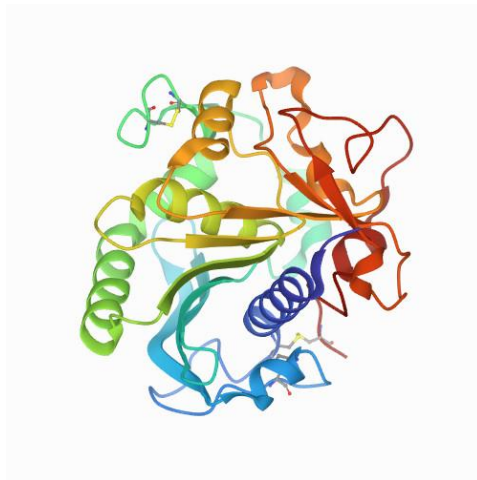
Enzimi su tvari koje su proizvedene u živim stanicama gdje ubrzavaju reakcije potrebne za obavljanje životnih funkcija, a mogu djelovati i izvan živih stanica pa se često koriste kao vrlo učinkoviti katalizatori u laboratorijima i industriji.³⁵ Po sastavu su proteini, no mnogi sadrže i neproteinski dio koji se naziva kofaktor, a djelovanje im je specifično što znači da pojedini enzim često katalizira samo određene vrste reakcija određenih tvari, odnosno supstrata. Smanjenje energije aktivacije i povećanje brzine reakcije enzimi omogućuju tako što prostorno usmjeravaju molekule u orijentaciju povoljnu za reakciju na način da se supstrat veže na odgovarajuće aktivno mjesto koje osigurava potrebne kisele ili bazične skupine.³³ Zbog brojnih prednosti enzima kao katalizatora u odnosu na konvencionalne industrijske katalizatore, sve se češće kemijski procesi katalizirani kiselinama ili lužinama zamjenjuju bioprocima. Naime, osim što su biorazgradivi, enzimi zahtijevaju niže operativne troškove jer ne nagriza opremu te im je katalitička aktivnost visoka pri blagim reakcijskim uvjetima pa je posljedično i potrošnja energije u procesu manja.³⁶ Također, zbog specifičnosti i selektivnosti enzima nastaje puno manje sporednih produkata što rezultira većom čistoćom produkta i time manjom potrebom za dodatnim pročišćavanjem produkata. Prepreke potpunoj zamjeni konvencionalnih katalizatora enzimima trenutno su njihova cijena, koja je još uvijek visoka, i postupan pad

aktivnosti enzima pri doticaju s određenim tvarima što otvara znatan prostor za napredak kroz istraživanja.³⁷

2.3.1. Enzim lipaza

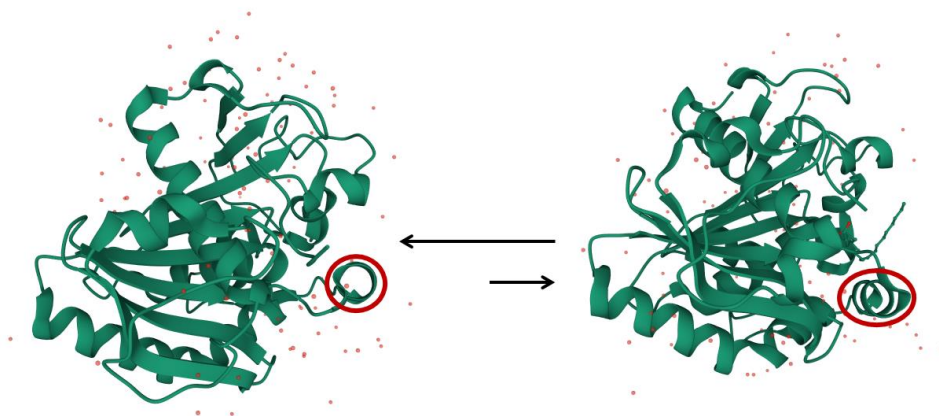
Jedan od najčešće korištenih enzima je lipaza koja pronalazi primjenu u brojnim granama industrije prvenstveno zbog svoje niske cijene. Ovome treba dodati i činjenicu da u usporedbi s ostalim enzimima konstantno raste količina komercijalno dostupnih lipaza počevši od njene prve upotrebe u industriji deterdženata.^{6,38,39} Enzim lipaza, čije je kemijsko ime triacilglicerol acilhidrolaza, katalizira reakcije hidrolize, esterifikacije, alkoholize, interesterifikacije i mnoge druge reakcije što znači da se može upotrebljavati kao katalizator u većem broju reakcija te za veći raspon supstrata umjesto jedne reakcije jednog supstrata, a to je također čini poželjnom za primjenu u industriji.³⁹ U teoriji se enzim lipaza može proizvesti iz bilo kojeg organizma kojem su potrebni enzimi za razgradnju masti, no najčešće je mikrobnog podrijetla te se dobiva iz gljiva i bakterija čiji uzgoj omogućuje jednostavnu masovnu proizvodnju.^{40,41}

Poseban komercijalni značaj ima enzim lipaza porijeklom iz gljive *Thermomyces lanuginosus*. *Thermomyces lanuginosus* je termofilna gljiva što čini enzime koje proizvodi stabilnijima čak i pri višim temperaturama.⁴⁰ Time su enzimi proizvedeni pomoću ove gljive prikladniji za upotrebu. Također je važno istaknuti nisku cijenu enzima lipaza porijeklom iz gljive *Thermomyces lanuginosus* u usporedbi s ostalim enzimima.^{6,40} Enzim lipaza sastoji se od proteinskog lanca molekulske mase 31.700 g/mol kojeg čini 269 aminokiselina, a njegova je trodimenzionalna struktura analizirana i potvrđena rendgenskom kristalografskom analizom te prikazana na Slici 5.^{39,42} Najveću aktivnost enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* postiže pri 40 °C i pH 9, a kao što je prethodno spomenuto stabilan je i pri većim temperaturama, odnosno zadržava aktivnost i pri temperaturama od oko 60 °C.^{6,39}



Slika 5. Molekulski model enzima lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* određen rendgenskom kristalografijom⁴²

Budući da lipaze općenito djeluju mehanizmom međufazne aktivacije, odnosno promjenom konformacije ukoliko se nalaze na međufaznoj površini, lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* imaju otvorenu i zatvorenu konformaciju (Slika 6.). U zatvorenoj konformaciji polipeptidni lanac zaklanja aktivna mjesta i odvaja ih od homogenog hidrofilnog medija te enzim u tom obliku nije aktivan. Prelazak u otvorenu konformaciju događa se pri doticaju s hidrofobnim molekulama čime nastaje međufazna površina, a polipeptidni se lanac pomiče i otkriva aktivne centre koji postaju dostupni za reakciju te enzim postaje aktivan.³⁹



Slika 6. Prikaz položaja polipeptidnog lanca (zaokružen crvenom bojom) pri prelasku enzima lipaza podrijetlom iz *Thermomyces lanuginosus* iz zatvorene (lijevo) u otvorenu konformaciju (desno)³⁹

Kao što je spomenuto, enzim lipaza koristi se u brojnim granama industrije, a to su, osim spomenute industrije deterdženata, industrija biogoriva budući da katalizira nastanak estera masnih kiselina, kozmetička i farmaceutska industrija, a ovaj enzim važan je i u obradi otpadnih voda te mnogim drugim područjima. S obzirom na toliko rasprostranjenu upotrebu enzima lipaza, jasno je da je nužno razviti održive, brze i jeftine procese njegove proizvodnje kako bi razvoj bioprocasa i prelazak na zelene tehnologije bio što uspješniji i učinkovitiji.⁴³ Zbog toga se sve više istražuje upotreba otpadnih materijala iz agroindustrije kao jeftinog i dostupnog supstrata za uzgoj mikroorganizama, kao što je primjerice korištenje kolača koji nastaje prešanjem pri proizvodnji raznih biljnih ulja. Komercijalizacija takvog postupka može donijeti znatnu dobit u ekonomskom i okolišnom smislu te učiniti proizvodnju enzima održivijom.⁴⁰

2.3.2. Pročišćavanje enzima

S obzirom na spomenuti rastući interes za primjenom proteina i enzima u industriji i proizvodima, često je važno enzime pročistiti prije upotrebe budući da se većinom dobivaju ekstrahiranjem iz materijala biološkog podrijetla. Naime, tijekom proizvodnje enzima se uglavnom dobivaju smjese proteina ili enzima s raznim nečistoćama i sporednim produktima koje je potrebno ukloniti, posebice ukoliko je riječ o proteinima koji se koriste u terapijske svrhe jer bi se u protivnom ugrozilo zdravlje pacijenta.^{18,34} Također, pročišćavanje kod enzima ima dodatno značenje budući da čišći uzorak donosi i veću katalitičku aktivnost što je vrlo bitno, posebice ako se enzimi koriste kao katalizatori u industrijskim procesima.⁴⁴ Dakle, osim samih procesa proizvodnje proteina i enzima potrebno je poboljšati i procese njihove prerade, odnosno procese pročišćavanja te je važno da oni budu brzi, učinkoviti i ekonomični. Naime, poboljšanja procesa pročišćavanja proteina i enzima su prijeko potrebna budući da ovi procesi mogu činiti i do 80 % troškova proizvodnog procesa jer se proteini vrlo lako denaturiraju i gube aktivnost u previše kiselim ili lužnatim uvjetima te pri većim temperaturama.^{23,34}

Međutim, najčešće korištene tradicionalne metode pročišćavanja proteina i enzima su kompleksne, dugotrajne i skupe, a također ih je vrlo teško prenijeti u veće mjerilo.¹⁸ Tradicionalne metode pročišćavanja uključuju postupke filtracije, centrifugiranja, elektroforeze, precipitacije, kromatografije i mnoge druge pri čemu se uobičajeno kombinira nekoliko postupaka za zadovoljavajuću čistoću uzorka. Isto tako, osim što se često isti postupak mora ponavljati više puta kako bi se dobila željena čistoća produkta - enzima, nabrojane postupke teško je provesti kontinuirano što dodatno usporava procese pročišćavanja.⁴⁴ Zbog ovih nedostataka sve je popularnije korištenje vodenih dvofaznih sustava za pročišćavanje

proteina i enzima budući da su prikladni i za osjetljive biomolekule te ne izazivaju njihova oštećenja.¹⁸

Primjerice, u sve istraživanim vodenim dvofaznim sustavima koji se sastoje od soli i eutektičnog otapala, proteini se ekstrahiraju iz faze bogate solju u fazu eutektičnog otapala u kojoj se nakuplja pročišćeni protein ili enzim.⁴⁵ Takav vodeni dvofazni sustav na bazi eutektičnog otapala pokazuje znatan potencijal pri pročišćavanju enzima lipaza budući da je pokazano kako lipaze u eutektičnim otapalima zadržavaju visoku aktivnost i stabilnost.^{6,46} Kao razlog tome navodi se formiranje vodikovih veza između enzima i komponenti eutektičnog otapala čime se enzim lipaza stabilizira uz rast aktivnosti pri prisutnosti određenog udjela vode koja je sastavni dio sustava.^{6,47}

2.4. Mikroekstraktor

Upotreba mikrotehnologije sve je češća u kemijskoj sintezi, proizvodnji energije, analitici i dijagnostici, no još je nedovoljno istražena u kontekstu biokatalitičkih procesa u farmaceutskoj i industriji finih kemikalija, kao i sličnim industrijama. S obzirom da mikrotehnologija omogućuje kontinuiranu proizvodnju i intenzifikaciju procesa, smatra se jednom od ključnih metoda zelenog inženjerstva za razvoj proizvodnih procesa zbog čega interes za njezino istraživanje u kombinaciji s bioprocima u industriji raste. Pod mikrotehnologijom se podrazumijevaju reakcijski i separacijski uređaji čija je barem jedna karakteristična dimenzija manja od milimetra pa se tako može govoriti o mikroreaktoru ili mikroseparatoru, ovisno o procesu koji se u mikrouređaju odvija.⁴⁸

2.4.1. Struktura i značajke mikroekstraktora

Mikroekstraktor je procesni uređaj čija je osnovna strukturna jedinica mikrokanal kružnog ili pravokutnog poprečnog presjeka s uobičajenim dimenzijama 10-500 μm zbog kojih ovakvi uređaji imaju brojne prednosti u odnosu na konvencionalne kontinuirane uređaje. Mikroekstraktori se mogu izvesti urezivanjem mikrokanala u elemente, odnosno pravokutne pločice od materijala prikladnog za korištene tvari. Urezivanje se provodi raznim tehnikama kao što su mokro jetkanje, fotolitografija ili lijevanje u kalupe, a od materijala najčešće su korišteni staklo, kvarc, silicij, nehrđajući čelik, kao i razni metali i polimeri. Element mikroekstraktora zatim se ugrađuje u čvrsto kućište čime se dobiva mikroekstraktorski čip, a jedan takav mikroekstraktor prikazan je na Slici 7.⁴⁹



Slika 7. Mikroekstraktor s dva ulaza “Y” oblika i jednim izlazom

Mikroekstraktori također mogu biti izvedeni u obliku zavojnice, a izrađeni su od politetrafluoretilenske (PTFE) cijevi i metalnih ili plastičnih spojnih elemenata u raznim oblicima (Slika 8.).⁶ Mikroekstraktori mogu imati nekoliko ulaznih i izlaznih tokova čije je spajanje odnosno razdvajanje izvedeno „Y“, „T“, „ψ“ ili „+“ spojnica, a procesni se tokovi u mikroekstraktor uvode preko vanjskih pumpi pomoću cijevi.^{6,49} Takva struktura omogućava jednostavno povećanje kapaciteta (eng. *numbering-up*), odnosno mjerila procesa paralelnim ili serijskim povezivanjem mikroekstraktora što je velika prednost u odnosu na klasično uvećanje procesa (eng. *scale-up*). Razlog tome je korištenje većeg broja jedinica iste veličine umjesto povećanja dimenzija opreme čime se izbjegava promjena značajki procesa, a time i komplicirani postupci razvoja i testiranja koji su neophodni kod klasičnog uvećanja procesa.



Slika 8. Mikroekstraktor izrađen od PTFE cijevi i plastičnog spojnog elementa u obliku „T“-spojnice

Još jedna prednost mikroekstraktora je velik omjer površine i volumena, najčešće u rasponu $10.000-50.000 \text{ m}^2/\text{m}^3$ što je posljedica malih dimenzija mikrokanala, a zbog čega je prijenos tvari i energije u ovakvim sustavima značajno brži. Također, uslijed smanjenja

dimenzija skraćuje se put prijenosa tvari i energije čime sam prijenos postaje intenzivniji, a proces separacije vrlo brz uz visoke učinkovitosti. Nadalje, brzina prijenosa tvari i topline te visoke učinkovitosti u procesima ekstrakcije uvjetuju potrebu za manjom količinom ulaznih procesnih struja, čime nastaju manje količine otpadnih procesnih struja, kao i manju potrošnju energije što ovu tehnologiju čini ekološki prihvatljivijom od konvencionalnih.⁵⁰

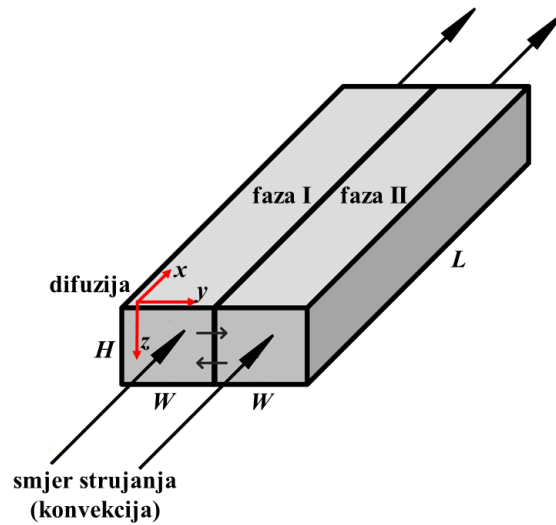
S obzirom na male dimenzije mikrokanala, tok fluida je obično laminaran što omogućuje jednostavnije postavljanje matematičkih modela za takve sustave, kao i olakšanu kontrolu procesa.^{49,50} Zbog toga, kao i zbog mogućnosti prilagodbe izvedbe i materijala od kojih su izrađeni te malih količina potrebnih tvari, mikroekstraktori nude iznimnu sigurnost pri provođenju procesa, posebice onih koji se provode pri ekstremnim uvjetima. Također, ukoliko je riječ o mikroreaktoru, odnosno mikrouređaju u kojem se provodi kemijska ili biokemijska reakcija, olakšana kontrola procesa donosi i znatnu selektivnost te pomak reakcije u željenom smjeru. Na taj način su produkti dobiveni u mikroreaktorima znatno čišći jer nastaje manje nusprodukata, a isto tako zaostaje mnogo manja količina reaktanata uslijed visokih postignutih učinkovitosti procesa.⁵⁰

Unatoč brojnim prednostima, postoje i problemi pri korištenju mikroekstraktora koji otvaraju prostor daljnjem istraživanju i usavršavanju ove tehnologije. Jedan od problema je moguće začepljenje mikroekstraktora uslijed malih dimenzija mikrokanala ako postoje čvrste čestice u sustavu ili je on vrlo viskoznan.³⁷ Također je zbog laminarnog toka važno voditi računa o hrapavosti mikrokanala koja ovisi o materijalu i tehnici izrade budući da u takvom režimu strujanja hrapavost ima znatan utjecaj na karakteristike procesa. Ukoliko su mikroekstraktori izrađeni od stakla ili kvarca, kao najčešćih materijala za njihovu izradu, probleme može stvarati i krhkost takvih sustava.⁴⁹

2.4.2. Matematički modeli procesa mikroekstrakcije

U svrhu ubrzavanja dizajna procesa i njegovog jednostavnijeg vođenja sve se češće koristi matematičko modeliranje procesa. Kako bi se postavili učinkoviti i primjenjivi matematički modeli procesa vrlo je važno utvrditi osnovne značajke sustava.³⁶ S obzirom da su mikroekstraktori kontinuirane izvedbe, za njih vrijedi da su otvoreni sustavi, odnosno da postoji izmjena tvari s okolinom. Također, veličine stanja poput koncentracije tvari mijenjaju se u prostoru, no nisu vremenski ovisne što znači da je riječ o stacionarnom procesu te da je za matematički opis takvog sustava potrebno postavljati bilance tvari za niz elemenata volumena.⁵¹ Nadalje, zbog malih dimenzija, za mikroekstraktore se može pretpostaviti uniforman profil

strujanja kroz poprečni presjek mikrokanala, a tok je laminaran uz paralelno strujanje dviju nemješljivih faza.



Slika 9. Shema mikrokanala u mikroekstraktoruz uz pojednostalvjeni prikaz prijenosa tvari između i unutar faza

U mikroekstraktorima postoje dvije faze između kojih se odvija prijenos tvari, a osim prijenosa tvari konvekcijom u smjeru strujanja potrebno je uzeti u obzir i difuziju koja se može odvijati u smjeru svih osi – x , y i z (Slika 9.). Prijenos tvari između faza odvija se samo na međufaznoj površini između dvaju paralelnih tokova, a može se opisati izrazom za faznu ravnotežu, odnosno preko koeficijenta raspodjele. S obzirom na sve prethodno navedene pretpostavke postavlja se matematički model procesa mikroekstrakcije koji se svodi na sustav bezdimenzijskih parcijalnih diferencijalnih jednačbi uz pripadajuće rubne i početne uvjete.⁵²

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U svrhu razvoja vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnog otapala za kontinuiranu ekstrakciju proteina, odnosno pročišćavanje enzima lipaza, pripravljeno je i karakterizirano šest različitih eutektičnih otapala. Pripremljen je niz vodenih dvofaznih sustava miješanjem komercijalnog enzima lipaza, vode, kalijeva hidrogenfosfata i eutektičnog otapala te je šaržnim pokusima ispitan utjecaj koncentracije soli i sastava eutektičnog otapala na učinkovitost procesa ekstrakcije proteina. Sustav s najvećom učinkovitošću ekstrakcije prenesen je u mikroekstraktor gdje je u nizu pokusa ispitan utjecaj vremena zadržavanja, ultrazvuka, temperature i promjera kanala na učinkovitost ekstrakcije proteina. Na temelju najveće postignute učinkovitosti ekstrakcije odabrane su optimalne značajke mikrosustava za ekstrakciju odabranim vodenim dvofaznim sustavom. Razvijena metoda kontinuirane ekstrakcije proteina vrednovana je upotrebom uzorka sirovog enzima lipaza proizvedenog fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče. Za odabrano eutektično otapalo ispitana je mogućnost recirkulacije u šaržnom i mikrosustavu uz upotrebu komercijalnog enzima lipaza, a dodatno i u mikrosustavu uz upotrebu uzorka sirove lipaze. Na kraju je proces mikroekstrakcije opisan 2D matematičkim modelom.

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U eksperimentima su korištene sljedeće kemikalije:

- betain, Sigma-Aldrich, Austrija
- Commassie Brillilant Blue G-250, Fluka, Švicarska
- etanol, Gram-Mol, Hrvatska
- etilen glikol, Gram-Mol, Hrvatska
- F.A.M.E. mix GLC-10, Sigma-Aldrich, Austrija
- glicerol, Sigma-Aldrich, Austrija
- glukoza, Fischer Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo
- goveđi serumski albumin, Sigma-Aldrich, Austrija
- jestivo suncokretovo ulje, Zvijezda, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat (KH_2PO_4), Lach:ner, Češka Republika
- kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4), Merck, Njemačka
- kolin klorid, Merck, Njemačka

- komercijalni enzim lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase 100L), Sigma-Aldrich, Austrija
- metanol, BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo
- ortofosforna kiselina, VWR Chemicals, SAD
- sirovi enzim lipaza proizveden fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče i ekstrahiran vodom, Prehrambeno-tehnološki fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Hrvatska
- urea, Sigma-Aldrich, Austrija

3.1.2. Oprema

Za provedbu eksperimenata korištena je sljedeća oprema:

- centrifuga, Universal 320 R, Hettich, SAD
- fluorescencijski spektrofotometar, Cary Eclipse, Varian, SAD
- FTIR spektrofotometar, Spectrum One, PerkinElmer, SAD
- inkubacijska tresilica, Innova 4330 Refrigerated Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, SAD
- kapilarna kolona, Zebron ZB-Wax GC, Phenomenex, SAD
- klipne pumpe, PHD 4400 Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, Holliston, MA, SAD
- magnetska miješalica, MS-H-S, DLAB, SAD
- nesterilni hidrofobni PTFE filtar za šprice, Chromafil Xtra RC-20/25 0,45 µm, Macherey-Nagel, Njemačka
- pH elektroda, BlueLine 16 pH, SI Analytics, Njemačka
- pH metar, Lab 860, Schott Instruments, Njemačka
- plinski kromatograf s FID detektorom, GC-2014, Shimadzu, Japan
- tresilica, ThermoMixer C, Eppendorf, Njemačka
- ultrazvučna kupelj, VTUSCT2, Velleman, Belgija
- UV-VIS spektrofotometar, UV-1601, Shimadzu, Japan
- UV-VIS spektrofotometar, UV-1800, Shimadzu, Japan

3.1.3. Priprema otopina i reagensa

- Bradford reagens

Bradford reagens pripremljen je otapanjem 100 mg bojila Commassie Brilliant Blue G-250 u mješavini 50 mL etanola i 100 mL ortofosforne kiseline te dopunjen ultračistom vodom do volumena od 1 L. Tako dobivena otopina potom je filtrirana te je reagens čuvan pri 4 °C u boci koja sprječava prodiranje svjetlosti. Prije upotrebe Bradford reagens bilo je potrebno zagrijati na sobnu temperaturu.

- fosfatni pufer, $c = 0,01$ mol/L, pH 7,4

Za pripremu fosfatnog pufera otopljeno je 0,174 g kalijevog hidrogenfosfata u 100 mL destilirane vode i 0,136 g kalijevog dihidrogenfosfata u 100 mL destilirane vode te su ovako dobivene otopine pomiješane u potrebnom omjeru za postizanje željene pH-vrijednosti.

3.2. Metode

3.2.1. Bradford test za mjerenje koncentracije proteina

Bradford test temelji se na vezanju boje Commassie Brilliant Blue G-250 sadržane u reagensu za proteine te je vrlo brz, jednostavan i osjetljiv, zbog čega je često korišten za određivanje koncentracije proteina.⁵³ Međutim, linearno područje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina u baždarnom se dijagramu pojavljuje u vrlo uskom rasponu koncentracija, najčešće 2-10 mg/L, što može predstavljati problem pri analizi. Iz tog razloga korišten je Bradford test koji je modificiran, odnosno lineariziran prema protokolu opisanom u radu Ernst i sur.⁵⁴ U plastičnu kivetu je dodano 500 μ L uzorka i 500 μ L Bradford reagensa te je ovako dobivena otopina kratko homogenizirana. Nakon točno 5 min spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija tako dobivenog uzorka pri $\lambda = 595$ nm i $\lambda = 450$ nm na UV-VIS spektrofotometru. Prethodno je pri valnim duljinama $\lambda = 595$ i $\lambda = 450$ nm bilo potrebno izmjeriti apsorbanciju plastičnih kiveta koje su sadržavale 1 mL deionizirane vode. Svi uzorci analizirani su u tri paralele. Koncentracija proteina u uzorku dobivena je iz baždarnog dijagrama (Prilog 1.) pri čemu je korišten omjer apsorbancija izmjerenih pri $\lambda = 595$ nm i $\lambda = 450$ nm. Baždarni dijagram izrađen je korištenjem otopine goveđeg serumskog albumina koncentracije 0,1 mg/mL, što odgovara apsorbanciji od 0,66 pri $\lambda = 280$ nm u kvarcnoj kivetu. Tako dobivena otopina razrjeđivana je na potrebne koncentracije u rasponu koncentracija 0,5-100 mg/L. Pritom je linearno područje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina u baždarnom dijagramu postignuto za koncentracije 0-50 mg/L.

3.2.2. Mjerenje koncentracije metilnih estera masnih kiselina i glicerola plinskom kromatografijom

Koncentracija metilnih estera masnih kiselina i glicerola određena je na plinskom kromatografu s FID detektorom i kapilarnom kolonom (dužina 30 m, unutarnji promjer 0,53 mm i debljina filma 1,00 μm) prema metodi opisanoj u radu Budžaki i sur.⁵⁵ Kolona se zagrijava brzinom od 5 °C/min počevši s temperaturom 180 °C uz završetak na 230 °C, dok FID detektor radi na 240 °C. Prema metodi, ukupno trajanje analize za svaki uzorak je 15 min, a kao plin nosilac korišten je dušik čiji je protok 1,97 mL/min. Smjesa F.A.M.E. mix GLC-10 korištena je kao standard za identifikaciju odgovarajućih metilnih estera masnih kiselina, kao i glicerola. Uzorci za analizu razrijeđeni su 100 puta kako bi koncentracije bile u području baždarnih dijagrama, a kao otapalo za pripremu uzoraka korišten je etanol. Nakon homogenizacije, uzorak je filtriran, prenesen u vijale i analiziran u triplicatima. Vremena zadržavanja za pojedine komponente bila su 7,74 min za palmitinske, 10,590 min za stearinske, 10,867 min za oleinske i 11,575 min za linolne estere. Vrijeme zadržavanja za glicerol je iznosilo 9,02 min, a koncentracije komponenti u uzorcima određene su na temelju baždarnih dijagrama (Prilozi 2.-6.).

3.2.3. Priprava i karakterizacija eutektičnih otapala

Eutektična otapala pripravljena su iz odabranih komponenti u potrebnom molarnom omjeru prikazanom Tablici 1. Eutektična otapala su pripravljena u čaši volumena 50 mL, a nakon dodatka odabranih komponenti i vode u potrebnom masenom udjelu (Tablica 1), sadržaj je miješan na magnetskoj miješalici 2 h pri 50 °C do formiranja homogene prozirne kapljevine. Tako pripremljenim eutektičnim otapalima izmjerena je pH-vrijednost. Gustoća pripremljenih eutektičnih otapala je određena piknometrijski, a viskoznost je izmjerena pomoću kapilarnog viskozimetra.

Tablica 1. Pripremljena eutektična otapala i njihove strukture

eutektično otapalo	kratica	molarni omjer komponenti	struktura	udio vode, % mas.
kolin klorid: urea	ChU	1:2		5
kolin klorid: glicerol	ChGly	1:2		-
kolin klorid: etilen glikol	ChEG	1:2		-
kolin klorid: glukoza	ChGlc	1:1		25
betain: glicerol	BGly	1:2		-
betain: urea	BU	1:3		40

3.2.4. Određivanje aktivnosti komercijalnog enzima lipaza u eutektnim otapalima

Aktivnost komercijalnog enzima lipaza u ispitivanim eutektnim otapalima određena je metodom početnih brzina na temelju provedbe reakcije transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja metanolom u šaržnom reaktoru (Slika 10.). U ovom reakcijskom sustavu je enzim lipaza katalizator o čijoj aktivnosti ovisi brzina reakcije, odnosno nastanak metilnih estera masnih kiselina (engl. *fatty acid methyl ester*, FAME).⁵⁵



Slika 10. Jednadžba kemijske reakcije transesterifikacije suncokretovog ulja metanolom katalizirana enzimom lipaza

Reakcija se provodila u plastičnim epruvetama od 2 mL u četiri paralele na tresilici pri 40 °C i 900 okr/min. Prije stavljanja na tresilicu, odnosno pokretanja reakcije, u epruvete je dodana reakcijska smjesa koja se sastojala od ulja, metanola i enzima suspendiranog u ispitivanom eutektnom otapalu ($\gamma_E = 0,1 \text{ g/mL}$) u masenom omjeru 1: 0,124: 0,1 te je tako dobivena smjesa homogenizirana. Po jedna epruveta uklonjena je s tresilice nakon 10, 20, 30 i 40 min provedbe reakcije te je svaka centrifugirana 10 min pri 40 °C i 14.000 okr/min. Nakon centrifugiranja odijelila su se tri sloja (Slika 11.) te je uzorak za određivanje FAME plinskom kromatografijom uzet iz srednjeg sloja, budući da je gornji sloj činio neizreagirani metanol, a donji eutektno otapalo. Na isti način ispitana je aktivnost enzima lipaza i u nizu uzoraka koji su sadržavali fosfatni pufer umjesto eutektnog otapala.



Slika 11. Slojevi u uzorku za određivanje aktivnosti komercijalnog enzima lipaza nakon centrifugiranja

Na temelju tih podataka dobiva se ovisnost koncentracije FAME o vremenu provedbe reakcije te se određuje nagib pravca na početku reakcije, odnosno kada je konverzija manja od 10 %. Iz dobivenog nagiba računa se specifična aktivnost enzima lipaza (S.A.) prema sljedećoj jednadžbi (Jednadžba (3)):

$$S. A. = \frac{d\gamma_{FAME}}{dt} \cdot \frac{m_r}{m_E} \cdot \frac{1}{\gamma_E} \quad (3)$$

gdje nagib pravca predstavlja član $\frac{d\gamma_{FAME}}{dt}$, a članovi m_r i m_E redom predstavljaju masu reakcijske smjese i masu enzima u istoj. Isti postupak primijenjen je za ispitivanje aktivnosti lipaze u fosfatnom puferu koji je upotrijebljen umjesto eutektičnog otapala u istoj količini.

3.2.5. Određivanje učinkovitosti ekstrakcije glicerola iz sintetiziranog biodizela primjenom eutektičnih otapala

S obzirom na sve češću upotrebu eutektičnih otapala u procesu sinteze biodizela kao reakcijskog, ali ujedno i ekstrakcijskog medija, testirana je mogućnost uklanjanja glicerola iz biodizela pomoću pripremljenih eutektičnih otapala.⁶ Biodizel, odnosno metilni esteri masnih kiselina sintetizirani su u šaržnom staklenom reaktoru s dvostrukom stijenkom ($V = 250$ mL) prema metodi opisanoj u radu Budžaki i sur.⁵⁵ U šaržni reaktor dodani su jestivo suncokretovo ulje, metanol i komercijalna lipaza suspendirana u fosfatnom puferu u masenom omjeru 1: 0,124: 0,1. Smjesa je konstantno miješana na magnetskoj miješalici pri 600 okr/min i temperaturi 40 °C, a reakcija je trajala 48 h nakon čega je reakcijska smjesa prebačena u lijevak za odjeljivanje. Nakon odjeljivanja u lijevku, u uzorku izuzetom iz gornjeg sloja, odnosno iz

sintetiziranog biodizela izmjerena je koncentracija glicerola plinskom kromatografijom. Potom su u plastičnim epruветama pomiješani po 1 g biodizela i 1 g ispitivanog eutektičnog otapala te su epruvete stavljene na tresilicu 2 h pri 40 °C i 900 okr/min. Po završetku ekstrakcije, epruvete su centrifugirane 10 min pri 40 °C i 14.000 okr/min te je iz gornjeg sloja uzet uzorak za određivanje koncentracije glicerola plinskom kromatografijom (Slika 12.).



Slika 12. Slojevi u uzorku za određivanje učinkovitosti ekstrakcije glicerola eutektičnim otapalima nakon centrifugiranja

3.2.6. Ispitivanje interakcije komercijalnog enzima lipaza i eutektičnih otapala

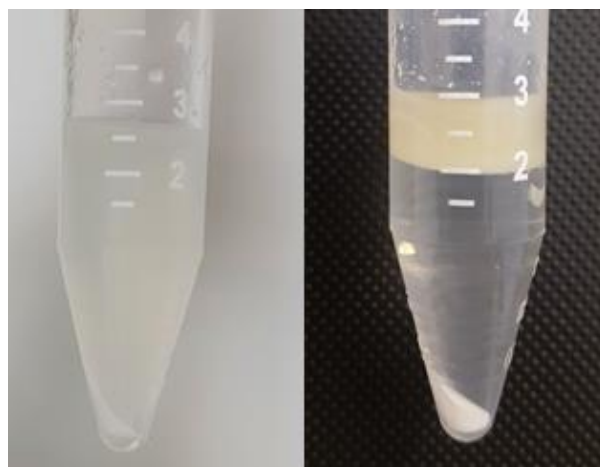
Kako bi se utvrdilo postoje li interakcije komercijalnog enzima lipaza s pripremljenim eutektičnim otapalima, odnosno utječe li pojedino otapalo na strukturu enzima, a time i njegovu aktivnost, korištene su UV-VIS, FTIR i fluorescencijska spektrofotometrija. Navedenim metodama izmjereni su spektri smjese enzima lipaza i eutektičnih otapala koji su potom uspoređeni sa spektrima otopine enzima u fosfatnom puferu i spektrima čistih eutektičnih otapala. Za mjerenje spektara UV-VIS spektrofotometrijom i FTIR spektrometrijom bilo je potrebno pripremiti smjesu komercijalnog enzima lipaza s ispitivanim eutektičnim otapalom uz volumni omjer 1: 2, dok je za mjerenje fluorescencijskog spektra dodano 20 μL komercijalnog enzima lipaza u 3 mL eutektičnog otapala uz valnu duljinu pobude $\lambda = 293 \text{ nm}$.

3.2.7. Šaržna ekstrakcija enzima lipaza

3.2.7.1. Odabir vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnog otapala za provedbu ekstrakcije enzima lipaza

U nizu eksperimenata provedenih u svrhu odabira vodenog dvofaznog sustava za ekstrakciju enzima lipaza, ispitane su promjene učinkovitosti ekstrakcije korištenjem različitih eutektičnih otapala uz različite koncentracije K_2HPO_4 u vodenoj otopini komercijalnog enzima

lipaza. Najprije je pripremljena početna otopina enzima dodatkom potrebne količine K_2HPO_4 za željenu koncentraciju soli u rasponu 0,3-0,9 g/mL te je izmjerena koncentracija proteina u tako dobivenoj otopini. Zatim je u Falcon epruvetama pomiješano 1,3 g analiziranog eutektičnog otapala i 2 mL početne otopine enzima te su tako dobiveni sustavi homogenizirani u inkubacijskoj tresilici 30 min pri 400 okr/min i temperaturi 25 °C. Nakon homogenizacije, smjesa je centrifugirana 5 min pri 4.000 okr/min i 25 °C nakon čega je, ukoliko su se odijelila dva sloja, izmjeren volumen svakog sloja. Slojevi su međusobno odvojeni pomoću šprice i igle kako bi se izbjeglo miješanje faza te je u svakoj od faza određena koncentracija proteina Bradford testom. Na Slici 13. prikazan je primjer jednofaznog sustava, odnosno sustava u kojem nije došlo do formiranja slojeva, te dvofazni sustav u kojemu je gornji sloj eutektično otapalo s ekstrahiranim enzimom lipaza, a donji otopina K_2HPO_4 .



Slika 13. Jednofazni sustav (lijevo) i dvofazni sustav (desno) pri šaržnoj ekstrakciji enzima lipaza

Iz dobivenih volumena i koncentracija izračunati su koeficijent raspodjele (Jednadžba (4)) i učinkovitost ekstrakcije proteina (Jednadžba (5)) u pojedinom sustavu korištenjem sljedećih jednadžbi:

$$K_P = \frac{\gamma_{P,G.F.}}{\gamma_{P,D.F.}} \quad (4)$$

$$E = \frac{\gamma_{P,G.F.} \cdot V_{G.F.}}{\gamma_{P,G.F.} \cdot V_{G.F.} + \gamma_{P,D.F.} \cdot V_{D.F.}} \quad (5)$$

gdje su $\gamma_{P,G.F.}$ i $\gamma_{P,D.F.}$ redom masene koncentracije proteina u gornjoj, odnosno donjoj fazi sustava, a $V_{G.F.}$ i $V_{D.F.}$ volumen gornje, odnosno donje faze. Na temelju izračunatih učinkovitosti

ekstrakcije enzima lipaza odabran je sustav u kojemu su provedeni svi daljnji pokusi, a kao optimalni sustav definiran je onaj u kojem je postignuta najveća učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza.

3.2.7.2. Ispitivanje ponovne upotrebe eutektičnog otapala

U svrhu ispitivanja ponovne upotrebe eutektičnog otapala provedene su tri serije pokusa. U prvoj seriji pokusa ispitivanja su provedena na način da je 1,3 g eutektičnog otapala pomiješano s 2 mL početne otopine enzima lipaza i K_2HPO_4 pri 25 °C, dok su druga i treća serija pokusa provedeni uz tri puta veće početne količine komponenti te pri temperaturama od 25 °C, odnosno 40 °C. Ekstrakcija je provedena dodatkom prethodno navedenih količina komponenti u Falcon epruvete koje su pri odabranim temperaturama homogenizirane na tresilici 30 min pri 400 okr/min. Nakon centrifugiranja koje je provedeno 5 min pri 4.000 okr/min i na temperaturi provedbe ekstrakcije, izmjereni su volumeni formiranih faza te je eutektično otapalo (gornji sloj) izdvojeno iz dvofaznog sustava i dodano novoj količini (2 ili 6 mL) svježje početne otopine enzima lipaza i K_2HPO_4 . Opisani postupak ponovljen je nekoliko puta, a učinkovitost ekstrakcije izračunata je na temelju mjerenja koncentracije proteina u početnoj otopini te u donjim slojevima formiranim nakon pojedinih ekstrakcijskih ciklusa. Za proračun učinkovitosti je Jednadžba (5) modificirana prema odgovarajućim mjernim podacima i glasi (Jednadžba (6)):

$$E = \frac{\gamma_{P,P.O.} \cdot V_{P.O.} - \gamma_{P,D.F.} \cdot V_{D.F.}}{\gamma_{P,P.O.} \cdot V_{P.O.}} \quad (6)$$

gdje su $\gamma_{P,P.O.}$ i $\gamma_{P,D.F.}$ redom masene koncentracije proteina u početnoj otopini i donjoj fazi sustava, a $V_{P.O.}$ i $V_{D.F.}$ volumen početne otopine dodane u sustav, odnosno donje faze.

3.2.8. Kontinuirana ekstrakcija enzima lipaza u mikroekstratoru

3.2.8.1. Odabir značajki mikrosustava

U svrhu intenzifikacije procesa ekstrakcije enzima lipaza provedeni su pokusi u mikroekstratorima oblika zavojnice izrađeni od teflonske cijevi s dva ulaza „T“ oblika, promjera kanala 500 ili 1000 μm i duljine 30 cm. Dvije plastične šprice prethodno su napunjene eutektičnim otapalom, odnosno početnom otopinom komercijalnog enzima lipaza i K_2HPO_4 te su pomoću klipnih pumpi ove otopine uvedene u mikroekstraktor (Slika 14.).



Slika 14. Aparatura za provedbu kontinuirane ekstrakcije enzima lipaza u mikroekstraktoru

Provedbi pokusa prethodio je odabir omjera volumnih protoka pri kojima pojedine otopine ulaze u mikroekstraktor. Omjer volumnih protoka određen je odabirom protoka faza eutektičnog otapala i početne otopine koji su rezultirali volumnim omjerom faza 1: 2 u uzorku na izlazu iz mikroekstraktora kakav je bio i u šaržnim pokusima. Ispitani su omjeri volumnih protoka eutektičnog otapala i početne otopine od 1: 2 do 1: 1,5. Uz omjer volumnih protoka pri kojem je postignut željeni volumni omjer faza 1: 2 u uzorku provedeni su svi daljnji pokusi u mikroekstraktoru. Proces ekstrakcije enzima lipaza proveden je pri vremenima zadržavanja, odnosno volumnim protocima prikazanim u Tablici 2. za korištene promjere kanala mikroekstraktora.

Tablica 2. Vremena zadržavanja i protoci za korištene promjere kanala mikroekstraktora

τ , min	$d = 1000 \mu\text{m}$		$d = 500 \mu\text{m}$	
	q_v (eutektično otapalo), $\mu\text{L}/\text{min}$	q_v (početna otopina), $\mu\text{L}/\text{min}$	q_v (eutektično otapalo), $\mu\text{L}/\text{min}$	q_v (početna otopina), $\mu\text{L}/\text{min}$
0,05	1683,0	3029,4	420,7	757,3
0,10	841,5	1514,7	210,4	378,7
0,20	420,7	757,3	105,2	189,3
0,25	336,6	605,9	84,1	151,5
0,30	280,5	504,9	70,1	126,2
0,50	168,3	302,9	42,1	75,7
1,00	84,1	151,5	21,0	37,9
3,00	28,0	50,5	7,0	12,6

Ukupno je provedeno pet različitih pokusa pri uvjetima navedenim u Tablici 3. pri čemu su korištena dva promjera kanala mikroekstraktora (500 ili 1000 μm) i dvije temperature (25 ili 40 $^{\circ}\text{C}$). Uz to analiziran je i utjecaj ultrazvuka na način da je dio pokusa proveden u mikroekstraktoru uronjenom u ultrazvučnu kupelj kako bi se razbile nakupine čestica koje su se pojavljivale u početnoj otopini i uzrokovale probleme sa začepljenjem kanala mikroekstraktora.

Tablica 3. Uvjeti provede procesa kontinuirane ekstrakcije enzima lipaza u mikroekstraktoru

pokus	$d, \mu\text{m}$	$t, ^{\circ}\text{C}$	ultrazvuk
1.	1000	25	-
2.	1000	25	+
3.	1000	40	-
4.	500	25	-
5.	500	25	+

Ukupno je na izlazu iz mikroekstraktora u plastične epruvete prikupljeno 300 μL uzorka koji je centrifugiran 5 min pri 4.000 okr/min i 25 $^{\circ}\text{C}$. Izmjereni su volumeni oba sloja koji su se nakon centrifugiranja formirali, a zatim je u svakom od slojeva izmjerena koncentracija proteina Bradford testom te izračunata učinkovitost ekstrakcije pomoću Jednadžbe (5). Sustav u kojem je postignuta najveća učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza odabran je za ispitivanje ponovne upotrebe eutektičnog otapala pri čemu je umjesto komercijalnog enzima lipaza u početnoj otopini korišten sirovi ekstrakt enzima lipaza dobiven fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče i ekstrahiran vodom, a sve u svrhu provjere metode na realnom uzorku enzima.

3.2.8.2. Ispitivanje ponovne upotrebe eutektičnog otapala

U mikroekstrakcijskom sustavu koji je prethodno odabran kao optimalan, ispitana je mogućnost ponovne upotrebe eutektičnog otapala. Tijekom provedbe kontinuirane ekstrakcije sakupljano je 8 mL uzorka te je nakon svakog ciklusa uzorak centrifugiran 5 min pri 4.000 okr/min i na temperaturi pri kojoj je provedena ekstrakcija. Nakon razdjeljivanja faza, izmjeren je volumen svake faze te je gornji sloj koji je bio eutektično otapalo ponovno korišten u idućem ciklusu kontinuirane ekstrakcije zajedno sa svježom početnom otopinom komercijalnog enzima lipaza i K_2HPO_4 . Postupak je ponovljen nekoliko puta, dok je učinkovitost ekstrakcije izračunata prema Jednadžbi (6) temeljem mjerenja koncentracije proteina u donjem sloju svakog uzorka i koncentracije proteina u početnoj otopini. Eksperiment je proveden pri

prethodno određenim optimalnim procesnim uvjetima s komercijalnim enzimom lipaza i sirovim ekstraktom enzima lipaza dobivenim fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče i ekstrahiranim vodom.

3.2.9. Matematičko modeliranje procesa ekstrakcije enzima lipaza u mikroekstraktoru

Proces ekstrakcije enzima lipaza u mikroekstraktoru opisan je 2D matematičkim modelom koji uključuje konvekciju u smjeru strujanja (x) te difuziju u dva smjera (x i y) kao što je predloženo u radu Miličević i sur.³ Uz pretpostavku stacionarnih uvjeta u mikroekstraktoru, postavljene su parcijalne diferencijalne jednačbe s pripadajućim rubnim i početnim uvjetima za koncentraciju proteina u fazi eutektičnog otapala (Jednačba (7)):

$$\begin{aligned}
 u \cdot \frac{\partial \gamma_{P,DES}}{\partial \xi} &= \frac{D_{P/DES}}{W} \cdot \left(\frac{\partial^2 \gamma_{P,DES}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \gamma_{P,DES}}{\partial \psi^2} \right) & (7) \\
 \gamma_{P,DES}(0, \psi) &= 0 & -1 \leq \psi \leq 0 \\
 \frac{\partial \gamma_{P,DES}\left(\frac{L}{W}, \psi\right)}{\partial \xi} &= 0 & -1 \leq \psi \leq 0 \\
 \gamma_{P,DES}(\xi, 0) &= \frac{D_{P/K_2HPO_4}}{D_{P/DES}} \cdot \frac{\partial \gamma_{P,K_2HPO_4}}{\partial \psi} & 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W} \\
 \frac{\partial \gamma_{P,DES}(\xi, -1)}{\partial \psi} &= 0 & 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}
 \end{aligned}$$

i fazi s otopljenim K_2HPO_4 (Jednačba (8)):

$$\begin{aligned}
 u \cdot \frac{\partial \gamma_{P,K_2HPO_4}}{\partial \xi} &= \frac{D_{P/K_2HPO_4}}{W} \cdot \left(\frac{\partial^2 \gamma_{P,K_2HPO_4}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \gamma_{P,K_2HPO_4}}{\partial \psi^2} \right) & (8) \\
 \gamma_{P,K_2HPO_4}(0, \psi) &= 0 & 0 \leq \psi \leq 1 \\
 \frac{\partial \gamma_{P,K_2HPO_4}\left(\frac{L}{W}, \psi\right)}{\partial \xi} &= 0 & 0 \leq \psi \leq 1 \\
 \gamma_{P,K_2HPO_4}(\xi, 0) &= K_P \cdot \gamma_{P,DES}(\xi, 0) & 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W} \\
 \frac{\partial \gamma_{P,K_2HPO_4}(\xi, -1)}{\partial \psi} &= 0 & 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}
 \end{aligned}$$

Difuzijski koeficijent enzima lipaza u fazi eutektičnog otapala i fazi s otopljenim K_2HPO_4 izračunati su korištenjem Hayduk-Laudie empirijske korelacije (Jednadžba (9)):

$$D_{P/DES(K_2HPO_4)} = \frac{13,26 \cdot 10^{-5}}{\eta_B^{1,4} \cdot V_S^{0,589}} \quad (9)$$

Sustav parcijalnih diferencijalnih jednadžbi riješen je korištenjem metode konačnih razlika uz diskretizaciju na statičku mrežu s jednakim udaljenostima pomoću programskog paketa Mathematica 10.0 (Wolfram Research, SAD). Korišteni kod prikazan je u Prilogu 7., a provedene su i statističke analize podataka dobivenih eksperimentom i proračunatih modelom.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu razvijen je vodeni dvofazni sustav na bazi eutektičnog otapala za kontinuiranu ekstrakciju proteina u mikroekstraktoru, odnosno pročišćavanje komercijalnog enzima lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*. Odabir eutektičnog otapala i potrebne koncentracije otopljenog K_2HPO_4 u sustavu provedeni su šaržnom ekstrakcijom pri čemu je kriterij za odabir optimalnih uvjeta bila najveća učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza. Odabrani sustav prenesen je u mikroekstraktor te su nakon niza pokusa provedenih pri različitim temperaturama i promjerima kanala mikroekstraktora te u pokusima s i bez ultrazvuka odabrani optimalni uvjeti provedbe kontinuiranog procesa ekstrakcije enzima lipaza u mikrosustavu. Ispitan je i kapacitet eutektičnog otapala, odnosno mogućnost njegove ponovne upotrebe u šaržnom i mikrosustavu, a pri optimalnim uvjetima proveden je i pokus gdje je enzim lipaza ekstrahiran iz sirovog ekstrakta dobivenog *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče i ekstrahiranog vodom. Također je ispitan kapacitet eutektičnog otapala u mikrosustavu sa sirovim ekstraktom enzima lipaza, a proces mikroekstrakcije opisan je 2D matematičkim modelom.

4.1. Odabir i karakterizacija eutektičnih otapala

S obzirom da eutektična otapala mogu biti pripremljena korištenjem različitih kombinacija donora i akceptora vodikove veze koji znatno utječu na svojstva samih otapala, prije pripreme bilo je potrebno odabrati komponente koje su se u literaturi pokazale najprikladnijima za ekstrakciju proteina ili korištenje u sustavima koji sadrže enzim lipaza.

Kada je riječ eutektičnim otapalima koja se koriste u sustavima gdje se nalaze proteini i enzimi, kolin klorid i betain se ističu kao dva najčešće korištena akceptora vodikove veze.⁵ Eutektična otapala s kolin kloridom pokazala su se prikladnim medijima u reakcijama kataliziranim enzimom lipaza kao što su transesterifikacija, alkoholiza i esterifikacija jer stabiliziraju ovaj enzim.⁵⁶ Eutektična otapala s betainom kao donorom vodikove veze pokazala su se vrlo učinkovitim pri ekstrakciji proteina u radu Li i sur.⁵, a također se u radu Fernandez-Lafuentea³⁹ navodi kako betain povećava termičku stabilnost i štiti strukturu enzima lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*. Stoga su kolin klorid i betain odabrani kao donori vodikove veze s najvećim potencijalom za učinkovitu ekstrakciju proteina, odnosno pročišćavanje enzima lipaza.

Pretraživanjem literature odabrana su i četiri različita donora vodikove veze, a to su etilen glikol, glicerol, glukoza i urea. Etilen glikol je uzet u obzir jer su eutektična otapala koja ga sadrže pokazala izrazitu učinkovitost ekstrakcije fenolnih komponenti, a također se koristi i pri

sintezi biodizela kataliziranoj enzimom lipaza.^{3,6,57} Isto tako, visoka aktivnost enzima lipaza postignuta je u reakciji transesterifikacije provedenoj u radu Gorke i sur.⁵⁸ uz prisutnost eutektičnih otapala koja sadrže glicerol, a koja se često koriste pri enzimatskoj sintezi biodizela.⁶ Glukoza je odabrana jer je u radu Elgharbawy i sur.⁵⁹ pokazano kako je aktivnost enzima lipaza povećana u eutektičnim otapalima koja ju sadrže. U radu Zeng i sur.⁴⁵ primjenom eutektičnih otapala koja su sadržavala ureu postignuta je učinkovitost ekstrakcije goveđeg serumskog albumina veća od 99 % pa je stoga i urea uzeta u obzir kao akceptor vodikove veze.

Na temelju odabranih akceptora i donora vodikove veze te njihovih kombinacija pripravljeno je šest različitih eutektičnih otapala prikazanih u Tablici 1., od kojih su neka sadržavala i vodu jer bez dodatka vode nije bilo moguće prirediti eutektično otapalo. Izmjerene su gustoće, viskoznosti i pH pripremljenih eutektičnih otapala, a rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 4. Isto tako, za formiranje vodenog dvofaznog sustava na bazi eutektičnog otapala potrebna je i sol topljiva u vodi u visokim koncentracijama. Za tu svrhu često se koriste kalijevi ili natrijevi di- ili hidrogenfosfati, a u ovom radu korišten je kalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4).^{3,5,45}

Tablica 4. Neka fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih eutektičnih otapala

eutektično otapalo	ρ , g/mL	pH, -	η (25°C), mPas	ν (25 °C), mm ² /s
ChU	1,185	9,32	30,686±0,711	25,895±0,186
ChGly	1,150	5,32	53,099±0,892	46,173±0,776
ChEG	1,135	6,98	15,536±0,036	13,688±0,032
ChGlc	1,265	5,69	38,785±0,220	30,660±0,174
BGly	1,180	9,25	212,193±4,181	179,825±3,543
BU	1,190	9,25	3,472±0,019	2,918±0,016

4.2. Šaržna ekstrakcija enzima lipaza u različitim vodenim dvofaznim sustavima na bazi eutektičnih otapala

Vodeni dvofazni sustav na bazi eutektičnih otapala pogodan za ekstrakciju proteina, odnosno pročišćavanje enzima lipaza odabran je temeljem rezultata provedenih šaržnih pokusa. Pritom su ekstrakcijski sustav činili jedno od pripremljenih eutektičnih otapala i otopina komercijalnog enzima lipaza s određenom koncentracijom K_2HPO_4 . Provedeno je 35 eksperimenata s pet eutektičnih otapala (ChU, ChGly, ChEG, ChGlc i BGly). Koncentracije soli manje od 0,3 g/mL nisu korištene jer pri toj koncentraciji ni s jednim eutektičnim otapalom nije došlo do formiranja dvije faze. Slično ponašanje uočeno je u radu Miličević i sur.³ pri ekstrakciji polifenola gdje do formiranja dvije faze nije došlo pri koncentracijama soli manjim

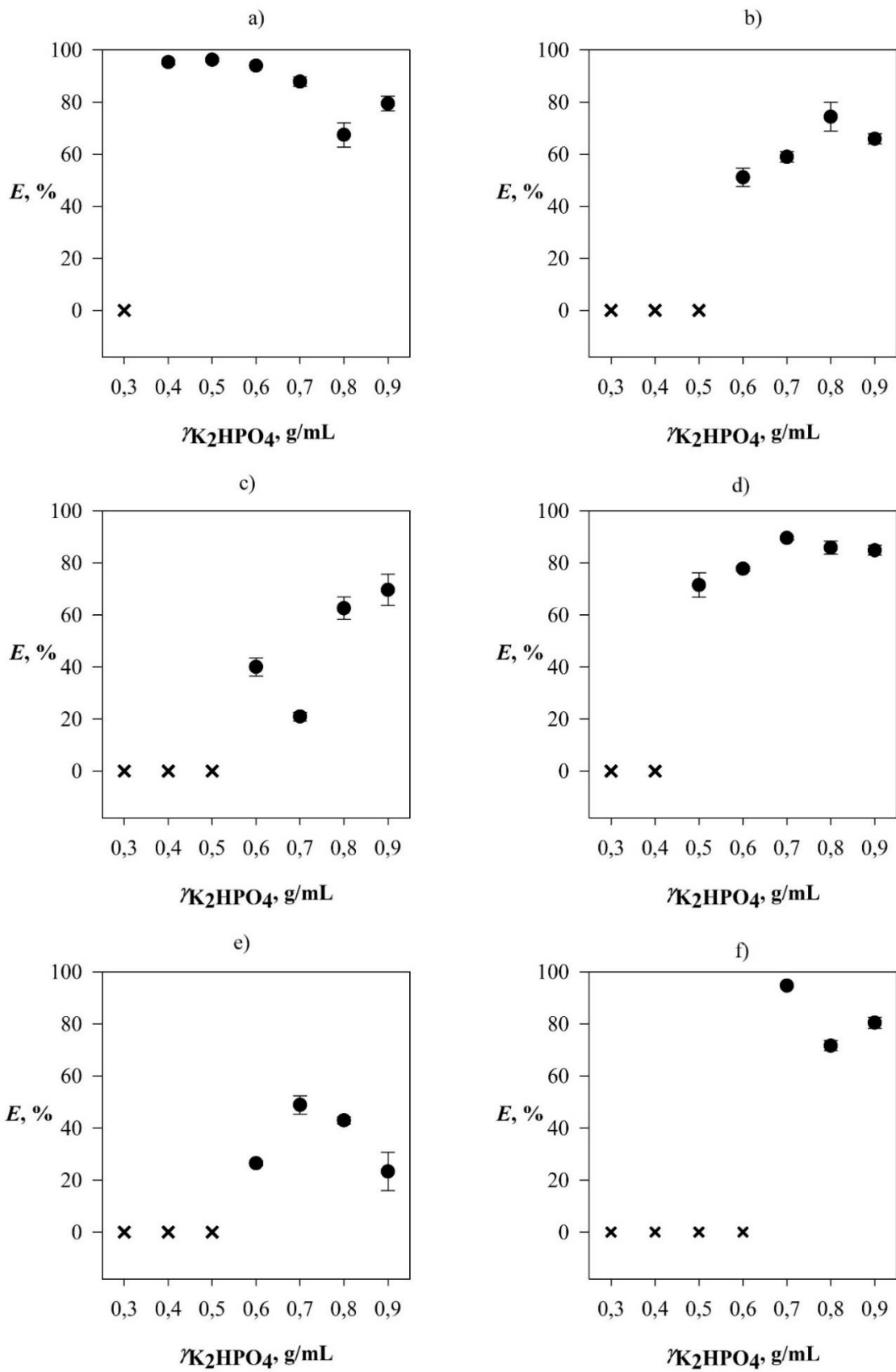
od 0,3 g/mL. U sustavima u kojima su se formirale dvije faze, koncentracije proteina u obje faze određene su Bradford testom te su izračunate učinkovitosti ekstrakcije enzima lipaza i koeficijenti raspodjele (Tablica 5.).

Tablica 5. Utjecaj koncentracije soli na učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza i koeficijent raspodjele za vodene dvofazne sustave na bazi eutektičnih otapala (ChU, ChGly, ChEG, ChGlc, BGly i BU)

eutektično otapalo	$\gamma_{K_2HPO_4}$, g/mL	K_P , -	E , %
ChU	0,9	2,990±0,514	79,433±2,849
	0,8	1,051±0,239	67,391±4,681
	0,7	4,877±0,786	87,844±1,771
	0,6	7,840±0,605	93,989±0,438
	0,5	12,930±1,990	96,231±0,603
	0,4	10,363±2,077	95,315±0,828
	0,3	nema formiranja faza	
ChGly	0,9	11,787±3,042	69,644±6,044
	0,8	15,243±2,993	62,597±4,345
	0,7	1,326±0,138	20,946±1,704
	0,6	3,351±0,475	40,021±3,513
	0,5	nema formiranja faza	
	0,4	nema formiranja faza	
	0,3	nema formiranja faza	
ChEG	0,9	2,793±1,147	23,309±7,393
	0,8	3,763±0,212	42,925±1,365
	0,7	6,244±0,889	48,867±3,510
	0,6	1,439±0,069	26,450±0,936
	0,5	nema formiranja faza	
	0,4	nema formiranja faza	
	0,3	nema formiranja faza	
ChGlc	0,9	11,321±1,750	84,859±1,868
	0,8	9,344±2,113	85,910±2,545
	0,7	17,248±1,386	89,581±0,740
	0,6	17,526±0,999	77,781±1,007
	0,5	12,829±3,211	71,515±4,699
	0,4	nema formiranja faza	
	0,3	nema formiranja faza	
BGly	0,9	3,344±0,301	65,878±2,029
	0,8	5,178±1,568	74,334±5,530
	0,7	7,193±0,618	58,938±2,030
	0,6	3,452±0,482	51,101±3,554
	0,5	nema formiranja faza	
	0,4	nema formiranja faza	
	0,3	nema formiranja faza	
BU	0,9	5,658±0,777	80,456±2,152
	0,8	2,530±0,239	71,602±1,936
	0,7	17,889±1,227	94,695±0,334
	0,6	nema formiranja faza	
	0,5	nema formiranja faza	
	0,4	nema formiranja faza	
	0,3	nema formiranja faza	

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je najveća učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza ($E = 96,231 \pm 0,603$ %) postignuta u sustavu s ChU uz koncentraciju soli od 0,5 g/mL, dok je drugi sustav po učinkovitosti bio onaj s ChGlc ($E = 89,581 \pm 0,740$ %) gdje je najveća učinkovitost postignuta uz koncentraciju soli 0,7 g/mL. Općenito se može uočiti kako su veće učinkovitosti ekstrakcije enzima lipaza ostvarene u sustavima s kolin kloridom kao akceptorom vodikove veze u odnosu na sustav koji su činili BGly i betain. Međutim, ukoliko se usporede sustavi s istim donorom vodikove veze, a to su oni koji sadrže ChGly i BGly, vidljivo je da su učinkovitosti ekstrakcije veće u sustavu u kojem je korišten BGly. Stoga je sintetizirano eutektično otapalo BU kako bi se eventualno dodatno povećala učinkovitost ekstrakcije postignuta pomoću sustava ChU. Najveća učinkovitost ekstrakcije u sustavu s BU iznosila je $94,695 \pm 0,334$ % uz koncentraciju soli od 0,7 g/mL što znači da je promjenom donora vodikove veze maksimalna učinkovitost porasla za oko 20 % u odnosu na sustav s BGly, što je vjerojatno posljedica male viskoznosti sustava s BU (Tablica 4.) čime je omogućena bolja mješljivost faza. Usporedbom sustava s ChU i BU vidljivo je kako maksimalne postignute učinkovitosti ekstrakcije imaju sličnu vrijednost, no istovremeno se koeficijenti raspodjele znatno razlikuju. Naime, u sustavu s ChU koeficijent raspodjele iznosio je $12,930 \pm 1,990$, dok je u sustavu s BU on bio $17,889 \pm 1,227$.

Vidljivo je kako koncentracija soli ima značajan utjecaj i na formiranje faza i na učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza. S obzirom da je u vodenim dvofaznim sustavima potrebno postići kritične koncentracije dviju komponenti u vodi, a to su u ovom slučaju eutektično otapalo i sol, potrebno je razmotriti i čimbenike koji utječu na iznos kritične koncentracije, odnosno na formiranje faza.¹⁷ Prema literaturi⁵, najvažniji čimbenik za formiranje faza je hidrofilnost eutektičnog otapala. Što je eutektično otapalo hidrofilnije, to je potrebna veća količina soli kako bi se faze odvojile, što je vidljivo u slučaju sustava s BU u kojem se faze formiraju tek pri koncentraciji soli od 0,7 g/mL. To ga čini najhidrofilnijim od šest ispitanih eutektičnih otapala, a mogući razlog tome je visok sadržaj vode u tom otapalu koji iznosi 40 %.

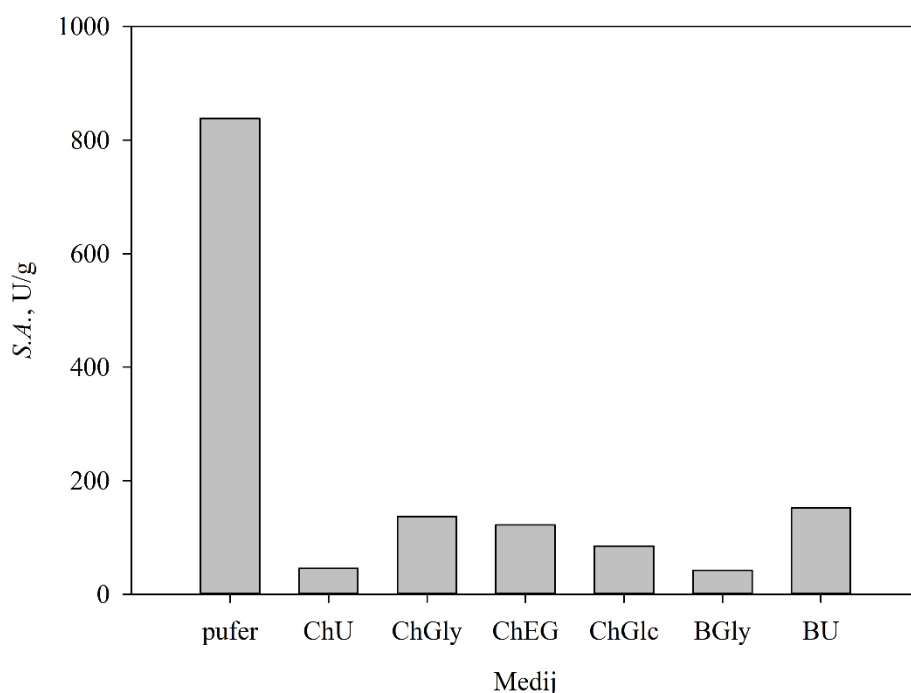


Slika 15. Utjecaj koncentracije K_2HPO_4 na učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza u vodenim dvofaznim sustavima na bazi: a) ChU, b) BGly, c) ChGly, d) ChGlc, e) ChEG i f) BU (x – nema formiranja faza, • – dvofazni sustav)

Što se tiče utjecaja koncentracije soli na učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza, iz rezultata koji su prikazani na Slici 15. vidljivo je da se u većini slučajeva učinkovitost ekstrakcije prvo povećava s povećanjem koncentracije soli, ali se nakon određene vrijednosti koncentracije soli učinkovitost ekstrakcije smanjuje. Kao razlog tome u literaturi⁵ se navodi da je rast učinkovitosti ekstrakcije uzrokovan smanjenjem topljivosti proteina u donjoj fazi uslijed veće koncentracije soli čime proteini prelaze u gornju fazu s eutektnim otapalom. S druge strane, pad učinkovitosti ekstrakcije nakon određene koncentracije soli uzrokovan je smanjenjem količine vode u gornjoj fazi zbog čega se proteini u njoj slabije otapaju i prelaze u donju. Naime, udio vode je vrlo važan čimbenik za otapanje proteina u vodenim dvofaznim sustavima te je ona potrebna u određenom udjelu kako bi proces ekstrakcije bio uspješan.

4.3. Reakcija transesterifikacije katalizirane enzimom lipaza u sustavu s eutektnim otapalom

Kako bi se odabrao prikladan vodeni dvofazni sustav na bazi eutektnog otapala za ekstrakciju enzima lipaza provedene su i neke dodatne analize. Tako je ispitana specifična aktivnost enzima lipaza u pripremljenim eutektnim otapalima na primjeru reakcije transesterifikacije katalizirane ovim enzimom. Specifične aktivnosti enzima lipaza u fosfatnom puferu i u pripremljenim eutektnim otapalima prikazane su na Slici 16.



Slika 16. Specifična aktivnost komercijalnog enzima lipaza u različitim medijima

Iz dobivenih rezultata vidljiv je znatan pad aktivnosti enzima lipaza u eutektnim otapalima u odnosu na njegovu aktivnost u puferu, odnosno vodenom mediju. Od svih pripremljenih eutektnih otapala najveća specifična aktivnost enzima lipaza postignuta je u eutektnom otapalu BU. S obzirom da je udio vode u sustavima važan čimbenik aktivnosti enzima lipaza, upravo je visok postotak vode od 40 % u tom eutektnom otapalu mogući razlog takvom rezultatu. Također, dodatan porast aktivnosti vjerojatno uzrokuje i pH-vrijednost BU koja iznosi 9,25 što je blisko optimalnoj pH-vrijednosti za aktivnost enzima lipaza porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus* koji je prema literaturi pH = 9.³⁹ Naime, određen postotak vode u sustavu je potreban lipazi kako bi očuvala svoju 3D strukturu te se u literaturi kao optimalan maseni udio vode u sustavu navodi 6,6 %.⁶ S obzirom da je u reakcijskom sustavu s BU maseni udio vode oko 3,3 %, manja specifična aktivnosti u odnosu na sustav s fosfatnim puferom je očekivan. Slično je i kod sustava koje formiraju ostala pripravljena eutektna otapala gdje je udio vode u sustavu još i manji.

Osim ispitivanja aktivnosti enzima lipaza u različitim eutektnim otapalima, provedena je i ekstrakcija glicerola iz sintetiziranog biodizela u pripremljenim eutektnim otapalima. Ova istraživanja su provedena jer se upravo eutektna otapala u zadnje vrijeme ističu kao poželjni i prihvatljivi sustavi za njegovo pročišćavanje.^{6,31} Rezultati ekstrakcije glicerola iz sintetiziranog biodizela s pripremljenim eutektnim otapalima su prikazani u Tablici 6. Može

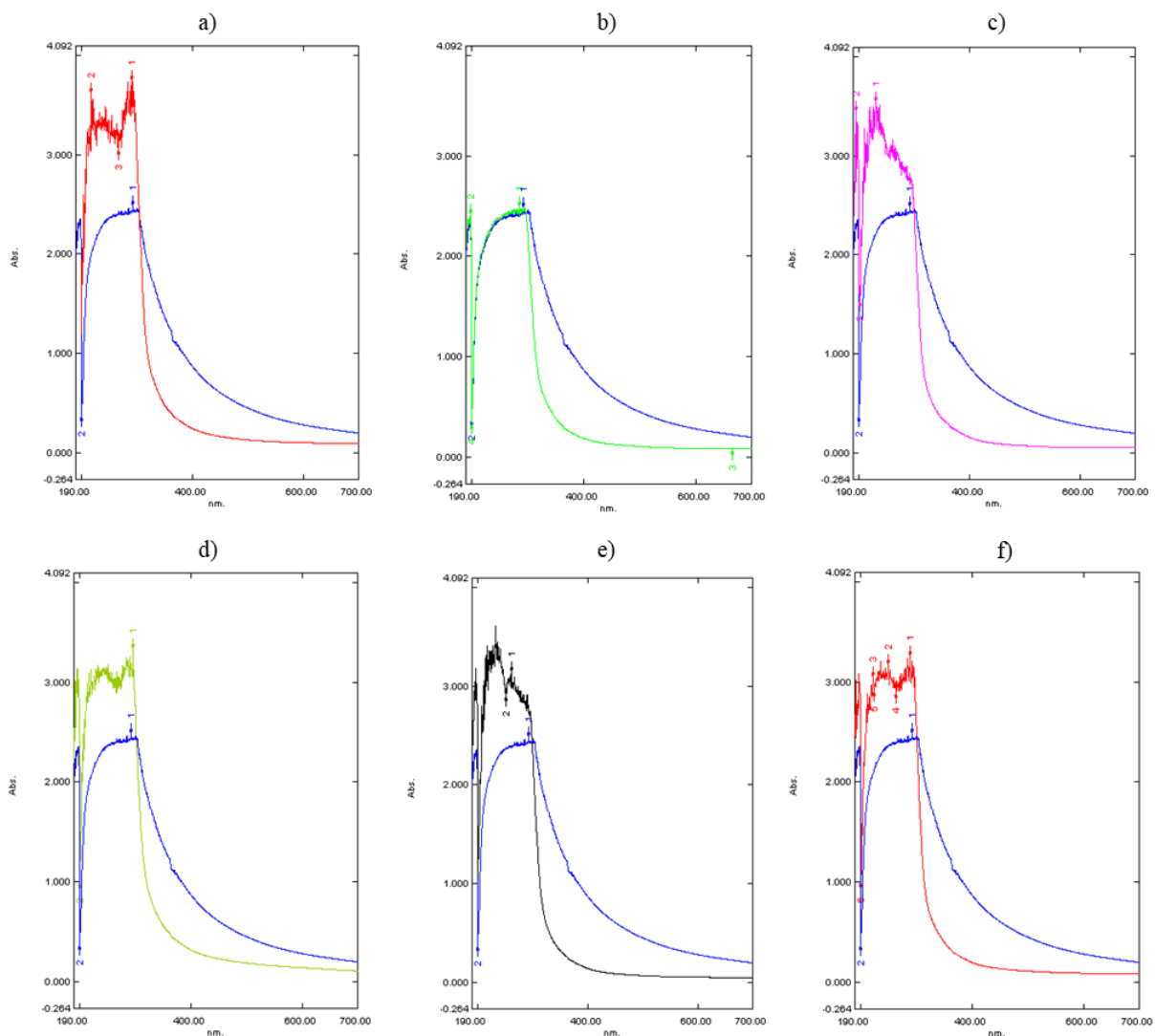
se uočiti kako je pomoću BU eutektičnog otapala postignuta najveća učinkovitost ekstrakcije glicerola koja je iznosila $25,918 \pm 4,759$ %. Razlog tome vjerojatno je opet povezan s najmanjom viskoznošću BU u odnosu na ostala eutektična otapala što je i ovdje omogućilo bolje miješanje faza i lakši prelazak glicerola iz biodizela u eutektično otapalo.

Tablica 6. Učinkovitost ekstrakcije glicerola iz sintetiziranog biodizela s pripremljenim eutektičnim otapalima

eutektično otapalo	učinkovitost ekstrakcije glicerola, %
ChU	$19,184 \pm 0,738$
ChGly	$20,461 \pm 3,588$
ChEG	$15,209 \pm 2,360$
ChGlc	$11,214 \pm 1,090$
BGly	$20,802 \pm 3,130$
BU	$25,918 \pm 4,759$

4.4. Međudjelovanje eutektičnih otapala i enzima lipaza

Prema istraživanju provedenom od Xu i sur.⁶⁰, u prisustvu eutektičnih otapala moguće su promjene u sekundarnoj strukturi enzima lipaza zbog potencijalnog negativnog djelovanja komponenti eutektičnog otapala, što bi objasnilo pad aktivnosti enzima. S obzirom na to provedena su ispitivanja u svrhu utvrđivanja eventualnih promjena konformacije enzima lipaza pri ekstrakciji eutektičnim otapalima. Pritom je korištena UV-VIS spektrofotometrija te su uspoređeni spektri enzima lipaza u fosfatnom puferu kao referentnom otapalu sa spektrima enzima lipaze u pripremljenim eutektičnim otapalima, a izmjereni spektri prikazani su na Slici 17.



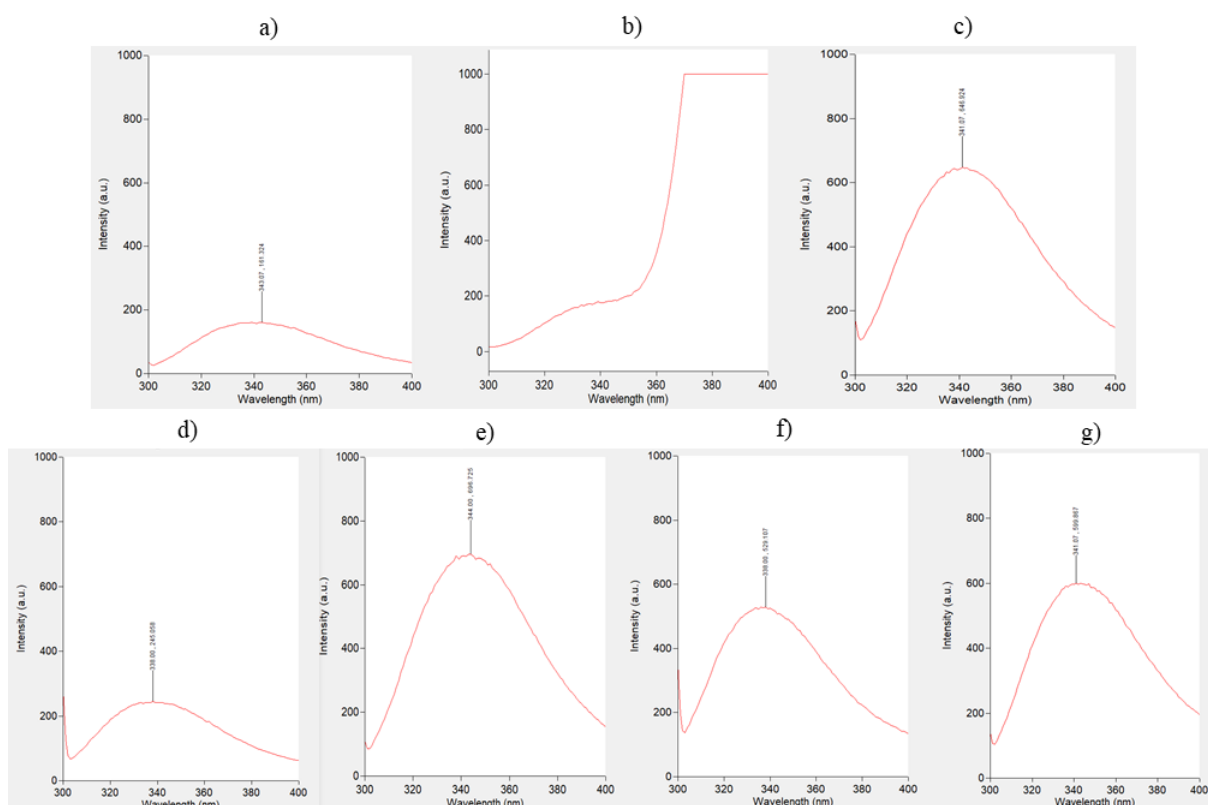
Slika 17. UV-VIS spektri enzima lipaza u fosfatnom puferu (—) u usporedbi s enzimom lipaza u eutektnom otapalu: a) BU (—), b) ChU (—), c) ChGlc (—), d) ChEG (—), e) ChGly (—) i f) BGly (—)

Ukoliko se maksimumi apsorpcije nalaze na istim valnim duljinama, tada nema promjena u konformaciji enzima lipaza te se može zaključiti kako nema formiranih kemijskih veza između molekula otapala i enzima⁴⁵. Maksimum apsorpcije enzima lipaza u puferu nalazio se pri valnoj duljini 292,5 nm, dok se u eutektnim otapalima BU, ChU, ChGlc, ChEG, ChGly i BGly ovaj maksimum redom nalazio pri 291,0 nm, 286,5 nm, 230,5 nm, 284,0 nm, 262,0 nm i 289,0 nm. Iz navedenog se može zaključiti kako su moguće konformacijske promjene u strukturi enzima lipaza pri čemu su one minimalne u eutektnim otapalima BU i BGly gdje su vrijednosti valnih duljina maksimuma bliske onoj enzima lipaza u puferu. Ovakva zapažanja

nisu u skladu s rezultatima Zeng i sur.⁴⁵ jer su se u njihovom istraživanju maksimumi apsorpcije goveđeg serumskog albumina pojavljivali pri istim valnim duljinama prije i poslije ekstrakcije.

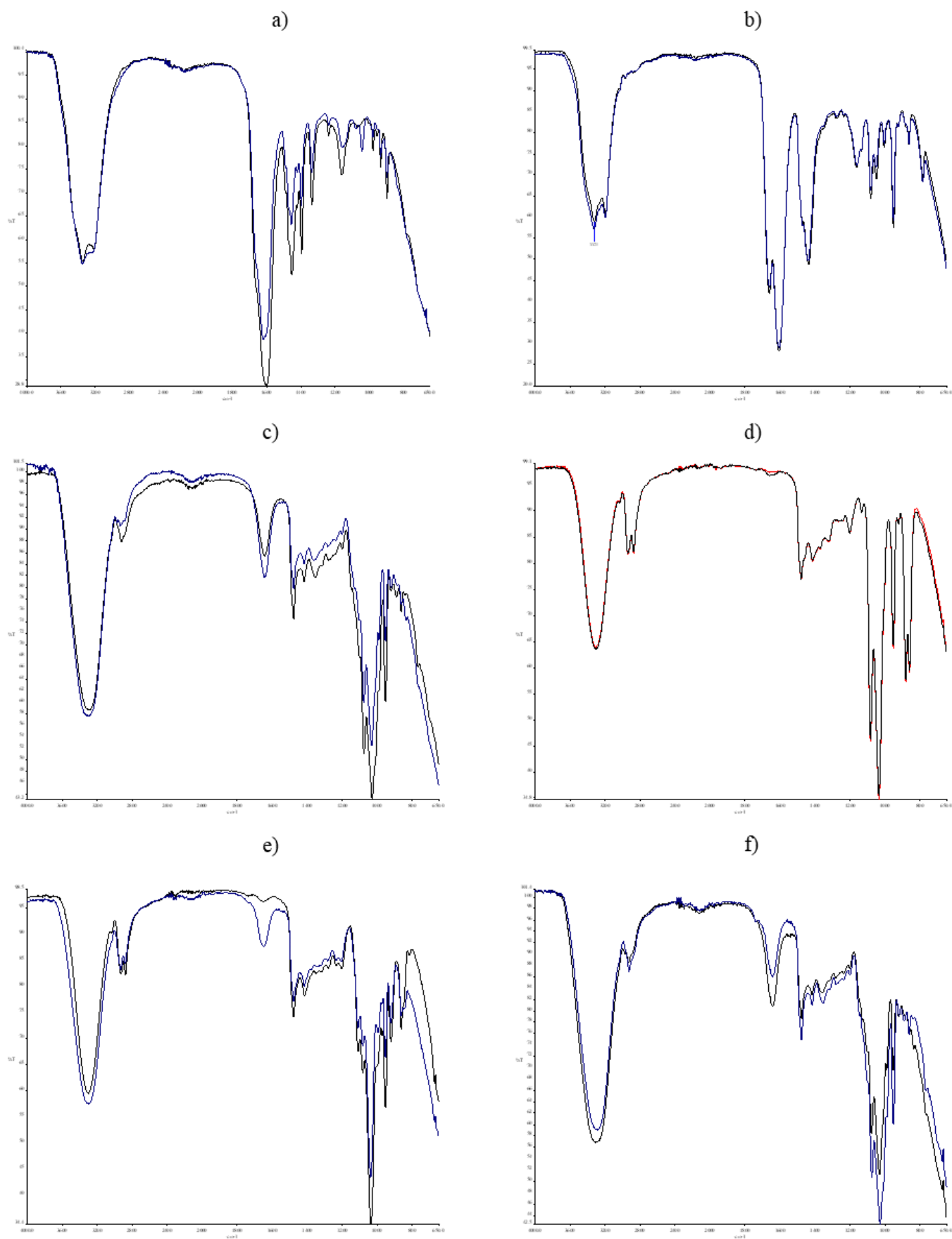
Zbog neslaganja s literaturnim podacima, odnosno u svrhu potvrde dobivenih rezultata provedeno je dodatno mjerenje vrlo osjetljivom metodom fluorescentne spektrofotometrije koja se često koristi za proučavanje sekundarne i tercijarne strukture proteina, kao i biomolekulskih interakcija.^{60,61} Naime, proteini sadrže dijelove molekule koji fluoresciraju, a to su aromatski aminokiselinski ostaci triptofan, tirozin i fenilalanin te prema tome spektri ovise o njihovoj kemijskoj strukturi. Na taj način se iz promjena u emisijskom spektru (intenzitet maksimalne fluorescencije i valna duljina emisijskog maksimuma) triptofana, čiji je maksimum apsorpcije u području valnih duljina od oko 280 nm, a emisije oko 340 nm, mogu pratiti konformacijske promjene, kao i vezanje podjedinica ili denaturacija proteina.⁶²

Spektri ovisnosti intenziteta fluorescencije o valnoj duljini snimljeni su za enzim u puferu i u pripravljenim eutektnim otapalima te su prikazani na Slici 18. Na dobivenim spektrima mogu se primijetiti znatne razlike u intenzitetu fluorescencijskog maksimuma između spektra izmjerenog za enzim u puferu i spektara enzima u pripravljenim eutektnim otapalima, dok valne duljine tih maksimuma imaju male razlike u vrijednostima. Te razlike ukazuju da promjene u konformaciji enzima u ispitivanim eutektnim otapalima postoje i objašnjavaju smanjenu aktivnost lipaze koja je uočena u prethodnim pokusima.



Slika 18. Fluorimetrijski spektri enzima lipaza u fosfatnom puferu (a) i eutektičnim otapalima: b) BU, c) ChU, d) ChGlc, e) ChEG, f) ChGly i g) BGly

Eutektična otapala mogu, osim na sekundarnu, utjecati i na tercijarnu strukturu enzima lipaza formiranjem vodikovih veza te tako stabilizirati enzim.⁵⁹ U svrhu provjere vodikovih veza u sustavu eutektičnog otapala i enzima lipaza provedene su FTIR analize čistih eutektičnih otapala i eutektičnih otapala s enzimom lipaza. Ovi spektri su prikazani na Slici 19. te je vidljivo kako nema značajnih promjena u izgledu spektara eutektičnih otapala s i bez enzima lipaza te se oni većinom preklapaju što znači da nema negativnih utjecaja vodikovih veza na strukturu enzima lipaza, a što bi se očitovalo u promjeni intenziteta vrpci u spektrima.

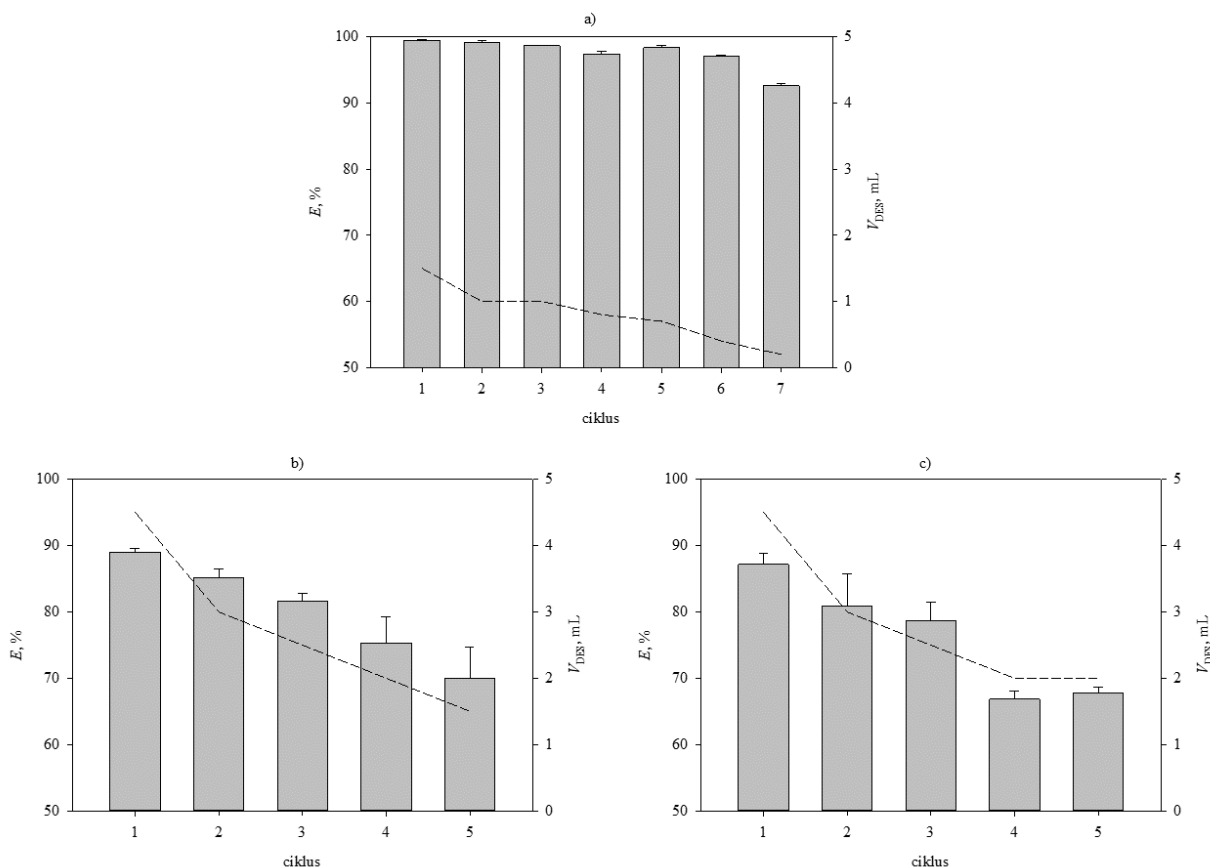


Slika 19. FTIR spektri pojedinih eutektičnih otapala (—) u usporedbi sa spektrima enzima lipaza u eutektičnom otapalu: a) BU (—), b) ChU (—), c) ChGlc (—), d) ChEG (—), e) ChGly (—) i f) BGLy (—)

U konačnici, na temelju rezultata šaržnih pokusa te prikazanih rezultata dodatnih mjerenja i analiza, utvrđeno je kako je eutektično otapalo BU (betain: urea) najbolje otapalo za provedbu ekstrakcije enzima lipaza te je ono korišteno u svim daljnjim pokusima. Naime, u sustavu s BU postignuta je vrlo velika učinkovitost te najveći koeficijent razdiobe. Uz to, u ovom sustavu su najveći aktivnost enzima lipaza te učinkovitost ekstrakcije glicerola iz sintetiziranog biodizela.

4.5. Ponovna upotreba eutektičnog otapala u šaržnom sustavu

Kako bi proces ekstrakcije bio ekološki prihvatljiviji, a također i u svrhu povećanja količine enzima lipaza u odabranom eutektičnom otapalu, a time i njegove specifične aktivnosti, ispitan je kapacitet eutektičnog otapala u procesu ekstrakcije enzima lipaza. To je provedeno ponovnim korištenjem eutektičnog otapala, odnosno njegovim ponovnim vraćanjem u sustav nakon svakog provedenog ciklusa ekstrakcije uz dodatak svježe otopine enzima i soli u svakom novom ciklusu. Rezultati pokusa provedenih pri različitim temperaturama i različitim volumenima ekstrakcijskog sustava prikazani su na Slici 20. Uspješno je provedeno sedam ciklusa u sustavu s manjim volumenom, a po pet ciklusa u sustavima s većim volumenom. Nakon tog broja ciklusa volumen preostalog eutektičnog otapala znatno je pao pa daljnja provedba pokusa nije bila moguća.



Slika 20. Učinkovitost ekstrakcije (■) i volumen preostalog eutektičnog otapala (---) tijekom ponovljive ekstrakcije u šaržnom sustavu pri 25 °C i uz ukupni volumen smjese od a) 3,5 mL i b) 10,5 mL te c) pri 40 °C i uz ukupni volumen smjese 10,5 mL

Iz rezultata je vidljivo kako povećanjem volumena ekstrakcijskog sustava učinkovitost ekstrakcije pada te da je ekstrakciju zbog učinkovitijeg prijenosa tvari bolje provoditi na manjoj skali. Također, s obzirom da je u radu Petračić i sur.⁶³ utvrđeno kako porastom temperature ekstrakcija postaje učinkovitija, ekstrakcija je provedena i pri 40 °C. Ova temperatura je odabrana je jer se pri toj temperaturi najčešće provodi reakcija transesterifikacije ulja, a ujedno je to i temperatura pri kojoj je aktivnost enzima lipaza najveća.⁶ U ovom procesu ekstrakcije uočen je pad učinkovitosti ekstrakcije s porastom temperature što je u skladu s rezultatima istraživanja Li i sur.⁵ Prema ovim istraživanjima, učinkovitost ekstrakcije se povećava do temperature 30 °C zbog smanjenja viskoznosti eutektičnog otapala, ali se s povećanjem temperature do 40 °C učinkovitost počinje smanjivati što je i pokazano ovim istraživanjem. Smanjenje učinkovitosti ekstrakcije je vjerojatno posljedica pucanja vodikovih veza između aminokiselinskih ostataka i vode vezane na površinu enzima koja je prijeko potrebna za dobro

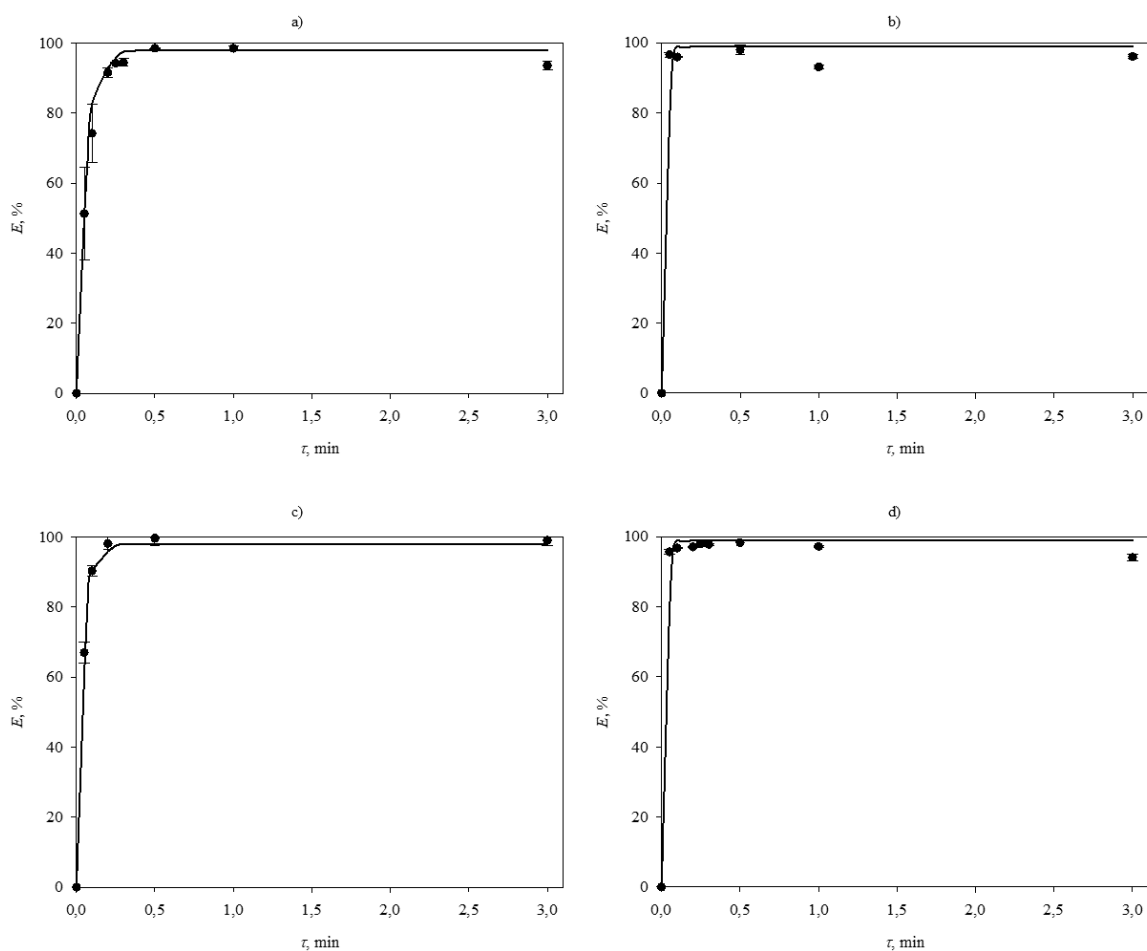
otapanje enzima lipaza. Stoga se povećanjem temperature ekstrakcije iznad određene vrijednosti učinkovitost ekstrakcije sve više smanjuje.⁵

Također je uočen pad volumena eutektičnog otapala iz ciklusa u ciklus što je vjerojatno uzrokovano gubicima u prijenosu eutektičnog otapala iz jednog ciklusa u drugi. Dodatno, u istraživanju koje su proveli Passos i sur.⁶⁴ utvrđeno je kako se u vodenim dvofaznim sustavima struktura eutektičnih otapala može narušiti prekidima vodikovih veza između komponenti zbog preferencijalnog otapanja u vodi kada se ekstrakcija provodi u šaržnom sustavu. Dakle, u svakom ciklusu mala količina eutektičnog otapala, odnosno njegovih komponenti otopi se u fazi bogatoj solima te se ta količina nepovratno gubi za iduće cikluse ekstrakcije.

4.6. Ekstrakcija enzima lipaza u mikrosustavu

S obzirom na prethodne rezultate ispitivanja kapaciteta eutektičnog otapala koji su ukazali na smanjenje učinkovitosti ekstrakcije povećanjem skale i smanjenje volumena eutektičnog otapala tijekom provedbe šaržnog procesa, u nastavku istraživanja provedena je kontinuirana ekstrakcija na mikroskali. Mikrosustavi su posebice zanimljivi u kontekstu primjene pri pročišćavanju globularnih proteina kao što je enzim lipaza jer je zbog laminarnog toka, koji u takvim sustavima pri ekstrakciji prevladava, vjerojatnost denaturiranja ovih proteina minimalna.²¹ Provedbi eksperimenata u mikroekstraktor prethodilo je određivanje omjera volumnog protoka eutektičnog otapala i početne otopine enzima lipaza i K_2HPO_4 kako bi se s obzirom na ovaj omjer dobila usporedivost sa šaržnim sustavom. Utvrđeno je kako je volumni omjer eutektičnog otapala i početne otopine u uzorku na izlazu iz mikroekstraktora iznosio 1: 2 pri omjeru volumnih protoka 1: 1,8 te je taj omjer protoka korišten u daljnjim pokusima.

U pokusima provedenim u mikroekstraktor ispitan je utjecaj promjera kanala, temperature i vremena zadržavanja na učinkovitost ekstrakcije. Isto tako ispitan je i utjecaj ultrazvuka na učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza. Rezultati provedenih pokusa su prikazani na Slici 21. Vidljivo je kako je provedbom procesa u mikroekstraktor postignuta znatna intenzifikacija procesa u usporedbi s pokusima provedenima u šaržnom sustavu. U mikroekstraktor je učinkovitost ekstrakcije veća od 98 % postignuta za vrijeme zadržavanja od 30 sekundi, dok je u šaržnom sustavu maksimalna učinkovitost ekstrakcije bila 94,70 % nakon 30 minuta provedbe procesa. Provedba eksperimenata uz promjer kanala 500 μm nije bila moguća bez korištenja ultrazvuka zbog toga što je početna otopina enzima lipaza i soli sadržavala nakupine čestica koje su uzrokovale začepljenje mikrosustava te stoga rezultati tog pokusa nisu ni prikazani.



Slika 21. Utjecaj vremena zadržavanja na učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza za pokuse provedene u mikroekstraktoru pri 25°C za promjer kanala: a) $d = 1000 \mu\text{m}$, b) $d = 500 \mu\text{m}$ i uz ultrazvuk, c) $d = 1000 \mu\text{m}$ i ultrazvuk te d) $d = 1000 \mu\text{m}$ pri 40°C
 (● eksperimentalni podaci, — matematički model procesa)

Kao jedan od čimbenika visoke učinkovitosti ekstrakcije u mikrosustavu Vicente i sur.²¹ navode nisku viskoznost tvari koja u sustavu s dva ulaza omogućuje omjer protoka povoljan za formiranje stabilne međufazne površine. Budući da je viskoznost BU eutektičnog otapala mala, postignuti rezultati su u skladu s ovim literaturnim podatcima. Također, iz dobivenih rezultata je vidljivo kako se smanjenjem promjera kanala na $500 \mu\text{m}$ maksimalna učinkovitost ekstrakcije postiže za deset puta kraće vrijeme u odnosu na sustav s promjerom kanala $1000 \mu\text{m}$ (Slika 21. b i c). Naime, u slučaju manjeg promjera kanala prijenos tvari je intenzivniji zbog veće međufazne površine.

Uspoređujući rezultate dobivene za pokuse provedene pri istom promjeru kanala, ali pri različitim temperaturama može se uočiti sličan trend, odnosno znatno brže postizanje

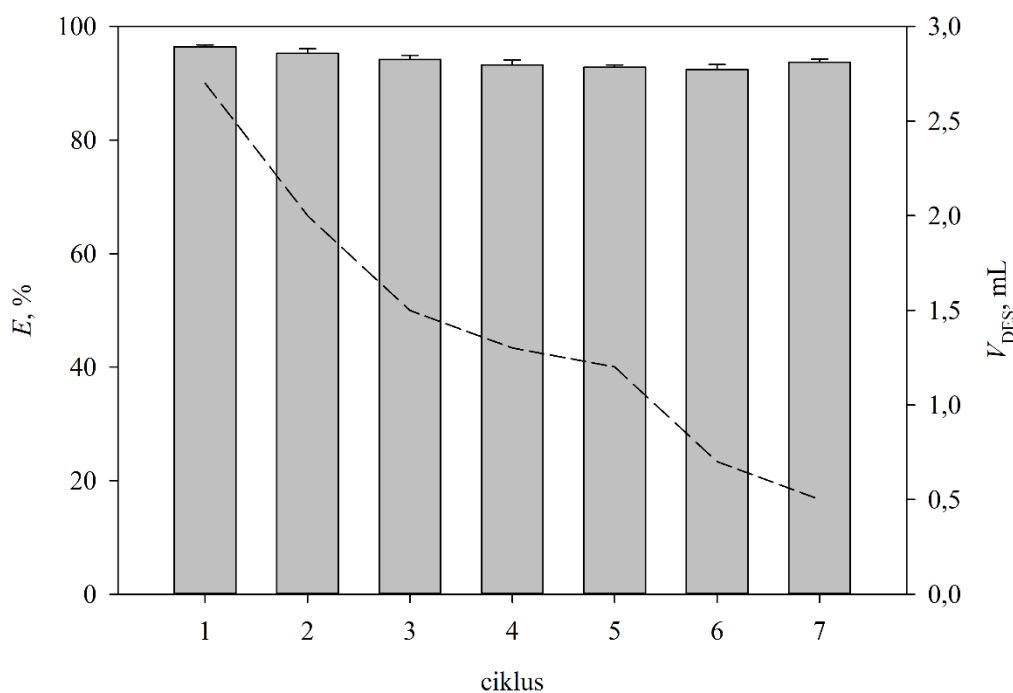
maksimalne učinkovitosti ekstrakcije pri pokusu provedenom na temperaturi od 40 °C u odnosu na pokus proveden pri temperaturi 25 °C (Slika 21. a i d). S obzirom na uočeno smanjenje učinkovitosti ekstrakcije s povećanjem temperature u šaržnom sustavu, sve prednosti mikrosustava pri provedbi procesa ekstrakcije su i u ovim pokusima došle do izražaja. Naime, pozitivan učinak smanjenja viskoznosti eutektičnog otapala s povećanjem temperature pridonio je većoj učinkovitosti ekstrakcije jer je izbjegnuto negativan učinak pucanja vodikovih veza između aminokiselinskih ostataka i vode na površini enzima što se uobičajeno događa s povećanjem temperature. U mikrosustavima je moguće izbjeći takve neželjene posljedice intenzivnog prijenosa tvari i topline i kratkog kontakta faza koji je potreban za postizanje velikih učinkovitosti ekstrakcije.

Zbog nemogućnosti provedbe procesa ekstrakcije u mikrokanalu promjera 500 μm , temeljem literaturnih podataka⁶⁴ u kojima je pokazan pozitivan utjecaj korištenja ultrazvuka na proces ekstrakcije, provedena su i dva eksperimenta uz korištenje ultrazvuka. Kao što je vidljivo iz usporedbe rezultata prikazanih na Slikama 21. a i c, postizanje maksimuma učinkovitosti ekstrakcije nešto je brže u slučaju korištenja ultrazvuka.

Na temelju provedenih eksperimenata, kao optimalan je definiran mikrosustav promjera kanala 1000 μm i pri temperaturi 25 °C te su svi daljnji pokusi u mikroekstraktor provedeni pri tim uvjetima. Unatoč činjenici kako su maksimalne učinkovitosti od približno 98 % postignute brže u drugim analiziranim sustavima, odabrani sustav zahtjeva najmanju potrošnju energije i ne zahtjeva nikakvu dodatnu opremu za svoju provedbu. Također, maksimalna učinkovitost ekstrakcije postignuta je nakon 30 sekundi što je i dalje vrlo brzo, posebice u usporedbi sa šaržnom ekstrakcijom.

4.7. Ponovna upotreba eutektičnog otapala u mikrosustavu

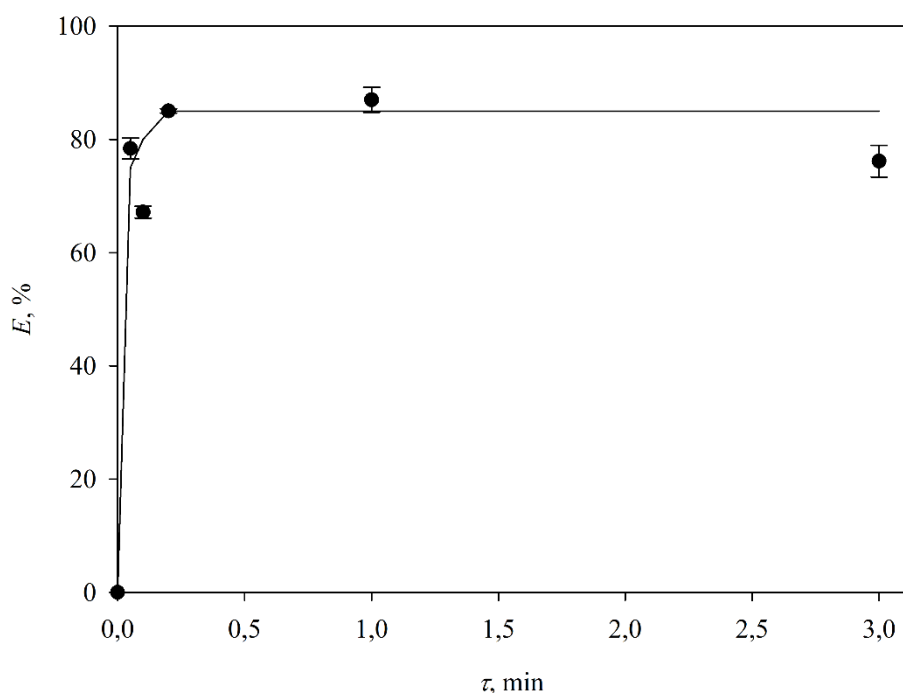
Kapacitet eutektičnog otapala ispitan je u mikrosustavu pri vremenu zadržavanja $\tau = 30$ s budući da je pri tom vremenu zadržavanja postignuta najveća učinkovitost ekstrakcije ($E = 98,501 \pm 0,154$ %). Rezultati višestruke upotrebe eutektičnog otapala u mikrosustavu prikazani su na Slici 22. Provedeno je ukupno sedam ciklusa ekstrakcije uz vrlo visoke učinkovitosti ekstrakcije u svakom ciklusu, a kao i pri ekstrakciji provedenoj u šaržnom sustavu došlo je do značajnog smanjenja volumena eutektičnog otapala tijekom provedbe svakog ciklusa (Slika 22).



Slika 22. Učinkovitost ekstrakcije (■) i volumen preostalog eutektičnog otapala (---) nakon svakog ciklusa mikroekstrakcije u pokusima provedenima s komercijalnim enzimom lipaza

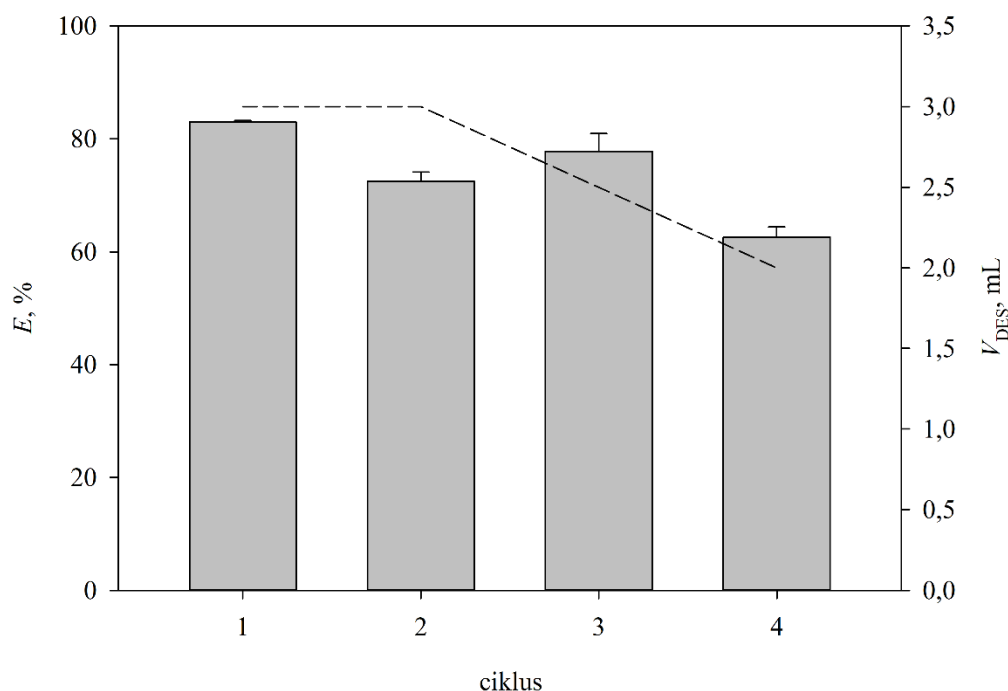
4.8. Ekstrakcija sirovog enzima lipaza proizvedenog fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče

Optimalni uvjeti kontinuirane ekstrakcije enzima lipaza u mikrosustavu, kao i ponovna upotreba eutektičnog otapala primijenjeni su na sirovi ekstrakt enzima lipaza (bez dodatnih stupnjeva pročišćavanja) proizveden fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče. Na Slici 23. prikazani su rezultati pokusa ispitivanja utjecaja vremena zadržavanja na učinkovitost ekstrakcije sirovog ekstrakta enzima lipaza provedenog pri optimalnim uvjetima. Iz rezultata ovih pokusa vidljiva je nešto manja učinkovitost ekstrakcije u odnosu na sustav u kojem je tijekom ekstrakcije korišten komercijalni enzim lipaza te je maksimalna vrijednost učinkovitosti ekstrakcije iznosila $E = 85,040 \pm 0,371$ % pri vremenu zadržavanja od samo $\tau = 12$ s. Manje vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije u pokusima provedenima sa sirovim ekstraktom enzima lipaza vjerojatno su posljedica prisustva različitih tvari u ovom ekstraktu, kao što su primjerice ugljikohidrati i drugi enzimi, nakon fermentacije *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče.



Slika 23. Utjecaj vremena zadržavanja na učinkovitost ekstrakcije u mikrosustavu za pokuse provedene sa sirovim ekstraktom enzima lipaza (● eksperimentalni podaci, — matematički model procesa)

Rezultati ispitivanja kapaciteta eutektičnog otapala u pokusu provedenom uz korištenje sirovog ekstrakta enzima lipaza pri $\tau = 12$ s prikazani su na Slici 24. Iz rezultata tih pokusa razvidne su manje učinkovitosti ekstrakcije u odnosu na pokuse provedene s komercijalnom lipazom. I u ovim pokusima došlo je do značajnog smanjenja volumena eutektičnog otapala, a uspješno su provedena svega četiri ekstrakcijska ciklusa budući da tijekom provedbe petog ciklusa nije došlo do razdvajanja faza na izlazu iz mikroekstraktora. Moguće objašnjenje za tu pojavu su prisutne nečistoće u sirovom ekstraktu enzima lipaza koje su zasitile eutektično otapalo, a koje mogu utjecati na ravnotežu vodenih dvofaznih sustava. Bez obzira na nešto manje učinkovitosti postignute u pokusima provedenima u mikroekstraktoru sa sirovim ekstraktom enzima lipaza, rezultati ovih pokusa su obećavajući i otvaraju prostor za daljnje istraživanje te unaprjeđenje procesa ekstrakcije enzima lipaza u mikrosustavu.



Slika 24. Učinkovitost ekstrakcije (■) i volumen preostalog eutektičnog otapala (---) nakon svakog ciklusa mikroekstrakcije u pokusima provedenim sa sirovim ekstraktom enzima lipaza

4.9. Matematički model procesa mikroekstrakcije enzima lipaza

U konačnici, razvijen je i validiran 2D matematički model za svaki od eksperimenata provedenih u mikroekstraktor te su rezultati simulacije matematičkog modela procesa prikazani na Slikama 21. i 23. zajedno s eksperimentalnim podacima. Difuzijski koeficijenti izračunati su na temelju podataka prikazanih u Tablici 7. primjenom Hayduk-Laudie empirijske korelacije.

Tablica 7. Podaci za izračun difuzijskih koeficijenata za enzim lipaza primjenom Hayduk-Laudie empirijske korelacije u eutektičnom otapalu i fazi s otopljenom soli

otopljena tvar (S)	otapalo (B)	T , °C	η_B , mPa·s	V_S , mL/mol	$D_{S/B}$, cm ² /s
enzim lipaza	BU	25	3,472	$1,670 \cdot 10^4$	$1,411 \cdot 10^{-7}$
enzim lipaza	0,7 g/mL K ₂ HPO ₄	25	3,866	$1,670 \cdot 10^4$	$6,504 \cdot 10^{-8}$
enzim lipaza	BU	40	2,224	$1,670 \cdot 10^4$	$1,411 \cdot 10^{-7}$
enzim lipaza	0,7 g/mL K ₂ HPO ₄	40	2,371	$1,670 \cdot 10^4$	$1,290 \cdot 10^{-7}$

Kako bi se usporedili eksperimentalni rezultati i rezultati simulacije matematičkog modela procesa te provela ocjena valjanosti modela, provedene su statističke analize i izračunate vrijednosti koeficijenta određivanja (R^2), korijena srednje kvadratne pogreške (engl. *root mean square error*, RMSE) i p -vrijednosti (temeljem t-testa) (Tablica 8.).

Tablica 8. Koeficijenti određivanja, korijeni kvadratne pogreške i p -vrijednosti usporedbe eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih simulacijom matematičkog modela procesa za pokuse provedene u mikroekstraktoru

uvjeti u pokusu	R^2	RMSE, %	p -vrijednost
$d = 1000 \mu\text{m}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ komercijalni enzim lipaza (Slika 21. a)	0,992	3,483	0,914
$d = 500 \mu\text{m}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, ultrazvuk komercijalni enzim lipaza (Slika 21. b)	0,950	6,358	0,519
$d = 1000 \mu\text{m}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, ultrazvuk komercijalni enzim lipaza (Slika 21. c)	0,983	5,751	0,524
$d = 1000 \mu\text{m}$, $t = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ komercijalni enzim lipaza (Slika 21. d)	0,959	6,252	0,909
$d = 1000 \mu\text{m}$, $t = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ sirovi ekstrakt enzima lipaza (Slika 23.)	0,962	4,325	0,646

Iz usporedbe rezultata pokusa i rezultata simulacije matematičkog modela procesa (Slike 21. i 23.) te iz provedene statističke analize (Tablica 7.) vidljivo je njihovo izvrsno slaganje. Najmanja vrijednost koeficijenta određivanja iznosila je 0,950, a prema Le Man i sur.⁶⁵ matematički model procesa se smatra vjerodostojnim za koeficijente određivanja veće od 0,750. Sve vrijednosti korijena kvadratne pogreške su manje od 7 % što također ukazuje na pouzdanost matematičkog modela procesa. Na kraju, provedeni t-test je pokazao da su sve p -vrijednosti veće od 0,05 što znači da nema značajnih razlika između eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih matematičkim modelom procesa. Sve ovo ukazuje da se matematički model procesa može koristiti za daljnju optimizaciju ekstrakcije enzima lipaza u mikrosustavu te je on uspješno validiran.

5. ZAKLJUČAK

- Odabir pogodnog vodenog dvofaznog sustava za ekstrakciju enzima lipaza proveden je pokusima u šaržnom sustavu. Na temelju postignute učinkovitosti ekstrakcije i rezultata karakterizacije korištenih eutektnih otapala te njihovih interakcija s enzimom lipaza kao najbolji sustav pokazao se onaj s eutektnim otapalom betain: urea (BU) pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,7 g/mL. U tom je sustavu postignuta učinkovitost ekstrakcije $E = 94,695 \%$ za 30 minuta uz koeficijent raspodjele $K_P = 17,889$.
- Od četiri različita mikrosustava sa dvije ulazne struje koji su korišteni za kontinuiranu ekstrakciju lipaze, kao optimalan je odabran sustav u kojem je promjer mikrokanala 1000 μm , a ekstrakcija provedena pri 25 °C. U tom je sustavu postignuta maksimalna učinkovitost ekstrakcije $E = 98,501 \%$ pri vremenu zadržavanja $\tau = 30 \text{ s}$, a slične vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije postignute su u svim ispitivanim sustavima uz različita vremena zadržavanja.
- Ispitan je kapacitet BU eutektnog otapala za ekstrakciju enzima lipaza u šaržnom i mikrosustavu te je uspješno provedeno nekoliko ekstrakcijskih ciklusa čime je pokazano kako kapacitet ovog eutektnog otapala omogućuje njegovu višestruku upotrebu te ga čini pogodnim za provedbu ekstrakcije uz recirkulaciju.
- Razvijena metoda kontinuirane mikroekstrakcije ispitana je u pokusima sa sirovim ekstraktom enzima lipaza proizvedenim fermentacijom *Thermomyces lanuginosus* na pogači buče pri čemu je postignuta maksimalna učinkovitost ekstrakcije $E = 85,040 \%$ pri vremenu zadržavanja od $\tau = 12 \text{ s}$. I u pokusima provedenima u mikrosustavu sa sirovim ekstraktom enzima lipaza analiziran je kapacitet eutektnog otapala te su uspješno provedena četiri ciklusa ekstrakcije.
- Razvijen je 2D matematički model procesa ekstrakcije enzima lipaza u mikroekstraktoru te je provedena ocjena njegove valjanosti koja je pokazala kako ovaj model odlično opisuje eksperimentalne podatke te je prikladan za daljnju optimizaciju procesa kontinuirane ekstrakcije enzima lipaza u mikrosustavu.

6. LITERATURA

1. Chemat, F., Abert-Vian, M., Fabiano-Tixier, A. S., Nutrizio, M., Režek Jambrak, A., Munekata, P. E. S., Lorenzo, J., M., Barba, F. J., Binello, A., Cravotto, G., A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products, *Green Chem.*, 22 (2020) 2325-2353.
2. 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 systems (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol. Proced. Online*, 18 (2016) 1-18.
3. Miličević, N., Panić, M., Valinger, D., Cvjetko Bubalo, M., 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.*, 224 (2020) 116746.
4. Chandra, P., Singh, E., Singh, R., Arora, P. K., Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review, *Microb. Cell Fact.*, 19 (2020) 1-42.
5. 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.
6. Bačić, M., Ljubić, A., Gojun, M., Šalić, A., Jurinjak Tušek, A., Zelić, B., Continuous integrated process of biodiesel production and purification – the end of the conventional two-stage batch process?, *Energies*, 14 (2021) 403-421.
7. Anastas, P., Eghbali, N., Green chemistry: principles and practice, *Chem. Soc. Rev.*, 39 (2010) 301-312.
8. Jukić, M., Đaković, S., Filipović-Kovačević, Ž., Vorkapić-Furač, J., „Zelena“ kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim procesima, *Kem. Ind.*, 53 (2004) 217-224.
9. Anastas, P. T., Zimmerman, J. B., Design through the 12 principles of green engineering, *Env. Sci. and Tech.*, 37 (2003) 94-101.
10. Jimenez-Gonzalez, C., Poehlauer, P., Broxterman, Q. B., Yang, B., Ende, D., Baird, J., Bertsch, C., Hannah, R. E., Dell'Orco, P., Noorman, H., Yee, S., Reintjens, R., Wells, A., Massonneau, V., Manley, J., Key green engineering research areas for sustainable manufacturing: a perspective from pharmaceuticals and fine chemicals manufacturers, *Org. Process Res. Dev.*, 15 (2011) 900-911.
11. Chemat, F., Vian, M. A., Cravotto, G., Green extraction of natural products: concepts and principles, *Int. J. Mol. Sci.*, 13 (2012) 8615-8627.

12. Bhattacharya, S., *Conventional and advanced food processing technologies*, John Wiley & Sons, New Jersey, 2015., str. 129-130.
13. Patel, K., Panchal, N., Ingle, P., Review of extraction techniques, *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci.*, 6 (2019) 6-21.
14. URL: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=17468> (pristupljeno 15.4.2021.)
15. Sander, A., *Jedinične operacije u ekoinženjerstvu, I. dio, Toplinski separacijski procesi (Interna skripta)*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2011., Zagreb
16. Goja, A. M., Yang, H., Cui, M., Li, C., Aqueous two-phase extraction advances for bioseparation, *J. Bioprocess. Biotechniq.*, 4 (2013) 1000140.
17. Hatti-Kaul, R., Aqueous two-phase systems: A general overview, *Mol. Biotechnol.*, 19 (2001) 269-277.
18. Xu, K., Wang, Y., Huang, Y., Li, N., Wen, Q., A green deep eutectic solvent-based aqueous two-phase system for protein extracting, *Anal. Chim. Acta*, 864 (2015) 9-20.
19. Andrews, B. A., Asenjo, J. A., Theoretical and experimental evaluation of hydrophobicity of proteins to predict their partitioning behavior in aqueous two-phase systems: a review, *Sep. Sci. Technol.*, 45 (2010) 2165-2170.
20. Raja, S., Murty, V. R., Thivaharan, V., Rajasekar, V., Ramesh, V., Aqueous two phase systems for the recovery of biomolecules – a review, *Sci. Technol.*, 1 (2011) 7-16.
21. Vincente, F. A., Plazl, I., Ventura, S. P. M., Žnidaršić-Plazl, P., Separation and purification of biomacromolecules based on microfluidics, *Green Chem.*, 22 (2020) 4391-4410.
22. Xu, Y., Souza, M. A., Pontes, M. Z. R., Vitolo, M., Pessoa Junior, A., Liquid-liquid extraction of enzymes by affinity aqueous two-phase systems, *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 46 (2003) 741-750.
23. Rosa, P. A. J., Azevedo, A. M., Sommerfeld, S., Mutter, M., Aires-Barros, M. R., Bäcker, W., Application of aqueous two-phase systems to antibody purification: A multi-stage approach, *J. Biotechnol.*, 139 (2009) 306-313.
24. Hamta, A., Dehghani, M. R., Application of polyethylene glycol based aqueous two-phase systems for extraction of heavy metals, *J. Mol. Liq.*, 231 (2017) 20-24.
25. Cvjetko Bubalo, M., Panić, M., Radošević, K., Radojčić Redovniković, I., Metode pripreve eutektičkih otopala, *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.*, 3-4 (2016) 164-168.
26. Dreyer, S., Kragl, U., Ionic liquids for aqueous two-phase extraction and stabilization of enzymes, *Biotechnol. Bioeng.*, 99 (2008) 1416-1424.

27. Zhang, Q., Vigier, K. D. O., Royer, S., Jerome, F., Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chem. Soc. Rev.*, 41 (2012) 7108-7146.
28. Gotor-Fernandez, V., Paul, C. E., Deep eutectic solvents for redox biocatalysis, *J. Biotechnol.*, 293 (2019) 24-35.
29. Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., Duarte, A. R. C., Natural deep eutectic solvents – solvents for the 21st century, *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2 (2014) 1063-1071.
30. Petračić, A., Sander, A., Ćurić, M., Furač, D., Šimičević, A., Parlov-Vuković, J., Primjena niskotemperaturnih eutektičkih otapala u predobradi životinjskih masti i pročišćavanju sintetiziranog biodizela, *Kem. Ind.*, 68 (2019) 397-405.
31. Šalić, A., Jurinjak Tušek, A., Gojun, M., Zelić, B., Biodiesel purification in microextractors: Choline chloride based deep eutectic solvents vs water, *Sep. Purif. Technol.*, 242 (2020) 116783.
32. Homan, T., Shahbaz, K., Farid, M. M., Improving the production of propyl and butyl ester-based biodiesel by purification using deep eutectic solvents, *Sep. Purif. Technol.*, 174 (2017) 570-576.
33. McMurry, J., *Osnove organske kemije*, Zrinski d. d., Čakovec, 2014., str. 503-532.
34. Pei, Y., Wang, J., Wu, K., Xuan, X., Lu, X., Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins, *Sep. Purif. Technol.*, 64 (2009) 288-295.
35. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, *Tehnička enciklopedija*, 5. svezak, Zagreb, 1976., str. 334-345.
36. Gojun, M., Ljubić, A., Bačić, M., Jurinjak Tušek, A., Šalić, A., Zelić, B., Model-to-model: Comparison of mathematical process models of lipase catalysed biodiesel production in a microreactor, *Comput. Chem. Eng.*, 145 (2021) 107200.
37. Franjo, M., Šalić, A., Zelić, B., Microstructured devices for biodiesel production by transesterification, *Biomass Conv. Bioref.*, 8 (2018) 1005-1020.
38. Sørensen, M. H., Ng, J. B. S., Bergström, L., Alberius, P. C. A., Improved enzymatic activity of *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in a hydrophobic particulate mesoporous carrier, *J. Colloid Interface Sci.*, 343 (2010) 359-365.
39. Fernandez-Lafuente, R., Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 62 (2010) 197-212.
40. Tišma, M., Tadić, T., Budžaki, S., Ostojčić, M., Šalić, A., Zelić, B., Tran, N. N., Ngothai, Y., Hessel, V., Lipase production by solid-state cultivation of *Thermomyces lanuginosus* on by-products from cold-pressing oil production, *Processes*, 7 (2019) 465-477.

41. Chandra, P., Enespa, Singh, R., Arora, P. L., Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review, *Microb. Cell Fact.*, 19 (2020) 1-42.
42. Brzozowski, A., M., Savage, H., Verma, C. S., Turkenburg, J. P., Lawson, D. M., Svendsen, A., Patkar, S., Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase, *Biochemistry*, 39 (2000) 15071-15082.
43. Anobom, C. D., Pinheiro, A. S., De-Andrade, R. A., Aguiéiras, E. C. G., Andrade, G. C., Moura, M. V., Almeida, R. V., Freire, D. M., From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological application of lipases, *Biomed Res. Int.*, 2014 (2014) 684506.
44. Bajpai, P., *Xylanolytic Enzymes*, Academic Press, Oxford, 2014, str. 53-61.
45. 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.
46. Monhemi, H., Housaindokht, M. R., Moosavi-Movahedi, A. A., Bozorgmehr, M. R., How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of *Candida antarctica* lipase B in urea: choline chloride deep eutectic solvent, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16 (2014) 14882.
47. Gotor-Fernandez, V., Paul, C. E., Deep eutectic solvents for redox biocatalysis, *J. Biotechnol.*, 293 (2019) 24-35.
48. Wohlgemuth, R., Plazl, I., Žnidaršić-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. Šalić, A., Tušek, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B., *Mikroreaktori*, *Kem. Ind.*, 59 (2010) 227-248.
50. Šalić, A., Zelić, B., Synergy of microtechnology and biotechnology: microreactors as an effective tool for biotransformation processes, *Food Technol. Biotechnol.*, 56 (2018) 464-479.
51. Gomzi, Z., *Kemijski reaktori*, HINUS, Zagreb, 1998., str. 36-55.
52. Žnidaršić-Plazl, P., Plazl, I., Steroid extraction in a microchannel system – mathematical modelling and experiments, *Lab Chip*, 7 (2007) 883-889.
53. Bradford, M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72 (1976) 248-254.
54. Ernst, O., Zor, T., Linearization of the Bradford protein assay, *J. Vis. Exp.*, 38 (2010) 1918-1924.

55. Budžaki, S., Šalić, A., Zelić, B., Tišma, M., Enzyme-catalysed biodiesel production from edible and waste cooking oils, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 29 (2015) 329-333.
56. Cvjetko Bubalo, M., Jurinjak Tušek, A., Vinković, M., Radošević, K., Gaurina Srček, V., Radojčić Redovniković, I., Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 122 (2015) 188-198.
57. Qi, X., Peng, X., Huang, Y., Li, L., Wei, Z., Zu, Y., Fu, Y., Green and efficient extraction of bioactive flavonoids from *Equisetum palustre* L. by deep eutectic solvents-based negative pressure cavitation method combined with macroporous resin enrichment, *Ind. Crops Prod.*, 70 (2015) 142-148.
58. Gorke, J. T., Srienc, F., Kazlauskas, R. J., Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents, *Chem. Commun.*, 10 (2008) 1235-1237.
59. Elgharbawy, A. A., Hayyan, A., Hayyan, M., Rashid, S. N., Nor, M. R. M., Zulkifli, M. Y., Alias, Y., Mirghani, M. E. S., Shedding light on lipase stability in natural deep eutectic solvents, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 32 (2018) 359-370.
60. Xu, P., Zheng, G., Zong, M., Li, N., Lou, W., Recent progress on deep eutectic solvents in biocatalysis, *Bioresour. Bioprocess.*, 4 (2017) 1-18.
61. Parikh, H. H., McElwain, K., Balasubramanian, V., Leung, W., Wong, D., Morris, M. E., Ramanathan, M., A rapid spectrofluorimetric technique for determining drug-serum protein binding suitable for high-throughput screening, *Pharm. Res.*, 17 (2000) 632-637.
62. Lakowicz, J. R., Principles of fluorescence spectroscopy, Springer, New York, 2013., str. 1-3.
63. Petračić, A., Sander, A., Magić, L., Separation of free glycerol and glycerides from biodiesel by means of liquid-liquid extraction, *Sci. J. Energy Eng.*, 5 (2017) 87-94.
64. Sukor, N., Jusoh, R., Rahim, S. A., Kamarudin, N., Ultrasound assisted methods for enhanced extraction of phenolic acids from *Quercus Infectoria* galls, *Mater. Today: Proc.*, 5 (2018) 21990-21999.
65. Le Man, H., Behera, S. K., Park, H. S., Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate, *Int. J. Environ. Sci, Tech.*, 7 (2010) 157-164.

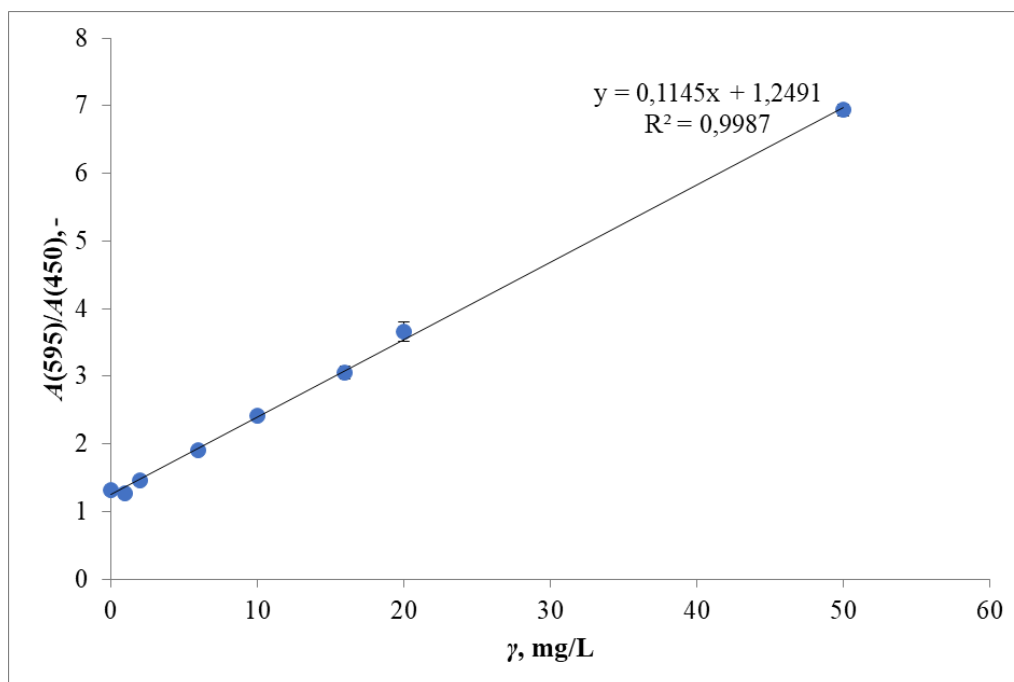
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA

BGly	eutektično otapalo betain: glicerol
BU	eutektično otapalo betain: urea
ChEG	eutektično otapalo kolin klorid: etilen-glikol
ChGlc	eutektično otapalo kolin klorid: glukoza
ChGly	eutektično otapalo kolin klorid: glicerol
ChU	eutektično otapalo kolin klorid: urea
γ	masena koncentracija, g/mL
d	promjer, μm
$D_{S/B}$	difuzijski koeficijent otopljene tvari kroz otapalo, cm^2/s
DES	eutektično otapalo
D.F.	donja faza
E	učinkovitost ekstrakcije proteina, %
E	enzim
FAME	metilni esteri masnih kiselina
G.F.	gornja faza
η	dinamička viskoznost, mPas
η_B	dinamička viskoznost otapala, mPas
K_P	koeficijent raspodjele proteina, -
L	dužina mikrokanala, m
m	masa, g
ν	kinematička viskoznost, mm^2/s
ξ	bezdimenzijska nezavisna varijabla, x/W , -
P	protein
P.O.	početna otopina
q_V	volumni protok, $\mu\text{L}/\text{min}$
r	uzorak
ρ	gustoća, g/mL
S.A.	specifična aktivnost, U/g
t	temperatura, $^{\circ}\text{C}$
τ	vrijeme zadržavanja, min
u	linearna brzina, m/s
V	volumen, mL

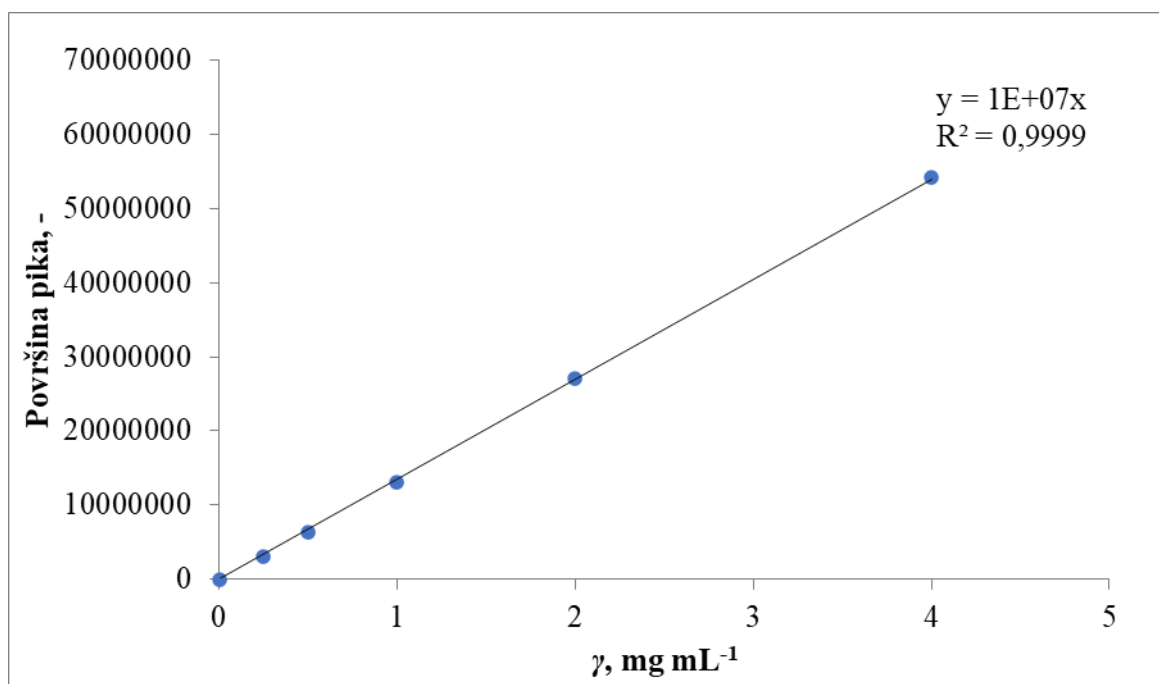
V_s	molarni volumen otopljene tvari, mL/mol
W	polu-širina mikrokanala, mm
x	dužina mikrokanala, mm
y	širina mikrokanala, mm
ψ	bezdimenzijska nezavisna varijabla, y/W , -

8. PRILOZI

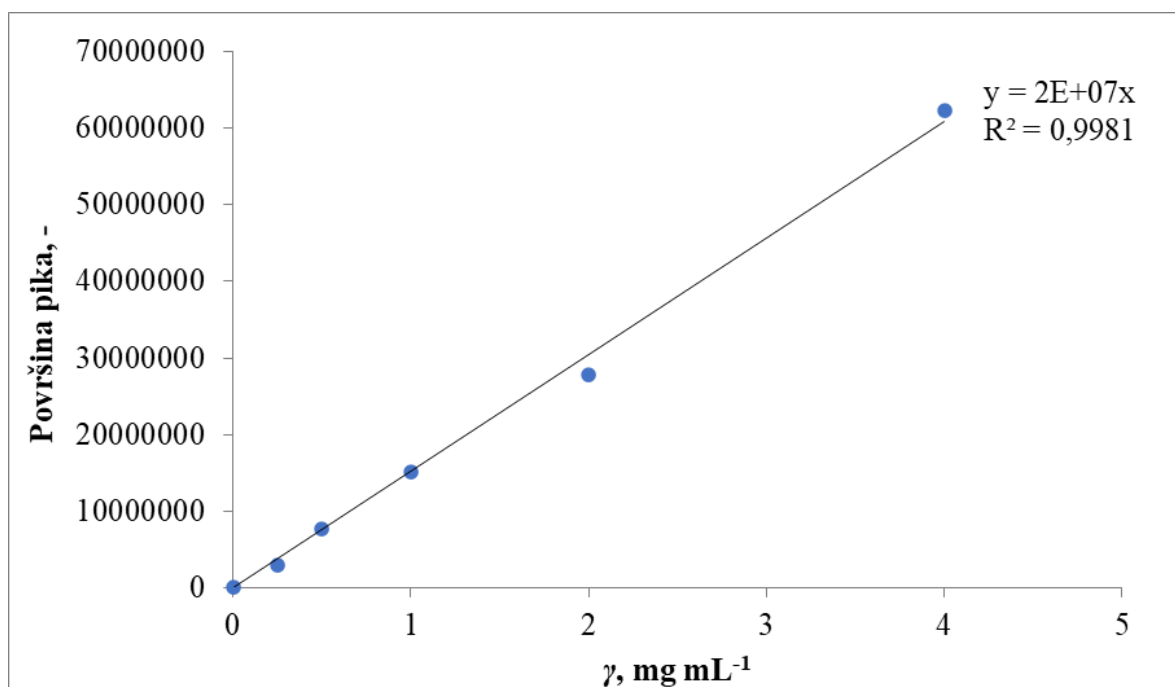
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina



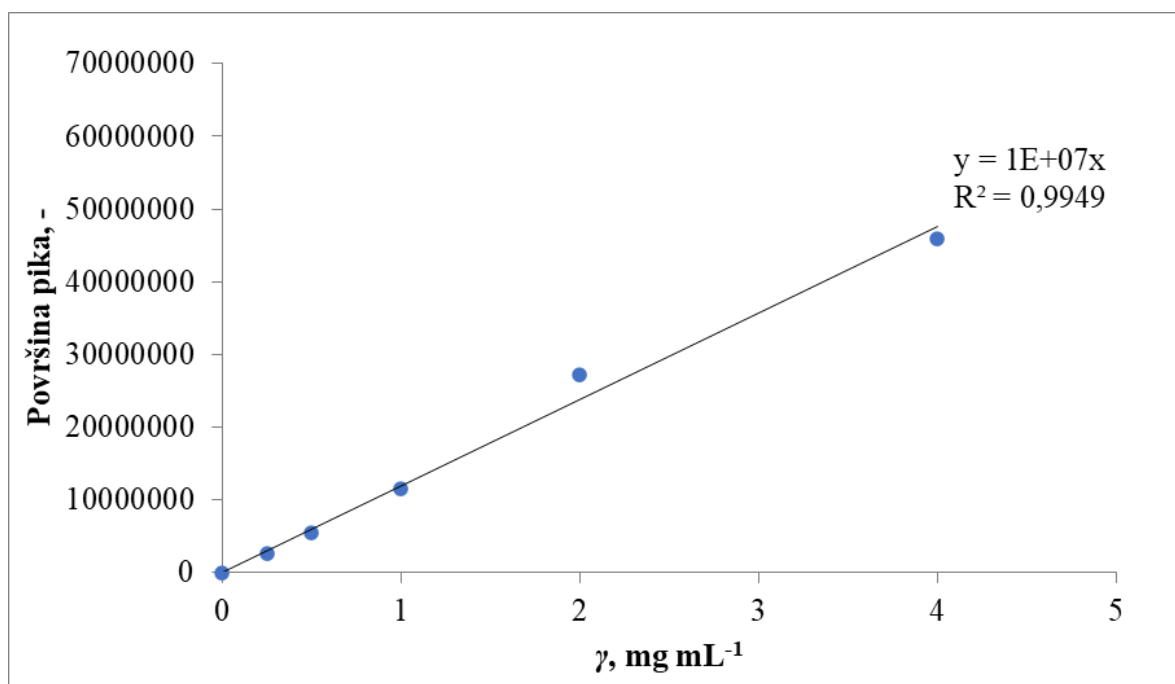
Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije estera palmitinske kiseline



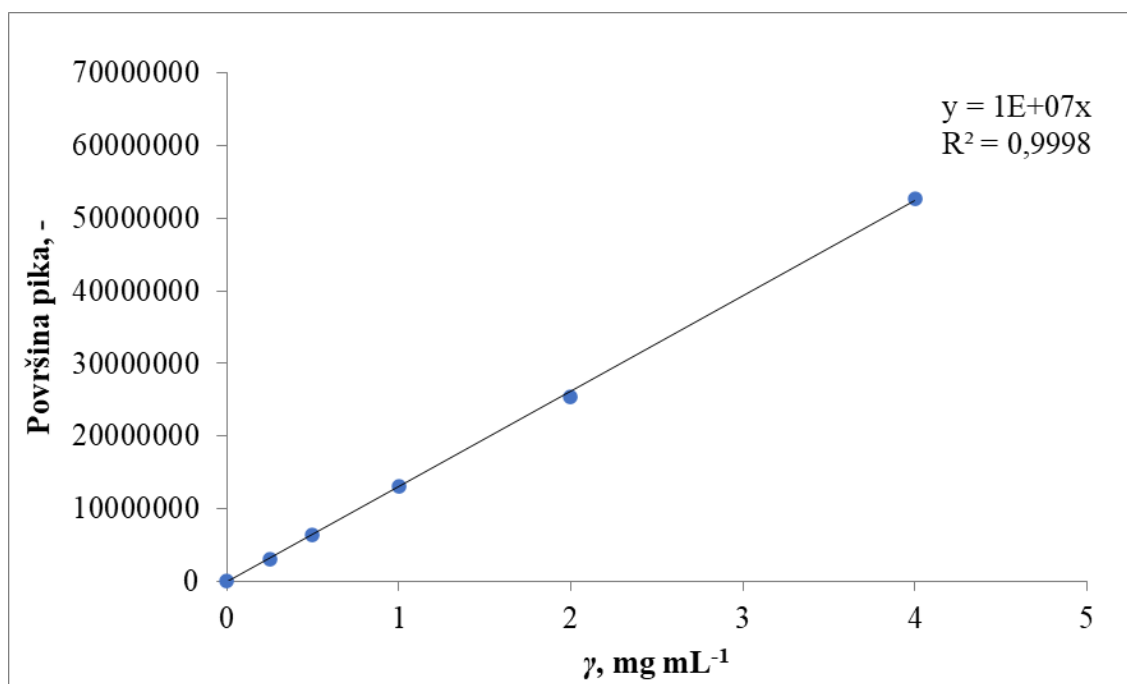
Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije estera stearinske kiseline



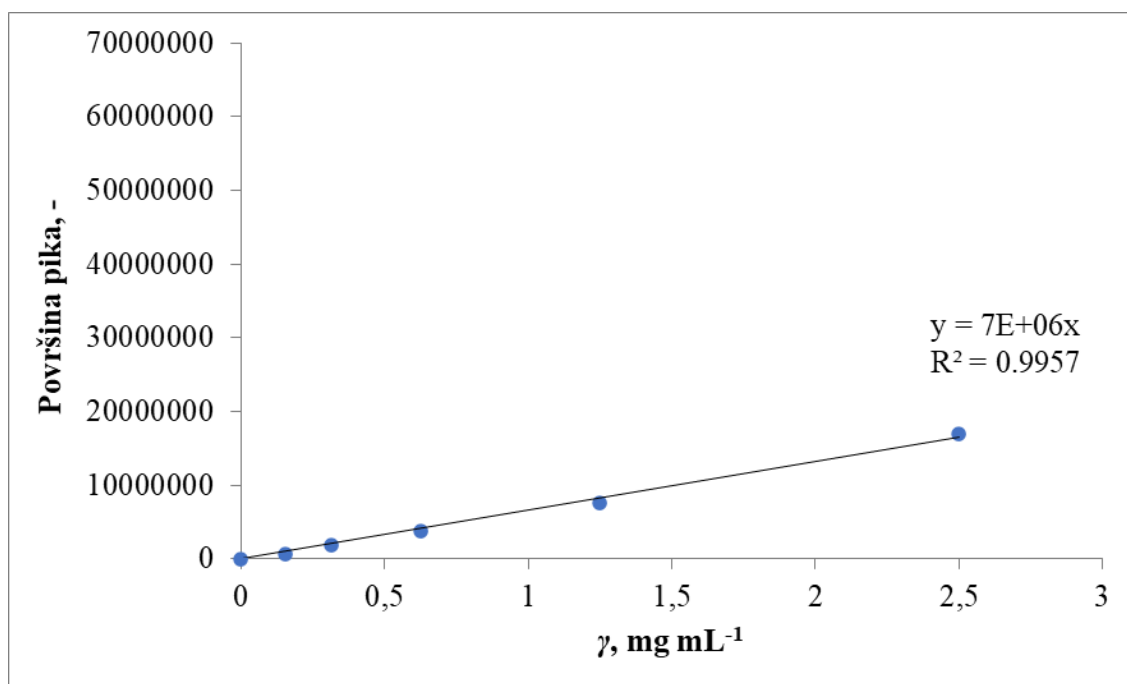
Prilog 4. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije estera oleinske kiseline



Prilog 5. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije estera linolne kiseline



Prilog 6. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glicerola



Prilog 7. Kod u programskom paketu Mathematica 10.0 – 2D matematički model procesa

(*za proteine*)

```
dUF2=1.411*10-7;  
dUF1=6.504*10-8;  
length=0.300;  
Kp=54;  
width=1000/1000000;  
emax=N[length/width];  
v=0.0042;
```

(*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[ $\zeta_i = x_0 + i h_x$ , {i,0,nx}]  
Do[ $\eta_j = y_0 + j h_y$ , {j,0,ny}]
```

```
varsUF1=Table[cUF1i,j, {i,0,nx}, {j,0,ny/2}];  
Table[{cUF1i,j,0}, {i,0,nx}, {j,0,ny/2}];  
AUF1=v/hx;  
BUF1=dUF1/(width* $h_x$ * $h_x$ );  
GUF1=dUF1/(width* $h_y$ * $h_y$ );
```

(*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[ $\zeta_{i1} = x_{01} + i h_{x1}$ , {i,0,nx1}]  
Do[ $\eta_{j1} = y_{01} + j h_{y1}$ , {j,0,ny1}]
```

```
varsUF2=Table[cUF2i,j, {i,0,nx1}, {j,ny1/2,ny1}];
```

```

Table[{cUF2i,j,0},{i,0,nx1},{j,ny1/2,ny1]];
AUF2=v/hx1;
BUF2=dUF2/(width*hx1*hx1);
GUF2=dUF2/(width*hy1*hy1);
cUF1ulaz=0;
cUF2ulaz=3.41;
(*rubni uvjeti*)

```

```

boundUF11=Table[{(cUF1i,0-cUF1i-1,1)/hy==0/.x→ζ1,(cUF1i,ny2-cUF1i-1,ny2)/hy==dUF2/dUF1*(cUF2i-1,ny2-cUF2i,ny2)/hy/.x→ζ1},{i,nx-1}];

```

```

boundUF12=Table[{cUF10,j==0/.y→ηj,(cUF1nx,i-cUF1nx-1,i)/hx==0/.y→ηj},{j,0,ny/2}];

```

```

boundUF21=Table[{cUF2i,ny2==Kp*cUF1i,ny2/.x→ζ1,(cUF2i,ny-cUF2i-1,ny)/hy==0/.x→ζ1},{i,nx-1}];

```

```

boundUF22=Table[{cUF20,j==cUF2ulaz/.y→ηj,(cUF2nx,i-cUF2nx-1,i)/hx==0/.y→ηj},{j,ny/2,ny}];

```

```

MatrixForm[boundUF11];

```

```

MatrixForm[boundUF12];

```

```

MatrixForm[boundUF21];

```

```

MatrixForm[boundUF22];

```

```

(*aproksimacija konacnim razlikama*)

```

```

eqnsUF1=Table[cUF1i,j==BUF1/(AUF1+2*BUF1+2*GUF1)*cUF1i+1,j+(AUF1+BUF1)/(AUF1+2*BUF1+2*GUF1)*cUF1i

```

```

1,j+GUF1/(AUF1+2*BUF1+2*GUF1)*cUF1i,j+1+GUF1/(AUF1+2*BUF1+2*GUF1)*cUF1i,j-1/.{x→ζ1,y→ηj},{i,nx-1},{j,ny/2-1}];

```

```

eqnsUF2=Table[cUF2i,j==BUF2/(AUF2+2*BUF2+2*GUF2)*cUF2i+1,j+(AUF2+BUF2)/(AUF2+2*BUF2+2*GUF2)*cUF2i

```

```

1,j+GUF2/(AUF2+2*BUF2+2*GUF2)*cUF2i,j+1+GUF2/(AUF2+2*BUF2+2*GUF2)*cUF2i,j-1/.{x→ζ1,y→ηj},{i,1,nx-1},{j,ny/2+1,ny-1}];

```

```

MatrixForm[Flatten[{eqnsUF1,eqnsUF2,boundUF11,boundUF12,boundUF21,boundUF22}]]

```

```

;
```

```

solfaza1=varsUF1/.FindRoot[Flatten[{eqnsUF1,eqnsUF2,boundUF11,boundUF12,boundUF21,boundUF22}},{cUF10,0,0},{cUF10,1,0},{cUF10,2,0},{cUF10,3,0},{cUF10,4,0},{cUF10,5,0},{cUF11,0,0},{cUF11,1,0},{cUF11,2,0},{cUF11,3,0},{cUF11,4,0},{cUF11,5,0},{cUF12,0,0},{cUF12,1,0},{cUF12,2,0},{cUF12,3,0},{cUF12,4,0},{cUF12,5,0},{cUF13,0,0},{cUF13,1,0},{cUF13,2,0},{cUF13,3,0},{cUF13,4,0},{cUF13,5,0},{cUF14,0,0},{cUF14,1,0},{cUF14,2,0},{cUF14,3,0},{cUF14,4,0},{cUF14,5,0},{cUF15,0,0},{cUF15,1,0},{cUF15,2,0},{cUF15,3,0},{cUF15,4,0},{cUF15,5,0},{cUF16,0,0},{cUF16,1,0},{cUF16,2,0},{cUF16,3,0},{cUF16,4,0},{cUF16,5,0},{cUF17,0,0},{cUF17,1,0},{cUF17,2,0},{cUF17,3,0},{cUF17,4,0},{cUF17,5,0},{cUF18,0,0},{cUF18,1,0},{cUF18,2,0},{cUF18,3,0},{cUF18,4,0},{cUF18,5,0},{cUF19,0,0},{cUF19,1,0},{cUF19,2,0},{cUF19,3,0},{cUF19,4,0},{cUF19,5,0},{cUF110,0,0},{cUF110,1,0},{cUF110,2,0},{cUF110,3,0},{cUF110,4,0},{cUF110,5,0},{cUF20,5,1.457},{cUF20,6,1.457},{cUF20,7,1.457},{cUF20,8,1.457},{cUF20,9,1.457},{cUF20,10,1.457},{cUF21,5,0},{cUF21,6,0},{cUF21,7,0},{cUF21,8,0},{cUF21,9,0},{cUF21,10,0},{cUF2

```

```
2,5,0},{cUF22,6,0},{cUF22,7,0},{cUF22,8,0},{cUF22,9,0},{cUF22,10,0},{cUF23,5,0},{cUF23,6,0},
{cUF23,7,0},{cUF23,8,0},{cUF23,9,0},{cUF23,10,0},{cUF24,5,0},{cUF24,6,0},{cUF24,7,0},{cUF
24,8,0},{cUF24,9,0},{cUF24,10,0},{cUF25,5,0},{cUF25,6,0},{cUF25,7,0},{cUF25,8,0},{cUF25,9,0
},{cUF25,10,0},{cUF26,5,0},{cUF26,6,0},{cUF26,7,0},{cUF26,8,0},{cUF26,9,0},{cUF26,10,0},{c
UF27,5,0},{cUF27,6,0},{cUF27,7,0},{cUF27,8,0},{cUF27,9,0},{cUF27,10,0},{cUF28,5,0},{cUF28,
6,0},{cUF28,7,0},{cUF28,8,0},{cUF28,9,0},{cUF28,10,0},{cUF29,5,0},{cUF29,6,0},{cUF29,7,0},{
cUF29,8,0},{cUF29,9,0},{cUF29,10,0},{cUF210,5,0},{cUF210,6,0},{cUF210,7,0},{cUF210,8,0},{c
UF210,9,0},{cUF210,10,0}]
```

```
solfaza2=varsUF2/.FindRoot[Flatten[{eqnsUF1,eqnsUF2,boundUF11,boundUF12,boundUF2
1,boundUF22}],{cUF10,0,0},{cUF10,1,0},{cUF10,2,0},{cUF10,3,0},{cUF10,4,0},{cUF10,5,0},{c
UF11,0,0},{cUF11,1,0},{cUF11,2,0},{cUF11,3,0},{cUF11,4,0},{cUF11,5,0},{cUF12,0,0},{cUF12,1
,0},{cUF12,2,0},{cUF12,3,0},{cUF12,4,0},{cUF12,5,0},{cUF13,0,0},{cUF13,1,0},{cUF13,2,0},{c
UF13,3,0},{cUF13,4,0},{cUF13,5,0},{cUF14,0,0},{cUF14,1,0},{cUF14,2,0},{cUF14,3,0},{cUF14,4
,0},{cUF14,5,0},{cUF15,0,0},{cUF15,1,0},{cUF15,2,0},{cUF15,3,0},{cUF15,4,0},{cUF15,5,0},{c
UF16,0,0},{cUF16,1,0},{cUF16,2,0},{cUF16,3,0},{cUF16,4,0},{cUF16,5,0},{cUF17,0,0},{cUF17,1
,0},{cUF17,2,0},{cUF17,3,0},{cUF17,4,0},{cUF17,5,0},{cUF18,0,0},{cUF18,1,0},{cUF18,2,0},{c
UF18,3,0},{cUF18,4,0},{cUF18,5,0},{cUF19,0,0},{cUF19,1,0},{cUF19,2,0},{cUF19,3,0},{cUF19,4
,0},{cUF19,5,0},{cUF110,0,0},{cUF110,1,0},{cUF110,2,0},{cUF110,3,0},{cUF110,4,0},{cUF110,5
,0},{cUF20,5,1.457},{cUF20,6,1.457},{cUF20,7,1.457},{cUF20,8,1.457},{cUF20,9,1.457},{cUF2
0,10,1.457},{cUF21,5,0},{cUF21,6,0},{cUF21,7,0},{cUF21,8,0},{cUF21,9,0},{cUF21,10,0},{cUF2
2,5,0},{cUF22,6,0},{cUF22,7,0},{cUF22,8,0},{cUF22,9,0},{cUF22,10,0},{cUF23,5,0},{cUF23,6,0},
{cUF23,7,0},{cUF23,8,0},{cUF23,9,0},{cUF23,10,0},{cUF24,5,0},{cUF24,6,0},{cUF24,7,0},{cUF
24,8,0},{cUF24,9,0},{cUF24,10,0},{cUF25,5,0},{cUF25,6,0},{cUF25,7,0},{cUF25,8,0},{cUF25,9,0
},{cUF25,10,0},{cUF26,5,0},{cUF26,6,0},{cUF26,7,0},{cUF26,8,0},{cUF26,9,0},{cUF26,10,0},{c
UF27,5,0},{cUF27,6,0},{cUF27,7,0},{cUF27,8,0},{cUF27,9,0},{cUF27,10,0},{cUF28,5,0},{cUF28,
6,0},{cUF28,7,0},{cUF28,8,0},{cUF28,9,0},{cUF28,10,0},{cUF29,5,0},{cUF29,6,0},{cUF29,7,0},{
cUF29,8,0},{cUF29,9,0},{cUF29,10,0},{cUF210,5,0},{cUF210,6,0},{cUF210,7,0},{cUF210,8,0},{c
UF210,9,0},{cUF210,10,0}]
```

```
solfaza2a=solfaza2*2
```

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

```
uappr2=ListInterpolation[solfaza2a,{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]
```

(*koncentracija rafinat na izlazu iz jedne cijevi*)

```
((uappr1[emax,-1]+uappr1[emax,-0.5]+uappr1[emax,0])/3)
```

(*koncentracija ekstrakt na izlazu iz druge cijevi*)

```
((uappr2[emax,0]+uappr2[emax,0.5]+uappr2[emax,1])/3)
```

(*provjera zakona očuvanja tvari*)

$(u_{appr1}[emax,-1]+u_{appr1}[emax,-0.5]+u_{appr1}[emax,0])/6+(u_{appr2}[emax,0]+u_{appr2}[emax,0.5]+u_{appr2}[emax,1])/6$

9. ŽIVOTOPIS

Anabela Ljubić [REDACTED] U Ivanu je završila Osnovnu školu Ivana Kukuljevića Sakcinskog i Osnovnu glazbenu školu Ladislav Šaban te je sudjelovala na državnim natjecanjima iz fizike, matematike i hrvatskog jezika, dok je na državnom natjecanju iz kemije osvojila 2. mjesto. Potom je upisala Prvu gimnaziju Varaždin, smjer prirodoslovno-matematička gimnazija i tijekom tog razdoblja sudjelovala na državnim natjecanjima iz kemije i fizike, a proglašena je i najboljom maturanticom škole. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo upisala je u Zagrebu 2016. godine, dok je diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijsko procesno inženjerstvo upisala 2019. godine. Tijekom studija primila je nagrade Fakulteta za najbolju studenticu 1., 2. i 3. godine preddiplomskih studija te 1. godine diplomskog studija, a završni rad pod vodstvom prof. dr. sc. Bruna Zelića obranila je 2019. godine uz pohvalu *Summa Cum Laude*. Sudjelovala je na 2. kongresu studenata biotehnologije, XII. susretu mladih kemijskih inženjera, 18. Ružičkinim danima i *The 1st International Conference on Micromachines and Applications* s posterskim priopćenjima te je koautorica tri znanstvena rada objavljenih u časopisima *Micromachines*, *Computers & Chemical Engineering* i *Energies*. Dobitnica je Rektorove nagrade za individualni znanstveni rad u ak. god. 2019./2020., također pod vodstvom prof. dr. sc. Bruna Zelića, te je od 2019. godine članica Studentskog zbora Fakulteta, a od travnja 2021. obnaša dužnost predsjednice Savjeta mladih Grada Ivanca.