

# Oksidacija katehola lakazom iz *Trametes versicolor* u šaržnom reaktoru i mikroreaktoru

---

Raguž, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*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:109:173008>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-05**

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

Željka Raguž

**OKSIDACIJA KATEHOLA LAKAZOM IZ *TRAMETES VERSICOLOR* U  
ŠARŽNOM REAKTORU I MIKROREAKTORU**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, veljača, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj  
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska

**Diplomski sveučilišni studij Procesno inženjerstvo****Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija**Nastavni predmet:** Kemijski i biokemijski reaktori**Tema rada** je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2022./2023. održanoj 17. srpnja 2023.**Mentor:** prof. dr. sc. *Marina Tišma***Pomoć pri izradi:** *Anđela Matić, mag. ing. proc.***Oksidacija katehola lakazom iz *Trametes versicolor* u šaržnom reaktoru i mikroreaktoru***Željka Raguž, 0113145355***Sažetak:**

Katehol je jednostavan fenol koji se prirodno u okolišu pronalazi u tragovima, a sve češću primjenu nalazi u raznim industrijama. Ukoliko se višak katehola pravilno ne zbrine, zaostaje u industrijskim otpadnim vodama i svojim nakupljanjem predstavlja potencijalnu opasnost za okoliš i ljudsko zdravlje. U bioprocima kataliziranim lakazom, može se koristiti kao supstrat za proizvodnju polimera. Lakaze su enzimi koje imaju sposobnost katalize oksidacije fenolnih spojeva. U ovom radu istraživana je oksidacija katehola katalizirana komercijalnom lakazom i vlastito proizvedenom lakazom u različitim vrstama reaktora. U svrhu proizvodnje lakaze proveden je uzgoj *Trametes versicolor* na pivskom tropu, metodom fermentacije na čvrstim nosačima. Istražena je kinetika oksidacije katehola katalizirana lakazom te su procijenjeni kinetički parametri (Michaelisova konstanta  $K_m$  i maksimalna reakcijska brzina  $V_m$ ). Oksidacije katehola komercijalnom lakazom i sirovim ekstraktom lakaze provedene su u kotlastom reaktoru i kotlastom reaktoru s prihranjivanjem (3 ciklusa). Oksidacija katehola u mikroreaktoru Y-oblika provedena je samo s komercijalnom lakazom.

**Ključne riječi:** katehol, lakaza, kotlasti reaktor, kotlasti reaktor s prihranjivanjem, mikroreaktor**Rad sadrži:** 60 stranica  
38 slika  
2 tablica  
63 literaturnih referenci**Jezik izvornika:** hrvatski**Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. prof. dr. sc. <i>Mirela Planinić</i>           | predsjednik   |
| 2. prof. dr. sc. <i>Marina Tišma</i>              | član-mentor   |
| 3. prof. dr. sc. <i>Ana Bucić-Kojić</i>           | član          |
| 4. izv. prof. dr. sc. <i>Kristina Mastanjević</i> | zamjena člana |

**Datum obrane:** 16. veljače 2024.

**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 Process engineering**  
**Subdepartment of Energy, Environment and Sustainable Development**  
Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia

### Graduate program Food engineering

**Scientific area:** Biotechnical sciences

**Scientific field:** Food technology

**Course title:** Chemical and biochemical reactors

**Thesis subject** was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X. held on July 17, 2023.

**Mentor:** *Marina Tišma*, PhD, prof.

**Technical assistance:** *Anđela Matić*, mag. ing. proc.

### Oxidation of catechol by laccase from *Trametes versicolor* in a batch reactor and microreactor

*Željka Raguž*, 0113145355

#### Summary:

Catechol is a simple phenol naturally found in trace amounts in the environment and is increasingly utilized in various industries. If excess catechol is not properly managed, it remains in industrial wastewater, posing a potential threat to the environment and human health through accumulation. In laccase-catalysed bioprocesses, it can be used as a substrate for polymer production. Laccases are enzymes capable of catalysing the oxidation of phenolic compounds. This study investigates the oxidation of catechol catalyzed by commercial laccase and crude laccase extract in different types of reactors. For laccase production, *Trametes versicolor* was cultivated on spent brewery grain using solid-state fermentation. The kinetics of catechol oxidation catalyzed by laccase were explored, and the kinetic parameters (Michaelis constant  $K_m$  and maximum reaction rate  $V_m$ ) were estimated. Catechol oxidations using commercial laccase and crude laccase extract were conducted in a batch stirred tank reactor and a fed-batch stirred tank reactor (3 cycles). Catechol oxidation in a Y-shaped microreactor was carried out only with commercial laccase.

**Key words:** catechol, laccase, batch reactor, fed-batch reactor, microreactor

**Thesis contains:** 60 pages  
38 figures  
2 tables  
63 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |  |             |
|--|-------------|
| 1. <i>Mirela Planinić</i> , PhD, prof.           | chairperson |
| 2. <i>Marina Tišma</i> , PhD, prof.              | supervisor  |
| 3. <i>Ana Bucić-Kojić</i> , PhD, prof.           | member      |
| 4. <i>Kristina Mastanjević</i> , associate prof. | stand-in    |

**Defense date:** February 16, 2024

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

Ovaj je rad sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IPS-2023-02-6614.



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>4</b>
<b>2.1. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA</b> .....	<b>5</b>
2.1.1. <i>Trametes versicolor</i> .....	5
<b>2.2. LAKAZA</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3. FENOLNI SPOJEVI</b> .....	<b>11</b>
2.3.1. Katehol.....	12
2.3.2. Oksidacija fenolnih spojeva lakazom .....	13
<b>2.4. KINETIKA ENZIMSKE REAKCIJE</b> .....	<b>14</b>
<b>2.5. TIPOVI REAKTORA</b> .....	<b>19</b>
2.5.1. Kotlasti reaktor .....	19
2.5.2. Kotlasti reaktor s prihranjivanjem .....	21
2.5.3. Mikroreaktori.....	22
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2. KEMIKALIJE</b> .....	<b>27</b>
3.2.1. Priprema otopina.....	27
<b>3.3. METODE</b> .....	<b>28</b>
3.3.1. Proizvodnja lakaze .....	28
3.3.2. Istraživanje kinetike oksidacije katehola katalizirane lakazom iz <i>Trametes versicolor</i> metodom početnih brzina .....	28
3.3.3. Istraživanje ovisnosti aktivnosti enzima o pH i temperaturi.....	30
3.3.4. Određivanje koncentracije katehola .....	31
3.3.5. Oksidacija katehola katalizirana lakazom iz <i>Trametes versicolor</i> u kotlastom reaktoru .....	32
3.3.6. Oksidacija katehola katalizirana lakazom iz <i>Trametes versicolor</i> u kotlastom reaktoru s prihranjivanjem.....	33
3.3.7. Oksidacija katehola katalizirana lakazom iz <i>Trametes versicolor</i> u mikroreaktoru .....	33
3.3.8. Izolacija produkta .....	34
3.3.9. Aparatura.....	34
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1. PRELIMINARNA ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2. REZULTATI ISTRAŽIVANJA KINETIKE OKSIDACIJE KATEHOLA KATALIZIRANE LAKAZOM METODOM POČETNIH BRZINA</b> .....	<b>42</b>
<b>4.3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA UTJECAJA PH VRIJEDNOSTI I TEMPERATURE NA AKTIVNOST ENZIMA</b> .....	<b>43</b>
<b>4.4. REZULTATI OKSIDACIJE KATEHOLA KATALIZIRANE LAKAZOM U KOTLASTOM REAKTORU</b> .....	<b>44</b>
<b>4.5. REZULTATI OKSIDACIJE KATEHOLA KATALIZIRANE LAKAZOM KOTLASTOM REAKTORU S PRIHRANJIVANJEM</b> .....	<b>46</b>
<b>4.6. REZULTATI OKSIDACIJE KATEHOLA KATALIZIRANE LAKAZOM U MIKROREAKTORU</b> .....	<b>49</b>
<b>4.7. PRODUKT OKSIDACIJE KATEHOLA LAKAZOM</b> .....	<b>50</b>
<b>5. ZAKLJUČCI</b> .....	<b>53</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>55</b>

## Popis oznaka, kratica i simbola

### OZNAKE:

$A$	apsorbancija [-]
$c$	množinska koncentracija tvari [ $M = \text{mol dm}^{-3}$ ]
$d$	promjer kivete [cm]
$k$	konstanta brzine reakcije
$K_m$	Michaelisova konstanta [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]
$n$	broj okretaja [ $\text{o min}^{-1}$ ]
$r$	brzina reakcije [ $\text{U cm}^{-3}$ ]
$t$	vrijeme [min, h]
$T$	temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]
$v/q$	volumni protok [ $\mu\text{L min}^{-1}$ ]
$V_r$	reakcijski volumen [ $\text{cm}^3$ ]
$V_E$	volumen uzorka koji sadrži enzim [ $\text{cm}^3$ ]
$V_m$	maksimalna brzina reakcije [ $\text{U mg}^{-1}$ ]
$X$	konverzija [%]
$\gamma_E$	masena koncentracija enzima [ $\text{mg cm}^{-3}$ ]
$\tau$	vrijeme zadržavanja [s]
$dA/dt$	promjena apsorbancije u vremenu, nagib pravca [ $\text{min}^{-1}$ ]
$\varepsilon$	ekstinkcijski koeficijent [ $\text{dm}^3 \text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]
$U$	međunarodna jedinica enzimске aktivnosti [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]

**KRATICE:**

ABTS	2,2' - azino - bis - (3 - etilbenzotiazolin - 6 - sulfonska kiselina)
BTEX	benzen, toluen, etilbenzen i ksilen
E	enzim
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
ES	enzim-supstrat kompleks
HAA	3 - hidroksiantranilat
HBT	1 - hidroksibenzotriazol
LiP	lignin-peroksidaza
MnP	mangan-peroksidaza
PSK	polisaharopeptid krestin
PSP	polisaharid peptid
S	supstrat
SmF	<i>Submerged fermentation</i>
SSF	<i>Solid state fermentation</i>
UHPLC	<i>Ultra-High-Performance Liquid Chromatography</i>
V.A.	volumna aktivnost enzima [U cm <sup>-3</sup> ]



## **1. UVOD**

Enzimski procesi postaju sveprisutnija alternativa u mnogim industrijskim sektorima, zamjenjujući kemijske procese koji imaju značajan negativan utjecaj na okoliš. Primjena enzima donosi jednostavne, ekonomične i ekološki prihvatljive metode proizvodnje, odražavajući suvremeni trend prema "čišćim" tehnologijama i materijalima (Jurinjak Tušek, 2013).

Industrijski bioprocesi koji uključuju filamentozne mikroorganizme obuhvaćaju proizvodnju velikog broja biotehnoških produkata, kako u pogledu količine tako i raznolikosti metabolita. Gljive bijelog truljenja, poput *Trametes versicolor*, sintetiziraju smjesu izvanstaničnih lignolitičkih enzima koji se mogu primjenjivati u prehrambenoj industriji, industriji pulpe i papira, te u mnogim drugim industrijskim sektorima. Ovi enzimi učinkovito razgrađuju lignin i druge aromatske spojeve, doprinoseći transformaciji kompleksnih prirodnih polimera, poput lignina, u spojeve manje molekularne mase (Šelo, 2014).

Lakaze su među najstarijim poznatim biokatalizatorima, a dosad su izolirane iz različitih izvora, uključujući više biljke, gljive, prokariote i insekte. Lakaze kataliziraju oksidaciju različitih organskih spojeva, poput *o*- i *p*-difenola, aminofenola, poliamina, anilina, polifenola i metoksifenola uz prisutnost kisika, što ih čini ekološki prihvatljivim. Primjena lakaza proteže se na razne industrije, uključujući tekstilnu, industriju pulpe i papira, proizvodnju etanola iz obnovljivih izvora, razgradnju herbicida, oksidaciju alkena, te prehrambenu, kozmetičku i farmaceutsku industriju (Bregović, 2011).

Fenolni spojevi, koji se nalaze u otpadnim procesnim strujama brojnih industrija, predstavljaju značajan ekološki izazov, ali ohrabrujuća činjenica jest da mnoge bakterije i gljive posjeduju sposobnost razgradnje fenolnih spojeva, koristeći ih kao izvor ugljika.

Katehol, kao jednostavan fenolni spoj s jednim aromatskim prstenom i dvije hidroksilne skupine, uvelike se koristi u tekstilnoj i farmaceutskoj industriji, te ima primjenu u razvoju fotografija i bojanju krzna. Često dospijeva u okoliš u povišenim koncentracijama, što može predstavljati opasnost za ljudsko zdravlje (Đukić, 2012).

Industrijski važni produkti koji se proizvode enzimski kataliziranim procesima tradicionalno su šaržni, no suvremeni pristupi sve više potiču upotrebu kontinuiranih procesa u mikroreaktorima. Ključna prednost mikroreaktora leži u mogućnosti postizanja većih brzina reakcija te u primjeni iznimno malih količina kemikalija tijekom procesa. Ovo ne samo da

doprinosi smanjenju ukupnih troškova, već također rezultira smanjenjem otpadnih struja procesa.

Cilj ovog istraživanja bio je provesti oksidaciju katehola kataliziranu lakazom iz *Trametes versicolor*, u šaržnim uvjetima i repetitivnim šaržnim uvjetima te u mikroreaktoru, u kontinuiranom procesu.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. GLJIVE BIJELOG TRULJENJA

Gljive bijelog truljenja igraju ključnu ulogu u razgradnji organske tvari i recikliranju hranjivih sastojaka u ekosustavu, a osobito je značajna njihova sposobnost razgradnje i/ili modifikacije lignoceluloznih materijala. Ove gljive pripadaju razredu *Basidiomycota* i često se povezuju s procesom bijelog truljenja na deblima drveća. Mreža hifa gljiva bijelog truljenja proteže se kroz supstrat na kojem gljive rastu što omogućava apsorpciju hranjivih tvari. Tijekom rasta, ove gljive izlučuju kompleksan sustav izvanstaničnih lignoceluloznih enzima koji kataliziraju razne reakcije u procesima razgradnje i modifikacije lignoceluloznih materijala (Alvarado i sur., 2003).

Glavne komponente lignoceluloznog materijala su lignin, celuloza i hemiceluloza. Tijekom rasta na lignoceluloznim materijalima, gljive bijelog truljenja sintetiziraju izvanstanične lignolitičke enzime pri čemu dolazi do razgradnje navedenih lignoceluloznih komponenata. Najpoznatiji lignolitički enzimi su lignin-peroksidaze (LiP), mangan-peroksidaze (MnP) i lakaze (Wong, 2009).

Gljive bijelog truljenja posjeduju svojstva koja ih čine prilagodljivima različitim uvjetima okoline, uključujući širok temperaturni interval i raspon pH vrijednosti te otpornost na prisutnost različitih toksičnih spojeva. Iz navedenog razloga, brojna znanstvena istraživanja usmjerena su na razumijevanje mehanizama djelovanja ovih gljiva uključujući morfologiju, rast, proizvodnju enzima, te mogućnosti njihove primjene u okolišnoj i industrijskoj biotehnologiji (Singh & Chen, 2008).

### 2.1.1. *Trametes versicolor*

*Trametes versicolor* (Slika 1) predstavlja industrijski značajan mikroorganizam. Pripada razredu *Basidiomycota* i ima iznimnu sposobnost razgradnje različitih supstanci, uključujući lignocelulozne komponente, aromatske ugljikovodike, poliklorirane bifenile i sintetske boje zahvaljujući sintezi kompleksnog enzimatskog koktela lignolitičkih i hidrolitičkih enzima (Webster & Weber, 2007). Osim toga, *T. versicolor* igra ključnu ulogu u medicinskim istraživanjima, primjerice u proizvodnji polisaharopeptida krestina (PSK) i polisaharopeptida (PSP) (Blagodatski i sur., 2018).

U prirodi, ova gljiva naseljava različite vrste drveća, uključujući hrast i četinjače, pri čemu uzrokuje „bijelu trulež“ zbog razgradnje lignina, ostavljajući celulozu netaknutu. Njezina prisutnost vidljiva je tijekom cijele godine (Janjušević i sur., 2017). Ova sposobnost razgradnje lignoceluloznog materijala čini je značajnom za industriju papira gdje se koristi za delignifikaciju i izbjeljivanje pulpe, eliminirajući potrebu za kemikalijama štetnim za okoliš poput natrijevog hipoklorita, kalcijevog hipoklorita i kloramina -T (Young i Masod, 1998).

*T. versicolor* se može uzgajati i u laboratorijskim uvjetima primjenom različitih tehnika poput submerznog uzgoja (SmF) ili uzgoja na čvrstim nosačima (SSF). Submerzni uzgoj je uzgoj mikroorganizama u tekućem mediju bogatom hranjivim tvarima i često se koristi za proizvodnju enzima. Uzgoj na čvrstim supstratima često uključuje lignocelulozne materijale i rezultira modificiranim lignoceluloznim materijalom koji se može iskoristiti u proizvodnji enzima, biogoriva ili kao stočna hrana (Cui i Chisti, 2003). Unatoč prednostima postoji niz izazova u uzgoju *T. versicolor* uključujući regulaciju parametara kao što su temperatura, pH, koncentracija inokuluma i dostupnost kisika u bioreaktorima. Uzgoj na čvrstim supstratima može biti posebno izazovan zbog heterogenosti sustava i potrebe za optimalnim omjerom ugljika i dušika (Lizardi-Jimenez MA i Hernandez, 2017).

Unatoč tim izazovima, *T. versicolor* ostaje iznimno važna gljiva u istraživanjima i primjenama u biotehnološkoj industriji. Njezina sposobnost razgradnje štetnih tvari i proizvodnja korisnih enzima i spojeva pridonosi razvoju ekološki prihvatljivih tehnologija i očuvanju okoliša.



Slika 1 Gljiva bijelog truljenja *Trametes versicolor*

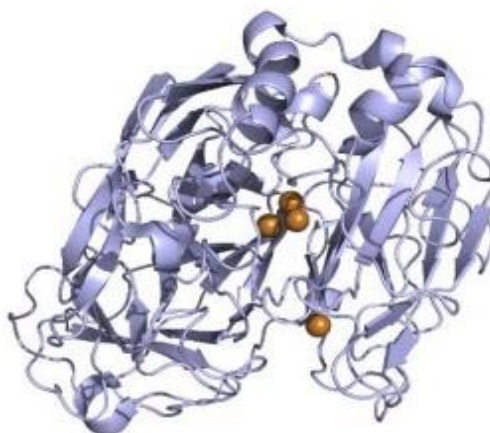
(<https://www.tonicherbsamsterdam.com/product/trametes-versicolor-coriolus-versicolor/>)

## 2.2. LAKAZA

Lakaze (EC 1.10.3.2., benzendiol:kisik oksidoreduktaze) su enzimi koji postaju predmet istraživanja krajem 19. stoljeća. Prvotno su identificirane u mliječnom soku japanskog lak drveta *Rhus verniciflua*, a kasnije su otkrivene i u gljivama. Iako su dugo bile poznate, značaj im je porastao tek nakon istraživanja enzimske razgradnje drveta pomoću gljiva bijelog truljenja (Baldrian, 2006).

Lakaze (**Slika 2**) pripadaju skupini oksidoreduktaza, a ističu se kao metaloenzimi s aktivnim mjestom koje uključuje četiri atoma bakra koje dijelimo u tri skupine:

- Tip I – paramagnetski „plavi“ bakar koji adsorbira pri valnoj duljini od 610 nm
- Tip II – paramagnetski „ne plavi“ bakar koji ne apsorbira u vidljivom dijelu spektra i
- Tip III – dijamagnetski par bakar- bakar koji apsorbira pri valnoj duljini od 330 nm



Slika 2 Pojednostavljeni strukturni prikaz lakaze izolirane iz *Trametes versicolor* (Anonymous 3, 2007)

Ove tipove karakterizira različito apsorpcijsko ponašanje, pridonoseći specifičnosti djelovanja lakaza (Claus, 2004). Lakaze su također klasificirane kao glikoproteini, pri čemu ugljikohidratna komponenta glikoproteina čini između 10% i 45% mase enzima, što doprinosi stabilnosti samog proteina. Ova komponenta uključuje različite vrste ugljikohidrata poput glukoze, fruktoze, galaktoze, arabinoze, manoze i heksozamina (Yaropolov i sur., 1994.).

U gljivama, lakaze se mogu pronaći u vrstama koje pripadaju razredima *Ascomycota*, *Duteromycota* i *Bazidiomycota* poput *Trametes versicolor*, *Trametes hirsute*, *Trametes gallica*,

*Trametes ochracea*, *Trametes villosa*, *Cerrena maxima*, *Coriolopsis polyzona*, *Phlebia radiata*, *Lentinus tigrinus*. Gljive, poput *Trametes versicolor* ili *Phlebia radiata*, proizvode lakaze u obliku izoenzima koji formiraju polimerne komplekse (Dwivedi i sur., 2011). Kod biljaka lakaze su detektirane u drveću, repi, kupusu, krumpiru, šparogama, jabukama, kruškama, breskvama, mangu, ananasu i drugim voćnim i povrtnim vrstama (Madhavia i Lele, 2009). Osim ovih izvora, lakaze su identificirane i u bakterijama i kukcima. Prva otkrivena bakterijska lakaza potječe iz bakterije *Azospirillum lipoferum* (Givaudan i sur., 1993), koja obitava u korijenju biljaka. Daljnja istraživanja potvrđuju prisutnost lakaze i njezinu aktivnost u raznim bakterijama, uključujući *Bacillus subtilis*, *Streptomyces lavendulae*, *Streptomyces cyaneus*, *Marinomonas mediterranea* (Sharma i sur., 2007). Dokazano je da su lakaze dobivene iz bakterija stabilnije i aktivnije na višim temperaturama, pri povišenim pH-vrijednostima, te u uvjetima visokih koncentracija kloridnih iona u odnosu na lakaze porijeklom iz gljiva (Held i sur., 2005; Rosconi i sur., 2005; McMahnnon i sur., 2007).

Mnogi enzimi pokazuju svojstvo specifičnosti prema određenom supstratu, dok lakaze pokazuju aktivnost prema širokom spektru različitih supstrata. Koristeći kisik, lakaze kataliziraju reakciju oksidacije *o*- i *p*-difenola, aminofenola, polifenola, poliamina, lignina, određenih anorganskih iona, aromatskih amina te različitih nefenolnih supstrata (Rodriguez Couto i Toca Herrera, 2006). Za katalitičku oksidaciju nefenolnih jedinica, lakaza koristi medijatore poput 1 - hidroksibenzotriazol (HBT), 3 - hidroksiantranilat (HAA) i 2,2' - azino - bis - (3 - etilbenzotiazolin - 6 - sulfonska kiselina) (ABTS) i dr. (Tišma, 2008). U prirodi se pojavljuju medijatori koji omogućuju lakazi samostalnu oksidaciju nefenolnih podjedinica lignina, bez prisustva mangan peroksidaze (MnP) i lignin peroksidaze (LiP). Lakaze kataliziraju oksidaciju supstrata koji imaju nizak redoks potencijal bez potrebe dodataka medijatora, dok se upotrebom određenog medijatora (prirodnog ili sintetskog) stvara kompleks lakaza-medijator koji omogućuje oksidaciju komponenata s višim redoks potencijalom od onog kojeg lakaza posjeduje (**Slika 3**) (Kunamneni i sur., 2008). Prvi sintetski spoj koji je identificiran kao učinkovit medijator u oksidacijskim procesima lakaza bio je 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) (Dwivedi i sur., 2011).





Slika 3 Shematski prikaz redoks ciklusa oksidacije lakazom (A) bez i (B) uz medijator (Jurinjak Tušek, 2013)

Biotehnološki potencijal lakaza prvi put je iskorišten u drevnoj Kini, gdje je smola *Rhus verniciflua*, bogata lakazom, korištena za proizvodnju lakova, predstavljajući prvi primjer korištenja enzima kao biokatalizatora za proizvodnju plastičnih polimera. U proizvodnji papira, lakaze se koriste u nekoliko različitih faza procesa: degradacija lignina, regulacija viskoznosti smjese, uklanjanje tinte prilikom recikliranja starog papira, detoksikacija mlinova za pulpu i papir, poboljšanje svojstava vlakana papira te izbjeljivanje (Jurinjak Tušek, 2013). Značajno je napomenuti da se primjena lakaza u izbjeljivanju pulpe smatra ekološki prihvatljivijom u usporedbi s tradicionalnim postupcima izbjeljivanja pomoću kemikalija na bazi klora pri visokim temperaturama. Lakaze se primjenjuju i u tekstilnoj industriji u kojoj bojila, otporna na izbjeljivanje, zbog svoje kemijske strukture predstavljaju ozbiljan problem u obradi otpadnih voda. Primjena enzima ima prednost u odnosu na kemijske metode razgradnje bojila zbog smanjenja negativnih utjecaja na okoliš (Asgher i sur., 2012, Hsu i sur., 2012). Također se primjenjuju u postupcima izbjeljivanja tekstila te sudjeluju u sintezi novih, ekološki prihvatljivijih boja. Korištenje lakaza može poboljšati održivost postupaka bojenja, smanjiti ekološki utjecaj boja te podržati ekološki odgovorne prakse u tekstilnoj industriji (Jurinjak Tušek, 2013). U kozmetičkoj industriji, lakaze se koriste u svrhu poboljšanja izbjeljivanja zubi kao sastavni dio paste za zube. Također, mogu biti sastavni dio boje za kosu kako bi se spriječila ili smanjila iritacija tjemena. Ovakve boje često su prihvatljivije u odnosu na klasične boje koje sadrže vodikov peroksid kao oksidirajuće sredstvo. Ova primjena lakaza doprinosi razvoju kozmetičkih proizvoda koji su učinkoviti i istovremeno manje agresivni prema korisnicima i

okolišu (Desai i Nityanand, 2011). U prehrambenoj industriji, lakaze se koriste s ciljem produljenja roka trajanja hrane i poboljšanja kvalitete, sprječavajući nepoželjne promjene poput gubitka boje, mutnoće, promjene okusa i mirisa hrane i pića (Tišma, 2008). Važno je napomenuti da se lakaze koriste i u organskim sintezama jer mogu izvoditi vrlo precizne transformacije, uključujući oksidaciju funkcionalnih grupa, te višemolekulskim sintezama za dobivanje novih derivata antibiotika (Kunamneni i sur., 2008). U **Tablici 1** dani su primjeri različitih upotreba lakaze porijeklom iz različitih mikroorganizama i vidljivo je da je najveći broj istraživanja napravljen s lakazom iz *Trametes versicolor*. U posljednje vrijeme, povećan je interes istraživača za primjenu nanotehnologije u biotehnologiji. Kroz imobilizaciju lakaza na površinu nanočestica, stvaraju se inovativni biosenzorski sustavi s integriranim biološkim dijelom, sposobni za pretvaranje biokemijskih signala u odgovarajuće električne odgovore (Rawal i sur., 2011).

Tablica 1 Industrijska primjena lakaze dobivene iz različitih izvora

PRIMJENA	IZVOR LAKAZE	LITERATURA
Dehalogenizacija <i>p</i> - klorofenola	<i>Trametes versicolor</i>	Maruyama i sur., 2003
Uklanjanje fenola s namjerom stabilizacije vina	<i>Trametes versicolor</i>	Minussi i sur., 2007
Oksidacija atracena lakazom imobiliziranom na nanočestice	<i>Trametes versicolor</i>	Hu i sur., 2009
Biosenzor za mjerenje polifenolnog indeksa vina	<i>Trametes versicolor</i>	Di Fusco i sur., 2010
Bioremedijacija atrazina	<i>Trametes versicolor</i>	Bastos i Magan, 2009
Razgradnja benzena, toluena, etilbenzena i ksilena (BTEX)	<i>Trametes versicolor</i>	Aranda i sur., 2010
Biosenzor za otkrivanje komercijalnih reaktivnih boja	<i>Trametes versicolor</i>	Munteanu i Cavaco-Paulo, 2010
Biološko izbjeljivanje eukaliptusne craft pulpe	<i>Streptomyces cyaneus</i> <i>CECT 3335</i> , <i>Pseudomonas stutzeri</i>	Sharma i sur., 2007
Kataliza razgradnje boje	<i>Bacillus subtilis</i>	Wang i sur., 2011
Kataliza razgradnje sintetičkih boja	<i>Coriolopsis gallica</i>	Daâssi i sur., 2014
Uklanjanje farmaceutika iz aktivnog mulja nakon obrade vode	<i>Trametes versicolor</i>	Rodríguez- Rodríguez i sur., 2012

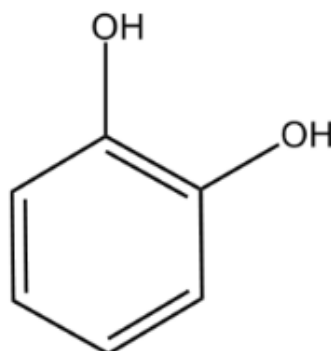
### 2.3. FENOLNI SPOJEVI

Fenolni spojevi, često nazivani fenoli, predstavljaju grupu aromatskih organskih spojeva koji su sastavljeni od aromatskog ugljikovodičnog prstena na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Ovi spojevi se mogu podijeliti na netopljive komponente poput kondenziranih lignina, tanina i hidroksicinamične kiseline vezane za stanične membrane, te topljive kao što su fenolne kiseline, kateholi, fenilpropanoidi, flavonoidi i kinoni (Rispaill i sur., 2005). Sekundarni su biljni metaboliti prisutni u svim biljnim tkivima, a nastaju tijekom rasta i razvoja biljke ili kao odgovor na stres biljke poput infekcije, oštećenja ili UV zračenja. Fenolne tvari u biljkama imaju višestruko pozitivno djelovanje. U samim biljkama djeluju kao antioksidansi, antimikrobne tvari, te pružaju zaštitu od UV zračenja.

Međutim, fenolni spojevi su također prisutni u prirodi u raznim okolišnim sustavima, uključujući tlo, vode i industrijske otpadne tokove te igraju važnu ulogu u raznim kemijskim procesima i ekološkim interakcijama. Njihova prisutnost pri niskim koncentracijama u okolišu može predstavljati značajan ekološki i zdravstveni rizik, a pogotovo ako se akumuliraju u visokim koncentracijama (Gianfreda i sur., 2003). Fenoli se često oslobađaju u okoliš kao nusprodukti industrijskih procesa, kao što su proizvodnja plastike, boja, pesticida i farmaceutskih proizvoda gdje su sastavne građevne komponente lijekova (Tišma i sur., 2010a). Industrijski procesi takvog tipa dovode do velike proizvodnje fenolnih spojeva, što dodatno naglašava važnost praćenja njihove prisutnosti u okolišu zbog potencijalne toksičnosti. Toksičnost fenola povezana je s dva mehanizma: a) toksičnost povezana s hidrofobnošću, koja utječe na topljivost fenola u staničnim otopinama te na interakciju spoja sa stanicama i tkivima; b) toksičnost povezana s nastankom slobodnih radikala (Michalowicz i Duda, 2007a). Također, prirodni procesi razgradnje organskog materijala mogu rezultirati oslobađanjem fenola u okoliš. Unatoč ozbiljnom ekološkom problemu koji predstavljaju fenolni spojevi, ohrabrujuća činjenica je ta što mnoge bakterije i gljive posjeduju prirodnu sposobnost razgradnje ovih spojeva i koriste ih kao izvor ugljika i energije (Bregović, 2011). Prirodna sposobnost mikroorganizama za obradu fenolnih onečišćenja pruža nadu za razvoj ekološki prihvatljivih metoda uklanjanja fenolnih spojeva iz okoliša.

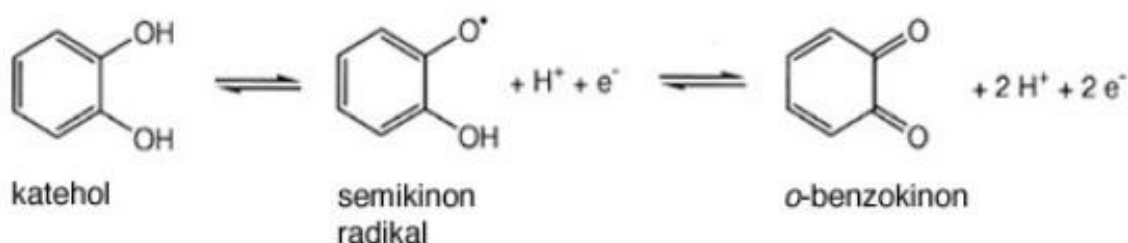
### 2.3.1. Katehol

Katehol, poznat i kao pirokatehol ili 1,2,-dihidroksibenzen, je organski spoj koji se prirodno pojavljuje u okolišu u tragovima. Katehol je jednostavan fenolni spoj sastavljen od jednog aromatskog prstena s dvije vezane hidroksilne skupine u orto položaju (**Slika 4**).



Slika 4 Kemijska struktura katehola

Prvi put ga je izolirao H. Reinsch 1839. godine tijekom destilacije katehina iz soka biljke *Mimosa catechu* (Jurinjak Tušek, 2013). Katehol se prirodno nalazi u biljkama gdje ima važnu ulogu u zaštiti biljaka od infekcija. Prilikom oštećenja biljnog tkiva, katehol se oslobodi i brzo oksidira uz pomoć enzima katehol-oksidaza stvarajući benzokinon (**Slika 5**). Taj brzi oksidacijski proces od ključne je važnosti za biljke u borbi protiv patogena, ali također može uzrokovati ubrzano posmeđivanje oštećenog voća (Schweigert i sur., 2001).

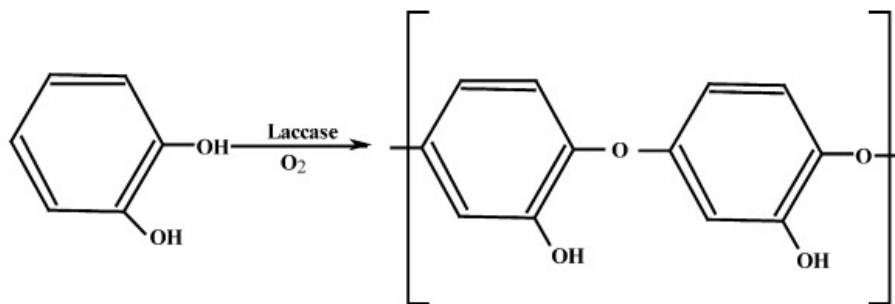


Slika 5 Produkti oksidacije katehola (Schweigert i sur., 2001)

Osim u biljkama, katehol se nalazi i u okolišu kao međuprodukt razgradnje aromatskih spojeva i lignina uslijed djelovanja mikroorganizama. Kod sisavaca se može pojaviti kao metabolit razgradnje benzena, estrogena ili kao dio endogenih spojeva poput neurotransmitera i njihovih prekursora (adrenalin, noradrenalin, dopamin i L-DOPA). Također, pomaže u biološkim procesima neurotransporta i regulacije hormona (Schweigert i sur., 2001). Važno je istaknuti da katehol, iako ima korisne prirodne uloge, također može biti opasan za okoliš i ljudsko zdravlje posebno kada se nalazi u povišenim koncentracijama. Katehol ima široku primjenu u različitim industrijama, a ukoliko se pravilno ne zbrine zaostane u industrijskim otpadnim vodama. Koristi se u proizvodnji insekticida, parfema, lijekova, za bojanje krzna, u proizvodnji gume i plastike, u razvijanju filmova, elektroplantiranju te u proizvodnji antioksidansa i organskoj sintezi (Tišma, 2008). Njegova toksičnost, prisutnost u industrijskim otpadnim vodama te sposobnost reakcije s teškim metalima i stvaranja netopljivih produkata čine ga potencijalno opasnim onečišćivačem. Trenutno se nalazi na listi tvari koje izazivaju značajna zagađenja u vodenom okolišu prema EPA (US Environmental Protection Agency) i EU (Europska unija), što ukazuje na potrebu za praćenjem i kontrolom njegove prisutnosti i koncentracija u vodi kako bi se smanjili potencijalno štetni utjecaji na ekosustave (Chen i sur., 2012).

### **2.3.2. Oksidacija fenolnih spojeva lakazom**

Oksidacija fenola lakazom predstavlja važan segment biokemijskih i biotehnoloških istraživanja. U samim počecima, istraživanja kinetike oksidativne polimerizacije fenolnih spojeva katalizirane lakazom nisu uključivala djelovanje kisika. Aktas i Tanyolac (2003) proveli su šaržni eksperiment kako bi odredili utjecaj koncentracije supstrata (otopljeni kisik i katehol) i temperature na brzinu polimerizacije katehola. Nakon pronalaska odgovarajućeg modela (Michaelis-Menteničin kinetički model s nekompetitivnom inhibicijom za kisik) izračunali su energiju aktivacije i procijenili kinetičke parametre oksidativne polimerizacije katehola. Na temelju strukturnih svojstava katehola i poli(katehola), određenih spektrofotometrijski pomoću FT-IR spektara, predložena je kemijska struktura poli(katehola) (**Slika 6**).



Slika 6 Predložena kemijska struktura poli(katehola) u reakciji polimerizacije katehola katalizirane lakazom (Aktas i Tanyolac, 2003)

## 2.4. KINETIKA ENZIMSKE REAKCIJE

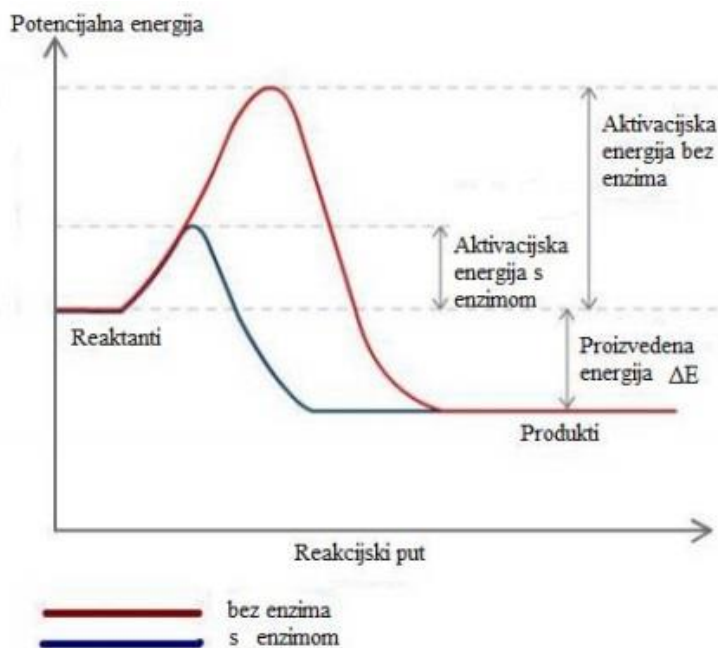
Općenito, pojam biokonverzije obuhvaća različite procese, uključujući jednostavne enzimске reakcije, kompleksne biokemijske reakcije koje se odvijaju u mikroorganizmima te njihovo razmnožavanje. S obzirom na to da enzimi proizlaze i nalaze se u svim živim stanicama, kompleksne biokemijske reakcije zapravo predstavljaju skup više enzimskih reakcija. Ovi procesi biokonverzije suočavaju se s dva ključna izazova. Prvi se odnosi na kinetiku procesa, gdje se utvrđuje stehiometrija bioprocesa i utjecaj različitih parametara poput pH-vrijednosti, temperature, produkata reakcije, supstrata, imobilizacije, itd. Drugi izazov je povezan s odabirom i projektiranjem bioreaktora. U ovom kontekstu, biraju se vrsta bioreaktora i način njegova rada, uzimajući u obzir specifične radne uvjete koje je potrebno postići. Ovaj proces obuhvaća izbor tipa bioreaktora i njegovo prilagođavanje, uzimajući u obzir razne parametre (Milivojević i sur. 2013).

Mnogi fizikalni i kemijski faktori, uključujući pH-vrijednost, temperaturu, ionsku jakost, hidrodinamičke sile, hidrostatički tlak, zračenje, površinski napon i prisutnost odgovarajućih kemijskih reagensa, značajno utječu na stabilnost enzima, dovodeći do smanjenja njihove aktivnosti zbog promjena u kemijskoj i geometrijskoj strukturi proteina. Enzimska aktivnost obično raste s povećanjem temperature, no često dolazi do degradacije enzima pri višim temperaturama, s početkom razgradnje već na temperaturama od 50 °C. Optimalne temperature za rad s enzimima nalaze se u rasponu temperatura organizma i okoline. Promjena pH-vrijednosti također ima sličan utjecaj kao promjena temperature, pa postoji optimalni raspon pH-vrijednosti u kojem je enzimska aktivnost najveća. Povećanje

koncentracije supstrata također utječe na aktivnost enzima, ovisno o vrsti enzima (Milivojević i sur., 2013). Očuvanje stabilnosti enzima ključno je svojstvo tijekom njihove primjene i kroz cijeli životni ciklus, obuhvaćajući i faze skladištenja i proizvodnje enzima. Jedna od često korištenih metoda za unaprjeđenje stabilnosti enzima i poboljšanje kontrole njihove aktivnosti jest imobilizacija na krute nosače (Arambašić, 2022).

Reakciju biokonverzije u bioreaktoru možemo izvoditi na tri osnovna načina: šaržni ("*batch*"), polušaržni ("*fed-batch*") i kontinuirani. Pravilan odabir reaktora za provedbu kemijske i/ili biokemijske reakcije ovisi o kapacitetu proizvodnje, troškovima sirovina, ekološkim zahtjevima i investicijskim troškovima, pri čemu vrsta reakcije ima ključnu ulogu. Također, detaljno poznavanje fizičkih i kemijskih svojstava reakcije, uključujući kemizam, termodinamiku i kinetiku, te razumijevanje karakteristika reaktora (fizikalna svojstva, parametre prijenosa tvari i topline) i podataka o katalizatorima i biokatalizatorima, ključno je za pravilan odabir tipa reaktora (Milivojević i sur. 2013).

Da bi se odvijala reakcija, supstrat mora posjedovati dovoljnu energiju za prijelaz preko energetske barijere potrebne za formiranje produkta. Drugim riječima, supstrat se mora aktivirati do određene razine energetskeg potencijala. Enzimski kataliziranu reakciju karakterizira snižena energija aktivacije, odnosno smanjenje energetske barijere. To se postiže stvaranjem enzim-supstrat kompleksa na višoj energetskej razini od slobodnog supstrata (**Slika 7**) (Perešin, 2017).

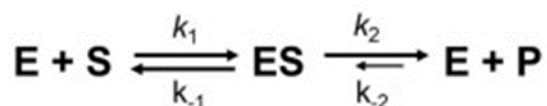


Slika 7 Grafički prikaz puta reakcije s i bez enzima (Perešin, 2017).

Kinetika enzimskih reakcija predstavlja područje istraživanja koje se bavi proučavanjem brzine i regulacije biokemijskih procesa. Omogućuje razvoj matematičkih modela za analizu aktivnosti enzima i kinetičkih modela radi planiranja i provedbe dizajna bioreaktora (Vojtkuf, 2023). Kinetički model enzimske reakcije predstavlja matematički izraz koji opisuje povezanost između brzine enzimske reakcije, reakcijskih veličina stanja te parametara. Razvoj enzimskog kinetičkog modela uključuje sljedeće korake: eksperimentalno mjerenje početne brzine enzimske reakcije pri različitim koncentracijama supstrata, matematičko analiziranje dobivenih rezultata ili formuliranje izraza koji opisuje brzinu reakcije, procjenu parametara, matematičko izračunavanje ukupne brzine reakcije, eksperimentalnu potvrdu razvijenog modela, integraciju s konfiguracijom reaktora zbog pronalaska veze između brzine reakcije i koncentracije reaktanata te izračunavanje i potvrđivanje parametara na temelju razvijenog modela procesa (Dropulja, 2010).

Osnovni model koji se često koristi za matematičko opisivanje enzimskih reakcija jest Michaelis-Menteničin model za jednosupstratnu reakciju, do čije se jednadžbe može doći temeljem mehanizma prikazanog na **Slici 8**.





Slika 8 Mehanizam jednosupstratne enzimске reakcije

Model se pretpostavlja na temelju rezultata mjerenja početne brzine enzimске reakcije u uvjetima kada se povratna reakcija može zanemariti. Pri takvim uvjetima početna brzina nastajanja produkta proporcionalna je koncentraciji kompleksa enzim-supstrat kako je prikazano na sljedećoj jednadžbi (1):

$$v_0 = k_2[ES] \quad (1)$$

U stacionarnom stanju koncentracija [ES] je stalna što znači da kompleks enzim-supstrat nastaje istom brzinom kojom se i razgrađuje što se može prikazati sljedećom jednadžbom (2):

$$k_2 \cdot [E] \cdot [S] = k_{-1} \cdot [ES] + k_2 \cdot [ES] \quad (2)$$

Preuređivanjem gornje jednadžbe, tri konstante brzine reakcije,  $k_1$ ,  $k_{-1}$  i  $k_2$  mogu se izraziti konstantom koja se naziva Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) (3):

$$[E] = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot \frac{1}{[S]} \cdot [ES]$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (3)$$

Kada se prethodna jednadžba uvrsti u izraz za ukupnu količinu enzima dobije se sljedeća jednadžba (4):

$$[E_0] = K_m \cdot \frac{1}{[S]} \cdot [ES] + [ES] \quad (4)$$

Izražavanjem koncentracije enzim-supstrat kompleksa i uvrštavanjem prethodne jednadžbe u izraz za početnu brzinu enzimске reakcije dobije se sljedeća jednadžba (5):

$$v = \frac{k_2 \cdot [E_0] \cdot [S]}{[S] + K_m} \quad (5)$$

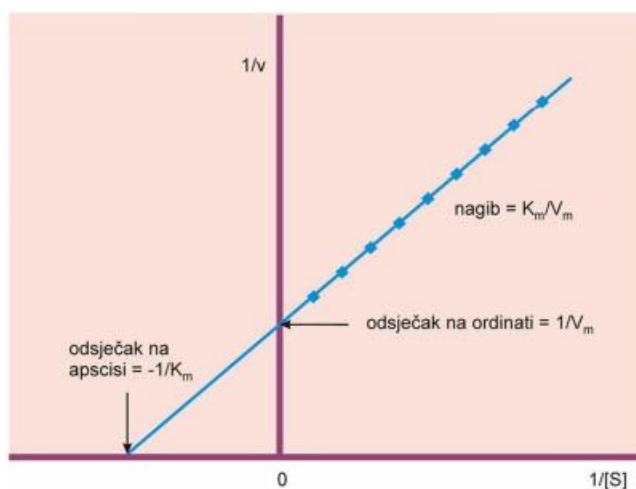
Umnožak konstante brzine reakcije  $k_2$  i ukupne koncentracije enzima  $[E_0]$  predstavlja maksimalnu brzinu enzimske reakcije  $V_m$ . Uvrštavanjem tog izraza u jednadžbu brzine reakcije dobiva se Michaelis-Menteničina jednadžba (6):

$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

Krivulja koja ilustrira Michaelis-Menteničinu jednadžbu ima oblik hiperbole, i u mnogim enzimski kataliziranim reakcijama ovisnost brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata prati oblik hiperbole. Zbog nemogućnosti preciznog očitavanja kinetičkih parametara iz hiperbole, provodi se linearizacija jednadžbe 6 Lineweaver-Burk metodom (Slika 9) te se dobije linearna ovisnost recipročne vrijednosti brzine enzimske reakcije o recipročnoj vrijednosti koncentracije supstrata (7):

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \quad (7)$$

Iz odsječka na ordinati (y-os) očitava se recipročna vrijednost maksimalne brzine ( $1/V_m$ ), dok se iz nagiba pravca može iščitati omjer Michaelisove konstante i maksimalne brzine enzimske reakcije ( $K_m/V_m$ ).



Slika 9 Lineweaver-Burk dijagram (Strelec, 2013)

Korištenjem matematičkog modela procesa koji uključuje model i bilancu tvari, moguće je predvidjeti tijek reakcije, potrebnu koncentraciju biokatalizatora, optimalan tip reaktora i sl. (Tišma, 2008).

## 2.5. TIPOVI REAKTORA

### 2.5.1. Kotlasti reaktor

Kotlasti reaktor, važan alat u području biotehnologije, kemijskog inženjeringa i industrijskih procesa, predstavlja uređaj za provođenje različitih kemijskih i biokemijskih reakcija (**Slika 10**). Obično je konstruiran kao zatvoreni sustav, često u obliku kotla, koji sadrži miješalicu, otvore za unos i izlaz reakcijske smjese, te plašt za razmjenu topline, hlađenje ili zagrijavanje (Dropulja, 2010). Karakteristike kotlastog reaktora uključuju odsustvo izmjene tvari s okolinom tijekom reakcije, što znači da sve što se stvori tokom reakcije ostaje unutar reaktora. Sastav reakcijske smjese ostaje konstantan u svakom trenutku, a reaktorski prostor karakterizira homogenost ostvarena približno idealnim miješanjem. Ova karakteristika vrijedi i za heterogene sustave ako se pojedini volumeni smatraju dovoljno malima. Stoga je moguće postaviti bilance za cijeli reaktor, umjesto ograničavanja na diferencijalne volumene. U kotlastom reaktoru, sve veličine stanja su funkcije vremena. To znači da sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije i količina utrošene/oslobođene topline uslijed reakcije variraju s vremenom. Model "idealnog" kotlastog reaktora osim pretpostavke homogenosti uključuje pretpostavku izoternog rada (temperatura se ne mijenja s vremenom) i pretpostavku da je volumen reakcijske smjese konstantan i neovisan o vremenu, odnosno, nema promjene gustoće (Gomzi, 1998). Na temelju pretpostavki idealnog miješanja u reaktoru, nezavisnosti veličina stanja o vremenu i nepromjenjivosti volumena reakcijske smjese postavlja se matematički model procesa koji se sastoji od bilance tvari i izraza za brzinu reakcije. Bilanca supstrata definirana je sljedećom jednadžbom (**8**):

$$(-r_s) \cdot V = -\frac{dn_s}{dt} \quad (8)$$

Integriranjem se dobiva izraz (**9**) za reakcijsko vrijeme, a koncentracije reaktanata se mijenjaju od početnih do konačnih vrijednosti:

$$t = -\frac{1}{V} \cdot \int_{n_{s0}}^{n_s} \frac{dn_s}{(-r_s)} \quad (9)$$

gdje  $t$  predstavlja reakcijsko vrijeme,  $V$  reakcijski volumen,  $n_{s_0}$  broj molova supstrata na početku reakcije,  $n_s$  broj molova supstrata na kraju reakcije, a  $r_s$  reakcijsku brzinu. Pri konstantnoj gustoći u reaktoru vrijedi da je  $c_s = \frac{n_s}{V}$ , pa iz tog proizlazi da je (10):

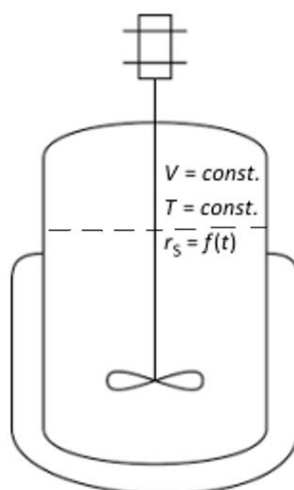
$$t = - \int_{c_{s_0}}^{c_s} \frac{dn_s}{(-r_s)} \quad (10)$$

Gdje je  $c_{s_0}$  koncentracija supstrata na početku,  $c_s$  na kraju reakcije.

U kotlastom reaktoru gdje sudjeluje samo jedan supstrat i nastajanje samo jedan produkt, uz pretpostavku da reaktanti nestaju brzinom  $r_s$  kojom produkt istovremeno nastaje, bilanca tvari opisuje se sljedećim jednadžbama (11 i 12):

$$\frac{dc_s}{dt} = -r_s \quad (11)$$

$$\frac{dc_p}{dt} = r_s \quad (12)$$



Slika 10 Shema kotlastog reaktora

Ovaj tip reaktora je prikladan za istraživanje kinetike u kapljevitoj fazi, ali nije optimalan za proučavanje kinetike u plinovitoj fazi, kao ni za reakcije koje se odvijaju pri visokim temperaturama i tlakovima (Gomzi, 1998). Može se koristiti i za provedbu reakcija u heterogenom sustavu kapljevina-kruti katalizator. U ovom slučaju, kruti katalizator suspendiran je u reakcijskoj smjesi u obliku čestica malog promjera. Šaržni procesi u kotlastim reaktorima pokazuju veću prilagodljivost promjenama reakcijskih uvjeta u usporedbi s kontinuiranim načinom vođenja reakcije. Ova fleksibilnost omogućuje jednostavnu promjenu kvalitete proizvoda i ravnomjernu raspodjelu produkata kod složenih reakcija. Jedna od značajnih primjena kotlastih reaktora je njihova česta upotreba na početku istraživanja proizvodnje određenog proizvoda. Radi ekonomske isplativosti, kotlasti se reaktori često koriste za proizvodnju manjih količina proizvoda, poput lijekova, organskih bojila i drugih kemikalija. Svojom jednostavnom izvedbom i sposobnošću prilagodbe promijenjenim uvjetima i zahtjevima, kotlasti reaktori postaju neizostavne procesne jedinice u različitim sektorima kemijske industrije (Mateša, 2021).

### 2.5.2. Kotlasti reaktor s prihranjivanjem

Kotlasti reaktor s prihranjivanjem ili dotokom supstrata (**Slika 11**) je sustav u koji se neprestano ili povremeno unosi reakcijska smjesa ili dio reakcijske smjese. S obzirom na to da ništa ne izlazi iz sustava, volumen smjese raste s vremenom, čime se ovaj reaktor stalno nalazi u nestacionarnom stanju, odnosno veličine stanja unutar reaktora ovise o vremenu. Kotlasti reaktor s prihranjivanjem se najčešće primjenjuje kada je supstrat inhibitor ili toksičan, što zahtijeva postupno dodavanje supstrata u reaktor (Vasić – Rački, 1990).

Bilanca tvari za komponentu S u takvom tipu reaktora izražena je sljedećom jednačinom (**13**):

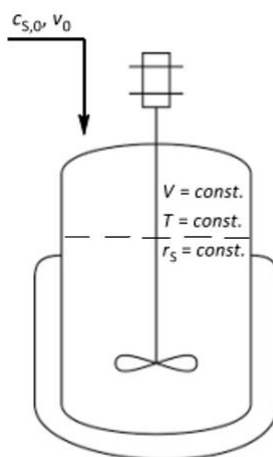
$$\frac{d(V \cdot c_S)}{dt} = c_{S,0} \cdot q + r_S \cdot V \quad (13)$$

Gdje je  $q$  volumni protok,  $c_{S,0}$  koncentracija komponente S u dotoku. Uzimajući u obzir da je promjena volumena u vremenu jednaka brzini volumnog dotoka, dobije se sljedeći matematički izraz (**14**):

$$\frac{dV}{dt} = q \quad (14)$$

Uvrstimo li taj izraz u prethodnu jednadžbu, jednadžba (15) poprima slijedeći oblik:

$$\frac{dc_S}{dt} = \frac{(c_{S,0} - c_S) \cdot q}{V} + r_S \quad (15)$$



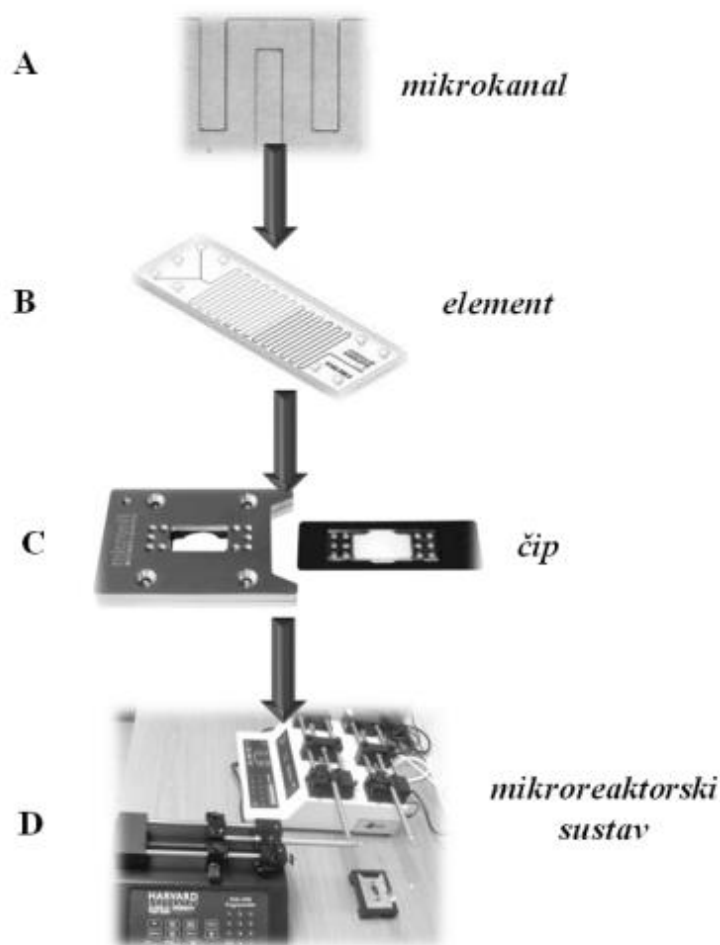
Slika 11 Shema kotlastog reaktora s prihranjivanjem

### 2.5.3. Mikroreaktori

Mikroreaktori su reaktorski sustavi projektirani u mikroskopskom mjerilu, a njihova proizvodnja u potpunosti ili djelomično koristi metode mikrotehnologije i mikroinženjeringa. Optimizacija dimenzija i posebna konstrukcija mikroreaktora donose brojne prednosti, proširujući njihovu primjenu u odnosu na konvencionalne makroskopske reaktorske sustave. Smanjenjem dimenzija mikroreaktora povećava se funkcionalnost sustava, omogućujući istovremeno odvijanje različitih fizikalno-kemijskih procesa, reakcija, separacija i analiza unutar jednog mikroreaktorskog sistema. Kao rezultat, kemijski i biokemijski procesi u mikroreaktorima znatno se razlikuju od onih u velikim reaktorskim sustavima. Minimizacija prostornih zahtjeva povećava učinkovitost, produktivnost i sigurnost procesa. Precizna regulacija procesnih uvjeta, upotreba malih količina reaktanata i katalizatora te optimalan omjer međufazne površine i volumena reaktora potiče intenzivan prijenos tvari i energije,

istovremeno smanjujući količinu otpadnih procesnih struja u usporedbi s konvencionalnim reaktorima. Mikroreaktori pružaju nove mogućnosti, posebno u područjima medicine i farmaceutike. Ipak, valja istaknuti da mikroreaktori ne mogu potpuno zamijeniti postojeće sustave, s obzirom na izazove poput mogućeg začepjenja mikrokanala pri radu s viskoznim i čvrstim tvarima (Šalić i sur.,2010). Mikroreaktori se razlikuju od makroskopskih (klasičnih/konvencionalnih) reaktora u nekoliko ključnih aspekata. U mikroreaktorima, fluidni tok obično ima laminarni karakter, što predstavlja suprotnost turbulentnom strujanju koje se često javlja u makroskopskim reaktorima. Prijenos tvari i topline u mikroreaktorima odvija se na izuzetno kratkim udaljenostima, što čini mikroreaktore iznimno prikladnima za reakcije u kojima su upravo prijenos topline i tvari ograničavajući faktori. Odlikuju se iznimno visokim omjerom površine i volumena, koji raste smanjenjem promjera reaktora. Za mikroreaktore, ovaj omjer varira u rasponu od  $10^3 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$  do  $10^5 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ , dok je za makroskopske reaktore oko  $10^2 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ . Na primjer, premještanjem procesa iz reaktora volumena  $1 \text{ dm}^3$  u reaktor volumena  $30 \text{ m}^3$  (koji nisu geometrijski slični sustavi), omjer površine i volumena smanjuje se 30 puta. Nasuprot tome, u slučaju prenošenja procesa u mikroreaktor volumena  $30 \text{ cm}^3$ , taj omjer raste 3000 puta. Također, u odnosu na makroskopske reaktore, stijenka kanala ima izrazito značajan utjecaj na strujanje fluida (Šalić i sur.,2010).

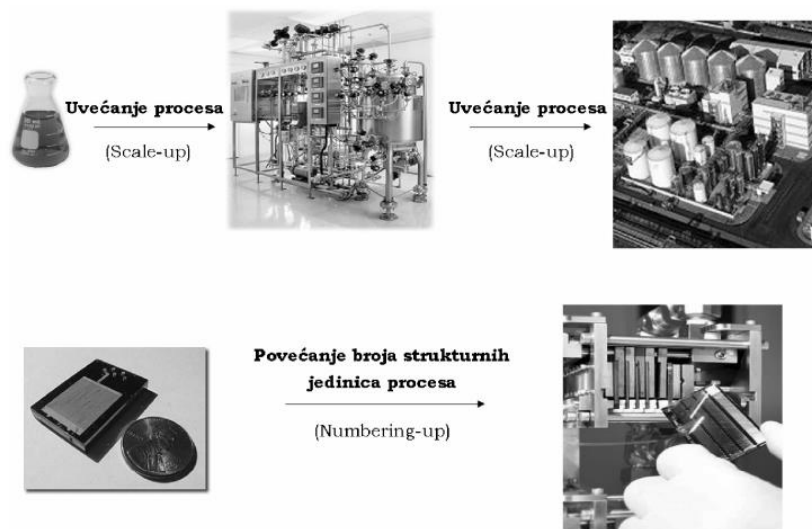
Mikrokanal predstavlja osnovnu strukturnu jedinicu mikroreaktora, te može zauzimati oblik pravokutnog ili kružnog kanala. Mikrokanali su obično raspoređeni paralelno i u nizu, opremljeni spojnicama za unos i izlaz fluida. Urezuju se u pravokutne pločice prosječne dimenzije duljina : širina : debljina = 45 mm : 15 mm : 2 mm. Ove pločice nazivaju se elementi mikroreaktora. Element mikroreaktora predstavlja ili pojedinačni protočni kanal ili skup povezanih kanala s određenom geometrijom. Kombinacijom mikroelemenata, povezanih linija toka fluida i odgovarajućeg nosača mikroelemenata, formira se mikroreaktorski čip. Mikroreaktorski čipovi samostalno ne mogu funkcionirati, stoga ih treba integrirati u kućište i povezati s različitim perifernim uređajima poput osjetila i pumpi putem odgovarajućih spojnica (**Slika 12**).



Slika 12 Strukturne jedinice mikroreaktorskog sustava: (A) mikrokanal, (B) element mikroreaktora, (C) mikroreaktorski čip, (D) čip integriran u kućište povezano s pumpom i osjetilima (Jurinjak Tušek, 2013)

U svrhu poboljšanja produktivnosti, mikroreaktorski čipovi se međusobno mogu povezivati. Paralelno ili serijsko povezivanje mikrouređaja, odnosno različitih mikroprocesnih jedinica za pripremu reaktanata, katalizatora, izvođenje reakcije i separaciju produkta, čini tzv. mikropostrojenje (**Slika 13**). Spojem mikrouređaja postiže se neprekidan protok procesa, čime se osigurava kontinuitet čak i u slučaju prestanka rada pojedinog čipa mikroreaktorskog sustava (Ehrfeld i sur., 2000).





Slika 13 Prikaz razlika u metodologiji uvećanja procesa između makroreaktora i mikroreaktora (Šalić i sur., 2010)

Mikroreaktori se klasificiraju u dvije skupine ovisno o vrsti reakcija koje se u njima odvijaju: kemijske i biokemijske. Većina mikroreaktora je konstruirana tako da zadovoljava specifične zahtjeve obiju vrsta reakcija. Za provedbu biokemijskih reakcija najčešće se koriste enzimski mikroreaktori, gdje je enzim imobiliziran na nosače ili stijenke mikrokanala. Također se koriste i za provođenje katalize reakcije slobodnim, neimobiliziranim enzimima (Šalić, 2010).

Značaj primjene mikroreaktora, posebice u području kemije i biokemije, neprestano raste zbog naglašene selektivnosti, povećanih prinosa, poboljšane kontrole procesa, pojačane sigurnosti, te bržeg i jednostavnijeg prelaska u veće mjerilo uz istovremenu fleksibilnost u proizvodnji. U enzimskim mikroreaktorima, bilo da koriste slobodne ili imobilizirane enzime, krije se značajan potencijal za primjenu u industriji (Tišma i sur., 2009).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Cilj ovog rada bio je:

- a) Provesti oksidaciju katehola kataliziranu komercijalnom lakazom iz *Trametes versicolor* i sirovim ekstraktom lakaze koji je proizveden uzgojem *Trametes versicolor* na pivskom tropu metodom fermentacije na čvrstim nosačima
- b) Istražiti kinetiku oksidacije katehola katalizirane lakazom u kiveti spektrofotometra te procijeniti kinetičke parametre reakcije (Michaelisova konstanta i maksimalna reakcijska brzina)
- c) Provesti oksidaciju katehola u kotlastom reaktoru (u šaržnim i repetitivnim šaržnim procesima) te u mikroreaktoru (u kontinuiranom procesu) pri različitim početnim koncentracijama katehola i lakaze

### 3.2. KEMIKALIJE

Katehol (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, SAD), lakaza iz *Trametes versicolor* (Sigma Aldrich, Njemačka), 99,5 % ledena octena kiselina (Macron, Njemačka), natrijev hidroksid ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) (KEFO, Slovenija), klorovodična kiselina, 37 % (Carlo Erba, Francuska), amonijev sulfat (Gram mol, Hrvatska), natrijev acetat (Gram mol, Hrvatska), ABTS (Sigma Aldrich, Kina) .

#### 3.2.1. Priprema otopina

##### 0,1 M acetatni pufer

Za pripremu  $100 \text{ cm}^3$  0,1 M acetatnog pufera, u  $80 \text{ cm}^3$  destilirane vode otopljeno je 186,093 mg natrijeva acetata i  $0,4422 \text{ cm}^3$  ledene octene kiseline, te je nadopunjeno destiliranom vodom do  $100 \text{ cm}^3$ . Dobivenoj otopini je pH korigiran na 4,5 dodatkom 1M natrijeva hidroksida.

##### 0,1 M fosfatni pufer

Za pripremu  $100 \text{ cm}^3$  0,1 M fosfatnog pufera, u  $80 \text{ cm}^3$  destilirane vode otopljeno je 0,367 g natrijevog dihidroksifosfat monohidrata i 1,191 g natrijevog hidroksifosfata, te je nadopunjeno destiliranom vodom do  $100 \text{ cm}^3$ . pH je korigiran na pH 6 dodatkom 1 M natrijeva hidroksida.

### 3,2 M amonijev sulfat

Priprema 10 cm<sup>3</sup> 3,2 M amonijevog sulfata uključuje otapanje 4,2284 g amonijeva sulfata u 10 cm<sup>3</sup> destilirane vode.

### 0,1 M citratni pufer

Za pripremu 0,1 M citratnog pufera, u 80 cm<sup>3</sup> destilirane vode otopljeno je 27,587 mg natrijeva citrat dihidrata i 0,189 g monohidrata limunske kiseline. Dobivenoj otopini je korigiran pH na 4,5 dodatkom 1 M natrijeva hidroksida.

## 3.3. METODE

### 3.3.1. Proizvodnja lakaze

Prema modificiranoj metodi Zeko-Pivač i sur. (2022), sirovi ekstrakt lakaze proizveden je biološkim tretiranjem 30 g pivskog tropa i 5 g industrijske konoplje, procesom fermentacije na čvrstim nosačima s gljivom bijelog truljenja *T. versicolor* u trajanju od 15 dana. Nakon 15 dana 2 g biološki obrađenog materijala ekstrahirano je u 10 cm<sup>3</sup> 0,1 M citratnog pufera te je proizveden sirovi ekstrakt lakaze za potrebe provedbe enzimski katalizirane reakcije oksidacije katehola, s ciljem usporedbe iste reakcije katalizirane s komercijalnim enzimom.

### 3.3.2. Istraživanje kinetike oksidacije katehola katalizirane lakazom iz *Trametes versicolor* metodom početnih brzina

#### Određivanje molarnog ekstinkcijskog koeficijenta

U svrhu izračuna molarnog ekstinkcijskog koeficijenta ( $\epsilon$ ) provedena je oksidacija katehola na sljedeći način: otopine supstrata pripremljene su otapanjem različitih koncentracija katehola (0,5 – 5 mmol dm<sup>-3</sup>) u 0,1 M citratnom puferu. Enzim lakaza je suspendirana u citratnom puferu ( $\gamma_{lakaza} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ ). Mjerenje je provedeno spektrofotometrijski na način da je u kivetu dodano 1000  $\mu\text{L}$  otopine katehola i 100  $\mu\text{L}$  suspenzije enzima. Apsorbancija je mjerena u 100. sekundi pri 395 nm. Dobivene vrijednosti apsorbancije i poznate koncentracije katehola uvrštene su u jednadžbu (16) te je izračunata srednja vrijednost ekstinkcijskog koeficijenta.

$$\varepsilon = \frac{A_{395}}{c_s \cdot d} \quad (16)$$

Gdje je:

- $\varepsilon$  - molarni ekstinkcijski koeficijent [ $0,3356 \text{ dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ]
- $A_{395}$  - apsorbancija izmjerena pri 395 nm [-]
- $c_s$  – koncentracija supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]
- $d$  – promjer kivete [1 cm]

### Određivanje brzine reakcije izražene kao volumna aktivnost metodom početnih brzina

Početna reakcijska brzina mjerena je spektrofotometrijski u kvarcnoj kiveti pri valnoj duljini od 395 nm. U kivetu je dodano 1000  $\mu\text{L}$  katehola otopljenog u puferu određene koncentracije ( $1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $3 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i 100  $\mu\text{L}$  enzima lakaze. Koncentracija lakaze u kiveti je bila  $0,090909 \text{ mg cm}^{-3}$ . Metoda traje 100 s. Iz vrijednosti  $dA/dt$  izračunata je volumna aktivnost prema jednadžbi (17):

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{dA}{dt} \quad [\text{U cm}^{-3}] \quad (17)$$

Gdje je:

- V.A. - volumna aktivnost [ $\text{U cm}^{-3}$ ]
- $V_r$  – ukupni volumen uzorka u kiveti [ $\text{cm}^3$ ]
- $\varepsilon$  – molarni ekstinkcijski koeficijent [ $0,3356 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ]
- $d$  – promjer kivete [1cm]
- $V_E$  – volumen enzimskog pripravka [ $\text{cm}^3$ ]
- $\frac{dA}{dt}$  – promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) [ $\text{min}^{-1}$ ]

Jedinica aktivnosti enzima U je internacionalna jedinica koja je definirana kao količina enzima potrebna za oksidaciju 1  $\mu\text{mol}$  supstrata u 1 minuti pri definiranim reakcijskim uvjetima.

### **Procjena kinetičkih parametara**

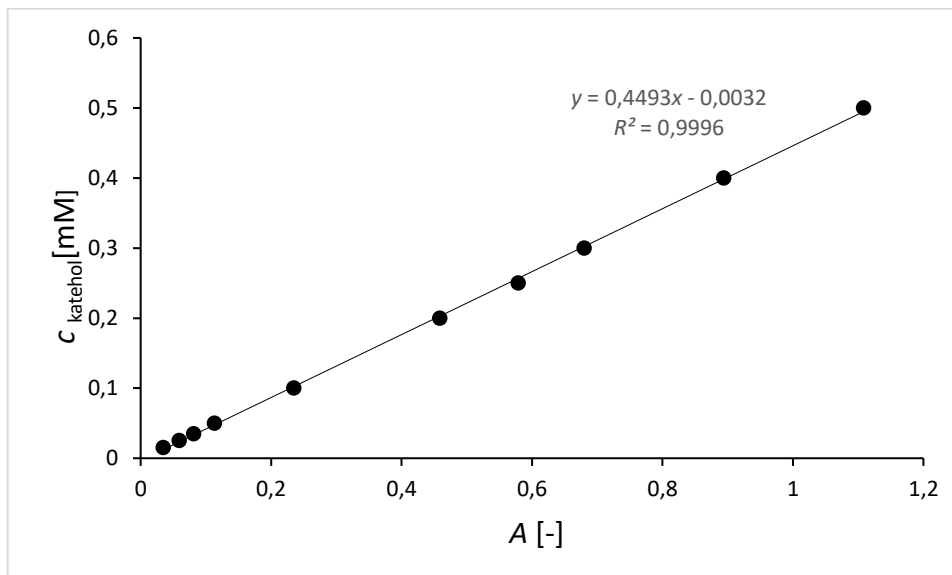
Iz dobivenih vrijednosti ovisnosti početne reakcijske brzine izražene kao volumna aktivnost enzima, o početnoj koncentraciji supstrata procijenjeni su kinetički parametri, maksimalna reakcijska brzina ( $V_m$ ) i Michaelisova konstanta ( $K_m$ ). Krivulja koja ilustrira Michaelis-Menteničinu jednadžbu ima oblik hiperbole, te radi preciznije procjene kinetičkih parametara provedena je linearizacija hiperbole Lineweaver-Burk metodom te je dobivena linearna ovisnost recipročne vrijednosti brzine enzimske reakcije o recipročnoj vrijednosti koncentracije supstrata (Jednadžba 7). Iz odsječka na ordinati (y-os) očitana je recipročna vrijednost maksimalne brzine reakcije ( $1/V_m$ ), dok je iz nagiba pravca očitana omjer Michaelisove konstante i maksimalne brzine enzimske reakcije ( $K_m/V_m$ ).

### **3.3.3. Istraživanje ovisnosti aktivnosti enzima o pH i temperaturi**

Istraživanje ovisnosti utjecaja pH i temperature na oksidaciju katehola provedeno je spektrofotometrijski u kvarcnoj kiveti volumena 1  $\text{cm}^3$  u 0,1 M citratnom puferu, pH u rasponu od 2,75 do 5,23. Istraživanje utjecaja temperature na enzimsku oksidaciju katehola provedeno je pri različitim temperaturnim intervalima od 25 °C do 80 °C. Spektrofotometrijskim mjerenjem dobivena je promjena apsorbancije u vremenu, te je iz te vrijednosti izračunata volumna aktivnost enzima prema jednadžbi (17).

### 3.3.4. Određivanje koncentracije katehola

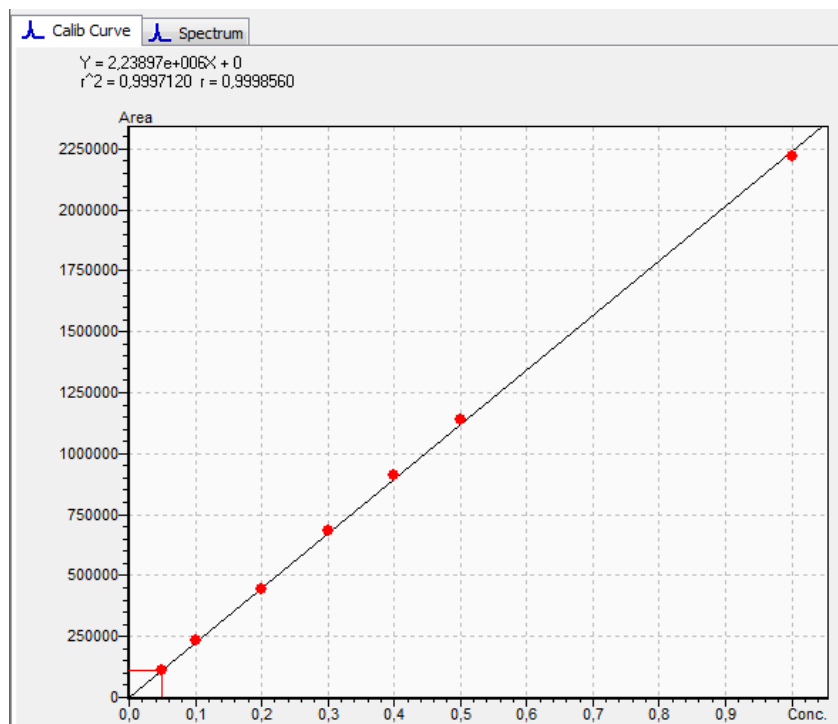
Koncentracija katehola mjerena je spektrofotometrijski pri valjnoj duljini od 280 nm. Za spektrofotometrijsko određivanje koncentracije katehola korišten je prethodno napravljen baždarni pravac (Slika 14).



Slika 14 Baždarni pravac za određivanje koncentracije katehola spektrofotometrijski

Dodatno, koncentracija katehola je mjerena i tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti (UHPLC, Nexera XR, Shimadzu, Kyoto, Japan). Analiti su razdvojeni korištenjem Kinetex® C18 jezgreno-omotačne kromatografske kolone (100 × 4,6 mm, 2,6 μm, Phenomenex, Torrance, CA, SAD), a njihova detekcija izvršena je pomoću PDA detektora pri valjnoj duljini od 280 nm. Uzorci su filtrirani kroz membrane (Chromafil Xtra PTFE, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Dueren, Njemačka) od 0,45 μm prije UHPLC analize. Kvalitativna analiza analita izvedena je usporedbom retencijskog vremena s poznatim standardom i ubrizgavanjem standarda poznatog sastava u uzorak koji se analizira. Kvalitativna analiza izvršena je koristeći prethodno izrađene kalibracijske krivulje. Dobiveni podaci su obrađeni

pomoću softvera LabSolutions 5.87. Razdvajanje je izvedeno s linearnim gradijentom dvaju otapala: Otapalo A (1,0 % octena kiselina u vodi) i otapalo B (50 % metanol, 50 % acetonitril).



Slika 15 Baždarni pravac za određivanje koncentracije katehola UHPLC-om

### 3.3.5. Oksidacija katehola katalizirana lakazom iz *Trametes versicolor* u kotlastom reaktoru

Šaržni pokus oksidacije katehola proveden je u staklenoj čaši, volumena 100 cm<sup>3</sup>, koja je predstavljala kotlasti reaktor. Homogenost reakcijske smjese postignuta je miješanjem pomoću magnetne miješalice brzinom okretaja 350 o min<sup>-1</sup>. Svi pokusi provedeni su pri sobnoj temperaturi te reakcijska smjesa nije bila dodatno aerirana zrakom, što znači da je kisik u reakcijsku smjesu dolazio kroz granični sloj atmosfera/reakcijska smjesa. Usporedno su provedena dva šaržna pokusa, jedan kataliziran komercijalnom lakazom, a drugi sirovim ekstraktom lakaze.

U prvom pokusu je pripremljeno 40 cm<sup>3</sup> otopine katehola koncentracije 3 mol dm<sup>-3</sup> te je dodano 4 cm<sup>3</sup> suspenzije komercijalnog enzima lakaze masene koncentracije 1 mg cm<sup>-3</sup> u 0,1 M citratnom puferu pH 4,5. Koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi je bila 0,091 mg cm<sup>-3</sup>, a volumna aktivnost 1750,83 U dm<sup>-3</sup>. U drugom šaržnom procesu je na isti način pripremljen supstrat, te je za katalizu oksidacije dodano 4 cm<sup>3</sup> sirovog ekstrakta lakaze masene



koncentracije  $200 \text{ mg cm}^{-3}$  i volumne aktivnosti  $1711,02 \text{ U dm}^{-3}$ . Koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi je bila  $18,182 \text{ mg cm}^{-3}$ . Oba pokusa su trajala 5 h. Uzorci za analizu koncentracije katehola uzimani su tijekom vremena, na način da su otopljeni u  $0,1 \text{ M}$  otopini HCl-a u svrhu zaustavljanja enzimski katalizirane reakcije. Mjerenje koncentracije je provedeno spektrofotometrijski.

### 3.3.6. Oksidacija katehola katalizirana lakazom iz *Trametes versicolor* u kotlastom reaktoru s prihranjivanjem

Usporedno su provedena dva paralelna eksperimenta oksidacije katehola katalizirane, komercijalnom lakazom i proizvedenim sirovim ekstraktom lakaze, u reaktoru s prihranjivanjem (staklena čaša volumena  $100 \text{ cm}^3$ ). Svi pokusi su provedeni pri sobnoj temperaturi i miješanje reakcijske smjese provelo se pomoću magnetske miješalice pri konstantnom broju okretaja od  $350 \text{ o min}^{-1}$ . Procesni uvjeti pokusa:  $V$  (reakcijske smjese) =  $44 \text{ cm}^3$ ;  $c$  (katehol) =  $3 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $\gamma$  (lakaza) =  $5 \text{ mg cm}^{-3}$ . Prema rezultatima dobivenim u šaržnom pokusu određeno je trajanje jednog ciklusa od 3 sata. Svaka 3 sata u reakcijsku smjesu dodano je  $700 \text{ }\mu\text{L}$  svježe otopine katehola koncentracije  $188,57 \text{ mmol dm}^{-3}$  tako da koncentracija katehola bude približno jednaka početnoj koncentraciji na početku pokusa. Ukupno je provedeno tri ciklusa, a ukupno reakcijsko vrijeme bilo je 9 sati. Tijekom vremena su uzimani uzorci za analizu koncentracije katehola, otapani u  $0,1 \text{ M}$  otopini HCl-a s ciljem zaustavljanja enzimski katalizirane reakcije. Uzorci su mjereni spektrofotometrijski i UHPLC- analizom.

### 3.3.7. Oksidacija katehola katalizirana lakazom iz *Trametes versicolor* u mikroreaktoru

Oksidacija katehola u mikroreaktoru provedena s komercijalnom lakazom iz *Trametes versicolor*. Pripremljene su slijedeće otopine:  $10 \text{ cm}^3$   $6 \text{ mM}$  otopine katehola i suspenzija enzima masene koncentracije  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ . Početna koncentracija katehola na ulazu u mikrokanal je bila  $3 \text{ mM}$ , dok je početna masena koncentracija lakaze iznosila  $5 \text{ mg cm}^{-3}$ . vrijeme zadržavanja je bilo  $71,4$  minute. Na izlazu iz mikroreaktorskog sustava, u svrhu zaustavljanja reakcije, uzorci za analizu su hvatani u  $0,1 \text{ M}$  HCl-u. Mjerenje koncentracije katehola je provedeno spektrofotometrijski.

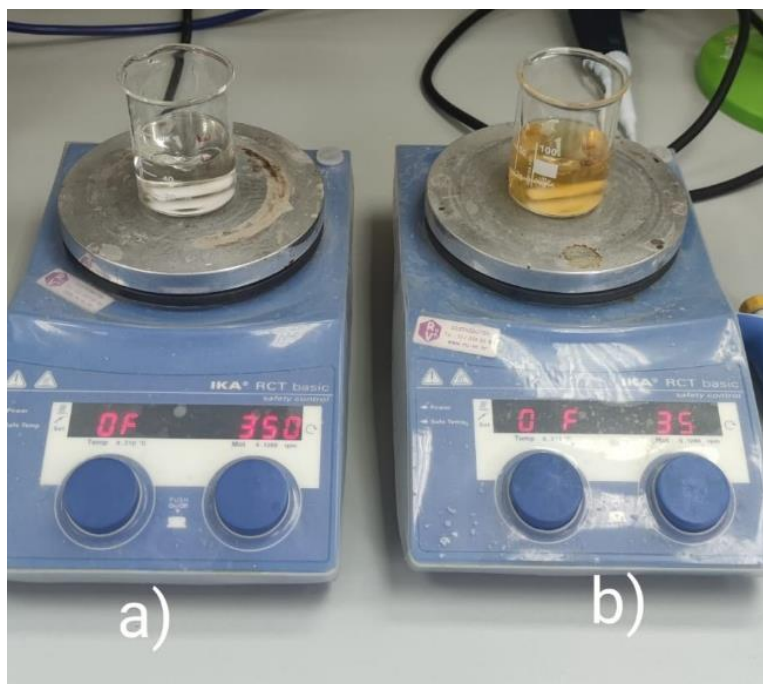
### 3.3.8. Izolacija produkta

Nakon završene reakcije oksidacije katehola katalizirane komercijalnom lakazom i proizvedenim sirovim ekstraktom lakaze, provedeno je izdvajanje produkta poli(katehola) na način da je prvo provedeno taloženje u hladnjaku na temperaturi 4 °C tijekom 48 sati. Zatim je provedena vakuum filtracija, preko glatkog filter papira postavljenog u Büchnerov lijevak.

### 3.3.9. Aparatura

#### Kotlasti reaktor

Oksidacija katehola provedena je u staklenoj čaši volumena 100 cm<sup>3</sup>, koja je predstavljala kotlasti reaktor, koristeći šaržne i repetitivne šaržne uvjete (**Slika 16**). Kako bi se osigurala homogenost sustava korištena je magnetna miješalica (IKA RCT basic, Kina).



Slika 16 Prikaz šaržnog procesa oksidacije katehola kataliziran: a) komercijalnom lakazom; b) sirovim ekstraktom lakaze

#### Mikroreaktorski sustavi

Za provedbu biotransformacije katehola korišten je mikroreaktor „Y“ oblika ulaznih kanala i s jednim izlazom (**Slika 17**). Prema informacijama proizvođača, volumen mikrokanala iznosio je 9,5 µL, a imao je sljedeće dimenzije: duljina 250 mm; širina 300 µm i visina 150 µm. Cjevčica

na izlazu bila je duljine 10 cm i volumena 78,5  $\mu\text{L}$ . Prema tome ukupni volumen mikroreaktorskog sustava bio je 88  $\mu\text{L}$ . Za uvođenje otopine katehola i suspenzije enzima lakaze u mikroreaktorski sustav korištena je pumpa (**Slika 18**) (SHENCHEN ISPLab02, Baoding Shenchen Precision Pump Co., Ltd., Hebei, Kina) koja može raditi pri različitim volumnim protocima. U svrhu zaustavljanja reakcije uzorak na izlazu iz mikrokanala prikupljan je u 0,1 M HCl-u.



Slika 17 Mikroreaktor „Y“ oblika



Slika 18 Pumpa za mikroreaktorski sustav (SHENCHEN ISPLab02, Baoding Shenchen Precision Pump Co., Ltd., Hebei, Kina)

### Visokotlačni tekućinski kromatograf

Za mjerenje koncentracije katehola korišten je visokotlačni tekućinski kromatograf (Nexera XR, Shimadzu, Japan) (**Slika 19**). Uređaj se sastoji od niza komponenata, uključujući vakuum otplinjač (DGU-20A5R), dvije binarne pumpe (A & B) (LC-20ADXR), automatski uzorkivač (SIL-

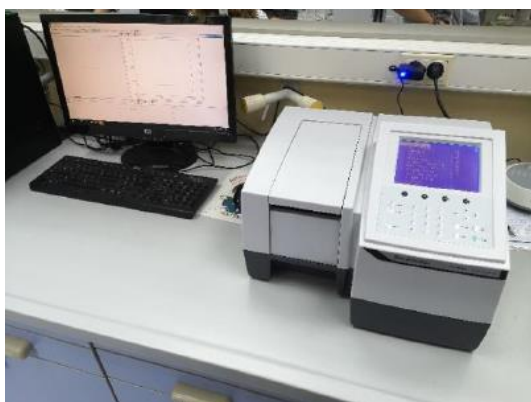
20ACXR), kolonsku pećnicu (CTO-20AC), PDA detektor (SPD-M20A), detektor indeksa loma (RID-20A), kontroler (CBM-20A) i računalo s odgovarajućim softverom (LabSolution) za upravljanje i obradu podataka. Analiza uzoraka provedena je pri valnoj duljini od 280 nm na Kinetex® C18 Phenomenex (100 x 4,6 mm, 2,6 µm).



Slika 19 UHPLC - visokotlačni tekućinski kromatograf (Nexera XR, Shimadzu, Japan)

### Spektrofotometar

Početna reakcijska brzina i aktivnost enzima lakaze određivane su spektrofotometrijski na UV-VIS spektrofotometru (UV-1280, Shimadzu, Japan) (Slika 20).



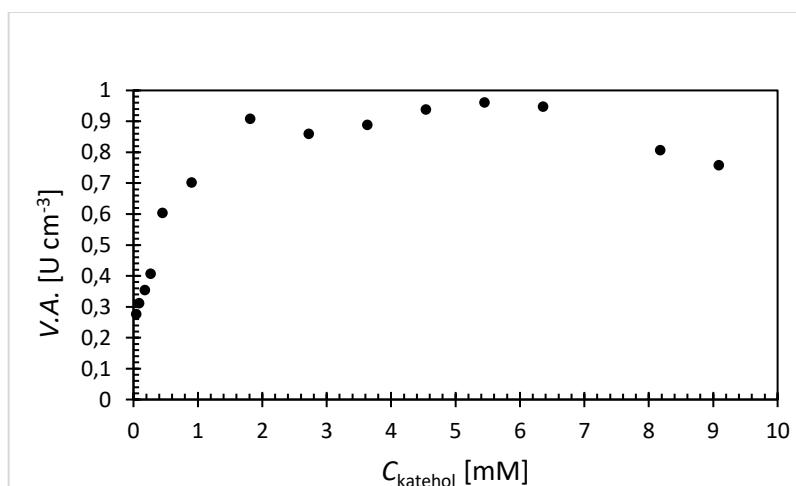
Slika 20 Spektrofotometar (UV-1280, Shimadzu, Japan)

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

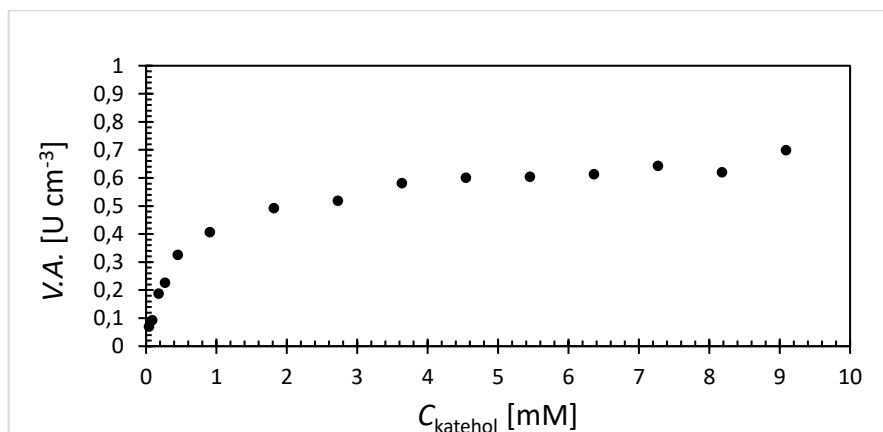
U prvom dijelu eksperimentalnog rada, mjerena je početna reakcijska brzina oksidacije katehola katalizirane komercijalnom lakazom u kiveti spektrofotometra. Metodom linearne regresije, procijenjeni su kinetički parametri procesa. Nakon toga, istraživana je utjecaj pH i temperature na aktivnost enzima. Na temelju dobivenih rezultata, provedeni su pokusi oksidacije katehola komercijalnom lakazom i sirovim ekstraktom lakaze u kotlastom reaktoru, kotlastom reaktoru s prihranjivanjem i mikroreaktoru.

#### 4.1. PRELIMINARNA ISTRAŽIVANJA

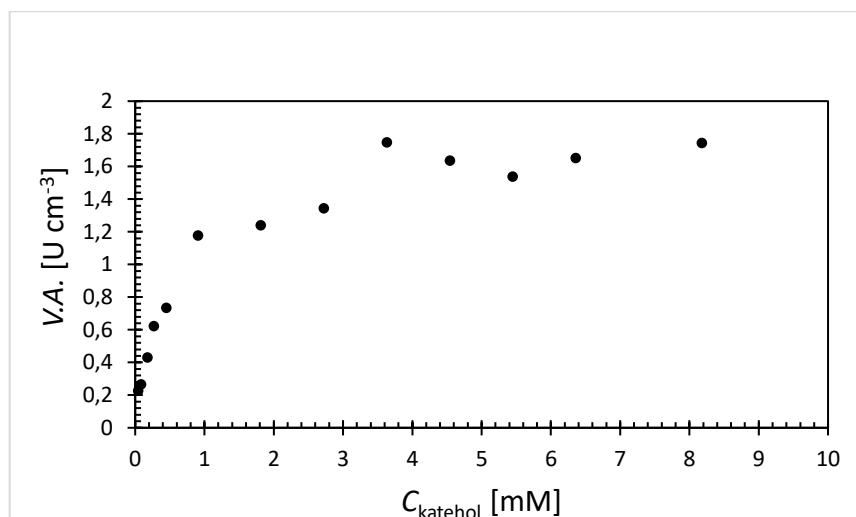
Provedeno je šest pokusa istraživanja ovisnosti aktivnosti lakaze o koncentraciji katehola u kiveti spektrofotometra. U svim pokusima koncentracija lakaze je bila jednaka ( $\gamma_{lakaza} = 0,091 \text{ mg cm}^{-3}$ ). U prva tri pokusa, istraživana je utjecaj pufera na aktivnost lakaze na način da je katehol otopljen u: a) 0,1 M acetatnom puferu pH 4,5 (**Slika 21**); b) 0,1 M fosfatnom puferu pH 6,0 (**Slika 25**) i c) 0,1 M citratnom puferu pH 4,5 (**Slika 23**), a lakaza suspendirana u 3,2 M amonijevom sulfatu. U slijedeća tri pokusa, i katehol i lakaza su otopljeni u istim puferima: a) 0,1 M acetatnom puferu pH 4,5 (**Slika 22**); b) 0,1 M fosfatnom puferu pH 6,0 (**Slika 26**) i c) 0,1 M citratnom puferu pH 4,5 (**Slika 24**).



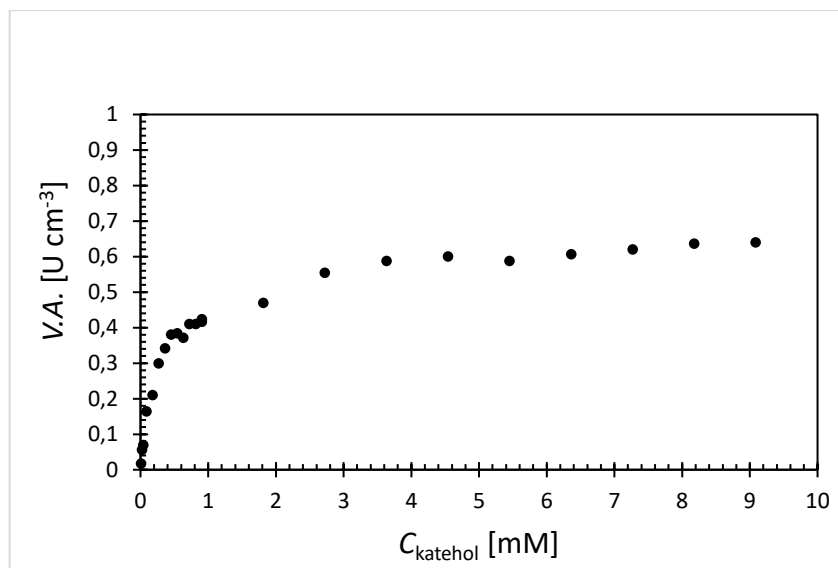
Slika 21 Ovisnost volumne aktivnosti lakaze suspendirane u amonijevom sulfatu o koncentraciji katehola (Procesni uvjeti: 0,1 M acetatni pufer, pH 4,5,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,091 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $V_r = 1,1 \text{ cm}^3$ )



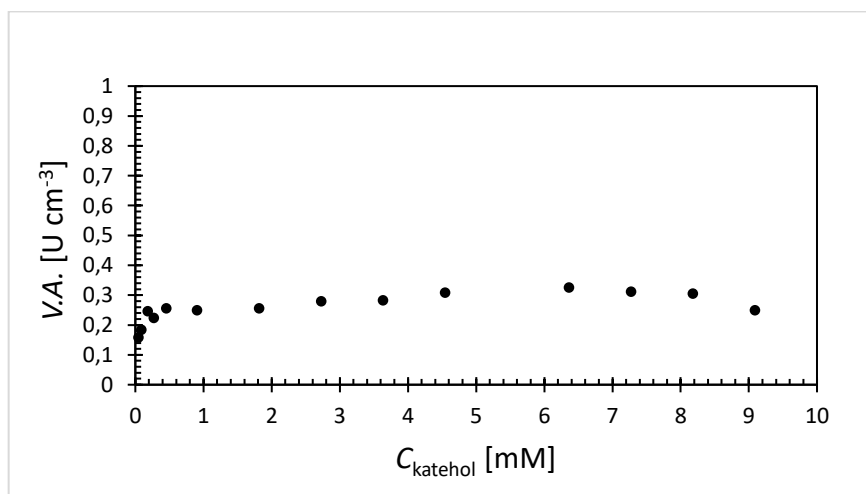
Slika 22 Ovisnost volumne aktivnosti lakaze suspendirane u 0,1 M acetatnom puferu o koncentraciji katehola (Procesni uvjeti: 0,1 M acetatni pufer, pH 4,5,  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\gamma_{\text{lakaza}} = 0,091\text{ mg cm}^{-3}$ ,  $V_r = 1,1\text{ cm}^3$ )



Slika 23 Ovisnost volumne aktivnosti lakaze suspendirane u 3,2 M amonijevom sulfatu o koncentraciji katehola (Procesni uvjeti: 0,1 M citratni pufer, pH 4,5,  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\gamma_{\text{lakaza}} = 0,091\text{ mg cm}^{-3}$ ,  $V_r = 1,1\text{ cm}^3$ )

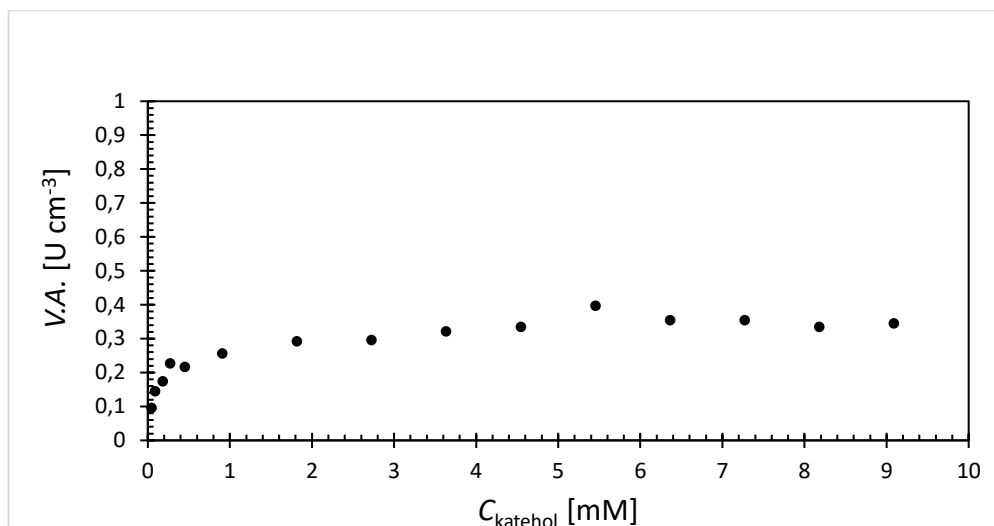


Slika 24 Ovisnost volumne aktivnosti lakaze suspendirane u 0,1 M citratnom puferu o koncentraciji katehola (Procesni uvjeti: 0,1 M citratni pufer, pH 4,5,  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\gamma_{\text{lakaza}} = 0,091\text{ mg cm}^{-3}$ ,  $V_r = 1,1\text{ cm}^3$ )



Slika 25 Ovisnost volumne aktivnosti lakaze suspendirane u 3,2 M amonijevom sulfatu o koncentraciji katehola (Procesni uvjeti: 0,1 M fosfatni pufer, pH 6,0,  $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $\gamma_{\text{lakaza}} = 0,091\text{ mg cm}^{-3}$ ,  $V_r = 1,1\text{ cm}^3$ )





Slika 26 Ovisnost volumne aktivnosti lakaze suspendirane u 0,1 M fosfatnom puferu o koncentraciji katehola (Procesni uvjeti: 0,1 M fosfatni pufer, pH 6,0 ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\gamma_{\text{lakaza}} = 0,091 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $V_r = 1,1 \text{ cm}^3$ )

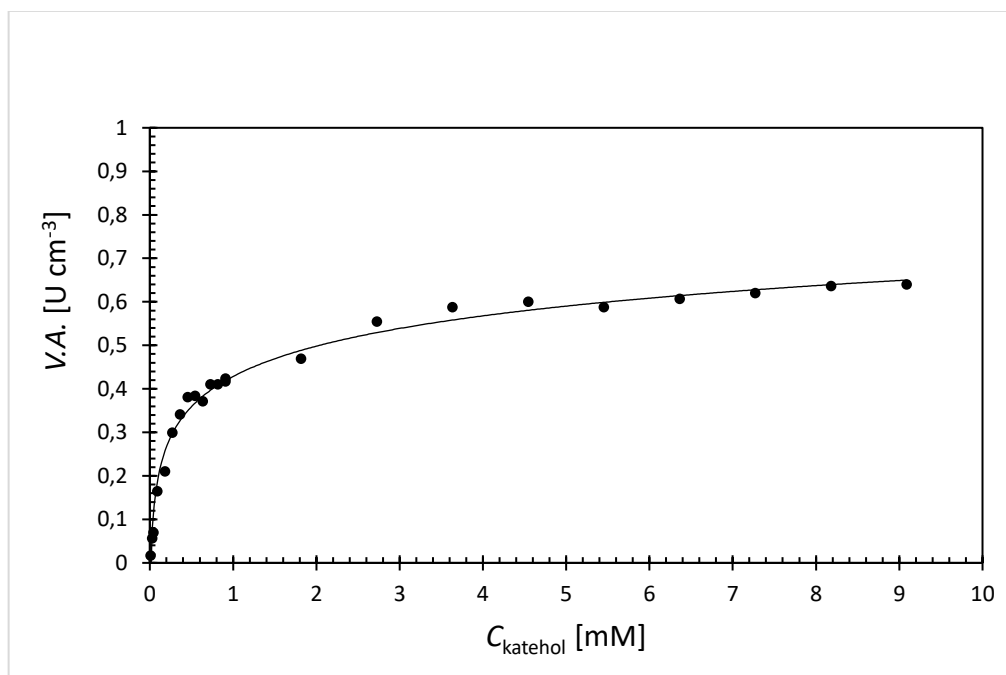
Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da su u pokusu u kojem je lakaza suspendirana u 3,2 M amonijevom sulfatu, a katehol otapan u citratnom puferu, postignute najveće volumne aktivnosti lakaze ( $2,0125 - 2,0256 \text{ U cm}^{-3}$ ) (**Slika 23**). Međutim, za daljnju provedbu eksperimenata, zbog taloženja lakaze u amonijevom sulfatu i potencijalnih problema u pokusima u mikroreaktoru, za otapanje lakaze korišten je citratni pufer. U ovom pokusu maksimalne volumne aktivnosti lakaze su bile u rasponu od  $0,9276$  do  $0,9833 \text{ U cm}^{-3}$  (**Slika 24**).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na raznovrsnu primjenu pufera u provođenju biotransformacije katehola lakazom. Prema istraživanju Aktas i sur. (2003), optimalni uvjeti za provođenje biotransformacije katehola lakazom iz *Trametes versicolor* su postignuti u natrij-acetatnom puferu pri pH 4,5. U daljnjim istraživanjima iste grupe autora, maksimalna aktivnost lakaze za katalizu oksidacije katehola je postignua u aceton-acetatnom puferu pri pH

5,0. U istraživanju Jurinjak-Tušek (2013) optimalni uvjeti za najveću aktivnost lakaze, koja katalizira oksidaciju katehola, postignuti su u fosfatnom puferu pH 6,6.

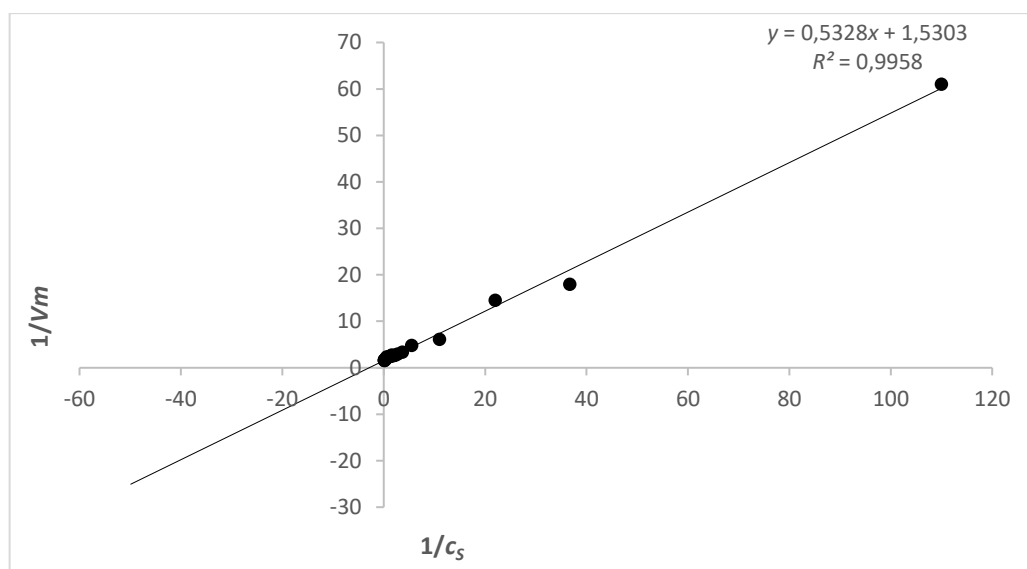
#### 4.2. REZULTATI ISTRAŽIVANJA KINETIKE OKSIDACIJE KATEHOLA KATALIZIRANE LAKAZOM METODOM POČETNIH BRZINA

Rezultati istraživanja kinetike oksidacije katehola lakazom prikazani su kao ovisnost početne brzine reakcije, izražene kao volumna aktivnost enzima, o različitim koncentracijama katehola (Slika 27). Pretpostavljen je Michaelis-Menteničin kinetički model za jednosupstratnu reakciju. Iz eksperimentalnih podataka linearnom regresijom su procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara, maksimalna brzina reakcije ( $V_m$ ) i Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) (Slika 28). Postignuto je dobro slaganje eksperimentalnih rezultata s kinetičkim modelom.



Slika 27 Ovisnost volumne aktivnosti komercijalne lakaze o koncentraciji katehola u reakciji oksidacije katehola, • eksperiment, — model (Procesni uvjeti: 0,1 M citratni pufer; pH

$$4,5, T = 25 \text{ }^\circ\text{C}, \gamma_{\text{lakaza}} = 0,091 \text{ mg cm}^{-3}, V_r = 1,1 \text{ cm}^3)$$

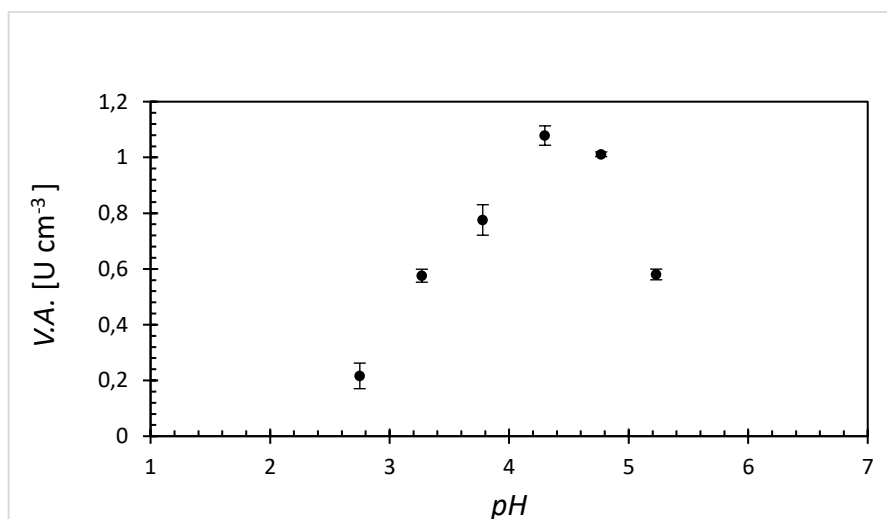


Slika 28 Lineweaver-Burk dijagram

Maksimalna brzina enzimske reakcije ( $V_m$ ) iznosi  $0,654 \text{ U mg}^{-1}$ , a Michaelisova konstanta ( $K_m$ )  $0,348 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

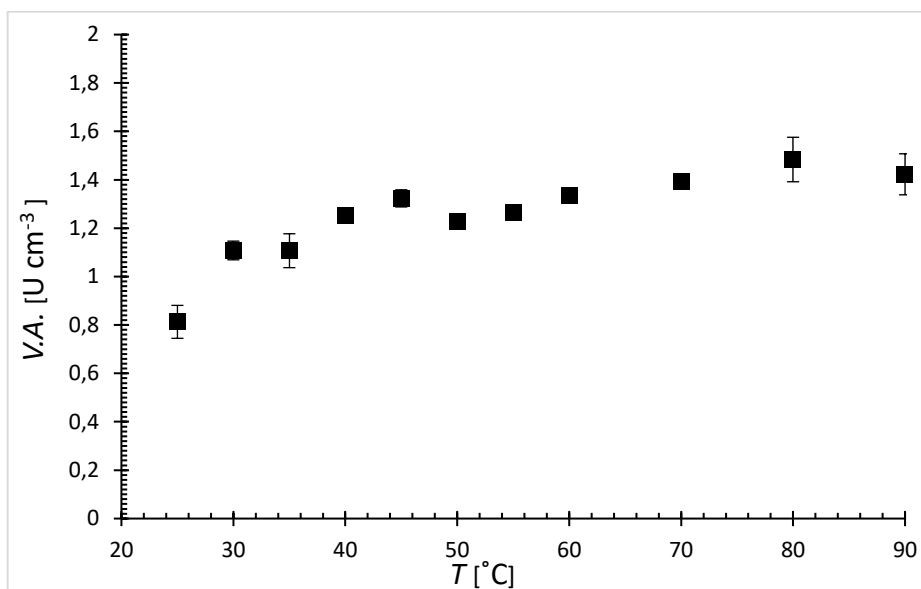
### 4.3. REZULTATI ISTRAŽIVANJA UTJECAJA PH VRIJEDNOSTI I TEMPERATURE NA AKTIVNOST ENZIMA

Rezultati istraživanja ovisnosti aktivnosti enzima lakaze o pH vrijednosti i temperaturi u reakciji oksidacije katehola prikazani su na slikama 29 i 30.



Slika 29 Ovisnost volumne aktivnosti lakaze u reakciji oksidacije katehola o pH vrijednosti ( $C_{\text{katehol}} = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{lakaza}} = 0,091 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $0,1 \text{ M}$  citratni pufer, pH 2,75 - 5,23,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V_r = 1,1 \text{ cm}^3$ )

Maksimalna aktivnost komercijalne lakaza pri oksidaciji katehola postignuta je pH 4,3 (**Slika 29**). Prema istraživanju Tišma (2008), u analizi utjecaja pH vrijednosti na oksidaciju katehola lakazom, najveća aktivnost lakaze postignuta je u citrat-fosfatnom puferu pri pH 4,0.



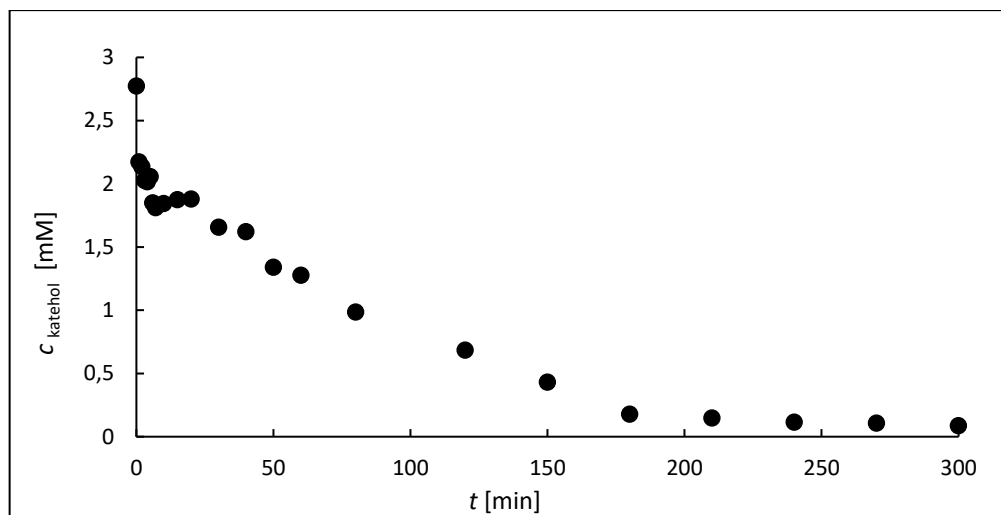
Slika 30 Ovisnost volumne aktivnosti lakaze u reakciji oksidacije katehola o temperaturi ( $C_{katehol} = 3 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,091 \text{ mg cm}^{-3}$ , 0,1 M citratni pufer, pH 4,5,  $T = 25 - 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_r = 1,1 \text{ cm}^3$ )

Ispitivanjem utjecaja temperature na aktivnost enzima lakaze dokazano je da enzim aktivan u velikom temperaturnom rasponu od 25 °C do 90 °C (**Slika 30**). Stabilnost lakaza je općenito najveća u temperaturnom rasponu od 30 °C do 50 °C, a pri temperaturama višim od 60 °C brzo gube aktivnost (Tišma, 2008). Iz toga se može zaključiti da je komercijalna lakaza korištena u ovom istraživanju termostabilna, što predstavlja prednost za moguću industrijsku primjenu.

#### 4.4. REZULTATI OKSIDACIJE KATEHOLA KATALIZIRANE LAKAZOM U KOTLASTOM REAKTORU

Provedena su dva paralelna eksperimenta, pri čemu je u prvom eksperimentu korištena komercijalna lakaza, a u drugom sirovi ekstrakt lakaze.

Na **Slici 31** su prikazani rezultati pokusa oksidacije katehola lakazom u kotlastom reaktoru pri koncentraciji katehola 2,8 mM, volumne aktivnosti 1750,83 U dm<sup>-3</sup> te uz masenu koncentraciju komercijalnog enzima lakaze 0,455 mg cm<sup>-3</sup>.

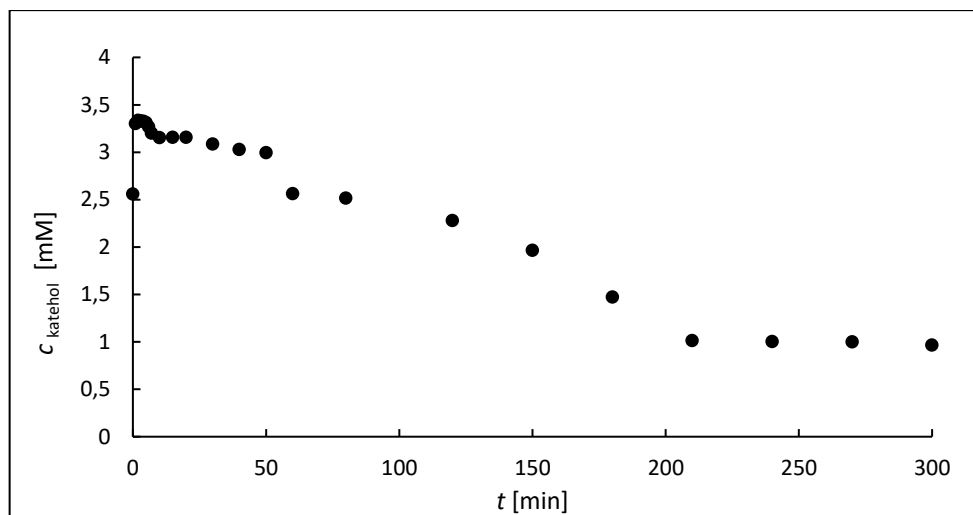


Slika 31 Ovisnost koncentracije katehola o vremenu tijekom pokusa oksidacije katehola katalizirane komercijalnom lakazom ( $C_{katehol} = 2,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,455 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $0,1 \text{ M}$  citratni pufer,  $\text{pH } 4,5$ ,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $V_r = 44 \text{ cm}^3$ )

Konverzija katehola se od 180. do 300. minute kretala u rasponu od 93,6 % do 96,9%. Iz dobivenih rezultata, vidljivo je da se 100 %-tna konverzija katehola nije ostvarila nakon 5 h.

U istraživanju Tišma (2008), u šaržnom pokusu biotransformacije katehola lakazom, volumena reakcijske smjese  $250 \text{ cm}^3$  i s početnom koncentracijom katehola  $3 \text{ mM}$  i lakaze  $0,099 \text{ mg cm}^{-3}$ , ostvarena je 100%-tna konverzija katehola nakon 120 minuta. Prema istraživanju Jurinjak Tušek, oksidacijom katehola lakazom u kotlastom reaktoru (početni uvjeti:  $V_r = 50 \text{ cm}^3$ ,  $C_{0,katehol} = 4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$ , fosfatni pufer  $\text{pH } 6,6$ ) postignuta je konverzija katehola od približno 20% u vremenu od 200 min. Potpuna konverzija katehola postignuta je u ovom istraživanju nakon 24 h.

Na **Slici 32** su prikazani rezultati oksidacije katehola pripremljene koncentracije  $2,56 \text{ mM}$  katalizirane pripremljenim ekstraktom enzima volumne aktivnosti  $1711,02 \text{ U dm}^{-3}$  i masene koncentracije  $18,182 \text{ mg cm}^{-3}$ .



Slika 32 Ovisnost koncentracije katehola o vremenu tijekom pokusa oksidacije katehola katalizirane proizvedenim sirovim ekstraktom lakaze ( $C_{katehol} = 2,56 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 18,182 \text{ mg cm}^{-3}$ , 0,1 M citratni pufer, pH 4,5,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_r = 44 \text{ cm}^3$ )

Iz dobivenih rezultata, vidljivo je da primjenom sirovog enzimskog ekstrakta dolazi do konverzije katehola. Prema dobivenim rezultatima u kotlastom reaktoru u reakciji oksidacije katehola sirovim ekstraktom lakaze nakon 300. minute je postignuta 62,2 %-tna konverzija. Međutim, teško je izračunati točnu konverziju katehola jer su u sastavu sirovog ekstrakta enzima prisutni drugi polifenoli i neodređeni spojevi koji, kao i katehol, daju odziv na 280 nm.

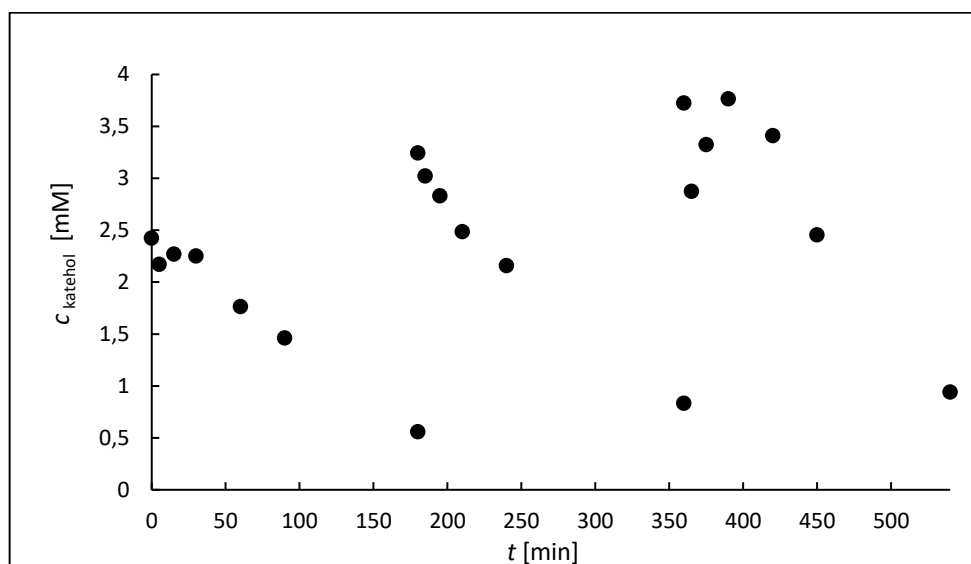
U istraživanju Dropulja (2010), proveden je šaržni pokus oksidacije katehola sirovim ekstraktom lakaze dobivene submerznim uzgojem *Trametes versicolor* G-99 na otpadu iz industrije papira (početni uvjeti:  $C_{katehol,0} = 4,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,94 \text{ mg cm}^{-3}$ , 0,2 M fosfatni pufer, pH 6,6  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_r = 200 \text{ cm}^3$ ). Potpuna konverzija katehola je ostvarena nakon više od 24 h.

#### 4.5. REZULTATI OKSIDACIJE KATEHOLA KATALIZIRANE LAKAZOM KOTLASTOM REAKTORU S PRIHRANJIVANJEM

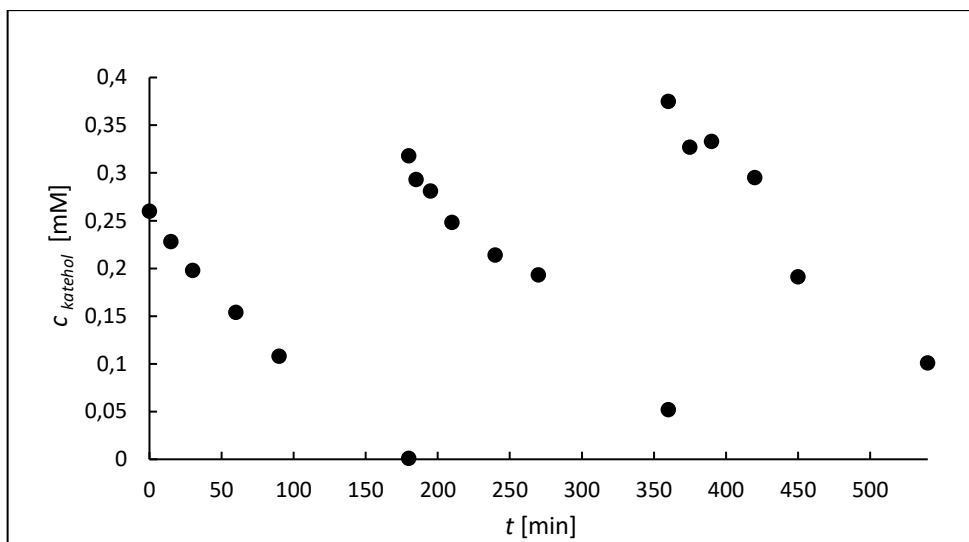
Usporedno su provedena dva paralelna eksperimenta oksidacije katehola katalizirane, komercijalnom lakazom i proizvedenim sirovim ekstraktom lakaze, u reaktoru s prihranjivanjem. Također, u ovim eksperimentima je koncentracija katehola mjerena spektrofotometrijski i tekućinskom kromatografijom ultravisoke učinkovitosti.

**Slika 33** prikazuje rezultate oksidacije katehola katalizirane komercijalnom lakazom aktivnosti  $1743,92 \text{ U dm}^{-3}$  u reaktoru s prihranjivanjem, dok **Slika 35** prikazuje rezultate oksidacije katehola katalizirane proizvedenim sirovim ekstraktom lakaze aktivnosti  $1698,03 \text{ U dm}^{-3}$  u reaktoru s prihranjivanjem. Prema rezultatima dobivenim u šaržnom pokusu, od 180. minute do 300. minute konverzija katehola se kretala u rasponu od 93,6 do 96,9 %. Budući da ni nakon 300. minute nije postignuta 100 %-tna konverzija, za reakcijsko vrijeme jednog ciklusa uzeto je vrijeme od 3h. Prema tome, pokus je proveden na način da je svaka 3 sata tijekom 9 sati dodavana nova količina katehola u reakcijsku smjesu da njezina koncentracija na početku svakog ciklusa bude približno jednaka koncentraciji katehola na početku eksperimenta. Ukupno je provedeno 3 ciklusa, te je ukupno reakcijsko vrijeme 9 h.

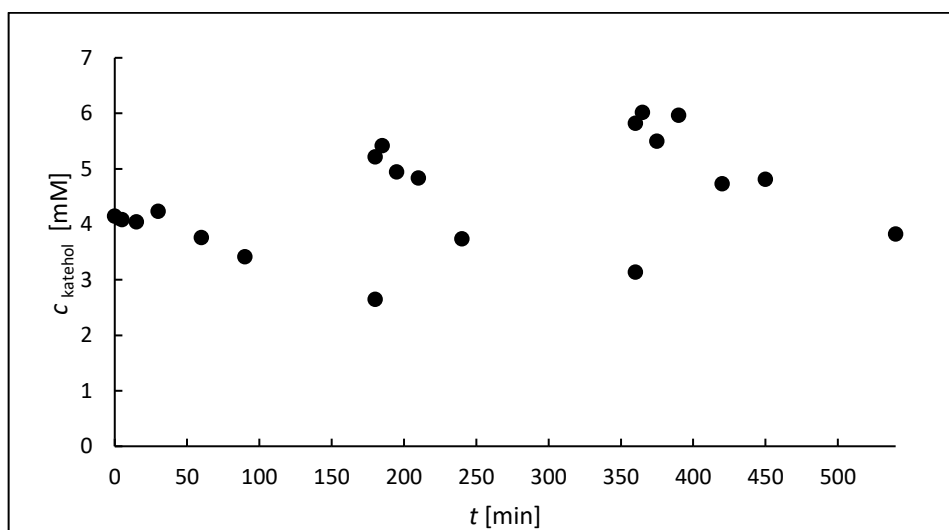
Na slici **33** su prikazani spektrofotometrijski dobiveni rezultati oksidacije katehola katalizirane komercijalnom lakazom u reaktoru s prihranjivanjem, a na slici **34** rezultati istog dobiveni UHPLC analizom. Slika **35** prikazuje spektrofotometrijski dobivene rezultate oksidacije katehola katalizirane proizvedenim sirovim ekstraktom lakaze, dok slika **36** prikazuje rezultate istog pokusa dobivene mjerenjem na UHPLC-u. Usporedbom grafova, može se zaključiti kako su rezultati dobiveni UHPLC analizom precizniji.



**Slika 33** Ovisnost koncentracije katehola o vremenu katalizirane komercijalnom lakazom u kotlastom reaktoru s prihranjivanjem ( $C_{katehol} = 2,45 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,455 \text{ mg cm}^{-3}$ , citratni pufer, pH 4,5,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_r = 44 \text{ cm}^3$ )- Spektrofotometrijsko mjerenje

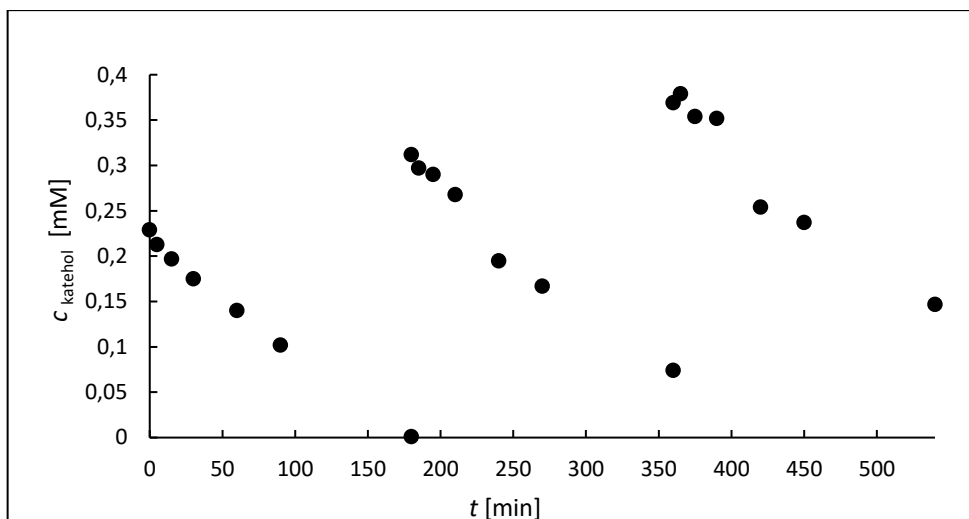


Slika 34 Ovisnost koncentracije katehola o vremenu katalizirane komercijalnom lakazom u kotlastom reaktoru s prihranjivanjem ( $C_{katehol} = 0,26 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,455 \text{ mg cm}^{-3}$ , citratni pufer, pH 4,5,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_r = 44 \text{ cm}^3$ )-UHPLC



Slika 35 Ovisnost koncentracije katehola o vremenu katalizirane sirovim ekstraktom lakaze u kotlastom reaktoru s prihranjivanjem ( $C_{katehol} = 4,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 18,182 \text{ mg cm}^{-3}$ , citratni pufer, pH 4,5,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_r = 44 \text{ cm}^3$ )- Spektrofotometrijsko određivanje





Slika 36 Ovisnost koncentracije katehola o vremenu katalizirane sirovim ekstraktom lakaze u kotlastom reaktoru s prihranjivanjem ( $c_{katehol} = 0,229 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 18,182 \text{ mg cm}^{-3}$ , citratni pufer, pH 4,5,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $V_r = 44 \text{ cm}^3$ )- UHPLC

#### 4.6. REZULTATI OKSIDACIJE KATEHOLA KATALIZIRANE LAKAZOM U MIKROREAKTORU

Istraživanje oksidacije katehola komercijalnom lakazom provedeno je u mikroreaktoru slijedećih dimenzija: duljina 250 nm, širina 300  $\mu\text{m}$  i visina 150  $\mu\text{m}$ . Za pokus je pripremljeno 10  $\text{cm}^3$  6 mM otopine katehola i suspenzija enzima masene koncentracije 10  $\text{mg cm}^{-3}$ . U sustav se uvodilo 5  $\text{cm}^3$  otopine katehola i 5  $\text{cm}^3$  suspenzije enzima. Koncentracija katehola unutar mikroreaktorskog sustava, na početku reakcije iznosila je 3 mM, a masena koncentracija lakaze 5  $\text{mg cm}^{-3}$ .

Tablica 2 Rezultati oksidacije katehola lakazom u mikroreaktoru ( $V = 88 \mu\text{L}$ )

POKUS	$C_{0,KATEHOL}$ [mol/dm <sup>3</sup> ]	$\gamma_{lakaza}$ [mg/cm <sup>3</sup> ]	$v_1$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	$v_2$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	$v_{UK}$ [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	$\tau$ [min]	$X$ [%]
1	3	5	0,7	0,7	1,4	71,4	44,13

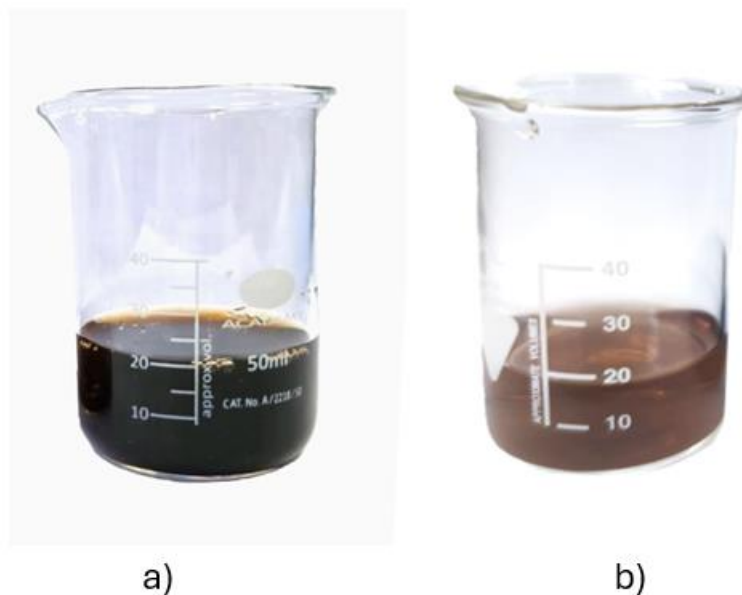
Pri istraživanim uvjetima, nakon vremena zadržavanja od 71,4 minute, ostvarena je 44,13 %-tna konverzija. Ovo je značajno niža konverzija u odnosu na kotlasti reaktor u kojem je već nakon 60 minuta reakcije pri istim početnim uvjetima koncentracije katehola i lakaze ostvarena konverzija od 54,01 %. Budući da se oksidacija katehola u mikroreaktoru u ovom istraživanju nije pokazala dobrom metodom, prema navedenim rezultatima, nije nastavljeno daljnje istraživanje kinetike oksidacije katehola primjenom ovakve vrste reaktora.

Prema istraživanju Jurinjak Tušek i sur. (2017), korišten je mikroreaktor s dimenzijama duljina : širina : visina = 267 mm : 150  $\mu$ m : 150  $\mu$ m, unutarnjeg volumena 6 mm<sup>3</sup>. Najviša postignuta konverzija katehola je 41,3 % s vremenom zadržavanja 72 s pri početnoj koncentraciji katehola 4,262 mmol dm<sup>-3</sup>, početnoj koncentraciji lakaze 0,1 g dm<sup>-3</sup> te početnoj koncentraciji kisika na ulazu od 0,271 mmol dm<sup>-3</sup>.

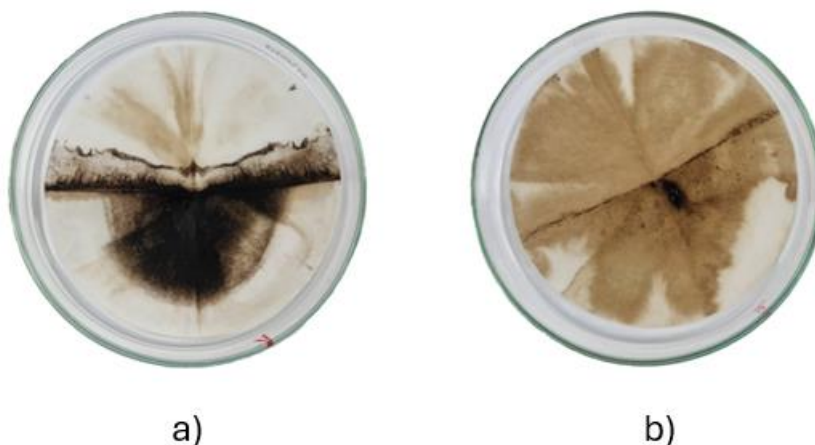
Prema literaturi, oksidacija katehola katalizirana lakazom provedena je u staklenom mikroreaktoru unutarnjeg volumena 6  $\mu$ L s dva ulaza („Y-oblik“) dimenzija duljina : širina : visina = 332 mm : 150  $\mu$ m : 150  $\mu$ m. Najviša dobivena konverzija katehola slobodnom lakazom je 19,85 % pri uvjetima  $c_{0,katehol} = 4$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $\gamma_{lakaza} = 0,1$  g dm<sup>-3</sup>,  $c_{0,kisik} = 0,487$  mmol dm<sup>-3</sup> i vremenu zadržavanja od 36 sekundi. Primijećeno je da se maksimalna konverzija supstrata slobodnim enzimom postigla pri vremenu zadržavanja od 36 sekundi te da daljnjim zadržavanjem nije došlo do povećanja konverzije katehola. Pretpostavlja se da je do ograničenja konverzije katehola došlo zbog potrošnje svog dostupnog kisika (Bregović, 2011).

#### 4.7. PRODUKT OKSIDACIJE KATEHOLA LAKAZOM

Nakon provedene oksidacije katehola katalizirane komercijalnom lakazom i proizvedenim sirovim ekstraktom lakaze, provedeno je izdvajanje produkta oksidacije, poli(katehola), filtriranjem. **Slika 37** prikazuje reakcijsku smjesu nakon završene oksidacije katehola komercijalnom lakazom i sirovim ekstraktom lakaze prije izolacije produkta. **Slika 38** prikazuje produkte oksidacije katehola katalizirane komercijalnom lakazom i proizvedenim sirovim ekstraktom lakaze nakon postupka izolacije.



Slika 37 Prikaz reakcijske smjese nakon završene oksidacije katehola: a) komercijalnom lakazom i b) sirovim ekstraktom lakaze



Slika 38 Izdvojeni poli(katehol) dobiven u reakciji kataliziranoj: a) komercijalnom lakazom i b) sirovim ekstraktom lakaze

Iz priloženih fotografija vidljivo je da je u pokusu oksidacije katehola kataliziranom komercijalnom lakazom proizvedeno više poli(katehola) u odnosu na pokus kataliziran proizvedenim sirovim ekstraktom lakaze. S ciljem postizanja povećanja prinosa produkta, bilo bi potrebno pročistiti sirovi enzimski preparat. U oba slučaja nije bilo moguće izračunati masu nastalog produkta, budući da je poli(katehol) adsorbiran na filter papir. Dodatno, potrebno je

pronaći optimalne metode izolacije i pročišćavanja nastalog produkta. U literaturi su pronađeni načini uspješnog izdvajanja poli(katehola) iz reakcijske smjese ( Aktas i sur., 2003 ; Dubey i sur.,1998)

U istraživanju Aktas i sur. (2003) izdvajanje i pročišćavanje produkta reakcije oksidacije katehola komercijalnom lakazom provelo se na način da je prvo uklonjeno otpalo rotacijskim evaporatorom. Nakon toga, talog je čuvan u hladnjaku na 4°C tijekom 2 dana kako bi se omogućila precipitacija poli(katehola). Nakon centrifugiranja taloga, polimer je izdvojen i više puta ispran destiliranom hladnom vodom u svrhu uklanjanja neizreagiranih katehola i enzima. Polimerni proizvod ostavljen je u pećnici tjedan dana na 40°C, a potom čuvan za kasniju uporabu. Daljnjim istraživanjem , Aktas i sur. su zaključili da je proizvedeni polimer termički stabilan, te da se počinje razgrađivati na oko 200°C.

Prema istraživanju Dubey i sur. (1998) izdvajanje poli(katehola), nastalog u reakciji oksidacije katehola kataliziranoj upotrebom peroksidaze dobivene iz hrena i soje, provedeno je na način da je nakon 24 sata reakcije otapalo ispareno pod smanjenim tlakom. Zaostala polimerna masa je uzastopno ispirana metanolom, vodom i izooktanom , te zatim sušena u vakuumu. Dobiveni produkt je podvrgnut istraživanju termičkih, morfoloških i električnih svojstava, te je dokazano da sintetizirani poli(katehol) ima strukturu sličnu „spužvi ili kamenu“, relativno visoku termalnu stabilnost, nema električnu vodljivost te da pokazuje paramagnetsko ponašanje.

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

Metodom početnih brzina istraživana je ovisnost reakcijske brzine o koncentraciji supstrata i linearnom regresijom su procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara, Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) i maksimalna brzina reakcije ( $V_m$ ) za katehol i one iznose:  $K_m = 0,348 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $V_m = 0,654 \text{ U mg}^{-1}$ .

Oksidacija katehola katalizirana komercijalnom lakazom i sirovim ekstraktom lakaze uspješno je provedena u šaržnim i repetitivnim šaržnim uvjetima u kotlastom reaktoru.

U kotlastom reaktoru je nakon 300 minuta ostvarena 96,9 %-tna konverzija katehola katalizirana komercijalnom lakazom i 62,2 %-tna konverzija katehola katalizirana sirovim ekstraktom lakaze.

Dokazano je da se lakaza može uspješno, bez gubitka aktivnosti, koristiti tijekom 9 sati provedbe reakcije oksidacije katalizirane komercijalnom lakazom i sirovim ekstraktom lakaze u repetitivnim šaržnim uvjetima (3 ciklusa).

U mikroreaktoru, oksidacijom katehola komercijalnom lakazom postignuta je konverzija od 44,13 % nakon 71,4 minute zadržavanja.

Nastali produkt poli(katehol) izdvojen je postupkom filtracije.

## **6. LITERATURA**

- Aktas N., Sahiner N., Kantoglu O., Salih B., Tanyolac A. "Biosynthesis and Characterization of Laccase Catalyzed Poly(Catechol)" *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 11, no. 3, 2003
- Aktaş N., Tanyolaç A. "Kinetics of Laccase-Catalyzed Oxidative Polymerization of Catechol." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22, no. 1–2: 61–69, 2003
- Aktas N., Tanyolac A. "Reaction Conditions for Laccase Catalyzed Polymerization of Catechol." *Bioresource Technology* 87, no. 3: 209–214, 2003
- Aranda E, Marco-Urrea E., Caminal G., Arias M. E., García-Romera I., Guillén F. "Advanced Oxidation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene Isomers (BTEX) by *Trametes Versicolor*." *Journal of Hazardous Materials* 181, no. 1–3: 181–186, 2010
- Asgher, M., Noreen, S., Iqbal, H.M.N. „Investigation of the potential of a fungal coculture for bioremediation of textile industry effluents.“ *Fresen. Environ. Bull.* 21, 1864-1872, 2012
- Baldrian P. "Fungal laccases- occurrence and properties." *FEMS Microbial Rev* 30, 215-242, 2006
- Bastos A. C., Magan N. "*Trametes Versicolor*: Potential for Atrazine Bioremediation in Calcareous Clay Soil, under Low Water Availability Conditions." *International Biodeterioration & Biodegradation* 63, no. 4: 389–394, 2009
- Blagodatski A., Yatsunskaya M., Mikhailova V., Tiasto V., Kagansky A., Katanaev V. L. "Medicinal Mushrooms as an Attractive New Source of Natural Compounds for Future Cancer Therapy." *Oncotarget* 9, no. 49: 29259–29274, 2018
- Bregović V.: Oksidacija katehola u mikroreaktoru slobodnom i imobiliziranom lakazom. Diplomski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb, 2011
- Cui J., Chisti Y. "Polysaccharopeptides of *Coriolus Versicolor*: Physiological Activity, Uses, and Production." *Biotechnology Advances* 21, no. 2: 109–122, 2003
- Daâssi D., Rodríguez-Couto S., Nasri M., Mechichi T. "Biodegradation of Textile Dyes by Immobilized Laccase from *Coriolopsis Gallica* into Ca-Alginate Beads." *International Biodeterioration & Biodegradation* 90: 71–78, 2014
- Desai, S. S., Nityanand, C. „ Microbial laccases and their applications: a review.“ *Asian J. Biotechnol.* 3, 98-124., 2011
- Di Fusco M., Tortolini C., Deriu D., Mazzei F. "Laccase-Based Biosensor for the Determination of Polyphenol Index in Wine." *Talanta* 81, no. 1–2: 235–240, 2010
- Dropulja I.: Oksidacija fenolnih spojeva katalizirana vlastito proizvedenom lakazom iz *Trametes versicolor*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2010



- Dubey S., Singh D., Misra R.A. „ Enzymatic synthesis and various properties of poy(catechol)“  
Enzyme and Microbial Technology, no.23:432-437,1998
- Dwivedi U. N., Singh P., Pandey V. P., Kumar A. “Structure–Function Relationship among  
Bacterial, Fungal and Plant Laccases.” Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 68,  
no. 2: 117–128, 2011
- Đukić I.: Biotransformacija katehola u mikroreaktoru katalizirana lakazom. Diplomski rad.  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb, 2012
- Findrik Z., Vrsalović Presečki A., Vasić-Rački Đ. “Mathematical Modeling of Maltose  
Hydrolysis in Different Types of Reactor.” Bioprocess and Biosystems Engineering 33,  
no. 3: 299–307, 2010
- Gianfreda L., Sannino F., Rao M. A., Bollag J. M. “Oxidative Transformation of Phenols in  
Aqueous Mixtures.” Water Research 37, no. 13: 3205–3215, 2003
- Givaudan A., Effosse A., Faure D., Potier P., Bouillant M. L., Bally R. “Polyphenol Oxidase in  
*Azospirillum Lipoferum* Isolated from Rice Rhizosphere: Evidence for Laccase Activity  
in Non-Motile Strains of *Azospirillum Lipoferum*.” FEMS Microbiology Letters 108, no.  
2: 205–210, 1993
- Gomzi Z.: Kemijski reaktori. Hinus d.o.o., Zagreb, 1998
- Held, C., Kandelbauer A., Schroeder M., Cavaco-Paulo A., Guebitz G. M. “Biotransformation  
of Phenolics with Laccase Containing Bacterial Spores.” Environmental Chemistry  
Letters 3, no. 2: 74–77, 2005
- Hsu C., Wen T., Su Y., Jiang Z., Chen C., Shyur L. “Biological Degradation of Anthroquinone  
and Azo Dyes by a Novel Laccase from *Lentinus Sp.*” Environmental Science &  
Technology 46, no. 9: 5109-5117, 2012
- <https://www.tonicherbsamsterdam.com/product/trametes-versicolor-coriolus-versicolor/>
- Hu X., Wang P., Hwang H. “Oxidation of Anthracene by Immobilized Laccase from *Trametes  
Versicolor*.” Bioresource Technology 100, no. 21: 4963–4968, 2009
- Janjušević Lj., Karaman M., Šibul F., Tommonaro G., Iodice C., Jakovljević D., Pejin B. “The  
Lignicolous Fungus *Trametes Versicolor* (L.) Lloyd (1920): A Promising Natural Source  
of Antiradical and AChE Inhibitory Agents.” Journal of Enzyme Inhibition and  
Medicinal Chemistry 32, no. 1: 355–362, 2017
- Kunamneni A., Camarero S., García-Burgos C., Plou F. J., Ballesteros A., Alcalde M.  
“Engineering and Applications of Fungal Laccases for Organic Synthesis.” Microbial  
Cell Factories 7, no. 1: 32, 2008
- Lizardi-Jimenez M. A., Hernandez-Martinez R. “Solid State Fermentation (SSF): Diversity of  
Applications to Valorize Waste and Biomass.” 3 Biotech 7, no. 1: 44, 2017

- Lizardi-Jiménez M. A., Hernández-Martínez R. "Solid State Fermentation (SSF): Diversity of Applications to Valorize Waste and Biomass." 3 Biotech 7, no. 1: 44, 2017
- Ma H. L., Kermasha S., Gao J. M., Morales Borges R., Yu X. "Laccase-Catalyzed Oxidation of Phenolic Compounds in Organic Media." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 57, no. 1–4: 89–95, 2009
- Madhavia V., Lele S. S. "Laccase: Properties and Applications." BioResources 4, no. 4: 1694–1717, 2009
- Marić V., Šantek B.: Biokemijsko inženjerstvo. Golden marketing-Tehnička knjiga, Zagreb, 2009
- Maruyama T., Uchida J., Ohkawa T., Futami T., Katayama K., Nishizawa K., Sotowa K., Kubota F., Kamiya N., Goto M. "Enzymatic Degradation of *P*-Chlorophenol in a Two-Phase Flow Microchannel System." Lab on a Chip 3, no. 4: 308, 2003
- Mateša L.: Sinteza cijanoalkohola katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom. Diplomski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb, Zagreb, 2021
- McMahon A. M., Doyle E. M., Brooks S., O'Connor K. E. "Biochemical Characterisation of the Coexisting Tyrosinase and Laccase in the Soil *Bacterium Pseudomonas Putida* F6." Enzyme and Microbial Technology 40, no. 5: 1435–1441, 2007
- Michałowicz, J. Duda W. "Phenols – Sources and Toxicity," Polish J. of Environ. Stud. Vol. 16, no. 3: 347-362, 2007
- Milivojević M. M., Đorđević V. B., Bugarski B. M.: Bioproceno inženjerstvo. Akademski misao, Beograd, 2013
- Minussi R. C., Rossi M., Bologna L., Rotilio D, Pastore G. M., Duran N. "Phenols Removal in Musts: Strategy for Wine Stabilization by Laccase." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 45, no. 3–4: 102–7, 2007
- Munteanu F. D., Cavaco-Paulo A. "Biosensors Based on Laccase for Detection of Commercially Reactive Dyes." Analytical Letters 43, no. 7–8: 1126–31, 2010
- Ostojčić M.: Sinteza biodizela u mikrokorektorima upotrebom komercijalne i nepročišćene lipaze porijeklom iz *Thermomyces lanuginosus*. Diplomski rad. Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek, 2018
- Perešin A.: Enzimatska sinteza 6-cijano-4-ketoheksan kiseline. Diplomski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb, Zagreb, 2017
- Portaccio M., Di Martino S., Maiuri P. D., De Luca D. P., Lepore M., Bencivenga U., Rossi S., De Maio A., Mita D. G. "Biosensors for Phenolic Compounds: The Catechol as a Substrate Model." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 41, no. 3–4: 97–102, 2006

- Portaccio M., Martino S. D., Maiuri P., Durante D., De Luca P., Lepore M., Bencivenga U., Rossi S., De Maio A., Mita D. G. "Biosensors for Phenolic Compounds: The Catechol as a Substrate Model." *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 41, no. 3–4: 97–102, 2006
- Rispail N., Morris P., Webb K. J. "Phenolic Compounds: Extraction and Analysis." In *Lotus Japonicus Handbook*, edited by Antonio J. Márquez, 349–54. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005
- Rodríguez-Rodríguez C. E., Barón E., Gago-Ferrero P., Jelić A., Llorca M., Farré M., Díaz-Cruz M. S., et al. "Removal of Pharmaceuticals, Polybrominated Flame Retardants and UV-Filters from Sludge by the Fungus *Trametes Versicolor* in Bioslurry Reactor." *Journal of Hazardous Materials* 233–234: 235–243, 2012
- Rosconi F., Fraguas L. F., Martínez-Drets G., Castro-Sowinski S. "Purification and Characterization of a Periplasmic Laccase Produced by *Sinorhizobium Meliloti*." *Enzyme and Microbial Technology* 36, no. 5–6: 800–807, 2005
- Schweigert N., Zehnder A. J. B., Eggen R. "Chemical Properties of Catechols and Their Molecular Modes of Toxic Action in Cells, from Microorganisms to Mammals: Minireview." *Environmental Microbiology* 3, no. 2: 81–91, 2001
- Sharma P., Goel R., Capalash N. "*Bacterial Laccases*." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, no. 6: 823–832, 2007
- Singh A, Kuhad R C, Ward O P: *Advances in Applied Bioremediation*. Springer, New York, 2009.
- Šalić, A., Tušek, A., Kurtanjek, Ž., Zelić, B. *Mikroreaktori*. *Kem. Ind.* 59, 227–248, 2010
- Švarc A.: *Biocatalytic synthesis of statin side-chain precursors*. Doktorski rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb, Zagreb, 2020
- Tišma M.: *Oksidacija fenolnih spojeva lakazom iz *Trametes versicolor* u različitim tipovima reaktora*. Magistarski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb, 2008
- Tišma, M., Zelić, B., Vasić-Rački, Đ., Žnidaršič-Plazl, P., Plazl, I. (2010a) Laccase-catalyzed L-DOPA oxidation on macro and microreactor Scale, 6th World Congress on Oxidation Catalysis, Lile, Francuska, 5-10, 2009.
- Tušek Jurinjak A. *Razvoj procesa biotransformacije katehola u mikroreaktoru*. Doktorski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Zagreb, Zagreb, 2013
- Tušek Jurinjak A., Šalić A., Zelić B. "Catechol Removal from Aqueous Media Using Laccase Immobilized in Different Macro- and Microreactor Systems." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 182, no. 4: 1575–1590, 2017
- Tušek Jurinjak A., Šalić A., Zelić B. "Mathematical Modelling of Polyphenol Extraction by Aqueous Two-Phase System in Continuously Operated Macro- and Micro-Extractors." *Separation Science and Technology* 52, no. 5: 864–875, 2017

- Tušek Jurinjak A., Tišma M., Bregović V., Ptičar A., Kurtanjek Ž., Zelić B.. "Enhancement of Phenolic Compounds Oxidation Using Laccase from *Trametes Versicolor* in a Microreactor." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 18, no. 4: 686–696, 2013
- Vasić-Rački Đ., Findrik Z., Vrsalović Presečki A. "Modelling as a Tool of Enzyme Reaction Engineering for Enzyme Reactor Development." *Applied Microbiology and Biotechnology* 91, no. 4: 845–856, 2011
- Visković K.: Utjecaj kalcijevih iona na stabilizaciju  $\alpha$ -amilaze pri hidrolizi škroba. Znanstveni rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb, Zagreb, 2009
- Vojtkuf K.: Matematičko modeliranje biokatalitičkih reakcija. Završni rad. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Zagreb, Zagreb, 2023
- Wang C. L., Zhao M., Lu L., Wei X., Li T. "Characterization of Spore Laccase from *Bacillus Subtilis* WD23 and Its Use in Dye Decolorization," *African Journal of Biotechnology* 10, no. 11: 2186-2192, 2011
- Webster J., Weber R.. *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press, 2007.
- Yaropolov A. I., Skorobogat' V. K., Vartanov S. S. "Properties, Catalytic .Mechanism, and Applicability." *Applied Biochemistry and Biotechnology* 49, 1994.
- Zeko-Pivač A., Bošnjaković A., Planinić M., Parlov Vuković J., Novak P., Jednačak T., Tišma M. "Improvement of the Nutraceutical Profile of Brewer's Spent Grain after Treatment with *Trametes Versicolor*." *Microorganisms* 10, no. 11: 2295, 2022