

# Polimerizacija flavonoida katalizirana enzimom peroksidaza porijeklom iz hrena

---

**Boltek, Ana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*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:149:302147>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-11**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Ana Boltek

ZAVRŠNIRAD

Zagreb, rujan 2024.

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

Kandidatkinja Ana Boltek

Predala je izrađen završni rad dana: 18. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

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

dr. sc. Andreja Žužić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Ivan Karlo Cingesar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

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

Završni ispit održat će se dana: 23. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Ana Boltek

POLIMERIZACIJA FLAVONOIDA KATALIZIRANA ENZIMOM PEROKSIDAZA  
PORIJEKLOM IZ HRENA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Anita Šalić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Anita Šalić
2. dr. sc. Andreja Žužić
3. dr. sc. Ivan Karlo Cingesa

Zagreb, rujan 2024.

## *Zahvala*

*Prvenstveno, od srca se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Aniti Šalić na strpljenju, pomoći, uloženom trudu i vremenu za izradu ovog završnog rada.*

*Također se zahvaljujem svojim kolegama, prijateljima i naravno svojoj obitelji na razumijevanju, podršci i pomoći tijekom studiranja.*

## SAŽETAK

Flavoni, u koje se ubraja i apigenin, prepoznati su kao obećavajući kandidati za prevenciju metastaza raka zahvaljujući njihovoj sposobnosti inhibicije ključnih signalnih puteva. Ipak, prirodni oblik apigenina pokazuje slabu topljivost i stabilnost, što ograničava njegovu terapijsku učinkovitost. Kako bi se prevladala ta ograničenja, apigenin se može kemijski modificirati u biflavonoide i derivate poliapigenina pomoću enzima poput lakaze i peroksidaze porijeklom iz hrena (HRP).

Cilj ovog rada bio je provesti polimerizaciju apigenina pomoću enzima peroksidaza porijeklom iz hrena. Polimerizacija je provedena u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru, a tijekom procesa praćene su karakteristične veličine procesa kao što su konverzija, reakcijsko vrijeme/vrijeme zadržavanja i procesna stabilnost enzima. Oligomerna struktura flavonoida potvrđena je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FT-IR) i kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD). U drugom dijelu istraživanja ispitana je reakcijska kinetika polimerizacije apigenina metodom početnih brzina te su procijenjeni kinetički parametri. Kinetika polimerizacije apigenina katalizirana enzimom peroksidaza porijeklom iz hrena opisana je Michaelis–Menteničinom kinetikom. Praćenjem procesne stabilnosti enzima, primijećen je pad aktivnosti te je procijenjena konstanta deaktivacije enzima peroksidaza porijeklom iz hrena. Za reakciju provedenu u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru postavljen je odgovarajući reaktorski model koji se sastojao od kinetičkog modela, deaktivacije enzima i bilanci tvari. Ocjena valjanosti modela provedena je na dva seta nezavisnih eksperimenata.

*Ključne riječi:* flavoni, apigenin, enzim peroksidaza, polimerizacija

## SUMMARY

Flavones, which include apigenin, are recognized as promising candidates for the prevention of cancer metastasis due to their ability to inhibit key signaling pathways. However, the natural form of apigenin shows poor solubility and stability, which limits its therapeutic efficacy. To overcome these limitations, apigenin can be chemically modified into biflavonoids and polyapigenin derivatives using enzymes such as laccase and horseradish-derived peroxidase enzyme (HRP).

The aim of this work was to polymerize apigenin using horseradish-derived peroxidase enzymes. The polymerization was carried out in a batch reactor and a microreactor, and during the process characteristic parameters such as conversion, reaction time/retention time and process stability of the enzyme were monitored. Oligomeric structure of flavonoids was confirmed by Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) and high performance liquid chromatography (HPLC-DAD). In the second part of the study, the reaction kinetics of apigenin polymerization was investigated using the initial rate method and the kinetic parameters were estimated. The kinetics of apigenin polymerization catalyzed by the enzyme horseradish peroxidase was described by Michaelis–Menten kinetics. When monitoring the process stability of the enzyme, a decrease in activity was observed and the deactivation constant of the horseradish peroxidase enzyme was estimated. A suitable reactor model was proposed for the reaction carried out in a batch reactor and a microreactor, which consisted of a kinetic model, enzyme deactivation and a mass balance. The validation of the developed model was performed using two independent experiments.

*Key words:* flavones, apigenin, peroxidase enzyme, polymerization

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Flavonoidi.....	2
2.1.1. Apigenin.....	3
2.2. Enzimi.....	4
2.2.1. Enzim peroksidaza.....	6
2.3. Kemijski reaktori.....	7
2.3.1. Kotlasti (šaržni) reaktor.....	7
2.3.2. Mikroreaktori.....	9
2.4. Matematičko modeliranje - reaktorski i kinetički modeli.....	10
2.4.1. Kinetički model.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	15
3.1. Kemikalije.....	15
3.2. Aparatura.....	16
3.3. Priprema otopina.....	16
3.4. Metode.....	17
3.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije flavonoida.....	17
3.4.2. Linearizirani Bradford test za određivanje koncentracije proteina.....	18
3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije apigenina.....	19
3.4.4. Određivanje aktivnosti enzima peroksidaza porijeklom iz hrena.....	19
3.4.5. Analiza uzoraka HPLC – DAD kromatografijom.....	20
3.4.6. Analiza uzoraka infracrvenom spektroskopijom s Fourireovom transformacijom (FT-IR).....	21
3.4.7. Ekstrakcija apigenina.....	21
3.4.8. Ispitivanje utjecaja količine otapala na učinkovitost ekstrakcije apigenina iz kapsule.....	21
3.4.9. Ispitivanje stabilnosti apigenina.....	21
3.4.10. Provedba polimerizacije apigenina u kotlastom reaktoru.....	22
3.4.11. Provedba polimerizacije apigenina u mikroreaktoru.....	22
3.4.12. Obrada podataka.....	22
3.5. Kriterij slaganja eksperimenta i modela.....	23
4. MATEMATIČKI MODEL POLIMERIZACIJE APIGENINA U KOTLASTOM I MIKROREAKTORU.....	24



5. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
5.1. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju apigenina .....	25
5.2. Utjecaj količine otapala na količinu ekstrahiranog apigenina porijeklom iz kapsule .....	29
5.3. Praćenje stabilnosti apigenina .....	30
5.4. Provedba polimerizacije apigenina.....	30
5.4.1. Polimerizacija apigenina u kotlastom reaktoru .....	31
5.4.2. Provedba polimerizacije apigenina u mikroreaktoru.....	32
5.5. Analiza produkta spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FT-IR) i kapljevinom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD).....	33
5.6. Matematički model polimerizacije apigenina u kotlastom i mikroreaktoru.....	35
6. ZAKLJUČAK.....	37
7. LITERATURA .....	38
8. PRILOZI .....	42
9. ŽIVOTOPIS.....	51

## 1. UVOD

U liječenju kroničnih bolesti poput dijabetesa, moždanog udara i raka, posebna pažnja posvećuje se prehrani bogatoj voćem i povrćem, koji su značajan izvor prirodnih bioaktivnih spojeva. Među njima, polifenoli predstavljaju najveću skupinu, s flavonoidima kao najzastupljenijom podskupinom. Flavonoidi uključuju flavone, flavonole, flavanone, izoflavonoide i antocijanidine.<sup>1</sup> Ovi spojevi su definirani kao sekundarni biljni metaboliti što znači da nisu neophodni za osnovne životne funkcije biljaka, poput rasta, razvoja ili reprodukcije, iako igraju ključne uloge u tim procesima. Flavonoidi sudjeluju u širokom spektru bioloških funkcija, uključujući regulaciju stanične diobe, održavanje integriteta membrane, transkripciju gena, staničnu signalizaciju i transport auksina. Također su uključeni u obrambene mehanizme biljaka, kao što su proizvodnja fitoaleksina za obranu od bakterija, te zaštita od UV zračenja i drugih abiotičkih stresova.

Flavonoidi također igraju ključnu ulogu u razmnožavanju i plodnosti biljaka, privlačeći oprašivače i raspršivače plodova, te omogućuju interakciju između biljaka i mikroorganizama, kao i natjecanje s drugim biljkama. Evolucija sinteze biflavonoida među različitim biljnim vrstama bila je značajno oblikovana interakcijama biljaka s okolišem, što je utjecalo na količinu, lokalizaciju i specifične funkcije ovih spojeva. Stoga, flavonoidi imaju značajnu ulogu u biokemiji i ekofiziologiji biljaka, pridonoseći njihovom rastu, razvoju, odgovoru na stresove i preživljavanju.<sup>2</sup>

U ovom radu istražen je flavon apigenin, poznat po svojoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala i djelovanju kao antioksidans, čime smanjuje oksidativni stres. Apigenin je poznat po brojnim zdravstvenim benefitima, uključujući potporu zdravlju srca i mozga, kao i zdravlju kože.<sup>3</sup> Kako bi se povećala stabilnost apigenina, provedena je njegova polimerizacija u poliapigenin. Proces je proveden u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru uz pomoć enzima peroksidaze porijeklom iz hrena (HRP).

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Flavonoidi

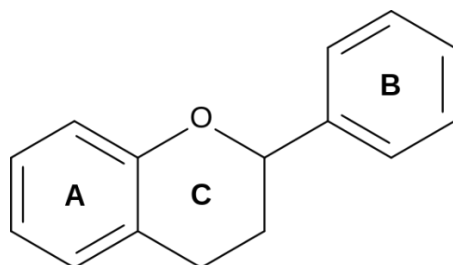
Flavonoidi predstavljaju značajnu skupinu fitokemikalija koje su prisutne u gotovo svim dijelovima biljke, gdje imaju ključne uloge u zaštiti od štetnog sunčevog zračenja, obrani od patogena i biljojeda te u regulaciji biljnog metabolizma. Do danas je identificirano i opisano preko 6000 različitih flavonoidnih spojeva. Kemijski, flavonoidi se svrstavaju u polifenole zbog česte prisutnosti jednog ili više hidroksilnih supstituenata unutar njihove molekulske strukture.<sup>1</sup> Osnovni kostur flavonoida sastoji se od 15 ugljikovih atoma raspoređenih u dva aromatska prstena međusobno povezana vezom od tri ugljikova atoma. (Slika 1.) Most je kod većine flavonoida zatvoren u heterociklički prsten (prsten C), dok kod nekih spojeva, poput halkona, ostaje otvoren.

Većina flavonoida u prirodi postoje kao O-glikozidi, koji sadrže šećernu komponentu, dok su flavanoli (npr. katehini i proantocijanidini) prisutni kao aglikoni, tj. bez šećerne komponente. Hidroksilne skupine i šećeri pridonose topljivosti flavonoida u vodi, dok drugi supstituenti, poput metil etera, povećavaju njihovu lipofilnost. Hidrofilni se flavonoidi pohranjuju u vakuolama biljnih stanica.<sup>4</sup> Široko su rasprostranjeni u povrću, voću i voćnim sokovima, kao što su grožđe, vino, jabuke, čaj i bobičasto voće. Zbog njihove visoke zastupljenosti u ljudskoj prehrani i njihove uloge u prevenciji različitih bolesti, flavonoidi su u posljednjih 15 godina postali predmetom intenzivnog interesa znanstvene zajednice i prehrambene industrije.

Flavonoidi posjeduju brojna biološka i farmakološka svojstva, uključujući antioksidativna, antimutagena, antikancerogena, antimikrobna, antialergijska, antivirusna i protuupalna svojstva. Njihova antiradikalna sposobnost, koja omogućava zaštitu od različitih vrsta slobodnih radikala poput hidroksila, superoksida, peroksida i lipid-peroksid radikala, posebno je važna. Struktura polifenola značajno utječe na njihov antioksidativni kapacitet, pri čemu konfiguracija, broj i raspodjela funkcionalnih skupina određuju njihovu reaktivnost i mehanizam djelovanja. Ključne strukturne značajke flavonoida koje osiguravaju učinkovitu antiradikalnu aktivnost uključuju o-dihidroksilnu skupinu na B prstenu, dvostruku vezu između C2 i C3 u kombinaciji s karbonilnom skupinom na C4 prstenu, te hidroksilne skupine na C3 i C5 položajima.<sup>5</sup>

Polifenolni spojevi od velikog su interesa zbog svojih antioksidativnih svojstava. Veza između unosa polifenola i poboljšanog zdravlja ljudi posebno je važna u zaštiti od kardiovaskularnih bolesti, hipertenzije, pretilosti i raka. Flavonoidi su također važan sastojak u

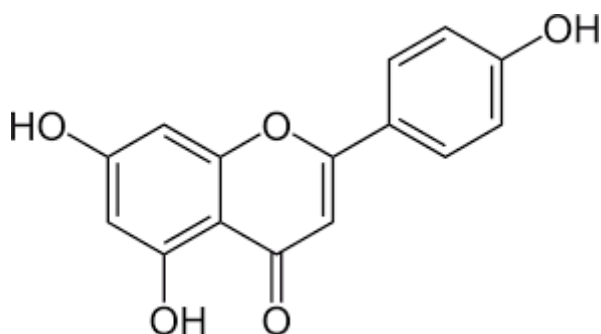
farmaceutskim, medicinskim i kozmetičkim pripravcima. Stupanj polimerizacije flavonoida značajno utječe na njihov biološki učinak.<sup>6</sup>



**Slika 1.** Prikaz osnovne strukturne formule flavonoida<sup>7</sup>

### 2.1.1. Apigenin

Apigenin (4',5,7-trihidroksiflavon; CAS: 520-36-5; Slika 2.) je jedan od najzastupljenijih i najviše proučavanih flavonoida, odnosno flavona u biljnom svijetu. Prisutan je u znatnim količinama u raznim prehrambenim izvorima, uključujući povrće (peršin, celer, luk), voće (naranče), ljekovitom bilju (kamilica, majčina dušica, origano, bosiljak) te biljnim napitcima (čaj, pivo i vino). Komercijalno, apigenin je dostupan kao svijetložuti kristalni prah. Osim što posjeduje brojne nutritivne i organoleptičke karakteristike, apigenin ima značajan potencijal za poboljšanje ljudskog zdravlja.



**Slika 2.** Prikaz strukturne formule apigenina<sup>8</sup>

Apigenin, poznat po svojim antioksidativnim svojstvima, može biti terapijski učinkovit u prevenciji i liječenju upala, autoimunih i neurodegenerativnih bolesti, kao i

određenih vrsta raka. Ovaj spoj pokazuje nisku toksičnost prema normalnim stanicama u usporedbi s kancerogenim stanicama, što ga čini posebno interesantnim kao terapeutika. Na primjeru kamilice (*Matricaria chamomilla*), koja je bogati izvor apigenina, istraženo je njegovo djelovanje u poboljšanju učenja i pamćenja kod demencije. Rezultati su pokazali pozitivne učinke apigenina na poboljšanje pamćenja, pripisane njegovoj sposobnosti hvatanja slobodnih radikala. Ovi rezultati sugeriraju da bi etanolni ekstrakt kamilice mogao imati korisne učinke u liječenju kognitivnih poremećaja poput Alzheimerove bolesti. Apigenin se smatra sigurnim čak i pri visokim dozama.

Zbog prepoznatih blagotvornih svojstava apigenina, kontinuirano se radi na poboljšanju njegove ekstrakcije koja u posljednje vrijeme uključuje i ekstrakciju iz alternativnih izvora kao što su makro- i mikroalge te agro-prehrambeni otpad. Primjena zelenih i inovativnih tehnologija poput enzimske obrade, mikrovalno potpomognute ekstrakcije i ekstrakcije ultrazvukom mogla bi omogućiti ekološki prihvatljive i održive metode za dobivanje apigenina.<sup>1</sup> Međutim, veliki izazov u njegovoj izolaciji je vrlo niska topljivost u vodi (1,35 µg/mL) i visoka propusnost, što osim problema kod ekstrakcije, ograničava i njegovu primjenu u istraživanjima i terapiji.<sup>1</sup> Podaci o topljivosti apigenina u vodenim i organskim otapalima ključni su za njegovu ekstrakciju, pročišćavanje, rekristalizaciju te ukoliko se koristi u proizvodnji lijekova, za otkrivanje i formulaciju samog lijeka.<sup>9</sup>

Kako bi se prevladala navedena ograničenja, apigenin se može kemijski modificirati u biflavonoide i derivate poliapigenina koji bi mogli povećati njegovu stabilnost i topljivost. Jedan od načina modifikacije je enzimatski katalizirana reakcija pomoću enzima poput lakaze i peroksidaze porijeklom iz hrena (HRP).

## **2.2. Enzimi**

Enzimi su biološki katalizatori ključni za ispunjavanje metaboličkih potreba stanica, omogućujući odvijanje brojnih biokemijskih reakcija. Građeni su od linearnih lanaca aminokiselina, koji tvore trodimenzionalnu strukturu. Ova struktura, određena slijedom aminokiselina, direktno utječe na katalitičku aktivnost enzima. U usporedbi sa supstratima, enzimi su obično veći, u rasponu od 62 do više od 2500 aminokiselinskih ostataka. Međutim, samo mali dio enzimske strukture tzv. aktivno mjesto sudjeluje u katalizi.

Iako podliježu svim zakonima fizike i kemije, enzimi se u mnogo čemu razlikuju od klasičnih kemijskih katalizatora. Enzimi pokazuju visoku specifičnost prema supstratima, omogućujući precizne biološke procese, poput sinteze proteina i nukleinskih kiselina s

minimalnim pogreškama, a enzimske reakcije odvijaju se između  $10^6$  do  $10^{12}$  puta brže od nekataliziranih te su najmanje 1000 puta brže od onih koje kataliziraju kemijski katalizatori.

Pri izlaganju povišenim temperaturama, enzimska struktura može denaturirati, što dovodi do gubitka njegove funkcionalnosti.<sup>10</sup> Aktivnost enzima može biti inhibirana specifičnim inhibitorima ili stimulirana aktivatorima, a neki enzimi zahtijevaju prisutnost kofaktora, poput metalnih iona ili koenzima, za svoju aktivnost.<sup>11</sup>

Zbog svoje visoke učinkovitosti, enzimi su iznimno zanimljivi za industrijsku primjenu, često nadmašujući tradicionalne kemijske katalizatore. Enzimske reakcije se obično provode pri blagim uvjetima temperature, pH i tlaka, bez potrebe za dodatnim koracima zaštite ili deaktivacije funkcionalnih skupina, što je uobičajeno u konvencionalnim organskim sintezama. Kiralnost enzima također omogućuje razvoj stereoselektivnih reakcija, smanjujući proizvodnju otpada i povećavajući učinkovitost u usporedbi s klasičnim metodama organske sinteze.

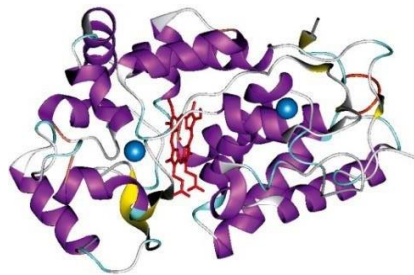
Ranije su enzimi dobivali imena prema istraživačima koji su ih otkrili, no s vremenom je klasifikacija postala sustavnija i preciznija. Prema Međunarodnoj uniji biokemičara i molekularnih biologa (IUBMB), enzimi su podijeljeni u šest glavnih funkcionalnih klasa, koje su klasificirane prema vrsti kemijske reakcije koju kataliziraju. Klase su:

- **Oksidoreduktaze** su enzimi koji kataliziraju oksidacijsko-redukcijske reakcije, u kojima dolazi do prijenosa elektrona između molekula, obično iz jednog oblika molekule u drugi.
- **Transferaze** su enzimi koji omogućuju prijenos funkcionalnih skupina s jedne molekule (donora) na drugu molekulu (akceptora).
- **Hidrolaze** su enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize, pri čemu dolazi do cijepanja kemijskih veza uz dodatak molekule vode.
- **Liaze** su enzimi koji kataliziraju reakcije u kojima se dodaju ili uklanjaju molekule poput vode, ugljičnog dioksida ili amonijaka, često stvarajući ili razgrađujući dvostruke veze.
- **Izomeraze** su enzimi koji kataliziraju unutarnje strukturne promjene unutar molekule, što dovodi do formiranja izomera—molekula s istim atomima, ali različitim rasporedom.
- **Ligaze** su enzimi koji kataliziraju reakcije u kojima dolazi do spajanja dviju molekula, proces poznat kao ligacija, obično uz korištenje energije dobivene hidrolizom ATP-a.<sup>12</sup>

### 2.2.1. Enzim peroksidaza

Enzimi peroksidaze kataliziraju oksidacijske reakcije koristeći vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) ili druge perokside kao supstrate. Ovi enzimi pripadaju skupini oksidoreduktaza i igraju važnu ulogu u obrani organizama od oksidativnog stresa, razgradnji toksičnih spojeva, te sudjeluju u različitim metaboličkim procesima.

Jedna od najpoznatijih peroksidaza je peroksidaza porijeklom iz hrena (HRP; Slika 3.), enzim s molekulskom masom od 40 kDa, koji se sastoji od najmanje 30 izoenzimskih oblika. Među njima, HRP izoenzim C (HRP-C) je najzastupljeniji i sastoji se od 308 aminokiselinskih ostataka, četiri disulfidna mosta između cisteinskih ostataka, hem skupine [željezo(III) protoporfirin IX] te dva atoma kalcija. Ovaj izoenzim koristi vodikov peroksid za kataliziranje jednoelektronske oksidacije širokog spektra aromatskih supstrata, što rezultira stvaranjem različitih polimera.<sup>6</sup>



**Slika 3.** Molekulski model enzima peroksidaze porijeklom iz hrena određen rendgenskom kristalografijom<sup>13</sup>

Kao što samo ime kaže, enzim peroksidaza porijeklom iz hrena, izolira se iz hrena. Hren (*Armoracia rusticana*) je višegodišnja zeljasta biljka koja se uzgaja u područjima svijeta s umjerenom kontinentalnom klimom, prvenstveno zbog kulinarske vrijednosti njegovih korijena. Korijen hrena bogat je izvor enzima peroksidaze. Proizvodnja peroksidaze iz korijena hrena odvija se u velikim razmjerima zbog komercijalne upotrebe enzima, primjerice kao komponente u kliničkim dijagnostičkim setovima i imunološkim testovima. Iako se termin "peroksidaza porijeklom iz hrena" često koristi generički, korijen hrena sadrži različite izoenzime peroksidaze, među kojima je HRP-C najzastupljeniji.<sup>13</sup>

## 2.3. Kemijski reaktori

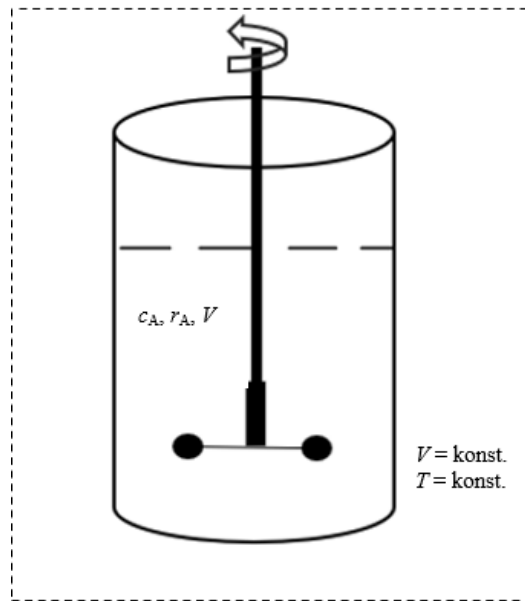
Kemijski reaktori su ključni dijelovi opreme u mnogim proizvodnim procesima. Prilikom odabira reaktora za specifične zadatke, neophodno je uzeti u obzir ekonomske i procesne aspekte. Reaktori se biraju tako da zadovolje zahtjeve reakcijskih mehanizama, kinetike reakcije i potrebnog proizvodnog kapaciteta. Ključni faktori u njihovom radu su produktivnost i konverzija koja se može postići u njima, koji izravno utječu na ekonomičnost procesa, uključujući troškove separacije reakcijske smjese i recikliranje neizreagiranih reaktanata. Radni uvjeti poput temperature, tlaka i brzine miješanja moraju biti optimalno podešeni kako bi se postigla najveća moguća ekonomičnost procesa.<sup>14</sup>

### 2.3.1. Kotlasti (šaržni) reaktor

Kotlasti reaktor dominantno je prisutan u industriji za provedbu velikog broja reakcija koje se uglavnom provode u kapljevitom stanju. Jednostavnost izvedbe i prilagodljivost promjeni početnih uvjeta čini kotlaste reaktore nezamjenjivim procesnim jedinicama u mnogim industrijama. Kotlasti reaktori se često koriste za proizvodnju manjih količina produkata, npr. lijekova, organskih bojila i drugih kemikalija (*fine chemicals industry*).<sup>15</sup> Ovi reaktori su zatvoreni sustavi što znači da za vrijeme reakcije nema izmjene tvari s okolinom. U njima se ostvaruje približno idealno miješanje, pa su vrijednosti svih parametara približno iste u bilo kojoj točki reaktorskog prostora. Zbog kemijske reakcije koja je vremenski proces, kotlasti reaktor je uvijek u nestacionarnom radu.

Kotlasti reaktor (Slika 4.) je obično izveden u obliku kotla s miješalom i plaštom za grijanje ili hlađenje. Valjkasti oblik reaktora uvjetovan je uglavnom konstruktivnim razlozima, namijenjen je lakšoj proizvodnji, mogućnosti postizanja višeg tlaka, boljim miješanjem kao i čišćenjem. Osim naziva kotlasti reaktor rabe se i izrazi šaržni reaktor ili engl. *batch reactor*.<sup>16</sup>





**Slika 4.** Shematski prikaz kotlastog reaktora

Osnovni reaktorski (matematički) model idealnog kotlastog reaktora čine bilanca množine tvari (Jednadžba (1)) i bilanca energije (Jednadžba (2)) koje se mogu prikazati na sljedeći način u slučaju odvijanja jednostavne reakcije gdje iz reaktanta A nastaje produkt P:

*Količina tvari A nestala kemijskom reakcijom u reaktorskom volumenu = Akumulacija tvari A u reaktorskom volumenu* (1)

*Količina nastale (nestale) topline kem. reakcijom u reaktorskom volumenu i jediničnom vremenu = Akumulacija topline u reaktorskom volumenu i jediničnom vremenu + Toplina koja se prenese u okolinu u jediničnom vremenu<sup>17</sup>* (2)

Matematički model kotlastog reaktora za reaktant A u tom slučaju glasi (Jednadžba (3)):

$$r_A \cdot V = - \frac{dn_A}{dt} \quad (3)$$

gdje su:

$r_A$  brzina kemijske reakcije

$V$  volumen

$n_A$  množina tvari A

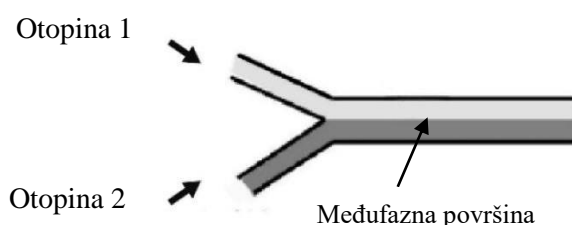
$t$  vrijeme

### 2.3.2. Mikroreaktori

Mikroreaktori pripadaju grupi cijevnih, protočnih reaktora (Slika 5.), karakteriziranih dimenzijama ispod 1 mm, pri čemu širina, visina, promjer i duljina variraju u rasponu od 10 do 1000  $\mu\text{m}$ . Razvoj minijaturiziranih procesa i reaktora započeo je kasnih 1980-ih godina, a tehnološki napredak u posljednja dva desetljeća značajno je ubrzao trend minijaturizacije, potaknut novim primjenama i potrebom za održivim proizvodnim metodama. Zbog sve strožih ekoloških regulativa i izazova energetske sigurnosti, sve više se istražuju alternativne tehnike koje omogućuju održiviju proizvodnju, pri čemu mikroreaktorska tehnologija (MRT) predstavlja jednu od ključnih inovacija.

Prvi pokušaj praktične primjene koncepta mikroreaktora potječe iz 1987. godine, gdje su znanstvenici demonstrirali prototip mikroreaktora izrađen tehnikom mikroelektromehaničkih sustava (MEMS). Ova istraživanja nastavila su se i tijekom 1990-ih, s eksperimentalnim studijama koje su uključivale kemijske reakcije u minijaturiziranim sustavima. Mikroreaktori imaju značajan potencijal u smanjenju transporta i proizvodnje opasnih kemikalija, smanjenju nastanka nusproizvoda te povećanju učinkovitosti i sigurnosti procesa.<sup>18</sup>

U idealnim uvjetima, prolaz reakcijske smjese kroz cijevni reaktor zamišljen je kao konvektivni prijenos isključivo u aksijalnom smjeru, bez miješanja po dužini reaktora, što se definira kao idealno strujanje. Idealno strujanje podrazumijeva jednolike brzine strujanja u smjeru aksijalne osi, uz dobro izmiješanu smjesu u radijalnom smjeru. Ovakvo idealno strujanje najbliže je ostvareno u cijevnim reaktorima, osobito onima s nepokretnim slojem katalizatora. Međutim, idealno strujanje predstavlja samo aproksimaciju stvarnog strujanja, jer je u praksi nemoguće postići savršene uvjete. S određenim prilagodbama i pod specifičnim uvjetima, realno strujanje može se približiti ovoj idealnoj predodžbi.<sup>17</sup>



**Slika 5.** Shematski prikaz mikrokanala, osnovne jedinice mikroreaktora<sup>19</sup>

Kako se u cijevnom reaktoru duž osi  $z$  (aksijalnom smjeru) mijenjaju veličine stanja

(npr. brzina reakcija, koncentracija), to se bilance moraju nužno postavljati za diferencijalni volumen.

Stoga se bilanca množine tvari (Jednadžba (4)) može prikazati na sljedeći način u slučaju odvijanja jednostavne reakcije gdje iz reaktanta A nastaje produkt P:

*Množina tvari A koja uđe u dif. volumen u jediničnom vremenu – množina tvari A koja izađe iz dif. volumena u jediničnom vremenu = množina tvari A koja nestane kemijskom reakcijom u dif. volumen u jediničnom vremenu* (4)

Matematički model cijevnog reaktora za reaktant A u tom slučaju glasi (Jednadžba (5)):

$$r_A = -u \cdot \frac{dn_A}{dz} \quad (5)$$

gdje su:

- $u$  linearna brzina
- $z$  duljina cijevnog reaktora

#### 2.4. Matematičko modeliranje - reaktorski i kinetički modeli

U kemijskom inženjerstvu i biotehnologiji, dobivanje produkata i postizanje optimalnih radnih uvjeta rezultat su složenih interakcija unutar sustava. Primjenom matematičkih modela u takvim sustavima, ove složene interakcije postaju jednostavnije za analizu i razumijevanje. Matematičko modeliranje omogućuje ubrzavanje i pojednostavljivanje razvoja proizvodnih procesa te pridonosi boljem razumijevanju i optimizaciji procesa. Matematički model obično se sastoji od kinetičkog i reaktorskog modela.

Reaktorski modeli predstavljaju bilance tvari u reaktorima i ključni su alati u projektiranju kemijskih reaktora. Jednostavnost matematičkih modela postiže se jednostavnom fizičkom predodžbom o reaktorskom sustavu prilikom čega se pretpostavljaju idealizirana stanja i jednostavne kemijske reakcije u reaktoru koje se tada mogu lakše matematički formulirati. Reaktorski modeli za kotlasti reaktor i mikroreaktor prikazani su jednadžbama (3) i (5).

### 2.4.1. Kinetički model

Za detaljno proučavanje kinetike enzimskih reakcija potrebno je analizirati ponašanje enzima i predvidjeti reakciju određenog enzima u specifičnim uvjetima. U tu svrhu razvijaju se matematički modeli koji opisno i kvantitativno prikazuju enzimske reakcije.<sup>20</sup> Matematičko modeliranje koristi matematičke jednadžbe za opis stvarnih sustava, s ciljem projektiranja i optimizacije sustava za koji je model razvijen. Unutar modela, svojstva sustava predstavljena su varijablama koje mogu biti različitih tipova: ulazne i izlazne, zavisne i nezavisne.<sup>21</sup>

Razvoj kinetičkog modela temelji se na matematičkoj obradi eksperimentalnih podataka dobivenih provođenjem enzimske katalizirane reakcije. Postupak razvoja enzimske kinetičkog modela uključuje nekoliko ključnih koraka<sup>22</sup>. Prvo se eksperimentalno određuje početna brzina reakcije pri različitim koncentracijama supstrata. Potom slijedi matematička obrada rezultata i postavljanje izraza za brzinu reakcije. Kinetički parametri se procjenjuju, određuje se ukupna brzina reakcije, a razvijen model se potvrđuje neovisnim eksperimentalnim podacima. Na temelju razvijenog modela, predviđaju se optimalni procesni uvjeti za određenu reakciju. Michaelis-Menteničin kinetički model (Jednadžba (6)) jedan je od najpoznatijih i najčešće korištenih modela za opis enzimske kinetike.<sup>23, 24</sup>

$$r_A = \frac{V_m \cdot c_A}{K_m + c_A} \quad (6)$$

gdje je:

$r_A$  brzina potrošnje supstrata (mmol/(L·min))

$c_A$  koncentracija supstrata (mmol/L)

$V_m$  maksimalna brzina reakcije (mmol/(L·min))

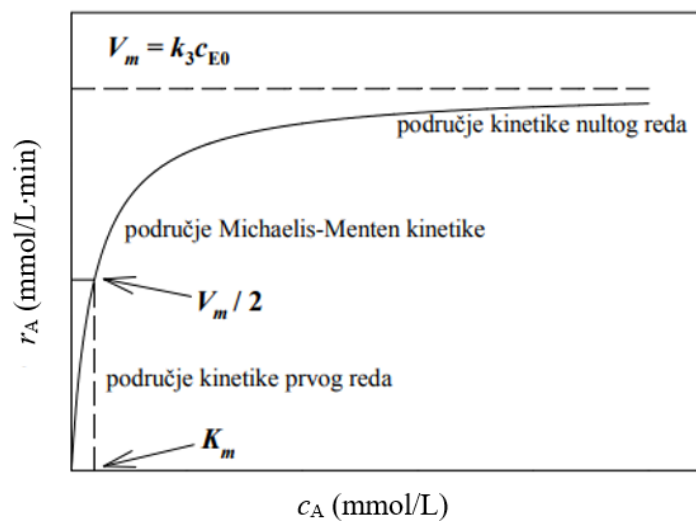
$K_m$  Michaelis-Menteničina konstanta (mmol/L).

Jednadžba Michaelis-Menteničine kinetike sastoji se od dva karakteristična parametra koje nazivamo maksimalna brzina reakcije,  $V_m$  te Michaelis-Menteničina konstanta,  $K_m$ . Maksimalna brzina reakcije je umnožak katalitičke konstante enzima i njegove koncentracije ( $c_{E0}$ ) (Jednadžba (7)), iz čega proizlazi da na maksimalnu brzinu koncentracije možemo utjecati promjenom koncentracije enzima. Izraz za Michaelisovu konstantu,  $K_m$ , (Jednadžba (8)) predstavlja koncentraciju supstrata kod koje je reakcijska brzina jednaka polovini maksimalne. Što je  $k_1$  veće vrijednosti u odnosu na  $k_2+k_3$  to je vrijednost  $K_m$  manja te iz toga slijedi da je reakcija nastajanja međukompleksa enzim-supstrat brža, odnosno da enzim ima veći afinitet prema supstratu.<sup>25</sup>

$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad (7)$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (8)$$

Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata se za Michaelis-Mentenčinu kinetiku može prikazati hiperbolom (Slika 6.).



**Slika 6.** Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis-Mentenčinu kinetiku.<sup>26</sup>

Pri vrlo niskim i vrlo visokim koncentracijama supstrata ovisnost reakcijske brzine  $r_A$  o koncentraciji supstrata  $c_A$  je linearna. Područje niskih koncentracija supstrata ( $c_A \ll K_m$ ) može se aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda, a područje visokih koncentracija supstrata ( $c_A \gg K_m$ ) može se aproksimirati kinetikom reakcije nultog reda.

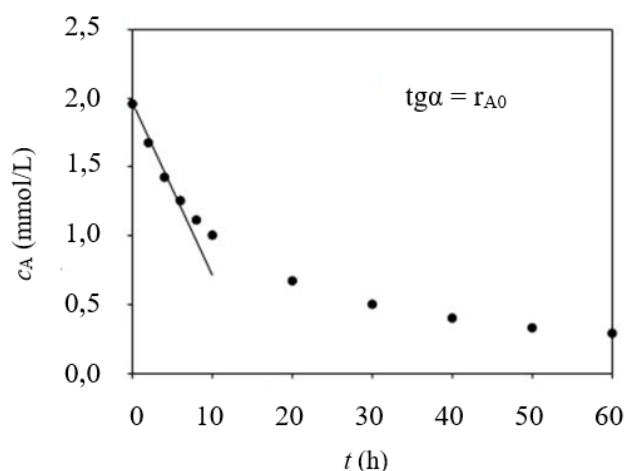
U reakcijskom se sustavu može javiti i deaktivacija enzima tj. smanjenje enzimске aktivnosti. Uzrok deaktivacije može biti promjena strukture proteinske molekule uslijed povišenja temperature, visokog tlaka, nagle promjene pH vrijednosti, povećanja brzine miješanja ili prisutnosti komponente koja ima deaktivirajući učinak na enzim.<sup>25</sup>

#### 2.4.1.1. Metoda početnih brzina

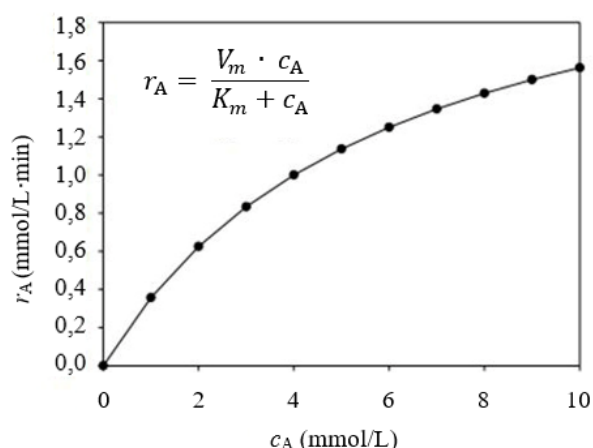
Metoda početnih brzina uključuje procjenu vrijednosti brzine reakcije u ranim fazama procesa, neposredno nakon početka reakcije. Ključna karakteristika ove metode je mjerenje brzine reakcije u uvjetima gdje su promjene koncentracija minimalne, obično kada konverzija

supstrata ne prelazi 10 %. Time se zanemaruje utjecaj povratne reakcije, omogućujući precizno određivanje konstante brzine napredujuće reakcije.

Kako bi se dobio veći broj mjernih točaka, potrebno je provesti seriju eksperimenata s različitim početnim koncentracijama reaktanata. Mjerenje početne brzine reakcije osigurava vrijednosti koje nisu pod utjecajem produkata reakcije, inhibicije ili deaktivacije enzima. Primjena metode početnih brzina u kotlastom reaktoru omogućuje određivanje ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji reaktanta A, pružajući sveobuhvatan uvid u dinamiku reakcije na temelju niza eksperimentalnih mjerenja.<sup>26</sup> (Slika 7. i Slika 8.)



**Slika 7.** Prikaz mjerenja u kotlastom reaktoru – metoda početnih brzina<sup>26</sup>



**Slika 8.** Ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji reaktanta A<sup>26</sup>

Mjerenjem promjene koncentracije u vremenu za niz početnih koncentracija supstrata te povlačenjem tangenti na krivulju u točki nula za svaki od tih eksperimenata, dobiva se ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, što je prikazano na Slici 7. Ova

ovisnost se zatim opisuje Michaelis-Menteničinim izrazom, a kinetički parametri procjenjuju se nelinearnom regresijom. Za procjenu parametara modela najčešće se koristi metoda najmanjih kvadrata.

Metoda najmanjih kvadrata uključuje pretpostavku određene matematičke funkcije koja može opisati promatranu ovisnost dviju veličina. Zatim se procjenjuju konstante ili parametri unutar te funkcije. Na temelju procijenjenih parametara izračunavaju se vrijednosti koje se uspoređuju s eksperimentalnim podacima. Postupak se ponavlja sve dok se ne zadovolji kriterij metode najmanjih kvadrata, koji zahtijeva da je kvadratno odstupanje između eksperimentalnih i izračunatih vrijednosti minimalno.<sup>17</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu provedena je polimerizacija apigenina u poliapigenin uz pomoć enzima peroksidaza porijeklom iz hrena. Na samom početku, apigenin je ekstrahiran iz kapsula pri čemu je ispitan utjecaj vrste i količine organskog otapala na učinkovitost ekstrakcije apigenina. Nakon ekstrakcije, polimerizacija je provedena u šaržnom i mikroreaktoru uz praćenje karakterističnih veličina procesa kao što je vrijeme, konverzija i procesna stabilnost enzima. Dobiveni poliapigenin karakteriziran je upotrebom FT-IR spektroskopije te HPLC-DAD kromatografije. U drugom dijelu istraživanja ispitana je reakcijska kinetika polimerizacije apigenina metodom početnih brzina te su procijenjeni kinetički parametri. Kinetika polimerizacije apigenina katalizirana enzimom peroksidaza porijeklom iz hrena opisana je Michaelis–Menteničinom kinetikom. Praćenjem procesne stabilnosti enzima, primijećen je pad aktivnosti te je procijenjena konstanta deaktivacije enzima peroksidaza porijeklom iz hrena. Za reakciju provedenu u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru postavljen je odgovarajući reaktorski model, koji se sastojao od kinetičkog modela, deaktivacije enzima i bilanci tvari. Ocjena valjanosti modela provedena je na dva seta nezavisnih eksperimenata.

#### 3.1. Kemikalije

U provedbi eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije:

- 2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolon-6-sulfonska kiselina), ABTS, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Aluminijski klorid, Kemika, Hrvatska
- Apigenin, čisti, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Apigenin porijeklom iz kapsule, Swanson, Sjeverna Dakota, SAD
- Bojilo Commassie brilliant Blue, G-250, Fluka, SAD
- Dimetil sulfoksid, DMSO, Sigma-Aldrich, Njemačka
- Enzim peroksidaza porijeklom iz hrena (HRP; S.A. = 150 U/mg), Sigma-Aldrich, Njemačka
- Etanol, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Goveđi serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich, Švicarska
- Kalij dihidrogenfosfat, Lach-Ner d.o.o., Češka
- Kalij hidrogenfosfat, Merck, Njemačka



- Katehin, Fluka, SAD
- Klorovodična kiselina, VWR-Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Metanol, VWR-Chemicals, Ujedinjeno Kraljevstvo
- Natrijev hidroksid, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- Natrijev klorid, Lachner, Češka
- Natrijev nitrit, Laphoma, Jugoslavija
- Ortofosfatna kiselina, VWR-Chemicals, Njemačka
- Triton X-100, Sigma-Aldrich, Njemačka

### 3.2. Aparatura

U provedbi eksperimenta korištena je sljedeća aparatura:

- 1260 Infinity II HPLC, Agilent, SAD
- Analitička vaga, Shimadzu AUW120, Japan
- Centrifuga, Hettich, UNIVERSAL 320 R, SAD
- Digestor, Flores Valles VA090810ADST, Španjolska
- FT-IR spektrofotometar, Perkin Elmer Instruments, SAD
- Homogenizator, DLAB-MX-S, Kina
- Magnetska miješalica, DLAB MS-H-S, Kina
- pH metar Schott Instruments, LAB 860, Njemačka
- Pumpa PHD 4400, Harvard Apparatus, SA
- Pumpa Pump 33, Harvard Apparatus, SAD
- Spektrofotometar, Shimadzu UV-1800, Japan
- Tehnička vaga, Kern EW1500-2M, Njemačka
- Tresilica Vibromix 313 EVT, Technica, Slovenija

### 3.3. Priprema otopina

U provedbi eksperimenta pripremljene su sljedeće otopine:

- **Otopina natrijevog nitrita ( $\text{NaNO}_2$ ) masene koncentracije 0,05 g/mL:** Otopina  $\text{NaNO}_2$  dobivena je otapanjem 1,25 g  $\text{NaNO}_2$  u 25 ml ultračiste vode.
- **Otopina aluminijevog klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) masene koncentracije 0,18 g/mL:** Otopina  $\text{AlCl}_3$  dobivena je otapanjem 4,48 g  $\text{AlCl}_3$  polaganim dodavanjem 25 mL ultračiste vode.

Otopinu je potrebno pripremati u digestoru jer je otapanje  $\text{AlCl}_3$  vrlo egzotermna reakcija.

- **Otopina natrijeve lužine (NaOH) koncentracije 1 mol/L:** Otopina NaOH pripremljena je otapanjem 2 g granula NaOH u 50 mL ultračiste vode.
- **Bradfordov reagens:** Bradfordov 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  $T = 4\text{ }^\circ\text{C}$  u boci koja sprječava prodiranje svjetlosti. Prije upotrebe Bradford reagens bilo je potrebno zagrijati na sobnu temperaturu ( $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ).
- **0,1 mol/L kalij-kalij fosfatni pufer pH 7:** 0,1 mol/L kalij-kalij fosfatni pufer pripremljen je otapanjem kalij hidrogenfosfata ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 4,672 g) i kalijevog dihidrogenfosfata ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,154 g) u 500 mL ultračiste vode.
- **Otopina A, 0,1 mol/L kalij-kalij fosfatni pufer pH 5:** Otopina A priprema se otapanjem kalij hidrogenfosfata ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1,742 g) u 100 mL ultračiste vode. Željeni pH 5,0 podešen je dodatkom 1 mol/L KOH.
- **Otopina B, 9,1 mmol/L otopina 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonske kiseline) (ABTS):** Otopina B priprema se otapanjem 0,150 g ABTS-a u 30 mL ultračiste vode. Otopina se priprema svježa neposredno prije mjerenja.
- **Otopina C, 0,3% otopina vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):** Otopina C priprema se dodavanjem 0,505 mL 30%-tne otopine  $\text{H}_2\text{O}_2$  u 50 mL ultračiste vode. Otopina se priprema svježa neposredno prije mjerenja.
- **Otopina D, otopina 0,25% (w/v) govedeg serumskog albumina (BSA) i 0,5% (v/v) Triton-X:** Otopina D priprema se otapanjem 0,25 g BSA i 0,5 g Triton-X u 100 mL otopine A.

### 3.4. Metode

#### 3.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije flavonoida

Za određivanje koncentracije ukupnih flavonoida koristi se metoda po Zhishenu i sur.<sup>27</sup> Metoda se temelji na stvaranju flavonoid-aluminij kompleksa koji su crvene boje i imaju maksimum apsorbancije pri  $\lambda = 510\text{ nm}$ .

Za provedbu eksperimenta potrebna je otopina natrijevog nitrita ( $\text{NaNO}_2$ ) masene koncentracije 0,05 g/mL, otopina aluminijevog klorida ( $\text{AlCl}_3$ ) masene koncentracije 0,18 g/mL te otopina natrijeve lužine ( $\text{NaOH}$ ) koncentracije 1 mol/L.

U plastične kivete od 2 mL otpipetirano je 400  $\mu\text{L}$  ultračiste vode, 100  $\mu\text{L}$  ekstrakta ili standarda (razrjeđenja temeljne otopine katehina za baždarni pravac) ili otapala (75% etanol) te 30  $\mu\text{L}$  vodene otopine  $\text{NaNO}_2$ . Sadržaj u kivetama se homogenizira pomoću homogenizatora te se nakon 5 min dodaje 30  $\mu\text{L}$  vodene otopine  $\text{AlCl}_3$ . Nakon 6 min u smjesu je dodano 200  $\mu\text{L}$  otopine vodene  $\text{NaOH}$  kako bi se zaustavila reakcija te konačno 240  $\mu\text{L}$  ultračiste vode. Sadržaj u kivetama je dobro promiješan nakon čega je uslijedilo mjerenje apsorbancije na  $\lambda = 510$  nm.

Za izradu baždarnog pravca (Prilog 1) pripremljena je otopina katehina  $\gamma = 1$  mg/mL u 75% etanolu. Budući da se katehin sporo otapa, sadržaj je miješan na magnetnoj miješalici 30 min. Iz tako pripremljene temeljne otopine pripremaju se razrjeđenja koncentracija katehina 50, 100, 150, 200 i 250  $\mu\text{g/mL}$ . Sadržaj ukupnih flavonoida izračuna se na temelju baždarnog pravca te se izražava u mikrogramima katehin ekvivalenta (engl. *catechin equivalents*, *CE*) po miligramu suhe tvari (ST) uzorka ( $\mu\text{g CE/mg ST}$ ).

### **3.4.2. Linearizirani Bradford test za određivanje 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. 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.<sup>28</sup>

Za provedbu testa, u plastičnu kivetu dodano je 500  $\mu\text{L}$  uzorka i 500  $\mu\text{L}$  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. Svi uzorci analizirani su u tri paralele. Koncentracija proteina u uzorku dobivena je iz baždarnog dijagrama pri čemu je korišten omjer apsorbancija izmjerenih pri  $\lambda = 595$  nm i  $\lambda = 450$  nm.

Baždarni dijagram izrađen je korištenjem otopine BSA  $\gamma = 0,1$  mg/mL, što odgovara apsorbanciji od 0,66 pri  $\lambda = 280$  nm u kvarčnoj kiveti. Tako dobivena otopina razrjeđivana je na

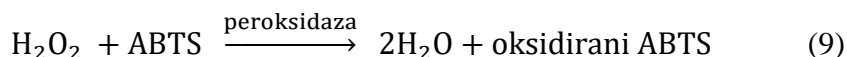
potrebne koncentracije u rasponu  $\gamma = 0,5-100$  mg/L. Pritom je linearno područje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina u baždarnom dijagramu (Prilog 2) postignuto za koncentracije 0-50 mg/L.

### 3.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije apigenina

Koncentracija apigenina spektrofotometrijski je određena na valnim duljinama  $\lambda = 268$  nm i  $\lambda = 335$  nm, gdje se pojavljuju apsorpcijski maksimumi apigenina. Za izradu baždarnog pravca za apigenin pripravljeno je 6 otopina s etanolom kao otapalom i s različitim koncentracijama apigenina; 0,3125  $\mu\text{g/mL}$ , 0,625  $\mu\text{g/mL}$ , 1,25  $\mu\text{g/mL}$ , 2,5  $\mu\text{g/mL}$ , 5  $\mu\text{g/mL}$  i 10  $\mu\text{g/mL}$ . Pri navedenim valnim duljina, uzorcima je izmjerena apsorbancija u kvarcnim kivetama. Na temelju dobivenih rezultata apsorbancije i poznatih koncentracija izrađeni su baždarni dijagrami (Prilog 3 i Prilog 4). Nepoznate koncentracija apigenina u uzorcima određene su korištenjem dobivenih baždarnih dijagrama.

### 3.4.4. Određivanje aktivnosti enzima peroksidaza porijeklom iz hrena

Određivanje aktivnosti enzima peroksidaza porijeklom iz hrena temelji se na oksidacijskoj ABTS metodi u kojoj enzim peroksidaza oksidira nefenolnu boju ABTS do stabilnijeg stanja kationskog radikala. Kemijska reakcija oksidacije može se opisati sljedećom jednadžbom (Jednadžba (9)):



Kako bi se odredila aktivnost enzima peroksidaze porijeklom iz hrena u kvarcnu kivetu volumena 1,5 mL otpipetirano je 967  $\mu\text{L}$  otopine B u koju je potom dodano 17  $\mu\text{L}$  razrijeđene otopine enzima. Dobivena otopina je homogenizirana, a u nju je potom dodano 33  $\mu\text{L}$  reagensa ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), odnosno otopine C. Otopina je ponovno dobro homogenizirana, a pri  $\lambda = 405$  nm praćenja je promjena apsorbancije tijekom 60 s.

Iz dobivene dinamičke promjene apsorbancije u vremenu, izračunata je vrijednost volumne aktivnosti (V.A.) enzima peroksidaze porijeklom iz hrena (Jednadžba (10)).

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon_{405} \cdot d \cdot V_e} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (10)$$

gdje su:

V.A.	volumna aktivnost enzima, U/mL, pri čemu 1 U predstavlja jedinicu enzimске aktivnosti, odnosno onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oksidira 1 μmol/L supstrata u minuti
$\Delta A/\Delta t$	promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca), min <sup>-1</sup>
$V_r$	ukupni volumen uzorka u kivetu, mL
$d$	faktor razrjeđenja
$\varepsilon_{405}$	ekstinkcijski koeficijent, $\varepsilon_{405} = 36,8 \text{ mmol}/(\text{L} \cdot \text{cm})$
$V_e$	volumen enzima, mL

Iz volumne aktivnosti enzima (V.A.) izračunata je specifična aktivnost enzima (S.A.) (Jednadžba (11)).

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_{\text{peroksidaza}}} \quad (11)$$

### 3.4.5. Analiza uzoraka HPLC – DAD kromatografijom

Kako bi se odredila koncentracija apigenina i dimera apigenina korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC) s DAD detektorom (engl. *Diode Array Detector*). Korišten je uređaj Agilent 1260 Infinity II HPLC koji je opremljen sa sustavom kvaterne pumpe, automatskim uzorkovanjem, dijelom za kolonu i navedenim DAD detektorom. Prikupljanje i obrada podataka provedena je korištenjem softvera Agilent OpenLAB CDS. Kromatografsko odvajanje provedeno je pomoću Zorbax 300Extend-C18 kolone, dimenzija 150 · 4,6, 3,5 μm na 30 °C. Mobilna faza A je bila 0,1 % mravlja kiselina, a mobilna faza B acetonitril. Tijekom 42 min trajanja analize protok obje mobilne faze bio je konstantan i iznosio 1,0 mL/min. Višestupnjeviti linearni gradijent otapala je bio: 0 min 98% A, 5 min 90% A, 15 min 70% A, 20 min 50% A, 25 min 50% A, 30 min 20% A, 32 min 2% A, 40 min 98% A. Za analizu je uzorkovano 10 μL standarda apigenina i uzorka. UV/Vis spektri su snimljeni u rasponu od 190 - 400 nm, a kromatogrami su snimljeni na 330 nm. Prije analiza bilo je potrebno izraditi standardnu otopinu čistog apigenina. Standardna otopina koncentracije 1000 μg/mL pripremljena je u DMSO.<sup>29</sup>

### **3.4.6. Analiza uzoraka infracrvenom spektroskopijom s Fourireovom transformacijom (FT-IR)**

Infracrvena spektroskopija Fourierove transformacije, također poznata kao FT-IR analiza ili FT-IR spektroskopija, je analitička tehnika koja se koristi za identifikaciju organskih, polimernih i, u nekim slučajevima, anorganskih materijala.<sup>30</sup> Mjerenje infracrvenog spektra čistog apigenina te apigenina nakon polimerizacije provedeno je na FT-IR instrumentu u području valnih brojeva od 4000 do 450  $\text{cm}^{-1}$  uz korištenje ATR (engl. *Attenuated Total Reflectance*) komore zbog čega prethodna priprema uzorka nije bila potrebna.

### **3.4.7. Ekstrakcija apigenina**

Za ekstrakciju apigenina iz kapsula pripravljeno je 48 odvaga praha iz kapsula apigenina u epruvete pri čemu je prosječna masa praha po odvagi iznosila 0,339 g. U odvagani prah iz kapsula dodano je 1 mL otapala odnosno u 24 epruvete dodan je 96% metanol, a u 24 epruvete dodan je 96% etanol. Ekstrakcija apigenina provedena je na laboratorijskoj tresilici pri 600 rpm i  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U vremenskim intervalima od 5 min s tresilice su skidane 4 epruvete koje su potom centrifugirane 5 min na 14.000 rpm. Talog je bačen, a u dobivenom supernatantu izmjerena je koncentracija apigenina.

### **3.4.8. Ispitivanje utjecaja količine otapala na učinkovitost ekstrakcije apigenina iz kapsule**

Kako bi se ispitaio utjecaj količine otapala na učinkovitost ekstrakcije apigenina iz jedne kapsule, napravljeno je 40 odvaga praha iz kapsula apigenina u epruvete pri čemu je prosječna masa praha po odvagi iznosila 0,339 g. U po 4 epruvete dodana je različita količina otapala 96% etanola u količini od 1 mL, 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL, 10 mL, 25 mL, 40 mL, 60 mL i 100 mL. Ekstrakcija apigenina provedena je na laboratorijskoj tresilici pri 600 rpm,  $t = 40\text{ min}$  i  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Nakon ekstrakcije, uzorci su centrifugirani 5 min na 14.000 rpm. Talog je bačen, a u dobivenom supernatantu izmjerena je koncentracija apigenina.

### **3.4.9. Ispitivanje stabilnosti apigenina**

Ispitivanje stabilnosti apigenina provedeno je kroz vremenski period od 6 dana. Mjerena je stabilnost ekstrahiranog apigenina u 96% etanolu pri  $T = 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . U vremenskim intervalima od 24 h u uzorcima je očitana vrijednost apsorbancije pri  $\lambda = 335\text{ nm}$ . Iz izmjerenih apsorbancija, a

uz pomoću baždarnog pravca, u uzorcima je određena koncentracija apigenina.

#### **3.4.10. Provedba polimerizacije apigenina u kotlastom reaktoru**

Proces polimerizacije apigenina proveden je u kotlastom reaktoru volumena  $V = 25$  mL. U reaktor je dodano 4 mL ekstrahiranog apigenina ( $\gamma = 2,327$  mg/mL) i 5 mL 0,1 mol/L fosfatnog pufera pH 7. Smjesa je homogenizirana na magnetnoj miješalici 5 min pri  $T = 25$  °C. U otopinu je zatim dodan enzim peroksidaza porijeklom iz hrena ( $\gamma = 4$  mg/mL, S.A. = 159,87 U/mg) suspendiran u 1 mL 0,1 mol/L fosfatnom puferu pH 7. Reakcija polimerizacije započeta je dodatkom 1,5 mL 0,03% otopine vodikovog peroksida. Početna koncentracija apigenina u tako pripremljenoj smjesi iznosila je 0,831 mg/mL. U različitim vremenskim intervalima (3 min, 15 min, 30 min, 1 h, 1,5 h, 2,5 h, 3,5 h i 23,5 h) iz reaktora su izuzimani uzorci. U uzorcima je prvo izmjerena aktivnost enzima, a uzorci su potom filtrirani (Filtar Chromafil Xtra RC-20/25 0,45  $\mu$ m, Macherrey-Nager, Njemačka). U filtriranim uzorcima određena je koncentracija apigenina.

#### **3.4.11. Provedba polimerizacije apigenina u mikroreaktoru**

Proces polimerizacije apigenina proveden je u mikroreaktoru izrađenom od teflonske cijevi s dva ulaza "T" oblika, promjera kanala 1000  $\mu$ m i duljine 30 cm. Dvije šprice prethodno su napunjene s ekstrahiranim apigeninom u etanolu (4 mL) i s vodikovim peroksidom u puferu, odnosno puferom i enzimom (12 mL) istih početnih koncentracija kao u šaržnom eksperimentu. Omjer volumnih protoka pojedinih otopina podešen je 1:3 kako bi omjer faza u mikroreaktoru bio jednak onome u šaržnom pokusu. Reakcija polimerizacije provedena je pri različitim vremenima zadržavanja od 0 – 11,8 min. Na izlazu iz mikroreaktora uzorci su sakupljeni u epruvetu koja se nalazila na ledu kako bi došlo do temperaturene deaktivacije enzima. Uzorci su filtrirani nakon sakupljanja (Filtar Chromafil Xtra RC-20/25 0,45  $\mu$ m, Macherrey-Nager, Njemačka) te je u njima određena koncentracija apigenina.

#### **3.4.12. Obrada podataka**

Eksperimentalno dobiveni podaci obrađeni su u programskom jeziku SCIENTIST (SCIENTIST handbook). Parametri su procijenjeni nelinearnom regresijom pomoću metode najmanjih kvadrata. Cilj ove metode je pronaći minimalni zbroj kvadrata pogreške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih korištenjem modela. Temeljem

izračunate sume kvadrata pogreške, parametri se proračunavaju do postignuća minimalne pogreške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih vrijednosti korištenjem SCIENTIST-a. Korištenjem napisanog modela i procijenjenih parametara provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi modela. Za rješavanje diferencijalnih jednadžbi SCIENTIST koristi numeričke metode. Maksimalna brzina reakcije, Michaelis-Menteničina konstanta i konstanta deaktivacije procijenjeni su iz eksperimentalnih podataka. Pri tome je korišten softverski paket SCIENTIST (MicroMath Scientist®, 3.0, MicroMath Scientific Software, Salt Lake City, UT, SAD). Isti programski paket korišten je i za simulacije matematičkog modela procesa. Svi korišteni kodovi prikazani su u Prilozima 5, 6 i 7.

### 3.5. Kriterij slaganja eksperimenta i modela

Parametri u modelu se računaju uz određeni kriterij točnosti slaganja eksperimentalnih podataka s vrijednostima dobivenim prema modelu. Kao opće prihvaćeni kriterij koriste se izrazi za kvocijent određivanja,  $R^2$  (jednadžba (12)), korijen kvadratnog odstupanja,  $RMSE$  (eng. *root mean square deviation*) (jednadžba (13)), standardna pogreška predviđanja ( $SEP$ ) (jednadžba (14)) te apsolutno prosječno odstupanje ( $AAD$ ) (jednadžba (15)).

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (Y_{i,p} - Y_{i,e})^2}{\sum_{i=1}^n (Y_{i,p} - Y_e)^2} \quad (12)$$

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Y_{i,p} - Y_{i,e})^2}{n}} \quad (13)$$

$$SEP = \frac{RMSE}{Y_e} \cdot 100 \quad (14)$$

$$AAD = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \frac{|Y_{i,p} - Y_{i,e}|}{|Y_{i,e}|} \quad (15)$$

gdje su:

$Y_{i,e}$  eksperimentalni podatci

$Y_{i,p}$  odgovarajuća predviđena vrijednost dobivena modelom

$n$  broj podataka

$Y_e$  srednja vrijednost eksperimentalnih podataka<sup>17</sup>



#### 4. MATEMATIČKI MODEL POLIMERIZACIJE APIGENINA U KOTLASTOM I MIKROREAKTORU

Polimerizacija apigenina katalizirana enzimom peroksidaza porijeklom iz hrena provedena je u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru te je za te procese postavljen matematički model koji se sastojao od kinetičkih i reaktorskih modela. Kinetički model razvijen je na temelju reakcije polimerizacije, eksperimentalnih podataka i procijenjenih kinetičkih parametara. Kinetika polimerizacije apigenina katalizirana peroksidazom porijeklom iz hrena opisana je Michaelis–Menteničinom kinetikom (Jednadžba (16)):

$$r_{\text{apigenin}} = \frac{V_{\text{max},0} \cdot c_{\text{apigenin}}}{K_m + c_{\text{apigenin}}} \quad (16)$$

Konstanta enzimske deaktivacije ( $k_d$ ) opisana je kinetičkim modelom reda prvog (Jednadžba (17)).

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \quad \longrightarrow \quad V_m = V_{\text{max},0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (17)$$

Reaktorski model za kotlasti reaktor sastojao se od bilance za apigenin (Jednadžba (18)).

$$\frac{dc_{\text{apigenin}}}{dt} = -V_{\text{max},0} \cdot e^{(-k_d \cdot t)} \cdot c_{\text{apigenin}} \cdot e \cdot \frac{1}{(K_m + c_{\text{apigenin}})} \quad (18)$$

Reaktorski model za mikroreaktor sastojao se od bilance za apigenin (Jednadžba (19)).

$$\frac{dc_{\text{apigenin}}}{dL} = -V_{\text{max},0} \cdot e^{(-k_d \cdot t)} \cdot c_{\text{apigenin}} \cdot e \cdot \frac{1}{(K_m + c_{\text{apigenin}})} \cdot \frac{1}{q_v} \quad (19)$$

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

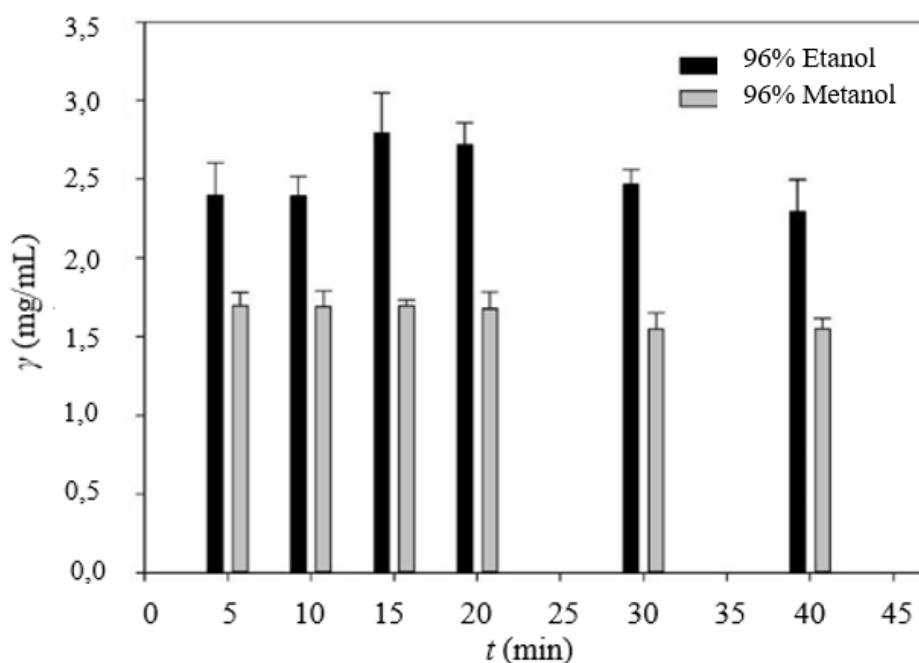
U ovom radu provedena je polimerizacija apigenina u poliapigenin uz pomoć enzima peroksidaza porijeklom iz hrena. Na samom početku, apigenin je ekstrahiran iz kapsula pri čemu je ispitan utjecaj vrste i količine organskog otapala (96% metanol i 96% etanol) na učinkovitost ekstrakcije apigenina. Nakon ekstrakcije provedeno je i ispitivanje stabilnosti ekstrahiranog apigenina u razdoblju od 6 dana na  $T = 4^{\circ}\text{C}$ . Proces polimerizacije apigenina proveden je u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru uz praćenje karakterističnih veličina procesa kao što je vrijeme, konverzija i procesna stabilnost enzima. Dobiveni poliapigenin karakteriziran je upotrebom FT-IR spektroskopije te HPLC-DAD kromatografije. U drugom dijelu istraživanja ispitana je reakcijska kinetika polimerizacije apigenina metodom početnih brzina te su procijenjeni kinetički parametri. Kinetika polimerizacije apigenina katalizirana enzimom peroksidaza porijeklom iz hrena opisana je Michaelis–Menteničinom kinetikom. Praćenjem procesne stabilnosti enzima, primijećen je pad aktivnosti te je procijenjena konstanta deaktivacije enzima peroksidaza porijeklom iz hrena. Za reakciju provedenu u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru postavljen je odgovarajući reaktorski model, koji se sastojao od kinetičkog modela, deaktivacije enzima i bilanci tvari. Ocjena valjanosti modela provedena je na dva seta nezavisnih eksperimenata.

### 5.1. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju apigenina

Korištenje čistog apigenina u istraživanjima predstavlja izazov zbog njegove visoke cijene na tržištu koja doseže iznose i do 380 - 430 USD/kg za apigenin 98% čistoće.<sup>31</sup> Međutim, zbog svojih pozitivnih svojstava, apigenin se danas može pronaći u mnogim dodatcima prehrani, a najčešće se konzumira u obliku kapsula gdje mu je koncentracija oko 50 mg po kapsuli. Cijena takvih kapsula je značajno niža od cijene čistog apigenina, a apigenin koji se nalazi unutar kapsula može biti dobar supstrat za istraživanje.<sup>32</sup> Međutim, u kapsulama se osim apigenina nalaze još i mikrokristalična celuloza koja djeluje kao punilo ili vezivo te pomaže u oblikovanju i stabilizaciji kapsule, osiguravajući tako ravnomjerno raspoređen sadržaj. Mikrokristalična celuloza također poboljšava teksturu i olakšava proizvodnju kapsula. Osim mikrokristalične celuloze, u kapsulama je najčešće prisutan i magnezijev sulfat koji služi kao sredstvo za sprječavanje zgrudnjavanja (antiaglomerant) ili kao stabilizator. On pomaže u održavanju konzistencije praškastog sadržaja unutar kapsule, sprječavajući stvaranje grudica i osiguravajući ravnomjernu dozu apigenina.

Kako bi se ovaj apigenin mogao koristiti u istraživanju potrebno ga je izolirati/ekstrahirati. Apigenin je praktički netopiv u vodi, ali je topiv u organskim otapalima poput DMSO-a, etanola, metanola.<sup>33</sup> Kada se radi o ekstrakciji netopivih komponenti, a u ovom kontekstu flavonoida odnosno flavona, najčešće korištena otapala su metanol i etanol. U istraživanju kojeg su proveli Lapornik i sur. autori su proveli ekstrakciju iz grožđa upotrebom različitih otapala. Primjenom 70% metanola iz grožđa je ekstrahirano 974,4 mg/mL polifenola, dok je primjenom 70% etanola postignuta niža koncentracije od 801,3 mg/mL. Najniža koncentracija polifenola postignuta je upotrebom vode i iznosila je 193,6 mg/mL.<sup>34</sup>

Stoga je u ovom istraživanju istražen utjecaj metanola i etanola na ekstrakciju apigenina porijeklom iz kapsula. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 9.



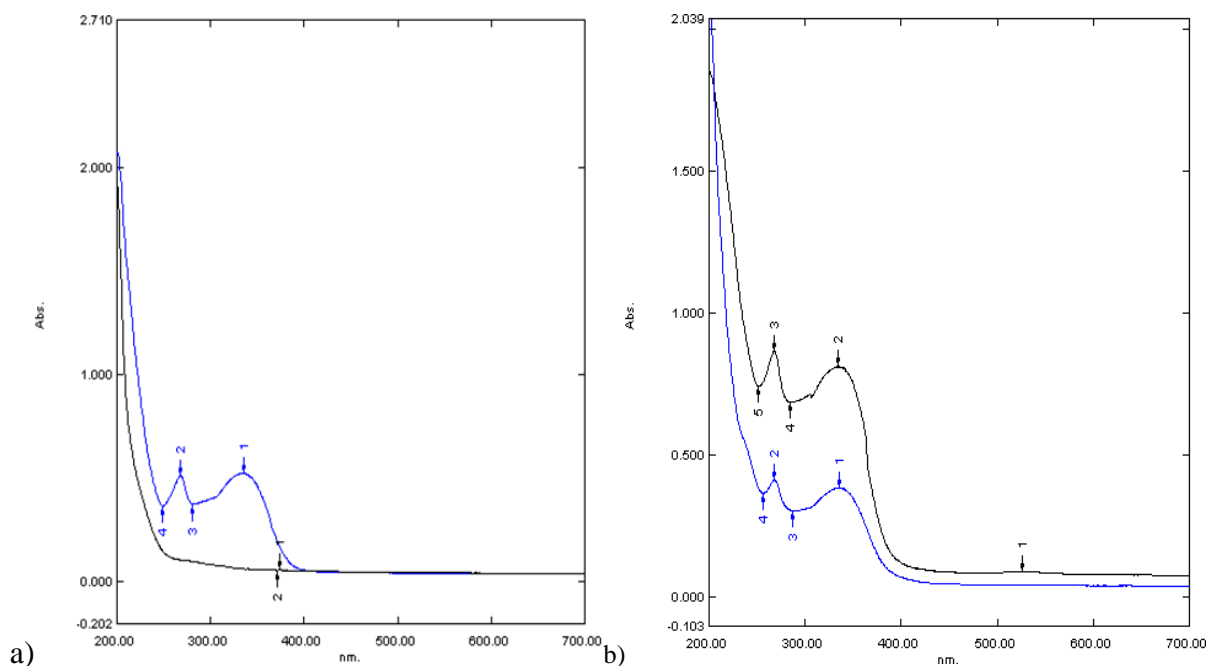
**Slika 9.** Utjecaj trajanja procesa ekstrakcije i vrste otapala na koncentraciju ekstrahiranog apigenina

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti kako je za apigenin porijeklom iz kapsula koji je korišten u ovom radu, za provedbu procesa ekstrakcije povoljniji 96% etanol. Stoga je u nastavku istraživanja 96% etanol korišten u svim ekstrakcijama.

Što se tiče utjecaja vremena ekstrakcije na koncentraciju ekstrakciju ekstrahiranog apigenina, može se uočiti da je najveća koncentracija dobivena nakon 15 min ekstrakcije. Prema literaturnim izvorima vremenska razdoblja između 10 i 30 min su najpovoljnija za ekstrakciju

polifenolnih spojeva odnosno flavonoida. Međutim, bitno je naglasiti kako je vrijeme ekstrakcije određeno količinom i sastavom ispitivanog uzorka. Općenito, učinkovitost ekstrakcije raste s povećanjem vremena ekstrakcije sve dok topljivost ne dosegne maksimalnu granicu.<sup>35</sup>

Prije nastavka rada, da se radi baš o ekstrahiranom apigeninu, a ne nekom drugom flavonoidu/flavonu, potvrđeno je upotrebom UV/VIS spektroskopije i HPLC-DAD kromatografije. Na Slici 10. prikazane su usporedbe UV/VIS spektra čistog apigenina i etanola (Slika 10a.) te usporedba čistog apigenina i apigenina porijeklom iz kapsule (Slika 10b). Kao što je vidljivo na Slici 10a., čisti apigenin pokazuje dva karakteristična pika odnosno apsorpcijska maksimuma na valnim duljinama  $\lambda = 268 \text{ nm}$  i  $\lambda = 335 \text{ nm}$ . Pojava dva maksimuma posljedica je molekulske strukture apigenina, odnosno različiti dijelovi molekula apigenina apsorbiraju svjetlost na određenim valnim duljinama zbog njihovih specifičnih elektronskih konfiguracija i rasporeda dvostrukih veza.<sup>36</sup> Usporedbom čistog apigenina i apigenina porijeklom iz kapsula (Slika 10b.) može se uočiti isti trend apsorpcijskih maksimuma te se može zaključiti da se najvjerojatnije radi o istom spoju.

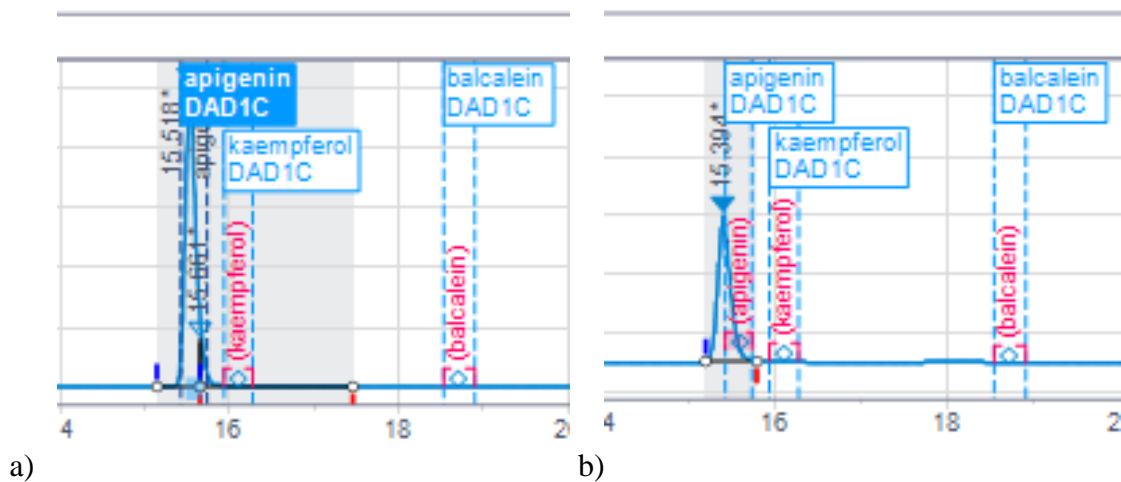


**Slika 10.** a) Prikaz UV/VIS spektra za čisti etanol (crno) i čisti apigenin (plavo) te b) prikaz UV/VIS spektra za čisti apigenin (plavo) i ekstrahirani apigenin porijeklom iz kapsula (crno)

Iako je analiza na UV/VIS spektrometru pokazala da je izolirani spoj najvjerojatnije apigenin, mnogi flavonoidni spojevi poput kvercetina, luteolina i kamferola imaju apsorpcijske maksimume na spomenutim valnim duljinama zbog sličnosti u strukturi spojeva. Naime, smatra se da su apsorpcijski maksimumi pri 300-380 nm povezani s cinamoilnim sustavom B-prstena

(Slika 1.), a maksimumi pri 240-280 nm s benzoilnim sustavom A-prstena u strukturi flavonoida.<sup>34</sup> Stoga, iako UV/VIS spektroskopija pruža korisne informacije o strukturi flavonoida, sama po sebi nije uvijek dovoljna za jednoznačnu identifikaciju spoja zbog preklapanja apsorpcijskih maksimuma između različitih flavonoida. S obzirom na to, dodatne analitičke tehnike, kao što su tekućinska kromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS) ili nuklearna magnetska rezonancija (NMR), često su potrebne za potvrdu spoja. Iz perspektive identifikacije strukture, NMR predstavlja nezamjenjivu tehniku u istraživanju flavonoida jer omogućuje potpunu identifikaciju flavonoidnih struktura, uključujući identitet aglikona, stereokemiju, prirodu i položaj šećera i aciliranih šećera, itd. Međutim, zbog cijene NMR uređaja te upotrebe vrlo čistih komponenti kao standarada, NMR je često zamijenjen analizom na HPLC koja isto tako može dati dobar uvid u strukturu flavonoida.<sup>37</sup>

Zbog toga je apigenin porijeklom iz kapsule, dodatno analiziran i pomoću HPLC-DAD kromatografije. Na Slici 11. prikazan je izdvojeni dio kromatograma koji je snimljen za čisti apigenin i apigenin porijeklom iz kapsule. Cijeli kromatogrami za čisti apigenin i apigenin porijeklom iz kapsule prikazan je u Prilogu 8 i Prilogu 9.

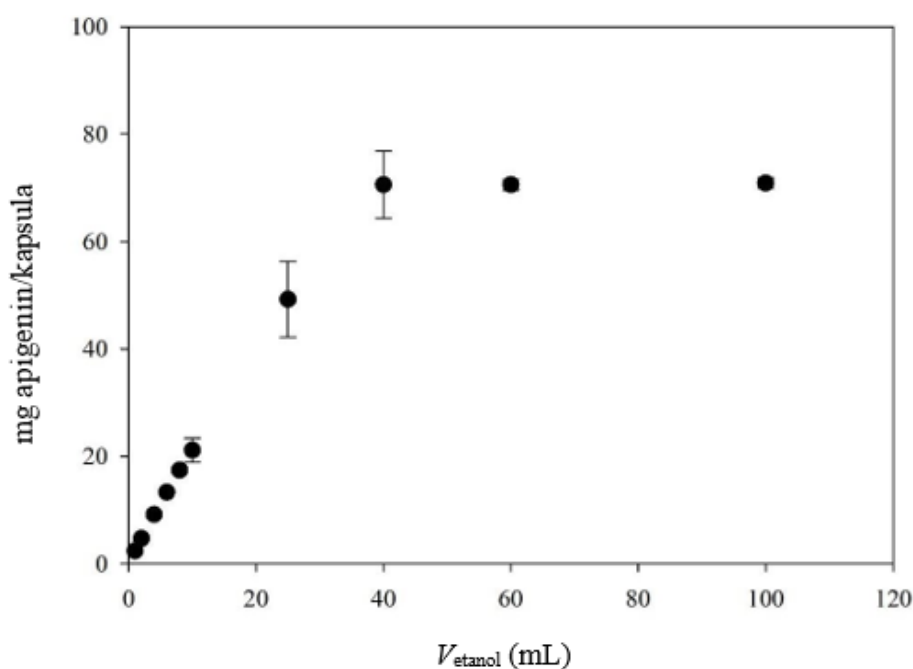


**Slika 11.** Izdvojeni prikaz kromatograma HPLC-DAD analize za **a)** čisti apigenina i **b)** apigenin porijeklom iz kapsule

Kao što se može vidjeti, oba uzorka izašla su na retencijskom vremenu od 15,518 min odnosno 15,394 min na temelju čega se može zaključiti da je spoj koji je ekstrahiran iz kapsula apigenin.

## 5.2. Utjecaj količine otapala na količinu ekstrahiranog apigenina porijeklom iz kapsule

Nakon što je odabrano najbolje otapalo i definirano najbolje vrijeme ekstrakcije, te potvrđeno da se u kapsulama nalazi apigenin, u sljedećem koraku cilj je bio izolirati što veće količine apigenina iz kapsula. Naime, primijećeno je kako dodatkom otapala dolazi do bubrenja sadržaja kapsule koji je apsorbirao dio otapala. Na taj način dolazi do smanjenja količine otapala namijenjenog ekstrakciji apigenina te se posljedično ekstrahira manje apigenina. Zbog toga je ispitan utjecaj količine otapala na uspješnost ekstrakcije apigenina. Utjecaj količine otapala na koncentraciju ekstrahiranog apigenina prikazan je na Slici 12.



**Slika 12.** Utjecaj količine otapala na količinu ekstrahiranog apigenina iz kapsule

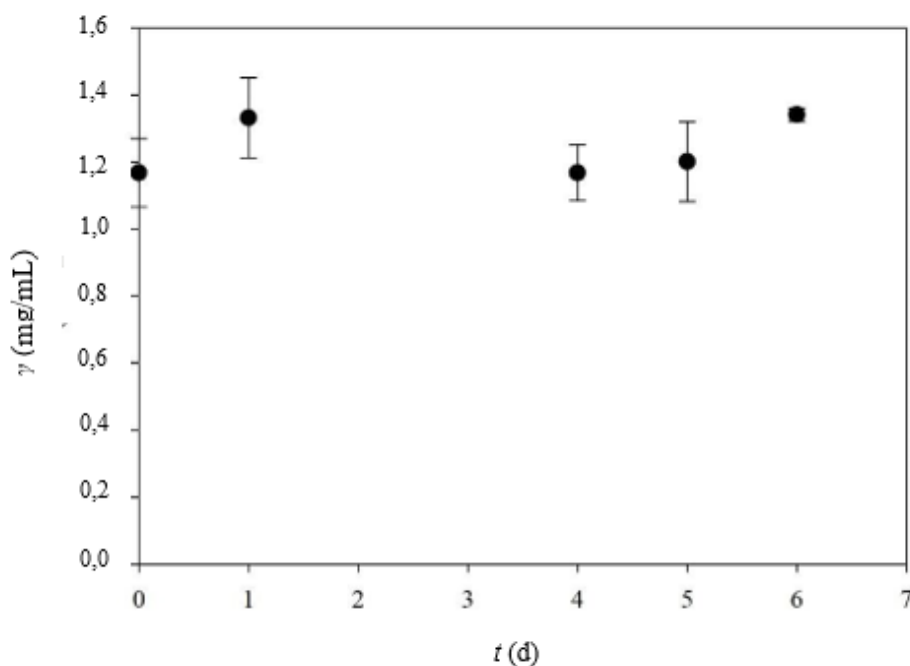
Kao što je vidljivo, koncentracija ekstrahiranog apigenina povećava se proporcionalno s volumenom dodanog 96% etanola sve do volumena od 40 mL nakon čega daljnje povećanje volumena otapala ne utječe na promjenu koncentracije ( $\gamma_{\text{apigenin}} = \text{konst.}$ ). Naime, kako je već spomenuto, učinkovitost ekstrakcije raste s povećanjem vremena ekstrakcije sve dok topljivost ne dosegne maksimalnu granicu.<sup>35</sup>

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako je optimalni volumen 96% etanola za provedbu ekstrakcije apigenina iz jedne kapsule  $V = 40$  mL.

### 5.3. Praćenje stabilnosti apigenina

Stabilnost apigenina ovisi o brojnim čimbenicima uključujući svjetlost, temperaturu, pH, prisutnost metalnih iona i interakcije s drugim molekulama.<sup>38</sup>

Kako bi se ekstrahirani apigenin mogao koristiti u daljnjem istraživanju ispitana je njegova stabilnost u 96% etanolu na  $T = 4^{\circ}\text{C}$ . Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 13.



**Slika 13.** Stabilnost ekstrahiranog apigenina u 96% etanolu na  $T = 4^{\circ}\text{C}$

Kao što je vidljivo, moguće je zaključiti kako je ekstrahirani apigenin stabilan u vremenskom periodu od 6 dana.

### 5.4. Provedba polimerizacije apigenina

Kao što je navedeno, stabilnost apigenina ovisi o brojnim čimbenicima uključujući svjetlost, temperaturu, pH, prisutnost metalnih iona i interakcije s drugim molekulama.<sup>38</sup> Iako su ispitivanja u ovom radu pokazala kako je apigenin stabilan u etanolu na  $T = 4^{\circ}\text{C}$  u vremenu od 6 dana, zbog više -OH skupina koje apigenin sadrži u svojoj strukturi, a koje olakšavaju proces raspadanja, smatra se vrlo nestabilnim spojem.<sup>39</sup> Zbog prisutnih aromatskih prstenova apigenin pokazuje i hidrofobna svojstva te njegova topljivost u vodi iznosi tek  $1,35 \mu\text{g/mL}$  što također ograničava njegovu komercijalnu upotrebu.<sup>40</sup> Kao potencijalno rješenje navedenih problema nameće se polimerizacija apigenina u poliapigenin. Naime, polimerizacijom dolazi do

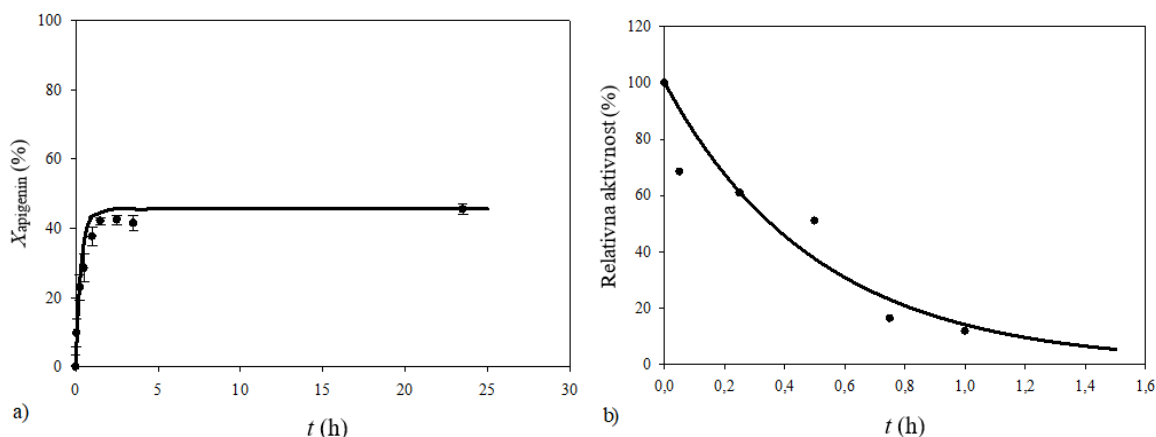
modificiranja strukture flavonoida, čime se poboljšava toplinska stabilnost, mijenja se antioksidativni kapacitet i antimikrobna sposobnost.<sup>5</sup> U literaturi se također navodi kako enzimski polimerizirani flavonoidi mogu imati produljenu aktivnost u relativno dugom vremenskom razdoblju zbog veće molekularne mase, a rezultat pojačane aktivnosti može predstavljati potencijal za terapiju ili kao sredstvo za prevenciju djelovanja raznih slobodnih radikala.<sup>41,42</sup>

Stoga je u ovom radu provedena polimerizacija apigenina uz pomoć enzima peroksidaze porijeklom iz hrena (HRP). Reakcija je provedena u kotlastom reaktoru, a na kraju identificirana u mikroreaktoru.

#### **5.4.1. Polimerizacija apigenina u kotlastom reaktoru**

Proces polimerizacije apigenina proveden je u kotlastom reaktoru ( $V = 25$  mL) pri  $T = 25$  °C. Kao što je vidljivo iz dobivenih rezultata (Slika 14a.), maksimalna konverzija apigenina iznosila je  $42,12 \pm 0,98\%$  i postignuta je u prvih 1 h reakcije nakon čega se više nije mijenjala. Naime, praćenjem procesne stabilnosti enzima peroksidaza porijeklom iz hrena zabilježena je značajna deaktivacija enzima (Slika 14b.) s konstantom deaktivacije,  $k_d = 1,96 \pm 0,36$  h<sup>-1</sup>, a već nakon 1 h enzim u potpunosti gubi svoju aktivnost što je na kraju i razlog dobivene niže konverzije. Razlog deaktivacije enzima peroksidaza porijeklom iz hrena može biti prisutnost vodikovog peroksida u reakciji. Naime enzim peroksidaza porijeklom iz hrena koristi vodikov preoksid za stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva, uključujući slobodne radikale, koji iniciraju polimerizaciju apigenina. Tijekom ovog procesa, slobodni radikali mogu izazvati oštećenja na samom enzimu. Naime, slobodni radikali mogu modificirati aminokiseline na aktivnom mjestu ili na drugim važnim dijelovima enzima, što rezultira gubitkom njegove katalitičke aktivnosti. Osim toga, produkti polimerizacije apigenina mogu se vezati na aktivno mjesto enzima peroksidaza porijeklom iz hrena. Produkti, bilo kraći, bilo duži lanci polimera apigenina, mogu djelovati kao kompetitivni inhibitori.<sup>43</sup>





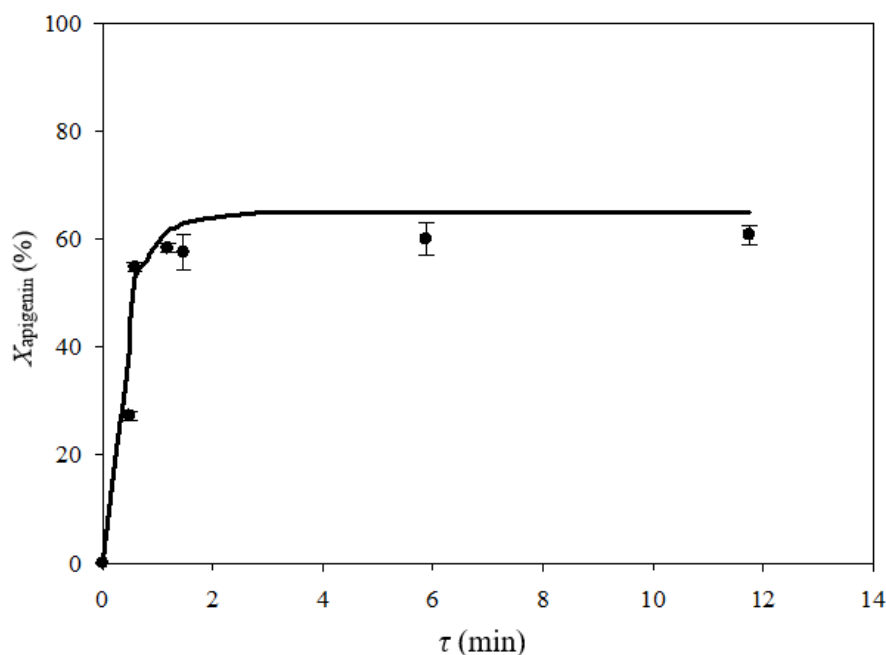
**Slika 14. a)** Dinamička promjena konverzije apigenina u vremenu i **b)** procesna stabilnost enzima peroksidaza porijeklom iz hrena

#### 5.4.2. Provedba polimerizacije apigenina u mikroreaktoru

Nakon provedene polimerizacije u kotlastom reaktoru ista reakcija provedena je mikroreaktoru s ciljem povećanja konverzije i skraćivanja vremena polimerizacije. Naime, poznato je kako mikroreaktori omogućuju preciznu kontrolu reakcijskih uvjeta, kao što su temperatura, tlak i vrijeme zadržavanja, što posljedično rezultira većom učinkovitosti procesa u usporedbi s konvencionalnim kotlastim reaktorima.<sup>44</sup> Prednosti korištenja mikroreaktorske tehnologije podrazumijevaju poboljšani prijenos topline i tvari, sigurnost u radu, pozitivan utjecaj na okoliš zbog korištenja manje sirovina, te stvaranja manje otpada u odnosu na makroreatore što je u konačnici čišći i energetski učinkovitiji pristup.<sup>45</sup>

Reakcija polimerizacije se u mikroreaktoru provodila pri istim početnim uvjetima koncentracije enzima i apigenina kao u eksperimentu koji je proveden u kotlastom reaktoru. Tijekom procesa ispitan je utjecaj različitih vremena zadržavanja na konverziju apigenina, a dobiveni rezultati su prikazani na Slici 15. Kao što je vidljivo, u procesu je postignuta konverzija od  $60,02 \pm 2,99\%$  za vrijeme zadržavanja od 5,87 min što je značajno poboljšanje u odnosu na kotlasti reaktor.

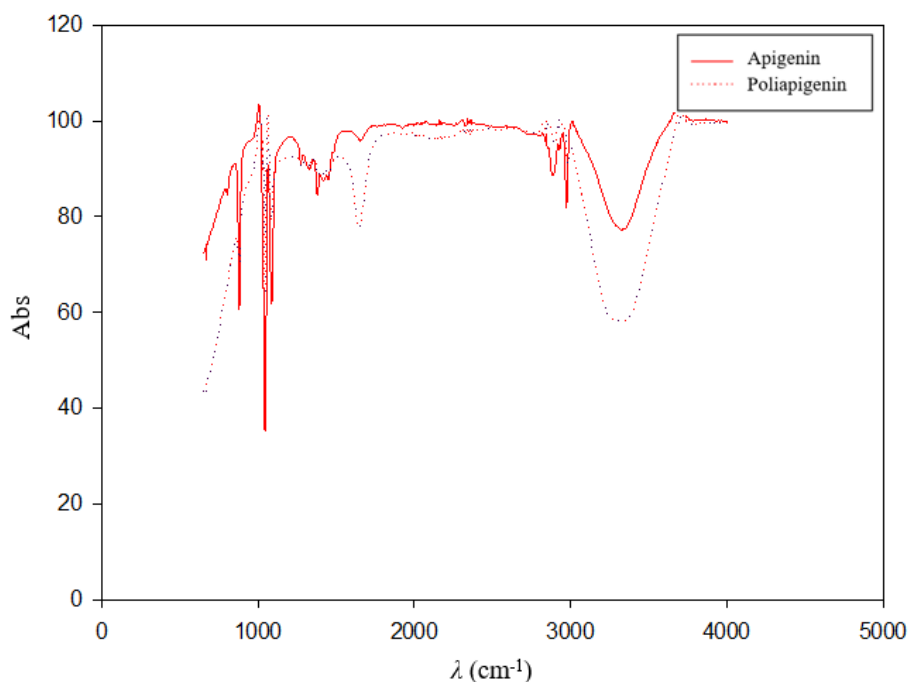
Tijekom provedbe procesa u mikroreaktoru, enzim peroksidaza porijeklom iz hrena nije bila u duljem kontaktu s vodikovim peroksidom jer su bili odvojeni u dva različita klipa, što znači da enzim nije deaktiviran djelovanjem vodikovog preoksida. Razlog što konverzija nije bila veća od 60% je vjerojatno kompetitivna inhibicija produktima reakcije ili reakcija depolimerizacije istim enzimom.<sup>46</sup>



**Slika 15.** Grafički prikaz utjecaja vremena zadržavanja na konverziju apigenina u mikroreaktoru

### 5.5. Analiza produkta spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FT-IR) i kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)

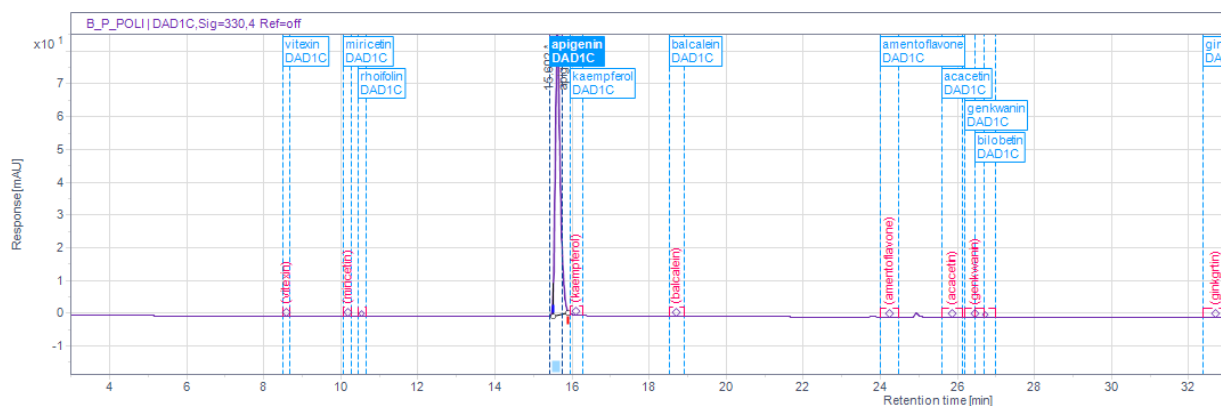
Na samom kraju, analiziran je dobiveni produkt reakcije polimerizacije. Kako bi se ispitale specifične kemijske skupine dobivenog poliapigenina, korištena je infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FT-IR) koja proizvodi vibracijski spektar zbog interakcije valnih duljina infracrvenog svjetla s kemijskim vezama što omogućuje identifikaciju sastavnih funkcionalnih skupina u uzorku.<sup>47</sup> Na Slici 16. prikazan je FT-IR spektar produkta dobivenog reakcijom polimerizacije apigenina, kao i spektar čistog apigenina. Kao što se može uočiti u uzorku nakon polimerizacije, vidljiva su značajna istezanja u području oko  $3390\text{ cm}^{-1}$  što odgovara vodikovim vezama unutar  $\text{-OH}$  skupina ( $3000 - 3500\text{ cm}^{-1}$ ). Navedene skupine povezane su s nastankom polimera. Isto tako, u uzorku nakon polimerizacije vidljiva su istezanja i u području  $1650 - 1800\text{ cm}^{-1}$ , odnosno na  $1602$  i  $1065\text{ cm}^{-1}$  koja se pripisuju karakterističnim funkcionalnim skupinama apigenina.<sup>48</sup> Na ovaj način potvrđen je nastanak polimera.



**Slika 16.** Prikaz FT-IR spektra za apigenin prije i nakon provedene polimerizacije

Osim FT-IR analize, produkti su dodatno analizirani pomoću HPLC-DAD kromatografije s ciljem kvalifikacije biflavonoida apigenina. Naime, istraživanja provedena na biflavonoidima pokazuju da oni imaju različitu biološku aktivnosti u odnosu na monomere što se pripisuje prisutnosti dodatnih hidroksilnih skupina. Dokazano je da biflavonoidi imaju bolji inhibitorni učinak na toksičnost uzrokovanu amiloidom- $\beta$  (glavna komponenta amiloidnih plakova, izvanstaničnih naslaga pronađenih u mozgu ljudi s Alzheimerovom bolešću) u usporedbi s monoflavonoidima.<sup>49</sup> Također biflavonoidi mogu imati antidijabetička svojstva te svojim mehanizmom djelovanja mogu sudjelovati u ublažavanju poremećaja metabolizma glukoze, povećanju izlučivanja inzulina i poboljšanju prijenosa inzulinskog signala.<sup>50</sup>

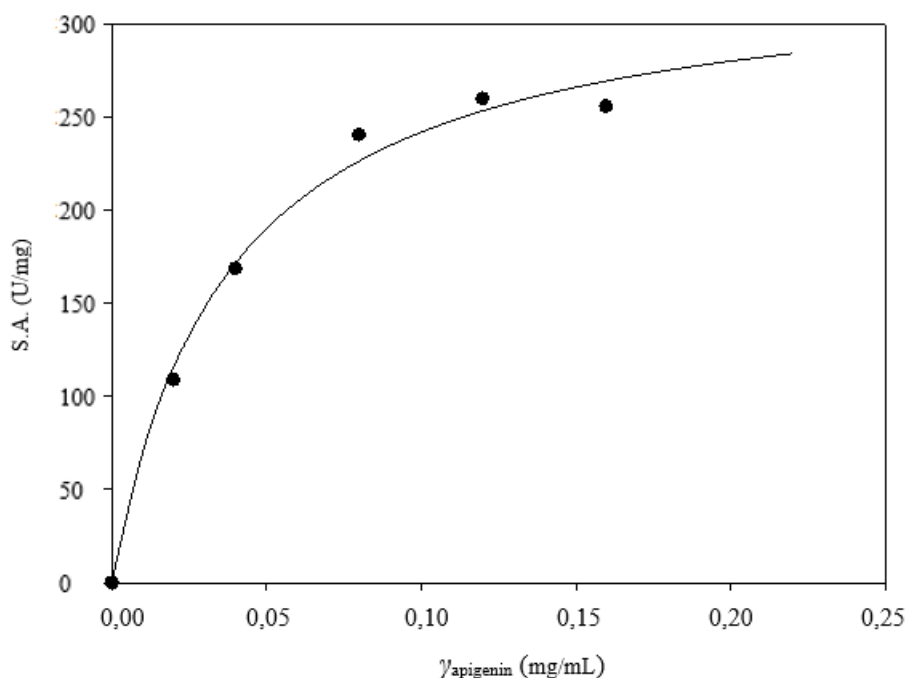
Snimljeni kromatogram prikazan je na Slici 17.. Na kromatogramu se, osim pika apigenina na retencijskom vremenu od 15,394 min može vidjeti i pojava dodatnih pikova na vremenu između 24 i 25 min, što ukazuje na pojavu biflavonoida, no u vrlo maloj količini.



Slika 17. Prikaz HPLC – DAD analize rezultata dobivenih polimerizacijom

### 5.6. Matematički model polimerizacije apigenina u kotlastom i mikroreaktoru

S ciljem boljeg razumijevanja i buduće optimizacije procesa, kao posljednji korak istraživanja provedena je kinetička karakterizacija enzima peroksidaza porijeklom iz hrena tj. ispitan je utjecaj koncentracije apigenina na brzinu reakcije pri čemu je kinetika enzima peroksidaza porijeklom iz hrena mjerena metodom početnih reakcijskih brzina. Na Slici 18. prikazana je ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji apigenina.



Slika 18. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji polimerizacije apigenina enzimom peroksidaza porijeklom iz hrena o koncentraciji apigenina

Na temelju dobivenih rezultata konstante Michaelis-Menteničine kinetike,  $K_m$  i  $v_{max}$ , procijenjene su nelinearnom regresijom korištenjem metode najmanjih kvadrata u računalnom

programu Scientist i njihove vrijednosti iznosile su:  $v_{\max} = 332,77 \pm 19,10$  U/mg i  $K_m = 0,04 \pm 0,01$  mg/mL. Procijenjeni parametri pružaju detaljniji uvid u enzimске reakcije i omogućuju optimizaciju i kontrolu tih reakcija u različitim biološkim, medicinskim i industrijskim zahtjevima.

Za reakciju provedenu u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru postavljen je odgovarajući reaktorski model, koji se sastojao od kinetičkog modela, deaktivacije enzima i bilanci tvari (Jednadžba (18) i Jednadžba (19)). Ocjena valjanosti modela provedena je na dva seta nezavisnih eksperimenata (Slika 14a. i Slika 15.).

Kao što je vidljivo, postignuto je dobro slaganje matematičkih modela i eksperimentalnih podataka. Kako bi se ispitala ispravnost matematičkog modela te provela ocjena valjanosti modela, provedena je i statistička analiza korištenjem Jednadžbi (12. – 15.), a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 1.

**Tablica 1.** Koeficijenti određivanja, korijeni kvadratne pogreške, standardne pogreške predviđanja i apsolutna prosječna odstupanja za eksperimentalne podatke i podatke dobivene simulacijom matematičkog modela za proces polimerizacije apigenina u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru

<b>Reaktor</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><i>RMSE</i> (%)</b>	<b><i>AAD</i> (%)</b>	<b><i>SEP</i> (%)</b>
<b>Kotlasti reaktor</b>	0,974	4,025	12,387	1,151
<b>Mikroreaktor</b>	0,961	5,931	11,399	2,421

Iz izračunatih vrijednosti možemo vidjeti da je najmanja vrijednost koeficijenta određivanja ( $R^2$ ) za oba modela vrlo visoka odnosno, 0,974 za kotlasti reaktor i 0,961 za mikroreaktor. Prema literaturi, matematički model smatra pouzdanim kada je vrijednost koeficijenta određivanja veća od 0,750, a vrijednosti korijena kvadratne pogreške, standardne pogreške predviđanje i apsolutnog prosječnog odstupanja što manja.<sup>51</sup> Iz svega navedenoga možemo zaključiti da oba predložena matematička modela dobro opisuju eksperimentalne podatke te da se mogu primjenjivati u daljnjoj optimizaciji procesa.

## 6. ZAKLJUČAK

- Rezultati istraživanja pokazali su kako je 96% etanol bolje otapalo za ekstrakciju apigenina porijeklom iz kapsule od 96% metanola.
- Najbolje vrijeme trajanja ekstrakcije apigenina porijeklom iz kapsule iznosilo je 15 min.
- Količina 96% etanola potrebna za potpunu ekstrakciju apigenina iz jedne kapsule je 40 mL.
- Provedbom polimerizacije u kotlastom reaktoru postignuta je konverzija od  $42,12 \pm 0,98\%$  u vremenu od 1 h.
- Zabilježena je brza deaktivacija enzima u procesu s procijenjenom konstantom deaktivacije  $1,96 \pm 0,36 \text{ h}^{-1}$ .
- S ciljem intenzifikacije procesa, polimerizacija je provedena u mikroreaktoru. Za vrijeme zadržavanja od 11,8 min postignuta je konverzija od  $60,02 \pm 2,99\%$ .
- Analizom dobivenog produkta spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FT-IR) i kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC-DAD) potvrđen je nastanak polimera, ali i biflavonoida u vrlo malim količinama.
- Kinetika polimerizacije apigenina katalizirana enzimom peroksidaza porijeklom iz hrena opisana je Michaelis–Menteničinom kinetikom.

## 7. LITERATURA

1. Salehi, B., Venditti, A., Sharifi-Rad, M., Kręgiel, D., Sharifi-Rad, J., Durazzo, A., Martins, N., The therapeutic potential of apigenin. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(6), (2019) 1305.
2. Galatro, A., Lucini Mas, A., Luquet, M., Fraga, C. G., Galleano, M., Plants as a source of dietary bioactives: Flavonoids and basis for their health benefits. *Aspects Mol. Med.*, 4, (2024) 100048.
3. Mahfoudi, R., Djeridane, A., Benarous, K., Gaydou, E. M., Yousfi, M., Structure-activity relationships and molecular docking of thirteen synthesized flavonoids as horseradish peroxidase inhibitors. *Bioorg. Chem.*, 74, (2017) 201–211.
4. Andersen, Ø. M., Markham, K. R., *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. CRC Press, Taylor & Francis Group., (2006) 1256.
5. Latos-Brozio, M., Masek, A., Piotrowska, M., Polymeric forms of plant flavonoids obtained by enzymatic reactions. *Molecules*, 27, (2022) 3702
6. Latos-Brozio, M., Masek, A., Piotrowska, M., Effect of enzymatic polymerization on the thermal stability of flavonoids. *J. Therm. Anal. Calorim.*, 148, (2023) 5357–5374.
7. <https://www.differencebetween.com/difference-between-flavonoids-and-polyphenols/> (Pristup: 19.7.2024.)
8. <https://www.scbt.com/p/apigenin-520-36-5> (Pristup: 19.7.2024.)
9. Shakeel, F., Alshehri, S., Ibrahim, M. A., Elzayat, E. M., Altamimi, M. A., Mohsin, K., Alsarra, I. A., Solubility and thermodynamic parameters of apigenin in different neat solvents at different temperatures. *J. Mol. Liq.*, 234, (2017) 73–80.
10. Albayati, S. H., Ghahremani Nezhad, N., Taki, A. G., Noor Zaliha, R., Abd Rahman, R., Efficient and feasible biocatalysts: Strategies for enzyme improvement. *Int. J. Biol. Macromol.*, 276, (2024) 133978.
11. Leksikografski Zavod Miroslav Krleža. (2013–2024). *Hrvatska enciklopedija*. (Pristup: 25.7.2024.)
12. <https://byjus.com/biology/enzymes/> (Pristup: 27.7.2024.)
13. Veitch, N. C., Horseradish peroxidase: A modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, 65(3), (2004) 249–259.
14. Coker, A. K., Industrial and laboratory reactors – Chemical reaction hazards and process integration of reactors. In *Ludwig's Applied Process Design for Chemical and Petrochemical Plants*, (2015) 1095–1208.
15. Gomzi, Z., *Kemijski reaktori*. HINUS, Zagreb, 1998;2009, 516.

16. Fogler, S. H., *Elements of Chemical Reaction Engineering*. Prentice-Hall, New Jersey, 1999, 537-547.
17. Kosar, V., *Nastavni materijali za kolegij Reaktori i bioreaktori*. Sveučilište u Zagrebu. (2017)
18. Seelam, P. K., Huuhtanen, M., Keiski, R. L., *Microreactors and membrane microreactors: Fabrication and applications*. *Handb. Membr. React.*, (2013) 188–235.
19. Bojang, A. A., Wu, H.-S., *Design, fundamental principles of fabrication, and applications of microreactors*. *Processes*, 8(8), (2020) 891.
20. Brass, J., Hoeks, F. W. J. M., Rohner, M., *Application of modelling techniques for the improvement of industrial bioprocesses*. *J. Biotechnol.*, 59(1-2), (1997) 63–72.
21. Bender, E., *An Introduction to Mathematical Modeling*. Dover Publications, New York, (1978) 1-14.
22. Straathof, A. J., *Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting*. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 11(4-6), (2001) 991–998.
23. Murphy, E. F., Gilmour, S. G., Crabbe, M. J. C., *Effective experimental design: Enzyme kinetics in the bioinformatics era*. *Drug Discov. Today*, 7(20), (2002) 187–191.
24. Baš, D., Boyacı, İ. H., *Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology*. *J. Food Eng.*, 78(3), (2007) 836–845.
25. Laidler, K. J., Bunting, P. S., *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*. Clarendon Press. (1973) 379-412
26. Findrik Blažević, Z., *Interna skripta za kolegij Reaktori i bioreaktori*, Sveučilište u Zagrebu. (2011)
27. Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., *The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals*. *Food Chem.*, 64(4), (1999) 555–559.
28. Ernst, O., Zor, T., *Linearization of the Bradford Protein Assay*. *J. Vis. Exp.*, 38. (2010)
29. Kovač Tomas, M., Jurčević, I., Šamec, D., *Tissue-specific profiling of biflavonoids in Ginkgo biloba L. Plants*, 12(1), (2023) 147
30. <https://rtilab.com/techniques/ftir-analysis/> (Pristup: 15.7.2024.)
31. <https://nutriherb.en.made-in-china.com/> (Pristup: 1.9.2024.)
32. <https://imuno-protect.eu/shop/apigenin-swanson-50-mg-90-kaps/> (Pristup: 1.9.2024.)
33. Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B., *The ultraviolet spectra of flavones and flavonols*. *In The Systematic Identification of Flavonoids*, (1970) 41–164.
34. Lapornik, B., Prošek, M., Golc Wondra, A., *Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time*. *J. Food Eng.*, 71(2), (2005) 214–222.
35. Chaves, J. O., de Souza, M. C., da Silva, L. C., Lachos-Perez, D., Torres-Mayanga, P. C.,



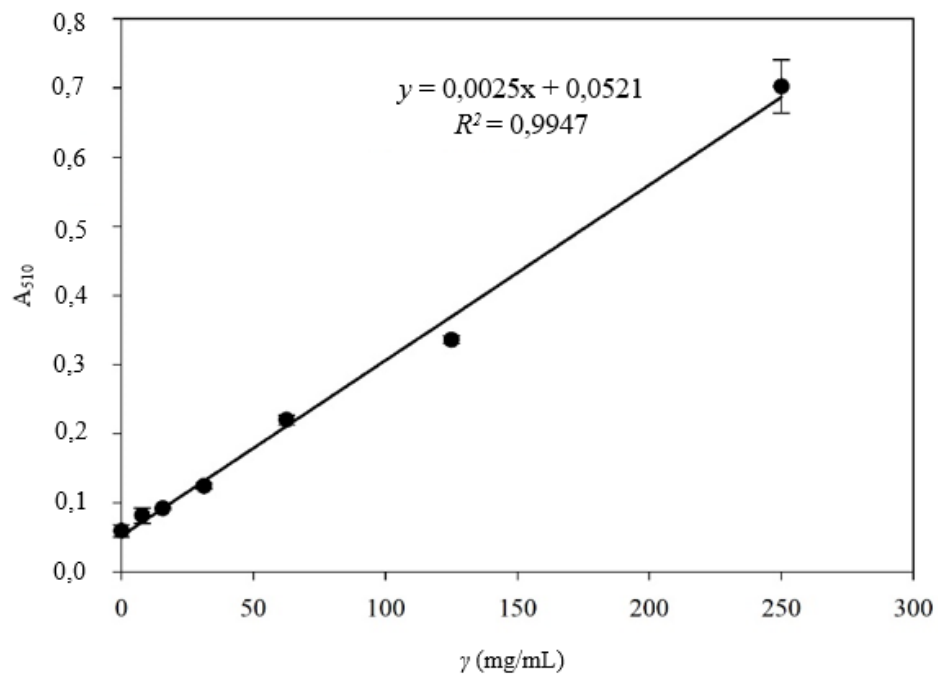
- Machado, A. P. D. F., Forster-Carneiro, T., Vázquez-Espinosa, M., González-de-Peredo, A. V., Barbero, G. F., Rostagno, M. A., Extraction of flavonoids from natural sources using modern techniques. *Front. Chem.*, 8, (2020) 507887.
36. Park, H.-R., Seo, J.-J., Park, C.-H., Yu, D., Bark, K.-M., Spectroscopic properties of apigenin in various bulk solutions and aerosol-OT reverse micelles. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 37(9), (2016) 1415–1425.
  37. De Villiers, A., Venter, P., Pasch, H., Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. *J. Chromatogr. A*, 1430, (2016) 16–78.
  38. Peng, C., Fuchao, C., ZhiLei, G., Jiexin, L., Benhong, Z., Recent advancement in bioeffect, metabolism, stability, and delivery systems of apigenin, a natural flavonoid compound: challenges and perspectives. *Front. Nutr.*, 10, (2023) 1221227.
  39. Majma Sanaye, P., Mojaveri, M. R., Ahmadian, R., Sabet Jahromi, M., Bahramsoltani, R., Apigenin and its dermatological applications: A comprehensive review. *Phytochemistry*, 203, (2022) 113390.
  40. Ang, S.-S., Devkota, L., Dhital, S., Thoo, Y. Y., Siow, L. F., Functional mango juice with apigenin encapsulated in spray-dried chitosan-coated liposomes: Characterisation, in-vitro gastrointestinal release, sensory acceptance, and storage stability. *LWT*, 203, (2024) 116361.
  41. Sahraei, A., Sahraei, R., Revealing binding mechanism of  $\beta$ -casein to chrysin, apigenin, and luteolin and locating its binding pockets by molecular docking and molecular dynamics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 733, (2024) 150438.
  42. Kurisawa, M., Chung, J. E., Kim, Y. J., Uyama, H., Kobayashi, S., Amplification of antioxidant activity and xanthine oxidase inhibition of catechin by enzymatic polymerization. *Biomacromolecules*, 4(3), (2003) 469–471.
  43. Mao, L., Luo, S., Huang, Q. et al. Horseradish Peroxidase Inactivation, Heme Destruction and Influence of Polyethylene Glycol. *Sci Rep* 3 (2013) 3126
  44. Jensen, K. F., Microreaction engineering – is small better? *Chem. Eng. Sci.*, 56(2), (2001) 293–303.
  45. Pohar, A., Plazl, I., Process intensification through microreactor application. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 23(4), (2009) 537–544.
  46. Joo, H., Chae, H. J., Yeo, J. S., & Yoo, Y. J., Depolymerization of phenolic polymers using horseradish peroxidase in organic solvent. *Process Biochemistry*, 32(4) (1997) 291–296
  47. Maxson, C., Tibby, J., Marshall, J., Kent, M., Tyler, J., Barr, C., Lomax, B. H., Fourier transform infrared spectroscopy as a tracer of organic matter sources in lake sediments.

Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol., 581, (2021) 110622.

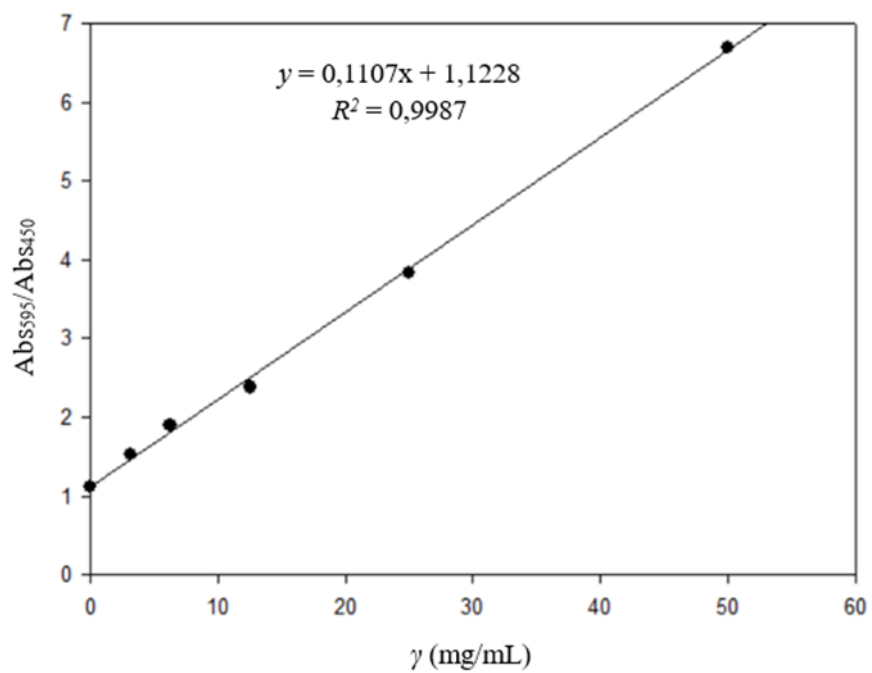
48. Biao, L., Tan, S., Meng, Q., Gao, J., Zhang, X., Liu, Z., Fu, Y., Green synthesis, characterization and application of proanthocyanidins-functionalized gold nanoparticles. *Nanomaterials*, 8(1), (2018) 53.
49. Thapa, A., Woo, E.-R., Chi, E. Y., Sharoar, M. G., Jin, H.-G., Shin, S. Y., & Park, I.-S., Biflavonoids Are Superior to Monoflavonoids in Inhibiting Amyloid- $\beta$  Toxicity and Fibrillogenesis via Accumulation of Nontoxic Oligomer-like Structures. *Biochemistry*, 50(13) (2011) 2445–2455
50. Huan Li, Jichen Yang, Mengfan Wang, Xiangzhao Ma, Xin Peng, Studies on the inhibition of  $\alpha$ -glucosidase by biflavonoids and their interaction mechanisms, *Food Chemistry*, Volume 420 (2023) 136113
51. Chauhan B., Gupta, R., Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14, *Process Biochem.*, 39 (2004) 2115–2122

## 8. PRILOZI

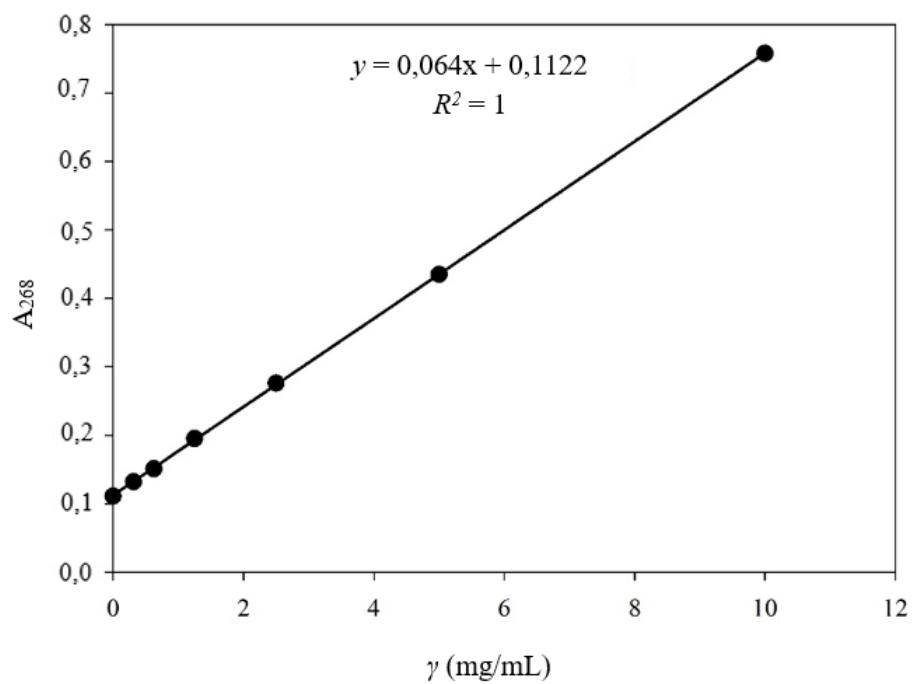
### Prilog 1. Baždarni pravac za ukupne flavonoide



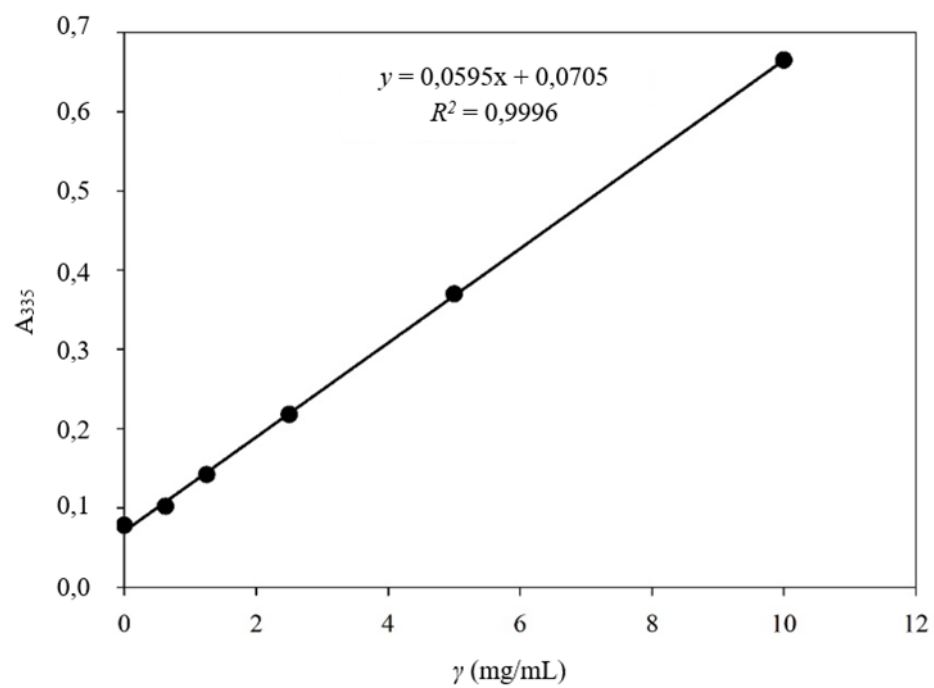
## Prilog 2. Linearizirani Bradford test za određivanje koncentracije proteina



### Prilog 3. Baždarni pravac za apigenin pri 268 nm



#### Prilog 4. Baždarni pravac za apigenin pri 335 nm



## Prilog 5. Ispis koda iz programskog paketa MicroMath Scientist matematičkog modela procesa provedenog u kotlastom reaktoru

```
//MicroMath
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: c
```

```
Params:
```

```
c'=-vmax0*exp(-kd*t)*c*e/(ks+c)
```

```
t=0
```

```
ks=0.03747
```

```
vmax0=332.767144
```

```
c=0.83
```

```
kd=3.07
```

```
e=0.0037
```

```
***
```

**Prilog 6. Ispis koda iz programskog paketa MicroMath Scientist korišten za određivanje brzine deaktivacije enzima peroksidaza porijeklom iz hrena**

```
// MicroMath
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: x
```

```
Params: kd
```

```
 $x' = -kd \cdot x$ 
```

```
t=0
```

```
x=100
```

```
kd=0.01
```

```
***
```



## Prilog 7. Ispis koda iz programskog paketa MicroMath Scientist matematičkog modela procesa provedenog u mikroreaktoru

```
//MicroMath
```

```
IndVars: L
```

```
DepVars: c
```

```
Params:
```

```
c'=-vmax0*exp(-kd*t)*c*e*A/(ks+c)/qv
```

```
L=0
```

```
ks=0.03747
```

```
vmax0=332.767144
```

```
c=0.344
```

```
kd=3.07
```

```
e=0.0037
```

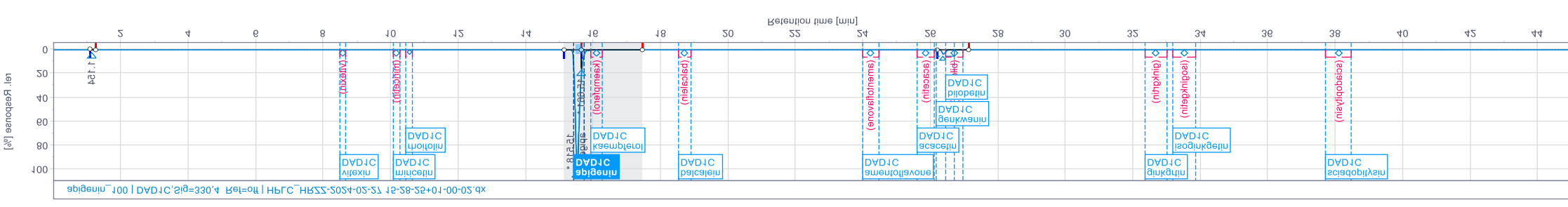
```
A=0.785
```

```
qv=480
```

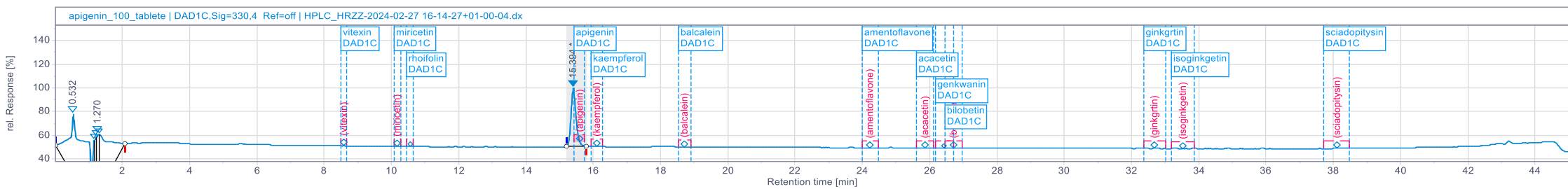
```
t=1.25
```

```
***
```

# Prilog 8. Cijeli kromatogram za čisti apigenin



## Prilog 9. Cijeli kromatogram za apigenin porijeklom iz kapsule



## 9. ŽIVOTOPIS

Ana Boltek [REDACTED] Osnovnu školu Matije Gupca završila je 2016. godine u Gornjoj Stubici. Tijekom osnovnoškolskog obrazovanja sudjelovala je u školskim aktivnostima kao član eko-odbora te djelovala kao urednica školskog časopisa pod nazivom „Lipin pučkoškolac“. Zatim je upisala srednju strukovnu školu Zdravstveno učilište Zagreb, smjer farmaceutski tehničar gdje je stekla vještinu rada u laboratoriju. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja odlučuje upisati Fakultet kemijskog inženjerstva u Zagrebu, smjer Ekoinženjerstvo. Na fakultetu aktivno sudjeluje na raznim radionicama i djeluje kao novinar fakultetskog časopisa „Reaktor ideja“.