

Utjecaj različitih puferskih sustava na stabilnost ljuske jaja kao nosača za imobilizaciju enzima

Begić, Ena

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:792383>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ena Begić

UTJECAJ RAZLIČITIH PUFERSKIH SUSTAVA NA STABILNOST LJUSKE
JAJA KAO NOSAČA ZA IMOBILIZACIJU ENZIMA

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za primijenjenu kemiju i ekologiju
Katedra za primijenjenu kemiju, biokemiju i instrumentalne metode
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Biokemija

Tema rada je prihvaćena na IX. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2020./2021. održanoj 24. lipnja 2021.

Mentor: prof. dr. sc. *Ivica Strelec*

Komentor: izv. prof. dr. sc. *Natalija Velić*

Pomoć pri izradi: *Marta Ostojčić*, mag. ing. proc., asistentica

Utjecaj različitih puferских sustava na stabilnost ljuske jaja kao nosača za imobilizaciju enzima

Ena Begić, 0113144160

Sažetak:

Cilj je ovog diplomskog rada bio ispitati utjecaj tri različita puferских sustava, natrij fosfatnog, Tris-HCl i Britton-Robinsonova, pri tri različite pH vrijednosti (6, 7 i 8) tijekom 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 24 sata na kemijsku stabilnost i inertnost ljuske jaja kao potencijalnog nosača za imobilizaciju enzima. Otpuštanje kalcija iz ljuske jaja praćeno je kompleksometrijskom titracijom. Rezultati su pokazali da se ljuska jaja pokazuje nepogodnom kao nosač za imobilizaciju enzima sa stanovišta kemijske stabilnosti i inertnosti budući da dolazi do otapanja sastavnog kalcijeva karbonata u sva tri puferских sustava. Pri tome se najnepovoljnijim pokazao Tris-HCl pufer čijim se djelovanjem tijekom 24 sata u otopinu otpustilo i do 4 % kalcija od ukupnog kalcija u kalcijevu karbonatu ljuske jaja. S druge strane, natrijev fosfatni pufer i Britton-Robinsonov pufer pokazali su podjednak učinak na otpuštanje kalcija iz kalcijeva karbonata ljuske jaja pri čemu je udio izdvojenog kalcija iz ljuske jaja tijekom 24 sata iznosio manje od 0,2 %. Uz navedeno, ustanovljeno je da primjena pufera niže pH vrijednosti u načelu dovodi do veće količine otopljenog kalcijeva karbonata ljuske jaja. Shodno tome može se zaključiti da ljuska jaja ne predstavlja pogodan nosač za imobilizaciju enzima.

Ključne riječi: *ljuska jaja, kemijska stabilnost, kemijska inertnost, puferi, otpuštanje kalcija*

Rad sadrži: 31 stranica
11 slika
3 tablice
0 priloga
52 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Sandra Budžaki</i> | predsjednik |
| 2. prof. dr. sc. <i>Ivica Strelec</i> | član-mentor |
| 3. izv. prof. dr. sc. <i>Natalija Velić</i> | član-komentor |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Ivana Flanjak</i> | zamjena člana |

Datum obrane: 27. rujna 2021.

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

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Applied Chemistry and Ecology
Subdepartment of Applied Chemistry, Biochemistry and Instrumental Methods
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program of Process Engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Biochemistry

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. IX. held on June 24, 2021.

Mentor: *Ivica Strelec*, PhD, prof.

Co-mentor: *Natalija Velić*, PhD, associate prof.

Technical assistance: *Marta Ostojčić*, mag. ing. proc., assistant

Effect of Different Buffer Systems on the Stability of Eggshells as Enzyme Immobilization Carriers

Ena Begić, 0113144160

Summary:

The present study investigated the effect of three buffer systems (sodium phosphate, Tris-HCl and Britton-Robinson buffer) of three different pH values (6, 7 and 8) during 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 24 hours, on the chemical stability and insolubility of eggshells as potential carrier for enzyme immobilization. The release of calcium from eggshells was monitored by complexometric titration. The obtained results showed that eggshells are unsuitable as a carrier for enzyme immobilization due to their chemical instability and solubility in buffer systems, as the calcium carbonate of eggshells dissolves. Tris-HCl buffer was the least favorable, up to 4 % of the calcium from eggshell calcium carbonate within 24 hours. The dissolution of eggshell calcium carbonate in sodium phosphate and Britton-Robinson buffers was much lower, where a release of up to 0.2 % of the calcium was observed within 24 hours. Generally, the greatest release of calcium was observed at the lowest pH. Based on the above mentioned, it can be concluded that eggshells are not suitable carriers for the immobilization of enzymes.

Key words: *Eggshells, chemical stability, reaction conditions insolubility, buffers, calcium release*

Thesis contains: 31 pages
11 figures
3 tables
0 supplements
52 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|---|--------------|
| 1. <i>Sandra Budžaki</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. <i>Ivica Strelec</i> , PhD, prof. | supervisor |
| 3. <i>Natalija Velić</i> , PhD, associate prof. | cosupervisor |
| 4. <i>Ivana Flanjak</i> , PhD, associate prof. | stand-in |

Defense date: September 27, 2021

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

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Ljuska jaja kao otpad	2
2.1.1. Struktura i kemijski sastav ljuske jaja.....	2
2.1.2. Zbrinjavanje ljuske jaja i mogućnosti njene uporabe.....	4
2.2. Imobilizacija enzima na ljusku jaja.....	7
2.2.1. Vrste imobilizacije	7
2.2.2. Nosači za imobilizaciju enzima	8
2.2.3. Ljuska jaja kao nosač za imobilizaciju enzima	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Zadatak	11
3.2. Materijali i metode	11
3.2.1. Uzorci.....	11
3.2.2. Kemikalije i reagensi	11
3.2.3. Priprema ljuske jaja za analize	12
3.2.4. Određivanje koncentracije kalcija u ljusci jaja.....	13
3.2.5. Određivanje utjecaja puferskih sustava na otpuštanje kalcija iz ljuske jaja	13
3.6. Kompleksometrijsko određivanje koncentracije kalcija u otopinama	14
3.7. Statistička obrada podataka.....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	15
4.1. Koncentracija kalcija u ljusci jaja	15
4.2. Utjecaj natrijeva fosfatnog pufera na kemijsku stabilnost ljuske jaja.....	16
4.3. Utjecaj Tris-HCl pufera na kemijsku stabilnost ljuske jaja	18
4.4. Utjecaj Britton-Robinsonova pufera na kemijsku stabilnost ljuske jaja	20
4.5. Usporedba utjecaja puferskih sustava na otpuštanje kalcija iz ljuske jaja	22
5. ZAKLJUČCI	27
6. LITERATURA.....	28

Veliko hvala mom mentoru prof. dr. sc. Ivici Strelecu, komentorici izv. prof. dr. sc. Nataliji Velić te mag. ing. proc. Marti Ostožić na pomoći i podršci tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela i pisanja diplomskog rada. Zahvaljujem na uloženom vremenu, strpljenju, svakom savjetu koji su mi udijelili te prenesenom znanju.

Zahvaljujem i svojoj obitelji, prijateljima i dečku na nesebičnoj i neizmjerljivoj podršci tijekom cijelog školovanja i izradi ovog rada.

Ovaj je rad financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj „IP-2020-02-6878.“

1. UVOD

Ljuska jaja otpad je poljoprivredno-prehrambene, farmaceutske i biotehnološke industrije, određenih obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava i obrta, ali isto tako restorana i domaćinstava, koja zbog svog pogodnog kemijskog sastava ima veliku mogućnost uporabe. Tako se primjenom nenaprednih tehnika transformacije može iskoristiti za proizvodnju hrane za životinje iz uzgoja, hrane za kućne ljubimce, organskih gnojiva i poboljšivača tla te za proizvodnju komposta i bioplina, dok se primjenom naprednih tehnika može iskoristi za proizvodnju visokovrijednih proizvoda poput kolagena, lizozima, membrana jaja te različitih kalcijevih soli (Strelec i sur., 2021). Uz navedeno, ljuska jaja pokazuje i potencijal iskorištenja kao biosorbens (Guru i Dash, 2014; Mashangwa i sur., 2017; Rápó i sur., 2020; Jendia i sur., 2020), te kao nosač za imobilizaciju enzima (Makkar i Sharma, 1983; Venkaiah i Kumar, 1995; Vemuri i sur., 1998; Chattopdhyay i Sen, 2012; Salleh i sur., 2016; Ribeiro i sur., 2018.).

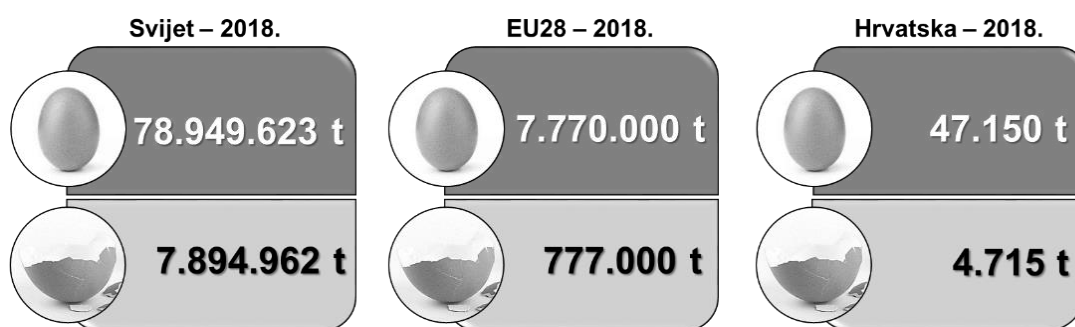
Jedan od ključnih zahtjeva za nosače za imobilizaciju enzima je njihova kemijska stabilnost i inertnost prema enzimu i okolini (Liu i Chen, 2016; Zdarta i sur., 2018) što je obzirom na kemijski sastav ljuske jaja (Walton i sur., 1973; Waheed i sur., 2019; Zajec, 2020) i reaktivnost sastavnog kalcijeva karbonata (Pramanpol i Nitayapat, 2006; Tsai i sur., 2006; Carvalho i sur., 2011; Holmes i sur., 2011; Luo i sur., 2018; Buksh i sur., 2018; Phipps i Lorusso, 2018; Tomičić, 2020) nadasve dvojbena.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada bio utvrditi kemijsku stabilnost i inertnost ljuske jaja kao potencijalnog nosača za imobilizaciju enzima. U tu svrhu ljuska jaja je podvrgnuta djelovanju tri različita pufera sustava: Tris-HCl, Britton-Robinsonova te natrijeva fosfatnog pufera pri tri različita pH: 6, 7 i 8 tijekom 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 24 sata, pri čemu je proces potencijalne dekalifikacije kalcijeva karbonata praćen kompleksometrijskom titracijom. Sukladno dobivenim količinama izdvojenog kalcija, procijenjena je stabilnost ljuske jaja kao potencijalnog nosača za imobilizaciju enzima i to sa stanovišta kako njezine kemijske stabilnosti, tako i kemijske inertnosti prema okolini.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Ljuska jaja kao otpad

Ljuska jaja otpad je poljoprivredno-prehrambene, farmaceutske i biotehnološke industrije, određenih obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava i obrta, ali isto tako restorana i domaćinstava čija se ukupna godišnje nastala količina u svijetu procjenjuje na 78.949.623 t, od čega na Europsku Uniju s Velikom Britanijom otpada oko 777.000 t, a na Republiku Hrvatsku oko 4.715 t (**Slika 1**) (Strelec i sur., 2021).

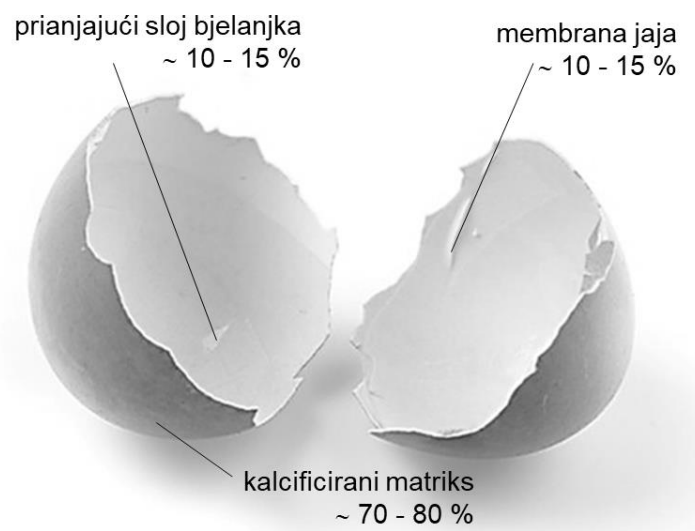


Slika 1 Ukupna količina proizvedenih kokošnjih jaja i procijenjena količina zaostale ljuske jaja u 2018. godini (Strelec i sur., 2021)

2.1.1. Struktura i kemijski sastav ljuske jaja

Ljuska jaja se strukturno sastoji od 3 dijela: kalcificiranog matriksa koji izvana vidimo kao „pravu“ ljusku jaja i na koju je s unutarnje strane vezana membrana ljuske jaja, a na nju prilijepljen mali dio bjelanjka zaostao nakon odvajanja bjelanjka i žumanjka od jaja (**Slika 2**). Promotri li se maseni udio pojedinih strukturnih komponenti ljuske jaja kao otpada, tada se može reći da od ukupne mase vlažne ljuske jaja između 70 i 80 % čini kalcificirani matriks, dok membrana i prijanjajući sloj bjelanjka sudjeluju u ukupnoj masi ljuske jaja između 10 i 15 % svaki pojedinačno (Strelec i sur, 2021).

Kemijski sastav ljuske jaja razlikuje se ovisno o porijeklu ljuske i načinu na koji je ljuska jaja tretirana. Ljuska jaja u prosjeku sadrži između 16 i 30 % vode, gdje je veći udio vode kod svježe ljuske jaja koja nije sušena, dok sušena ljuska jaja sadrži vrlo malu količinu vode. U kemijskom sastavu, najveći udio u ljusci jaja ima kalcijev karbonat čiji se udio kreće između 74 i 94 % ovisno o porijeklu, vrsti i načinu obrade ljuske jaja. Uz navedeno, ljuska jaja sadrži i mali udio proteina, dok su ostale komponente zastupljene u postotku manjem od 1 %. (Walton i sur., 1973; Ray i sur., 2017; Zajec, 2020; Tomičić, 2020; Strelec i sur., 2021). Prosječan kemijski sastav isprane i osušene ljuske jaja prikazan je u **Tablici 1**.



Slika 2 Struktura i udjeli pojedinih strukturnih komponenti ljuske jaja (Strelec i sur., 2021)

Tablica 1 Prosječan kemijski sastav bijele i smeđe ljuske jaja (Ray i sur., 2017)

Komponenta	Bijela ljuska jaja	Smeđa ljuska jaja
Vlaga (%)	0,46	0,20
Proteini (%)	3,92	5,04
Pepeo (%)	94,61	94,28
Masti (%)	0,35	0,08
Kalcij (%)	34,12	33,13
Magnezij (%)	0,29	0,36
Fosfor (%)	0,04	0,07
Kalij (%)	0,03	0,04
Natrij (%)	0,05	0,04
Bakar (mg kg ⁻¹)	< 1	< 1
Željezo (mg kg ⁻¹)	22	< 1
Mangan (mg kg ⁻¹)	< 1	< 1
Cink (mg kg ⁻¹)	< 1	< 1

2.1.2. Zbrinjavanje ljuske jaja i mogućnosti njene uporabe

Ljuska jaja zbog svog kemijskog sastava može imati široku primjenu, no zakonska regulativa nalaže da se ljuska jaja koja nastaje kao otpad u ugostiteljskim objektima, kao što su restorani, slastičarne, kantine i slično, kao i u malim obrtima i kućanstvima, ne može iskoristiti kao odvojena sirovina, već se može koristiti u sastavu komunalnog otpada za proizvodnju komposta ili za proizvodnju bioplina.

Međutim, ukoliko ljuska jaja nastaje kao otpad nakon industrijske proizvodnje, kao što su farme jaja, valionice pilića, tvornica za preradu jaja, OPG-ovi, prehrambena, farmaceutska i slične industrije, ona se klasificira kao nusproizvod životinjskog podrijetla kategorije III. koji nije namijenjen proizvodnji proizvoda za prehranu ljudi, nego se može sukladno Uredbi (EZ) br. 1069/2009 iskoristiti za proizvodnju hrane za životinje iz uzgoja, hrane za kućne ljubimce, organskih gnojiva i poboljšivača tla, te za proizvodnju komposta i bioplina. Pri tome se za iskorištavanje ljuske jaja kao nusproizvoda životinjskog podrijetla podrazumijeva da ljuska jaja

dolazi od kokoši koje ne pokazuju kliničke znakove bolesti te da jaja ne pokazuju znakove kontaminacije patogenim mikroorganizmima, koji bi se preko proizvoda dodatne vrijednosti prenijeli na konzumente. Svakako, mogućnost uporabe ljuske jaja kao nusproizvoda životinjskog podrijetla mora biti propisana od strane Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane koje je nadležno tijelo, a djeluje pod Ministarstvom poljoprivrede kako se ne bi pojavio rizik za zdravlje ljudi i životinja (Strelec i sur., 2021).

Međutim, ljuska jaja kao otpad ima veliki potencijal transformacije u proizvode visoko dodane vrijednosti. Naime, iz ljuske jaja se strukturnom transformacijom mogu dobiti membrane jaja i kalcificirani matriks, a ovisno o izvoru i prijanjajući sloj bjelanjka (Strelec i sur., 2021). Izdvajanjem prijanjajućeg sloja bjelanjka i njegovom daljnjom obradom se mogu dobiti visokovrijedni proteini poput ovalbumina, ovotransferina, lizozima i drugih (Abeyrathne i sur., 2013; Zajec, 2020; Strelac i sur., 2021). Membrana jaja u svom sastavu sadrži kolagen, hijaluronsku kiselinu i kondroitin sulfat koji imaju pozitivan učinak na zdravlje ljudi i životinja. Ovo membranu jaja čini najvrjednijom komponentom ljuske jaja, zbog čega se često koristi u proizvodnji dodataka prehrani (De Vore i Long, 2013; Strelac i sur., 2021). Kalcificirani matriks ljuske jaja sadrži veliki udio kalcijevog karbonata te pokazuje potencijal za proizvodnju kalcijevih soli. Kiselinskom obradom kalcificiranog matriksa ljuske jaja mogu se dobiti kalcijeve soli poput kalcijeva acetata, kalcijeva citrata, kalcijeva dihidrogenfosfata, kalcijeva fosfata, kalcijeva fumarata, kalcijeva glukonata, kalcijeva hidrogenfosfata, kalcijeva hidroksiapatita, kalcijeva klorida i kalcijeva malata (Strelec i sur., 2021).

Uz gore navedene mogućnosti uporabe ljuske jaja, svakako je potrebno istaknuti mogućnost uporabe ljuske jaja kao biosorbensa za uklanjanje različitih onečišćujućih tvari iz tla i vode.

Biosorpcija je fizikalno - kemijski proces uklanjanja onečišćujućih tvari iz otopina primjenom materijala biološkog porijekla kao adsorbensa (biosorbensa), pri čemu onečišćujuće tvari mogu biti organske ili anorganske te plinovite, tekuće ili čvrste. Biosorpcija uključuje mehanizme adsorpcije, apsorpcije, ionske izmjene, površinskog kompleksiranja i precipitacije (Gadd, 2008.). Neka od najvažnijih svojstava dobrog adsorbensa/biosorbensa su velika specifična površina te brzo postizanje adsorpcijske ravnoteže, jer povećavaju učinkovitost te brzinu uklanjanja onečišćujućih tvari adsorpcijom. Površina ljuske jaja je neravnomjerna i porozna, što ukazuje na veliku specifičnu površinu koja ljusku jaja čini potencijalnim biosorbensom za uklanjanje različitih onečišćujućih tvari iz vode (Rápó i sur., 2020). Poroznost

te time i specifična površina ljuske jaja može se dodatno povećati procesom kalcinacije, odnosno žarenjem CaCO_3 pri temperaturi od $1000\text{ }^\circ\text{C}$, pri čem se oslobađa ugljikov(IV) dioksid (Carvalho i sur., 2013).

Prisutnost različitih onečišćujućih tvari u otpadnim vodama, poput teških metala, bojila ili nitrata predstavlja veliki globalni problem. Navedene onečišćujuće tvari imaju negativan utjecaj na vodene ekosustave u koje se otpadne vode ispuštaju (ako se ne uklone prije ispuštanja), a dugoročno predstavljaju i zdravstveni rizik za ljude. Ljuska jaja pokazala se kao učinkovit biosorbens za uklanjanje različitih metala iz vode i otpadne vode poput bakra i cinka (Mashangwa i sur., 2017; Badrealam i sur., 2018), nikla (De Angelis i sur., 2017; Mashangwa i sur., 2017), kadmija (Makuchowska-Fryc, 2019), olova, željeza, aluminijska, magnezija, stroncija, arsena, kroma i drugih metala (Mashangwa i sur., 2017). Sintetska bojila se odlikuju velikom fizikalno-kemijskom stabilnošću, kao i otpornošću na razgradnju mikroorganizmima, što predstavlja problem prilikom njihovog uklanjanja iz otpadnih voda. Njihovo nakupljanje u okolišu izrazito negativno utječe na vodene ekosustave u koje se nedovoljno obrađene otpadne vode ispuštaju. Adsorpcija je najčešće korištena metoda uklanjanja sintetskih bojila, pri čemu se intenzivno istražuju različiti otpadni biološki materijali poput ljuske jaja (Gadd, 2008; Crini i Badot, 2008). Hevira i suradnici (2020) uspješno su uklonili kationsko bojilo metilensko modri te anionsko bojilo indigo carmine iz vode biosorpcijom na ljusku kokošnjeg jaja. Rápó i suradnici (2020) navode kako je biosorpcijom na ljusku jaja uspješno uklonjeno bojilo Remazol Brilliant Violet-5R te kako se ljuska jaja može smatrati jeftinim, učinkovitim i okolišno prihvatljivim biosorbensom za uklanjanje bojila iz otpadnih voda.

Prisutnost povećanih koncentracija nitrata u površinskim i podzemnim vodama uzrokovana ponajviše povećanom uporabom umjetnih gnojiva u poljoprivrednoj proizvodnji, također predstavlja veliki problem s kojim se suočavaju mnogi dijelovi svijeta. Jendia i suradnici (2020) koristili su ljuske jaja kao biosorbens za uklanjanje nitrata iz uzoraka vode izuzetih u Pojasu Gaze, pri čemu je postotak uklanjanja (učinkovitost) iznosila oko 90 %.

Ljuska jaja korištena je i za imobilizaciju teških metala iz tla (Ok i sur., 2011; Lee i sur., 2013), pri čemu autori navode kako se radi o izvrsnom materijalu na bazi vapna, koji ne zahtijeva dodatnu obradu prije uporabe zbog prirodno porozne strukture (Pettinato i sur., 2015). Tlo onečišćeno teškim metalima najčešće ima pH vrijednost oko 6 te dodatkom ljuske jaja pH

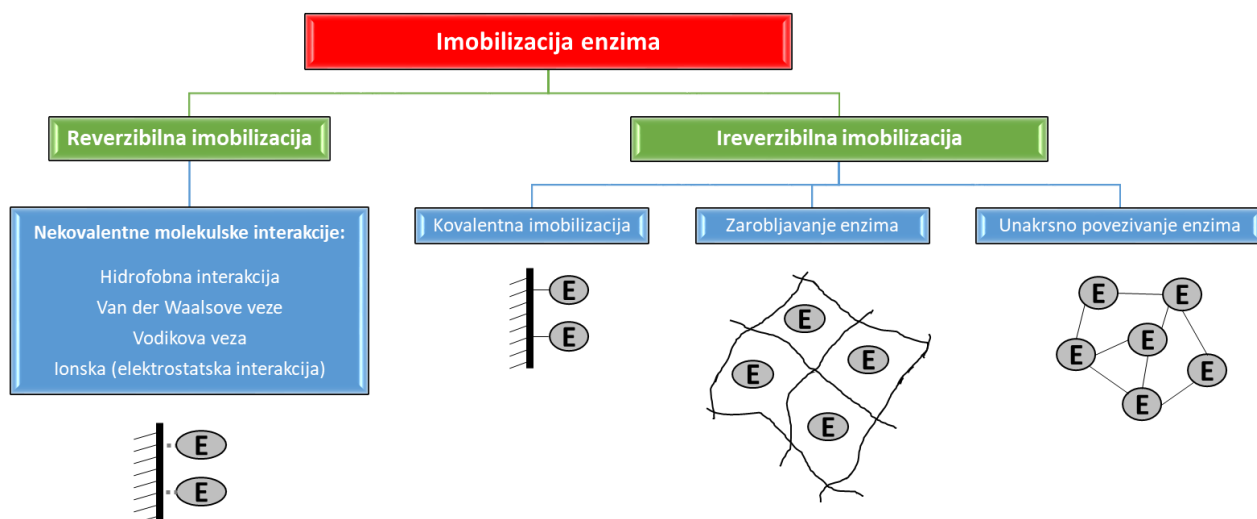
vrijednost tla raste i do 8,2 (Ok i sur., 2011; Lee i sur., 2013), čime se pospješuje imobilizacija teških metala iz tla (Bolan i sur., 1999; Hong i sur., 2010).

2.2. Imobilizacija enzima na ljusku jaja

Imobilizacija enzima je postupak ograničavanja pokretljivosti enzima, za razliku od prirodnog okruženja enzima, najčešće na čvrstu podlogu koja se naziva matriks ili nosač, a koja je kemijski drugačija od supstrata, tj. reaktanta ili produkta. Tako se enzim koncentrira na manju površinu i željena reakcija se provodi znatno brže. Također, kada se enzim imobilizira na nosač povećava se potencijal za višestruko korištenje i mogu mu se poboljšavati kemijska i fizikalna svojstva što u konačnici rezultira dugoročnim smanjenjem troškova proizvodnje (Budžaki i sur., 2020; Kolarić, 2020).

2.2.1. Vrste imobilizacije

Imobilizacija enzima se obzirom na povratnost, tj. reverzibilnost vezanja enzima na nosač može podijeliti na reverzibilnu i ireverzibilnu imobilizaciju, prikazanu na **Slici 3** (Kolarić, 2020).

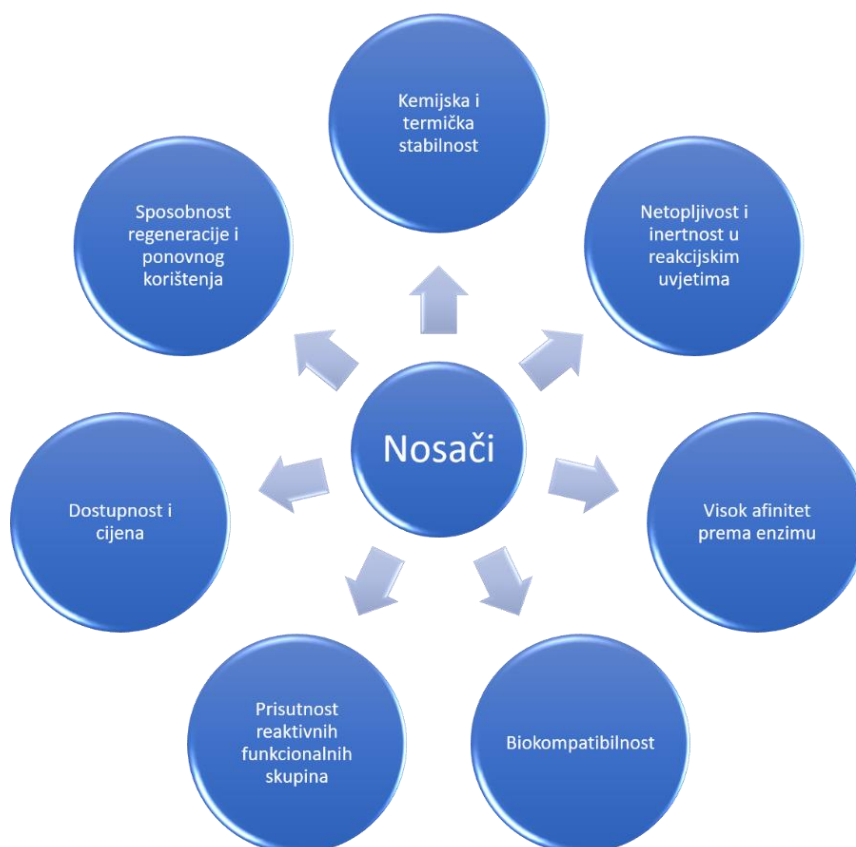


Slika 3 Shematski prikaz vrsta imobilizacije enzima (Kolarić, 2020)

Reverzibilna metoda imobilizacije podrazumijeva da se enzim može odvojiti od nosača za koji je vezan nekovalentnim molekulskim intrerkacijama kao što su hidrofobna interakcija, Van der Waalsove veze, vodikova i ionska veza. Ireverzibilna metoda imobilizacije podrazumijeva da se vezani enzim ne može odvojiti od nosača bez da mu se uništi enzimska aktivnost. U ireverzibilne metode imobilizacije ubrajaju se kovalentna imobilizacija, zarobljavanje enzima i unakrsno povezivanje enzima (Budžaki i sur., 2020; Kolarić, 2020).

2.2.2. Nosači za imobilizaciju enzima

Kemijska i strukturna svojstva nosača su ključan faktor koji određuje vrijednost enzima kao biokatalizatora. Pogrešan izbor nosača može djelovati nepovoljno na enzim i trošak procesa, a njegova uloga bi trebala biti upravo suprotna (Sheldon, 2007). Izbor nosača nije jednostavan i ovisi i o samom enzimu koji se imobilizira, no nosači trebaju zadovoljavati određene uvjete (Slika 4).



Slika 4 Poželjne karakteristike nosača za imobilizaciju enzima

Tako se od nosača očekuju sljedeće karakteristike:

1. jeftin, lako dostupan, ekološki prihvatljiv, inertan, stabilan te da poboljšava specifičnost i reaktivnost imobiliziranog enzima;
2. otporan na promjene temperature, pH, mehanički stres, organska otpala;
3. mogućnost regeneracije nakon određenog vremena;
4. vezanje relativno velike količine enzima;
5. dezinfekcijska svojstva (Sirisha i sur., 2016).

Nosači se obzirom na kemijski sastav mogu podijeliti na anorganske i organske, koji se dalje dijele na prirodne i sintetske. U anorganske nosače se ubrajaju staklo, silika gel, glinica, metalni oksidi i mnogi drugi materijali na bazi silicija zbog dobrih termičkih i mehaničkih svojstava (Hartmann i Kostrov, 2013). Organski nosači za imobilizaciju enzima se dijele u dvije grupe: biopolimere i sintetske polimere. Neki organski nosači koji se koriste za imobilizaciju enzima su polianilin, polistiren, polipropilen, hitozan, agaroz i celuloza (Zdarta i sur., 2018).

2.2.3. Ljuska jaja kao nosač za imobilizaciju enzima

U dostupnoj literaturi postoji nekoliko radova temeljenih na imobilizaciji enzima na ljusku jaja. Pri tome je prije imobilizacije enzima na ljusku jaja, ljusku bilo potrebno pripremiti.

Prvi korak u pripremi ljuske jaja za imobilizaciju enzima bio je obrada ljuske jaja koja je najčešće podrazumijevala ispiranje ili kuhanje ljuske jaja u destiliranoj vodi (Salleh i sur., 2016; Makkar i Sharma, 1983; Venkaiah i Kumar, 1995; Ribeiro i sur., 2018). S druge strane, neki su autori ljusku jaja obrađivali na način da su je odmah kuhali u 0,1 % otopini natrijeva dodecil-sulfata (Vemuri i sur., 1998; Chattopdhyay i Sen, 2012), dok su Salleh i suradnici (2016) i Makkar i Sharma (1983) nakon ispiranja ljuske jaja u vodi primijenili postupak kuhanja u 0,1 % otopini natrijeva dodecil-sulfata. Najčešći korak nakon kuhanja u 0,1 % otopini natrijeva dodecil-sulfata bilo je ispiranje u destiliranoj vodi, slijeđeno ispiranjem u acetonu, da bi se potom ljuska jaja sušila određeno vrijeme, te nakon sušenja usitnila na željenu veličinu čestica.

Na ovako pripremljenu ljusku jaja provođena je imobilizacija različitih enzima pri različitim uvjetima (**Tablica 2**), pri čemu je najčešće korištena bila imobilizacija unakrsnim povezivanjem enzima koji su prethodno adsorbirani na ljusku jaja.

Tablica 2 Pregled metoda i uvjeta imobilizacije enzima na ljusku jaja

Enzim	Vrsta imobilizacije	Korišteni pufer	Vrijeme imobilizacije	Referenca
β -galaktozidaza	Imobilizacija adsorpcijom slijeđena kovalentnim unakrsnim povezivanjem	50 mM fosfatni pufer pH 6,5	45 min	Makkar i Sharma, (1983)
Fosforilaza škroba	Imobilizacija adsorpcijom slijeđena kovalentnim unakrsnim povezivanjem	20 mM Tris-HCl pufer pH 7,6	preko noći (~ 12 h)	Venkaiah i Kumar (1995)
Lipaza	Imobilizacija adsorpcijom slijeđena kovalentnim unakrsnim povezivanjem	nije definirano	nije definirano	Vemuri i sur. (1998)
Tirozinaza	Imobilizacija adsorpcijom slijeđena kovalentnim unakrsnim povezivanjem	50 mM fosfatni pufer pH 7,0	8 h	Norouzian i sur. (2007)
Lipaza	Imobilizacija adsorpcijom	50 mM fosfatni pufer pH 7,0	12 h	Chattopadhyay i Sen (2012)
Lipaza	Imobilizacija adsorpcijom	1-50 mM fosfatni pufer pH 7,0	24 h	Salleh i sur. (2016)
Inulinaza	Imobilizacija adsorpcijom slijeđena kovalentnim unakrsnim povezivanjem	50 mM natrijev acetatni pufer pH 5,5	12 h 24 h	Ribeiro i sur. (2018.)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak

Zadatak ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj različitih puferkih sustava na kemijsku stabilnost ljuske jaja kao potencijalnog nosača za imobilizaciju enzima. U tu svrhu je prethodno pripremljena ljuska jaja podvrgnuta djelovanju tri različita puferka sustava: Tris-HCl, Britton-Robinsonovom te natrijevom fosfatnom puferu pri tri različita pH: 6, 7 i 8 tijekom 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 24 sata. Proces potencijalne dekalifikacije („curenja“ kalcija) ljuske jaja praćen je kompleksometrijskom titracijom, te je na temelju podataka o količini izdvojenog kalcija u puferke otopine procijenjena stabilnost ljuske jaja kao potencijalnog nosača za imobilizaciju enzima i to sa stanovišta njezine kemijske stabilnosti i kemijske inertnosti prema okolini.

3.2. Materijali i metode

3.2.1. Uzorci

Ljuska kokošnjih jaja prikupljena je iz kućanstava i lokalnog restorana te čuvana pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do ispitivanja utjecaja puferkih sustava na njenu stabilnost kao potencijalnog nosača za imobilizaciju enzima.

3.2.2. Kemikalije i reagensi

U ovom radu su korištene slijedeće kemikalije i reagensi: natrijev *di*-hidrogen fosfat monohidrat, *di*-natrijev hidrogenfosfat, natrijev dodecil sulfat (SDS) i kalkonkarboksilna kiselina dobavljeni su od proizvođača Acros Organics (Španjolska), a klorovodična i *o*-fosforna kiselina od proizvođača Carlo Erba (Španjolska). Aceton i natrijev hidroksid dobavljeni su od Gram mol (Hrvatska), natrijev hidroksid i kompleksal III od proizvođača T.T.T (Hrvatska), dok su tris-hidroksimetil aminometan dobavljeni od proizvođača Applichem (Njemačka). Borna

kiselina dobavljena je od proizvođača Plusone (Španjolska), kalcijev klorid od Merck-Alkaloid (Makedonija), a octena kiselina od J. T. Baker (Njemačka).

3.3.3. Priprema ljuske jaja za analize

Ljuska jaja pripremljena je prema Salleh i sur. (2016) uz minimalne modifikacije. U uređaj za obradu ljuske jaja (**Slika 5**) dodan je 1 kg ljuske jaja i 10 L destilirane vode te je ispiranje ljuske jaja provedeno 3 × 30 min pri 300 o/min. Nakon ispiranja, ljuska jaja je kuhana 15 minuta u 0,1 % (w/V) otopini natrijeva dodecil sulfata. Zatim je ljuska jaja tri puta po 15 min ispirana s destiliranom vodom na tresilici IKA KS 260 basic (Njemačka) pri 200 o/min kako bi se uklonio zaostali SDS i potom acetonom tijekom 15 min. Tako obrađena ljuska jaja sušena je 24 h pri 40 °C i potom samljevena u mlinu IKA WERKE M20 (Njemačka) na veličinu čestica manju od 0,5 mm.



Slika 5 Uređaj za ispiranje ljuske jaja

3.3.4. Određivanje koncentracije kalcija u ljusci jaja

Određivanje koncentracije kalcija u ljusci jaja provedeno je kompleksometrijskom titracijom pomoću *di*-natrijeve soli etilendiaminotetraoctene kiseline kao titranta i kalkan-karboksilne kiseline kao indikatora prema Tomičić (2020). Ukratko: masi od 0,5 g uzorka ljuske jaja je dodano 20 mL 2 M kloridne kiseline te je nakon potpunog otapanja miješanjem na elektromagnetskog miješalici Mix 1 (2Mag, Njemačka) pri 250 o/min, pH vrijednost otopine podešena na vrijednost pH 7 postepenim dodavanjem 2 M otopine natrijeva hidroksida. Uzorak je potom kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopunjen destiliranom vodom do oznake. Alikvot (10 mL) ovako pripremljenog uzorka je prenesen u Erlenmayerovu tikvicu volumena 250 mL, te mu je dodano 40 mL destilirane vode i 4 mL 8 M otopine natrijeva hidroksida. Smjesa je ostavljena stajati 5 minuta na sobnoj temperaturi u svrhu taloženja magnezij hidroksida i potom joj je dodano 250 μ L 0,1 % vodene otopine kalkan-karboksilne kiseline. Smjesa je potom titrirana 25 mM *di*-natrijevom soli etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA-2Na) do promjene boje iz ljubičaste u plavu. Postupak određivanja proveden je u 3 neovisna pokusa, a svaki pokus u 3 paralele.

3.3.5. Određivanje utjecaja puferских sustava na otpuštanje kalcija iz ljuske jaja

Određivanje utjecaja puferских sustava na potencijalno otpuštanje kalcija iz ljuske jaja provođeno je tijekom 24 sata prema sljedećoj proceduri. U 50 mL 0,1 M pufera (natrijev fosfatni, Tris-HCl ili Britton-Robinson pufer) odgovarajućeg pH (6, 7 ili 8) dodano je 5 g ljuske jaja te je proces potencijalne dekalifikacije provođen miješanjem na elektromagnetskoj miješalici Mix 6 (2Mag, Njemačka) pri 40 °C i 350 o/min tijekom 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 24 sata. Po isteku vremena otopina je odvojena od ljuske jaja filtracijom kroz nabrani filter papir te korištena za analizu koncentracije kalcija.

3.6. Kompleksometrijsko određivanje koncentracije kalcija u otopinama

Kompleksometrijsko određivanje koncentracije kalcija u otopinama provedeno je pomoću *di*-natrijeve soli etilendiaminotetraoctene kiseline kao titranta i kalkan-karboksilne kiseline kao indikatora prema Tomičić (2020). Volumenu od 5 mL filtrata dodano je dodano 45 mL destilirane vode i 4 mL 8 M otopine natrijeva hidroksida, te je smjesa ostavljena stajati 5 minuta na sobnoj temperaturi u svrhu taloženja magnezij hidroksida. Otopini je potom dodano 250 μ L 0,1 % vodene otopine kalkan-karboksilne kiseline i titracija je provedena 25 mM *di*-natrijevom soli etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA-2Na) do promjene boje iz ljubičaste u plavu (**Slika 6**). Postupak određivanja proveden je u 2 neovisna pokusa, a svaki pokus u 3 paralele.



Slika 6 Boja uzorka ljuske jaja prije titracije, nakon dodatka indikatora te nakon titracije

3.7. Statistička obrada podataka

Srednje vrijednosti i standardne devijacije triplikatnih mjerenja i višestrukih neovisnih pokusa su izračunate primjenom programa Excel (Microsoft, Sjedinjene Američke Države).

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj je ovog diplomskog rada bio ispitati utjecaj različitih puferских sustava na kemijsku stabilnost ljuske jaja kao potencijalnog nosača za imobilizaciju enzima. Naime, jedan od ključnih zahtjeva za nosače za imobilizaciju enzima je njihova kemijska stabilnost i inertnost prema enzimu i okolini (Liu i Chen, 2016; Zdarta i sur., 2018) što je obzirom na kemijski sastav ljuske jaja (Walton i sur., 1973.; Waheed i sur., 2019.; Zajec, 2020.) i reaktivnost sastavnog kalcijeva karbonata (Pramanpol i Nitayapat, 2006; Tsai i sur., 2006; Carvalho i sur., 2011; Holmes i sur., 2011; Luo i sur., 2018; Buksh i sur., 2018; Phipps i Lorusso, 2018; Tomičić, 2020) nadasve dvojbena.

Upravo je na temelju gore navedenih istraživanja koja ukazuju na reaktivnost kalcijeva karbonata postavljena hipoteza da je ljuska jaja, točnije kalcijev karbonat ljuske jaja potencijalno kemijski nestabilan i reaktivan u uvjetima kako imobilizacije enzima, tako i uvjetima provođenja enzimski kataliziranih reakcija enzima imobiliziranim na ljusku jaja. Kako bi se navedeno potvrdilo, ljuska jaja je podvrgnuta djelovanju tri različita puferских sustava: Tris-HCl, Britton-Robinsonova te natrijeva fosfatnog pufera pri tri različita pH: 6, 7 i 8 tijekom 1, 2, 3, 4, 5, 6 i 24 sata, pri čemu je proces potencijalne dekalifikacije kalcijeva karbonata praćen kompleksometrijskom titracijom. Sukladno dobivenim rezultatima o količini izdvojenog kalcija procijenjena je stabilnost ljuske jaja kao potencijalnog nosača za imobilizaciju enzima i to sa stanovišta kako njezine kemijske stabilnosti tako i kemijske inertnosti prema okolini.

4.1. Koncentracija kalcija u ljusci jaja

Kako bi se procijenio udio kalcija izdvojenog otapanjem kalcijeva karbonata ljuske jaja u ispitivanim puferским sustavima, bilo je potrebno odrediti koncentraciju kalcija koji se nalazi u pripremljenoj ljusci jaja (**Tablica 3**). Iako u dostupnoj literaturi ne postoje podatci o množinskoj koncentraciji kalcija ljusci jaja, to se dobiveni rezultati mogu na osnovu izračunatog udjela kalcija usporediti sa literaturnim. Udio kalcija u obrađenoj ljusci jaja iznosio je $33,31 \pm$

0,13 g na 100 g ljuske jaja (**Tablica 3**) što se djelomično slaže sa literaturnim podacima. Tako je Tomičić (2020) pronašla da udio kalcija u ispranoj i sušenoj ljusci jaja iznosi $35,51 \pm 0,67$ g na 100 g ljuske jaja, Walton i sur. (1973) navode udio kalcija od 36,4 do 37,3 g na 100 g suhe ljuske jaja, dok Waheed (2019) navodi da se udio kalcija kreće od 29,95 do 37,3 g na 100 g uzorka ljuske jaja ovisno o tome na koji način je tretirana ljuska jaja.

Tablica 3 Koncentracija i udio kalcija u ljusci jaja*

Uzorak	Koncentracija Ca^{2+} [mol/L]	Udio Ca^{2+} [g/100 g ljuske jaja]
Ljuska jaja (5 g)	$415,46 \pm 1,60$	$33,31 \pm 0,13$

*Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija dvije neovisne analize od kojih je svaka provedena u triplikatu.

4.2. Utjecaj natrijeva fosfatnog pufera na kemijsku stabilnost ljuske jaja

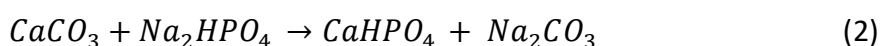
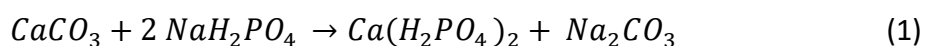
Natrijev ili kalijev fosfatni pufer jedni su od najčešće korištenih pufera, kako u imobilizaciji enzima na ljusku jaja, tako i u ispitivanju aktivnosti enzima imobiliziranih na istu (Makkar i Sharma, 1983; Norouzian i sur., 2007; Chattopadhyay i Sen, 2012; Salleh i sur., 2016). Pri tome se za imobilizaciju enzima na ljusku jaja koriste puferi raspona pH od 5,5 do 7,6, a ispitivanje aktivnosti i biokemijsku karakterizaciju imobiliziranih enzima puferi u rasponu pH od 3 do 10 (Makkar i Sharma, 1983; Venkaiah i Kumar, 1995; Vemuri i sur., 1998; Norouzian i sur., 2007; Chattopadhyay i Sen, 2012; Salleh i sur., 2016; Ribeiro i sur., 2018).

Sam natrijev fosfatni pufer predstavlja smjesu natrijeva *di*-hidrogen fosfata (NaH_2PO_4) i *di*-natrijeva hidrogen fosfata (Na_2HPO_4) pri čemu se u ispitivanom rasponu pH pufera od 6 do 8 uspostavlja ravnoteža između dviju ionskih vrsti *o*-fosforne kiseline, H_2PO_4^- i HPO_4^{2-} (Mohan, 2006; Park i sur., 2009; Stephenson, 2016). Tako pri pH 6 dominiraju *di*-hidrogen fosfatni ioni (H_2PO_4^-), dok pri pH 8 hidrogen fosfatni ioni (HPO_4^{2-}), čiji odnosi u vodenoj otopini ovise o koncentraciji samog pufera, a kreću se u rasponu od oko 16:1 pri pH 6 do oko 1:16 pri pH 8.

Izlaganje ljuske jaja otopinama 0,1 M natrijeva fosfatnog pufera pH vrijednosti 6, 7 i 8 u omjeru 1 g/10 mL tijekom 24 sata prikazano je **Slikom 7**. Vidljivo je da tijekom prvih 6 sati izloženosti ljuske jaja fosfatnom puferu pH vrijednosti 6 i 7 dolazi do porasta koncentracije otopljenog

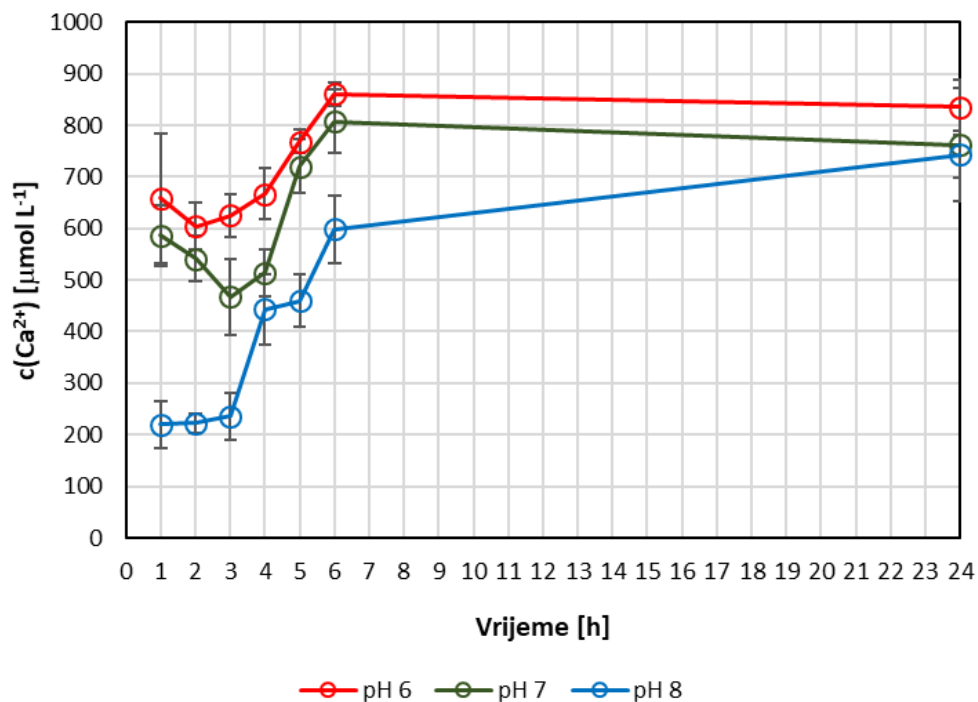
kalcija, da bi ona u 24-tom poprimila nešto nižu vrijednost od one zabilježene pri 6 h. Tako se nakon 6 h izlaganja ljuske jaja puferu pH 6 u otopini nalazi oko 860 $\mu\text{mol/L}$ kalcijevih iona, a nakon 24 sata oko 836 $\mu\text{mol/L}$, dok u slučaju pufera pH 7 oko 808 $\mu\text{mol/L}$ kalcijevih iona nakon 6 sati te oko 762 $\mu\text{mol/L}$ kalcijevih iona nakon 24 sata izlaganja ljuske jaja. S druge strane, izlaganjem ljuske jaja fosfatnom puferu pH 8 može se zamijetiti porast koncentracije kalcijevih iona tijekom prvih 6 sati, kojeg slijedi nešto blaži porast do 24-og sata, u kojemu je zabilježena koncentracija kalcijevih iona u iznosu od 744 $\mu\text{mol/L}$.

Samo izdvajanje kalcija iz kalcijeva karbonata ljuske jaja izloženog fosfatnom puferu može se pojasniti putem 2 kemijske reakcije:



Pri tome se pri pH 6 može pretpostaviti da je dominantna reakcija oslobađanja kalcijevih iona reakcija (1) i to obzirom na povećani udio natrijeva *di*-hidrogenfosfata, pri pH 8 dominantna reakcija (2) obzirom na povećani udio *di*-natrijeva hidrogen fosfata, dok se pri pH 7 oslobađanje kalcijevih iona iz kalcijeva karbonata ljuske jaja može pripisati objema reakcijama.

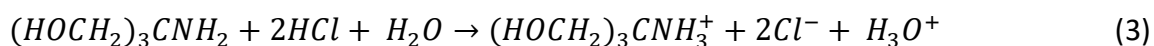
Na osnovi svega gore navedenog može se zaključiti da izlaganjem ljuske jaja otopinama fosfatnog pufera u rasponima pH korištenim pri imobilizaciji enzima dolazi do djelomičnog curenja kalcija, čime ljuska jaja očigledno ne zadovoljava osnovni kriterij za uporabu kao nosač, a to je kemijska stabilnost i inertnost prema enzimu i okolini. Međutim, bitno je za napomenuti da je udio kalcija oslobođenog iz ljuske jaja pod djelovanjem fosfatnog pufera manji od 0,2 % ukupnog kalcija prisutnog u kalcijevu karbonatu ljuske jaja.



Slika 7 Utjecaj natrijeva fosfatnog pufera na otpuštanje kalcija iz ljuske jaja
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna pokusa kod kojeg je svaka analiza provedena u triplikatu

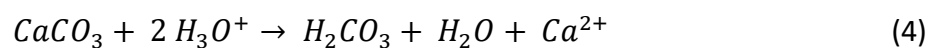
4.3. Utjecaj Tris-HCl pufera na kemijsku stabilnost ljuske jaja

Tris-HCl pufer je jedan od najčešće korištenih pufera u biokemijskim i medicinskim istraživanjima, a predstavlja otopinu *tris*(hidroksimetil)aminometana određene koncentracije čija se pH vrijednost na željenu podešava dodatkom kloridne kiseline (Mohan, 2006.). Dodatkom kloridne kiseline nastaje konjugirani kiselinskog bazni par Tris-baze, sastavljen od disociranog i nedisociranog oblika *tris*(hidroksimetil)aminometana što je prikazano kemijskom reakcijom (3).

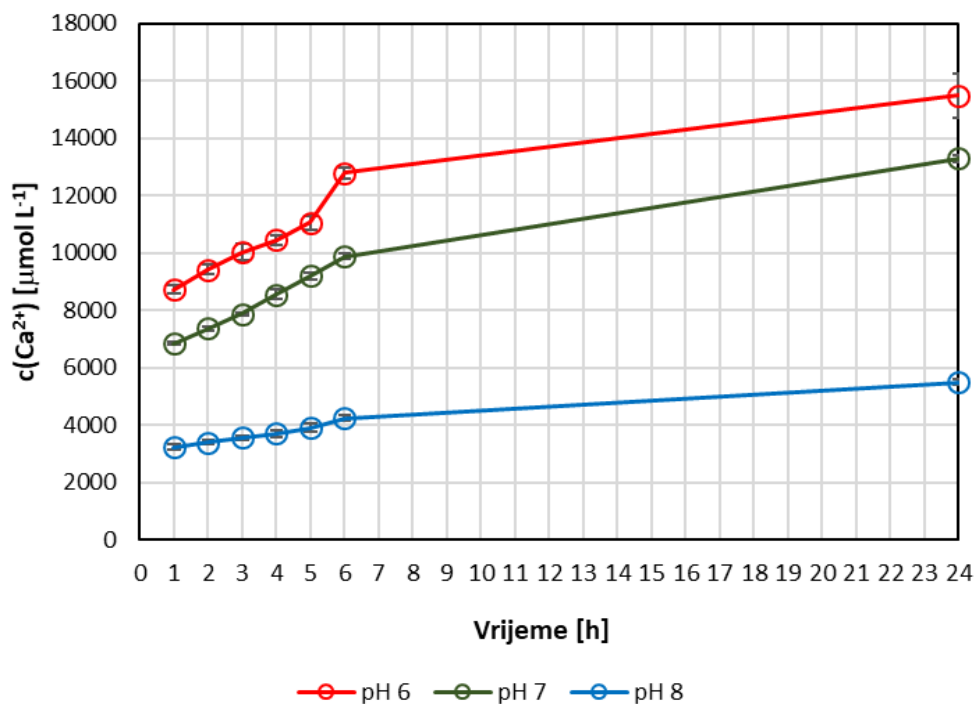


Izlaganje ljuske jaja otopinama 0,1 M Tris-HCl pufera pH vrijednosti 6, 7 i 8 u omjeru 1 g/10 mL tijekom 24 sata prikazano je na **Slici 8**.

Vidljivo je da tijekom 24 sata izloženosti ljuske jaja Tris-HCl puferu dolazi do porasta koncentracije kalcija u puferskim otopinama, odnosno da dolazi do otapanja kalcijeva karbonata ljuske jaja. Pri tome se najviše kalcija iz kalcijeva karbonata ljuske jaja oslobodi pri pH 6, nešto manje pri pH 7, a najmanje pri pH 8. Tako koncentracija kalcijevih iona u 24-tom satu iznosi 15476 $\mu\text{mol/L}$ pri pH 6, 13289 $\mu\text{mol/L}$ pri pH 7, te svega 5505 $\mu\text{mol/L}$ pri pH 8. Ovo je bilo i za očekivati, budući je za nižu vrijednost pH Tris-HCl pufera potrebno u otopinu *tris*(hidroksimetil)-aminometana dodati veću količinu kloridne kiseline (Mohan, 2006.), što podrazumijeva i veći udio kloridne kiseline koja može reagirati sa kalcijevim karbonatom ljuske jaja, a što je prikazano kemijskim reakcijama (4) i (5).



U prvom koraku (reakcija 4) dolazi do reakcije kalcijevog karbonata ljuske jaja sa hidronijevim ionima nastalim tijekom podešavanja pH otopine *tris*(hidroksimetil)aminometana (reakcija 3), nakon čega oslobođeni kalcijevi ioni reagiraju sa kloridnim ionima pri čemu nastaje kalcijev klorid (reakcija 5).



Slika 8 Utjecaj Tris-HCl pufera na otpuštanje kalcija iz ljuske jaja
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna pokusa kod kojeg je svaka analiza provedena u triplikatu

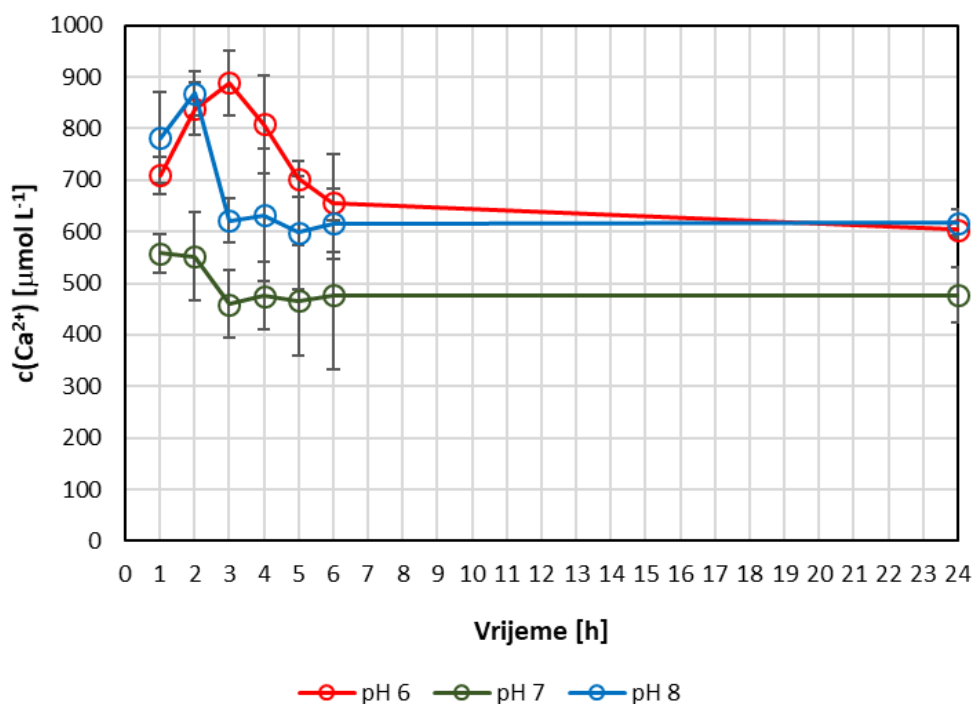
Na osnovi gore navedenog može se zaključiti da izlaganjem ljuske jaja otopinama Tris-HCl pufera u rasponu pH od 6 do 8, a koji su najčešće korištene vrijednosti pH pri imobilizaciji enzima dolazi do znatnog curenja kalcija iz kalcijeva karbonata ljuske jaja, čime ljuska jaja očigledno ne zadovoljava osnovni kriterij za uporabu kao nosač, a to je kemijska stabilnost i inertnost prema enzimu i okolini. Pri tome je bitno za napomenuti da udio kalcija oslobođenog iz ljuske jaja pod djelovanjem Tris-HCl pufera može iznositi i do 4 % od ukupnog kalcija prisutnog u kalcijevu karbonatu ljuske jaja.

4.4. Utjecaj Britton-Robinsonova pufera na kemijsku stabilnost ljuske jaja

Britton-Robinsonov pufer je univerzalni pufer sa rasponom pH djelovanja od 2 do 12. Sastoji se od smjese borne, octene i *o*-fosforne kiseline, svake prisutne u vodenoj otopini u ekvimolarnoj količini od 0,04 mol/L, a čiji pH se podešava na željeni pH dodatkom otopine natrijeva hidroksida koncentracije 0,2 mol/L. Obzirom da miješanjem otopina kiselina i natrijeva hidroksida dolazi do promjena u koncentracijama sastavnih komponenti, to se

podešavanje ionske jakosti ovog pufera postiže dodatkom određene količine kalijeva klorida (Mongay i Cerda, 1974).

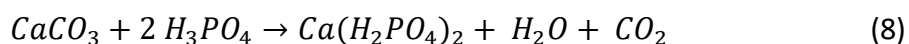
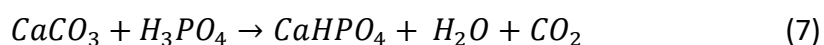
Utjecaj 0,1 M Britton-Robinsonovog pufera pH vrijednosti 6, 7 i 8 na otpuštanje kalcija iz ljuske jaja tijekom 24 sata prikazan je na **Slici 9**.



Slika 9 Utjecaj Britton-Robinsonova pufera na otpuštanje kalcija iz ljuske jaja
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna pokusa kod kojeg je svaka analiza provedena u triplikatu

Iz slike je vidljivo da tijekom prva dva (pH 7 i 8) ili tri sata (pH 6) izloženosti ljuske jaja Britton-Robinsonovom puferu dolazi do porasta koncentracije kalcijevih iona u otopini, da bi se nakon toga koncentracija kalcijevih iona nešto smanjila do 6-tog sata i ostala ustaljena do 24-tog sata. Tako se pri pH 6 u otopini postiže najveća koncentracija kalcijevih iona od 889 $\mu\text{mol/L}$ nakon tri sata, pri pH 7 od 558 $\mu\text{mol/L}$ nakon dva sata, a pri pH 8 od 869 $\mu\text{mol/L}$ nakon dva sata. U 24-tom satu izlaganja ljuske jaja Britton-Robinsonom puferu bilježe se vrijednosti koncentracije kalcijevih iona u otopini i to kako slijedi: pri pH 6 od 604 $\mu\text{mol/L}$, pH 7 od 477 $\mu\text{mol/L}$, te pri pH 8 u iznosu od 618 $\mu\text{mol/L}$. Ovakve promjene u koncentraciji kalcijevih iona u otopinama tijekom vremena dijelom se mogu pripisati reakcijama komponenti pufera koje daju produkte različitog karaktera, a koji potom mogu međusobno reagirati dajući netopljive

spojeve koji se vrlo vjerojatno adsorbiraju na kalcijev karbonat neizreagiranog dijela ljuske jaja. S druge strane, na samu reaktivnost kalcijeva karbonata ljuske jaja sa komponentama pufera očigledno ima i utjecaj stupanj disocijacije sastavnih kiselina. Tako se u ispitivanom rasponu pH od 6 do 8 octena kiselina nalazi gotovo u potpunosti disocirana, dok *o*-fosforna kiselina sadrži dominantno dvije ionske vrste: *di*-hidrogen fosfatni ($H_2PO_4^-$) i hidrogen fosfatni ion (HPO_4^{2-}), od čega pri pH 6 dominira $H_2PO_4^-$, pri pH 7 u otopini se nalazi gotovo podjednaka količina $H_2PO_4^-$ i HPO_4^{2-} iona, a pri pH 8 dominira hidrogen fosfatni ion (HPO_4^{2-}). S druge strane borna kiselina u ovom rasponu pH u otopini postoji dominantno u nedisociranoj H_3BO_3 formi, iako se ne može isključiti i postojanje male količine poliboratnih iona poput $B_3O_3(OH)_4^-$, $B_4O_5(OH)_4^-$ i $B_5O_6(OH)_4^-$ (Kabay i Bryjak, 2015). Iz svega toga može se pretpostaviti da se izdvajanje kalcija u otopine Britton-Robinsonova pufera može pripisati kemijskoj reakciji kalcijeva karbonata ljuske jaja sa octenom kiselinom (reakcija 6) i *o*-fosfornom kiselinom (reakcije 7 i 8).



Na temelju svega gore navedenog može se zaključiti da izlaganjem ljuske jaja otopinama Britton-Robinsonovog pufera raspona pH od 6 do 8 dolazi djelomičnog curenja kalcija, čime ljuska jaja kao i u slučaju prethodno ispitanih pufera ne zadovoljava osnovni kriterij za uporabu kao nosač, a to je kemijska stabilnost i inertnost prema enzimu i okolini. Međutim, i ovdje je bitno za napomenuti da udio kalcija oslobođenog iz ljuske jaja pod djelovanjem Britton-Robinsonovog pufera iznosi manje od 0,2 % ukupnog kalcija prisutnog u kalcijevu karbonatu ljuske jaja.

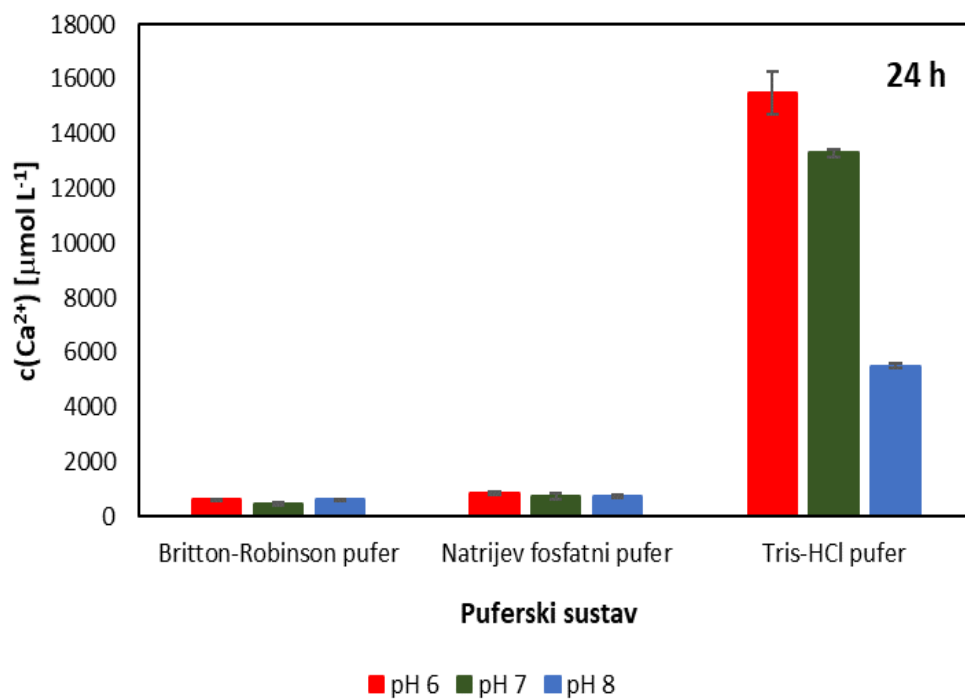
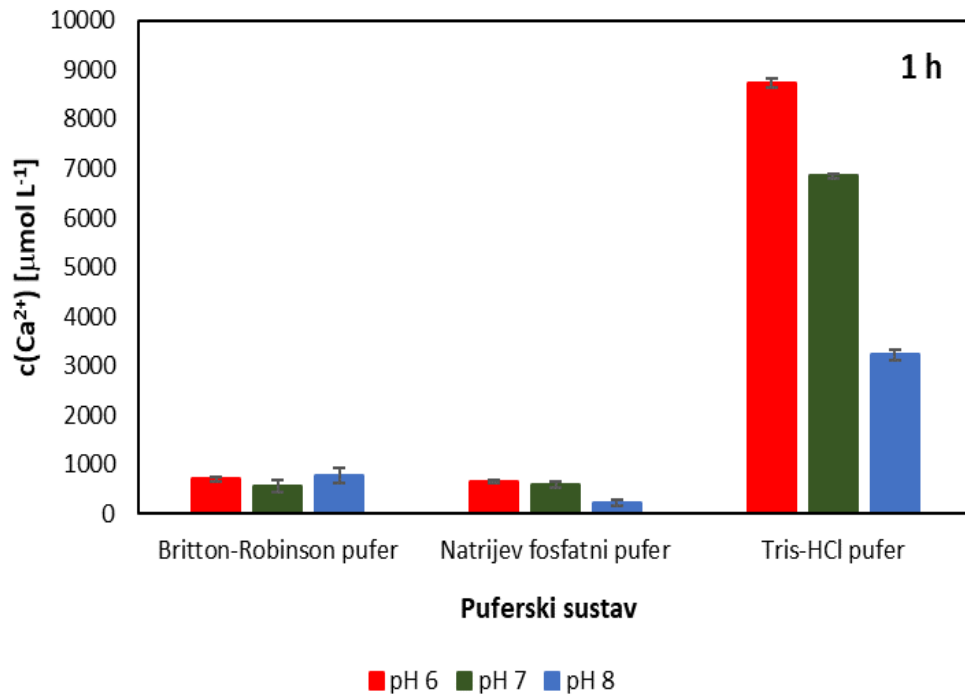
4.5. Usporedba utjecaja puferskih sustava na otpuštanje kalcija iz ljuske jaja

Kako bi se lakše procijenio utjecaj ispitivanih pufera na kemijsku stabilnost i inertnost ljuske jaja i to sa stanovišta otpuštanja kalcija iz kalcijeva karbonata ljuske jaja, količine kalcija

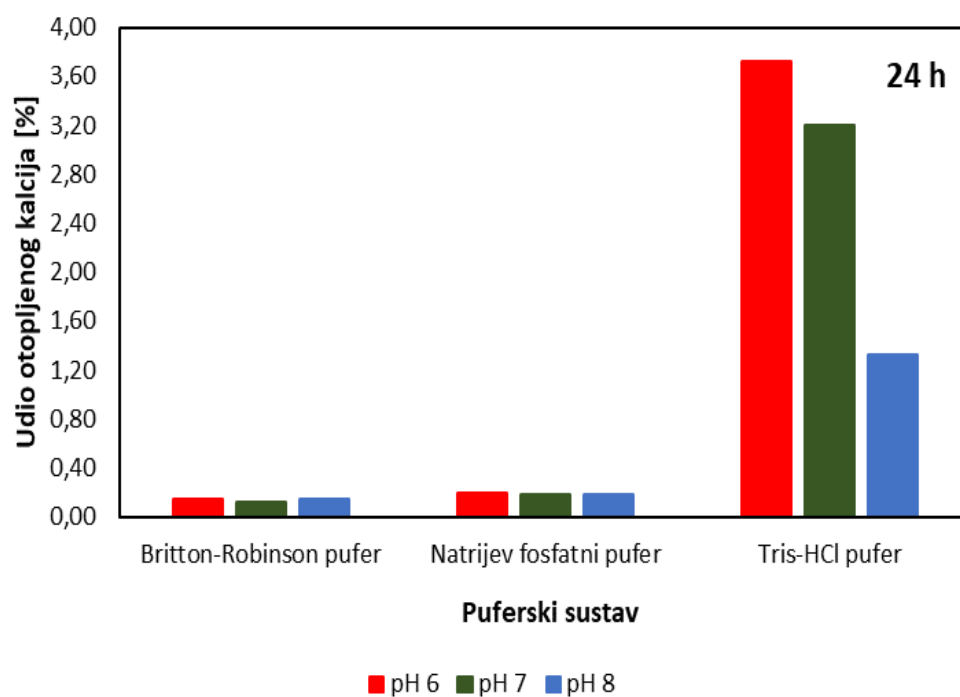
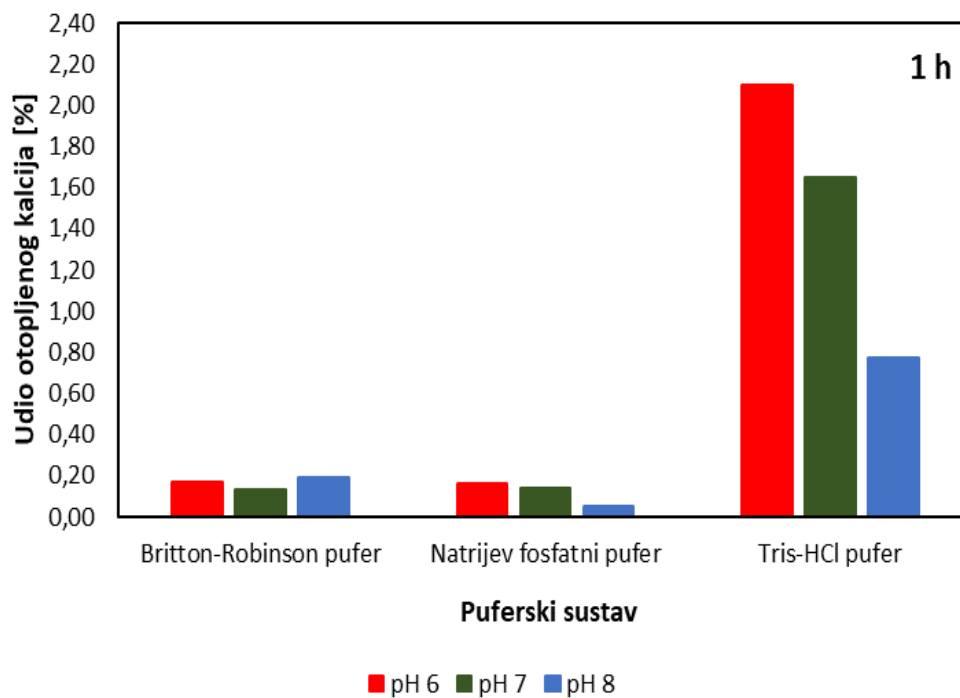
otpuštenog u otopine natrijeva fosfatnog, Tris-HCl i Britton-Robinsonova pufera nakon 1 i 24 sata su međusobno uspoređene. **Slikom 10** su prikazane koncentracije kalcija u puferskim otopinama nakon 1 i 24 sata, a **Slikom 11** udjeli otpuštenog kalcija u istim vremenskim intervalima.

Evidentno je da se Tris-HCl pufer pokazao najnepovoljnijim puferom za kemijsku stabilnost i inertnost ljuske jaja kao nosača za imobilizaciju enzima, dok se natrijev fosfatni pufer i Britton-Robinsonov pufer isto tako pokazuju podjednako nepovoljnima, ali znatno manje od Tris-HCl pufera. Pri tome se niži pH otopine pufera uglavnom pokazuje nepogodnijim od višeg. Tako se pri pH 6 otpušta veća količina kalcijevih iona nego pri pH 8, izuzev u slučaju Britton-Robinsonova pufera, gdje su najmanje koncentracije i udjeli kalcijevih iona zabilježeni pri pH 7.

Usporede li se koncentracije i udjeli kalcijevih iona otpuštenih nakon 1 sata u puferske otopine Tris-HCl pufera sa onima otpuštenim u puferske otopine natrijeva fosfatnog i Britton-Robinsonova pufera, tada se može zamijetiti da su one u Tris-HCl puferu oko 12-14 puta veće od onih zabilježenih u natrijevom fosfatnom i Britton-Robinsonovom puferu pri vrijednostima pH 6 i 7, dok su u slučaju pH vrijednosti pufera 8, oko 4 puta veće u Tris-HCl puferu nego u Britton-Robinsonovu puferu, te preko 14 puta veće u Tris-HCl puferu u odnosu na natrijev fosfatni pufer. Ove razlike postaju još izraženije nakon 24 sata izlaganja ljuske jaja puferskim otopinama. Tako se nakon 24 sata izlaganja ljuske jaja Tris-HCl puferu pH 6 i 7 postiže oko 18 puta veća koncentracija i udio kalcijevih iona u odnosu na natrijev fosfatni pufer, te oko 26 puta veća koncentracija u odnosu na Britton-Robinsonov pufer. S druge strane, pri pH 8 ova razlika je nešto manja, te se u Tris-HCl puferu postiže oko 8 puta veća koncentracija kalcija od one u natrijevom fosfatnom puferu i Britton-Robinsonovom puferu iste pH vrijednosti.



Slika 10 Utjecaj puferskih sustava na otpuštanje kalcija iz ljuske jaja
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna pokusa kod kojeg je svaka analiza provedena u triplikatu



Slika 11 Utjecaj puferskih sustava na udio otpuštenog kalcija iz ljuske jaja
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna pokusa kod kojeg je svaka analiza provedena u triplikatu

Na temelju svih gore navedenih rezultata može se zaključiti da se ljuska jaja pokazuje nepogodnom kao nosač za imobilizaciju enzima, budući ne udovoljava zahtjevima kemijske stabilnosti i inertnosti, na što definitivno ukazuju rezultati koncentracije kalcija u puferkim otopinama pH 6, 7 i 8 nakon izlaganja ljuske jaja istim (**Slike od 7 do 11**). Osim što ovi rezultati ukazuju na nepogodnost ljuske jaja kao potencijalnog nosača za imobilizaciju enzima, oni ujedno bacaju i određenu sjenu na objavljene znanstvene rezultate istraživanja vezane uz imobilizaciju enzima na ljusku jaja. To se posebice odnosi na podatke biokemijske i operative stabilnosti imobiliziranih enzima. Naime, dok je većina autora provodila imobilizaciju enzima na ljusku jaja pripremljenu na relativno sličan način i u rasponu pH pufera sličnom onom koji je ispitan u ovom diplomskom radu (Makkar i Sharma, 1983; Venkaiah i Kumar, 1995; Vemuri i sur., 1998; Norouzian i sur., 2007; Chattopadhyay i Sen, 2012; Salleh i sur., 2016; Ribeiro i sur., 2018), što bi obzirom na upotrijebljeni pufer za imobilizaciju i vrijeme imobilizacije trebalo imati relativno mali učinak na postotak imobiliziranog enzima, neki od njih su ispitali optimalni pH imobiliziranog enzima, te broj ciklusa ponovne uporabe imobiliziranog enzima (Vemuri i sur., 1998; Chattopadhyay i Sen, 2012). Obzirom da su ispitivanje pH optimuma enzima imobiliziranog na ljusku jaja provodili u širem rasponu pH (3-10; Vemuri i sur., 1998; 5,0-8,5; Chattopadhyay i Sen, 2012) velika je mogućnost da su pri nižim pH dobili djelomično krive vrijednosti. Naime, sukladno rezultatima ovog diplomskog rada očigledno je da se pri nižem pH iz ljuske jaja oslobađa i veća količina kalcijevih iona, što je onda moglo utjecati na djelomično odvajanje imobiliziranih enzima, a time i rezultat pH optimuma. S druge strane, ispitivanje višestrukosti uporabe imobiliziranog enzima provodi se na način da se imobilizirani enzim nakon provedene reakcije odvađa od reakcijske smjese, i potom koristi za enzimsku reakciju u sljedećem ciklusu ispitivanja. To zapravo znači da se pri svakom novom ciklusu enzim imobiliziran na ljusku jaja izlaže novoj količini pufera u reakcijskoj smjesi, što zapravo dugoročno dovodi do sve veće i veće količine oslobođenog kalcija i ljuske jaja, a time i potencijalne destabilizacije i otpuštanja imobiliziranog enzima.

Dobiveni rezultati o izdvajanju kalcija iz ljuske jaja u otopinu mogu utjecati i na daljnja razmatranja primjenjivosti ljuske jaja kao bisorbensa. Naime, osim što jeftini adsorbensi biološkog porijekla, poput ljuske jaja, često imaju značajno manji adsorpcijski kapacitet u odnosu na konvencionalne adsorbense, moguće otpuštanje organskih i anorganskih tvari (poput kalcija) iz njihove strukture u vodu ili otpadnu vodu predstavlja sekundarno onečišćenje vode koja se obrađuje (Wan i Hanafiah, 2008).

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata u ovom diplomskom radu mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ljuska jaja pripremljena za imobilizaciju enzima sadrži $33,31 \pm 0,13$ g Ca^{2+} /100 g_{s.t.}
- Ljuska jaja se pokazuje nepogodnom kao nosač za imobilizaciju enzima budući ne udovoljava zahtjevima kemijske stabilnosti i inertnosti uslijed otapanja sastavnog kalcijeva karbonata u puferkim otopinama.
- Najnepovoljnijim po ljusku jaja se pokazuje Tris-HCl pufer čijim se djelovanjem tijekom 24 sata u otopinu otpušta i do 4 % kalcija od ukupnog kalcija u kalcijevu karbonatu ljuske jaja.
- Natrijev fosfatni pufer i Britton-Robinsonov pufer pokazuju podjednak učinak na otpuštanje kalcija iz kalcijevog karbonata ljuske jaja pri čemu udio izdvojenog kalcija iz ljuske jaja tijekom 24 sata iznosi manje od 0,2 %.
- Primjena pufera niže pH vrijednosti u načelu dovodi do veće količine otopljenog kalcijeva karbonata ljuske jaja.

6. LITERATURA

- Abeyrathne EDNS, Lee HY, Ahn DU: Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents - A review. *Poultry Science* 92:3292–3299, 2013.
- Badrealam S, Roslan FS, Dollah Z, Bakar AAA, Handan R: Exploring the eggshell from household waste as alternative adsorbent for heavy metal removal from wastewater. U *AIP Conference Proceedings* 2020: 020077, 2018.
- Bolan NS, Naidu R, Syers JK, Tillman RW: Surface charge and solute interactions in soils. *Advances in Agronomy* 67:88–141, 1999.
- Budžaki S, Ostojčić M, Strelec I: Heterogeni biokatalizatori na bazi otpada/nusproizvoda prehrambene industrije za održivu proizvodnju biodizela. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije – Knjiga 2*, str.241-258. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.
- Buksh N, Yun C, Ping X, Hussain G, Shao Y: Chicken Eggshell as a Potential Eco-friendly, Low-cost Sorbent: A Mini Review. *Journal of Environment and Earth Science* 8:29-39, 2018.
- Carvalho J, Araujo J, Castro F: Alternative Low-cost Adsorbent for Water and Wastewater Decontamination Derived from Eggshell Waste: An Overview. *Waste and Biomass Valorization* 2:157–167, 2011.
- Carvalho J, Ribeiro A, Araújo J, Castro F: Technical Aspects of Adsorption Process onto an Innovative Eggshell-Derived Low-Cost Adsorbent. *Materials Science Forum* 730-732:648-652, 2013.
- Chattopadhyay S, Sen R: A comparative performance evaluation of jute and eggshell matrices to immobilize pancreatic lipase. *Process Biochemistry* 47:749–757, 2012.
- Crini G, Badot PM: Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature. *Progress in Polymer Science* 33:399–447, 2008.
- De Angelis G, Medeghini L, Conte AM, Mignardi S: Recycling of eggshell waste into low-cost adsorbent for Ni removal from wastewater. *Journal of Cleaner Production* 164:1497-1506, 2017.
- De Vore DP, Long DF: Anti-inflammatory activity of eggshell membrane and processed eggshell membrane preparations. Patent: US8580315B2, 2013.
- EZ, Europska zajednica: Uredba (EZ) br. 1069/2009 Nusproizvodi životinjskog podrijetla koji nisu namijenjeni prehrani ljudi. Službeni list Europske unije, L300:425-457, 2009.

- Gadd G: Biosorption: Critical Review of Scientific Rationale, Environmental Importance and Significance for Pollution Treatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84:13-28, 2008.
- Guru PS, Dash S: Sorption on eggshell waste-A review on ultrastructure, biomineralization and other applications. *Advances in Colloids and Interface Science* 209:49-67, 2104.
- Hartmann M, Kostrov X: Immobilization of enzymes on porous silicas-benefits and challenges. *Chemical Society Reviews* 42:6277–6289, 2013.
- Hevira L, Rahmi A, Zein R, Zilfa Z, Yeni, R: The fast and of low-cost-adsorbent to the removal of cationic and anionic dye using chicken eggshell with its membrane. *Mediterranean Journal of Chemistry* 10:294-301, 2020.
- Holmes JD, Sawyer JE, Kassel P, Ruiz Diaz D: Using ground eggshells as a liming material in corn and soybean production. *Crop Management* 10:1-12, 2011.
- Hong CO, Kim SY, Gutierrez J, Owens VN, Kim PJ: Comparison of oyster shell and calcium hydroxide as liming materials for immobilizing cadmium in upland soil. *Biology and Fertility of Soils* 46:491–498, 2010.
- Jendia A, Hamzah S, Abuhabib AA, El-Ashgar N: Removal of nitrate from ground water by eggshell Bio-waste. *Water Supply* 20: 2514–2529, 2020.
- Kabay N, Bryjak M: Boron Removal From Seawater Using Reverse Osmosis Integrated Processes. U *Boron Separation Processes*, str. 219-235. Elsevier, Amsterdam, 2015.
- Kolarić M: Kovalentna imobilizacija enzima. *Završni rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.
- Lee SS, Lim JE, El-Azeem SAMA, Choi B, Oh SE, Moon DH, Ok YS: Heavy metal immobilization in soil near abandoned mines using eggshell waste and rapeseed residue. *Environmental Science and Pollution Research* 20:1719–1726, 2013.
- Liu Y, Chen JY: Enzyme immobilization on cellulose matrixes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 31: 553-567, 2016.
- Luo W, Ji Y, Qu L, Dang Z, Xie y, Yang C, Tao X, Zhou J, Lu G: Effects of eggshell addition on calcium-deficient acid soils contaminated with heavy metals. *Frontiers of Environmental Science & Engineering* 12:4, 2018.
- Makkar HPS, Sharma OP: Egg shell as a carrier for enzyme immobilization. *Biotechnology and Bioengineering* 25: 595-597, 1983.
- Makuchowska-Fryc J: Use of The Eggshells in Removing Heavy Metals from Waste Water - The Process Kinetics and Efficiency. *Ecological Chemistry and Engineering* 26:165-174, 2019.

- Mashangwa TD, Tekere M, Sibanda, T: Determination of the Efficacy of Eggshell as a Low-Cost Adsorbent for the Treatment of Metal Laden Effluents. *International Journal of Environmental Research* 11:175–188, 2017.
- Mohan C: Buffers. A Guide for the Preparation and Use of Buffers in Biological Systems. EMD Bioscience, San Diego, 2006.
- Mongay C, Cerdà V: A Britton-Robinson buffer of known ionic strength. *Annales de chimie et de physique* 64:409-412, 1974.
- Norouzian D, Abarzadeh A, Mirdamadi S, Khetami S, Farhanghi A: Immobilization of Mushroom Tyrosinase by Different Methods in Order to Transform L-Tyrosine to L-3, 4 Dihydroxyphenylalanine (L-dopa). *Biotechnology* 6:436-439, 2007.
- Ok YS, Lee SS, Jeon WT, Oh SE, Usman ARA, Moon DH: Application of eggshell waste for the immobilization of cadmium and lead in a contaminated soil. *Environmental Geochemistry and Health* 33:31–39, 2011.
- Park Y, Kim SH, Matalon S, Wang NHL, Franses EI: Effect of phosphate salts concentrations, supporting electrolytes, and calcium phosphate salt precipitation on the pH of phosphate buffer solutions. *Fluid Phase Equilibria* 278:76-84, 2009.
- Pettinato M, Chakraborty S, Arafat H, Calabro V: Eggshell: A green adsorbent for heavy metal removal in an MBR system. *Ecotoxicology and environmental safety* 121:57-62, 2015.
- Phipps J, Lorusso M: Dissolution Behaviour of Calcium Carbonate in Mildly Acidic Conditions. U *The science of papermaking*, str.415–427. University of Oxford, Manchester, 2018.
- Pramanpol N. Nitayapat N: Adsorption of Reactive Dye by Eggshell and Its Membrane. *Kasetsart Journal - Natural Science* 40:192-197, 2006.
- Rápó E, Posta K, Suciú M, Robert S, Tonk S: Adsorptive Removal of Remazol Brilliant Violet-5R Dye from Aqueous Solutions using Calcined Eggshell as Biosorbent. *Acta Chimica Slovenica* 66:648-658, 2020.
- Ray S, Barman AK, Roy PK, Singh BK: Chicken eggshell powder as dietary calcium source in chocolate cakes. *The Pharma Innovation Journal* 6:1-4, 2017.
- Ribeiro GCA, Fernandes P, Aparecida de Assis S: Production, characterization, and immobilization of inulinase produced by *Pseudozyma sp.* (CCMB 306). *Chemical Engineering Communications* 205:1060-1068, 2018.
- Salleh S, See YS, Serri NA, Hena S, Tajarudin HA: Synthesis of butyl butyrate in 93 % yield by *Thermomyces lanuginosus* lipase on waste eggshells. *Environmental Chemistry Letters* 14: 189–194, 2016.
- Sheldon RA: Enzyme immobilisation: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis* 349:1289-1307, 2007.

- Sirisha VL, Jain A, Jain A: Chapter Nine - Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research* 79:179-211, 2016.
- Stephenson FH: Solutions, Mixtures, and Media. U *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology – 3rd edition*, str. 15-42. Academic Press, London, 2016.
- Strelec I, Ostojčić M, Budžaki S: Transformacija ljuske kokošnjih jaja u proizvode dodane vrijednosti. U *Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda prehrambene industrije – Knjiga 3*, str. 303-327. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2021.
- Tomičić K: Proizvodnja kalcijevih soli iz ljuske jaja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.
- Tsai WT, Yang JM, Lai CW, Cheng YH, Lin CC, Yeh CW: Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Bioresource technology* 97:488-493, 2006.
- Vemuri G, Banerjee R, Bhattacharyya BC: Immobilization of lipase using egg shell and alginate as carriers: optimization of reaction conditions. *Bioprocess Engineering* 19:111-114, 1998.
- Venkaiah B, Anil K: Process for the recovery and immobilization of starch phosphorylase from starch based industrial waste-water. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 21:77-85, 1995.
- Waheed M, Butt MS, Shehzad A, Adzahan NM, Shabbir MA, Suleria HAR, Aadil RM: Eggshell calcium: A cheap alternative to expensive supplements. *Trends in Food Science & Technology* 91:219-230, 2019.
- Walton HV, Cotterill OJ, Vandepopuliere JM: Composition of Shell Waste from Egg Breaking Plants. *Poultry Science* 52:1836-1841, 1973.
- Wan Ngah WS, Hanafiah MAKM: Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: A review. *Bioresource Technology* 99:3935–3948, 2008.
- Zajec M: Izolacija proteina i membrana ljuske jaja. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2020.
- Zdarta J, Meyer A, Jesionowski T, Pinelo M: A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts* 8:92, 2018.