

# Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u različitim reaktorskim sustavima

---

Šimunović, Roberto

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:109:626325>

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

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

REPOZITORIJ

PTF OS

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

dabar  
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Roberto Šimunović**

**OKSIDACIJA GALNE KISELINE KATALIZIRANA LAKAZOM U  
RAZLIČITIM REAKTORSKIM SUSTAVIMA**

**DIPLOMSKI RAD**

Osijek, rujan 2019.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Kemijski i biokemijski reaktori

**Tema rada** je prihvaćena na VII. sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 25. 4. 2019.  
**Mentor:** izv. prof. dr.sc. Marina Tišma  
**Pomoć pri izradi:** Marta Ostojčić, mag. ing. proc., asistent

### OKSIDACIJA GALNE KISELINE KATALIZIRANA LAKAZOM U RAZLIČITIM REAKTORSKIM SUSTAVIMA Roberto Šimunović

#### Sažetak

Galna kiselina je netoksičan i u prirodi široko raspostranjen fenolni spoj. U bioprocima kataliziranima lakazom može se koristiti kao supstrat za proizvodnju polikonjugiranih poluvodičkih polimera te u proizvodnji boja. U ovom radu istraživana je oksidacije galne kiseline katalizirana lakazom u različitim vrstama reaktora. Eksperimenti provedeni su u kotlastom reaktoru koristeći različite početne koncentracije galne kiseline, lakaze i kisika, te u ponovljivim šaržnim uvjetima (6 ciklusa). Reakcija je također istraživana u staklenom mikroreaktoru s ulaznim kanalima Y-oblika, unutarnjeg volumena 9,5  $\mu\text{L}$  i u mikroreaktoru s ugrađenim mikromikserom volumena 2  $\mu\text{L}$ . Lakaza je kontinuiranim protokom ulazila na jedan, a galna kiselina na drugi ulaz u mikrokanal. Ispitivana su različita vremena zadržavanja (konstantni volumni protoci od 10, 30 i 50  $\mu\text{L}$  / min), te različite koncentracije galne kiseline i lakaze. Na osnovu dobivenih rezultata pokazano je da lakaza ima visoku operativnu stabilnost u svim reaktorskim uvjetima. Nadalje, potvrđeno je da dolazi do inhibicije supstratom i da kisik nije limitirajući reaktant. U šaržnom reaktoru postignuta je 98% konverzija nakon 40 min (0,1 mg / mL lakaze, 0,1 mM galne kiseline). Vrijeme potrebno da se postigne ista konverzija smanjeno je na samo 15 min kada je koncentracija lakaze povećana pet puta. Značajno poboljšanje postignuto je u mikroreaktoru pri čemu je 44% konverzija galne kiseline postignuta nakon 29 s (0,1 mg/mL lakaze, 0,1 mM galne kiseline). Povećanjem koncentracije lakaze za 5 puta postignute su konverzije i do 99 %.

**Glavne riječi:** galna kiselina, lakaza, oksidacija, mikroreaktor, šaržni reaktor

*Ovaj rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije“ (POPI-WinCEco)(IP-2018-01-1227)*

**Rad sadrži:** Slika: 35  
Stranica: 50  
Tablica : 6  
Literarnih referenci: 22

**Jezik izvornika:** hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

1. predsjednik prof. dr. sc. Mirela Planinić
2. član-mentor izv. prof. dr. sc. Marina Tišma
3. član prof. dr. sc. Ana Bucić-Kojić
4. zamjena člana izv. prof. dr. sc. Sandra Budžaki

**Datum obrane:** 24. rujna, 2019.

**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 Thermodynamic and Reaction Engineering  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**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. VII held on April 25, 2019.  
**Mentor:** *Marina Tišma*, PhD, assoc. prof.  
**Technical assistance:** *Marta Ostožić*, mag. ing. proc. assistant

### Oxidation of Gallic Acid Catalyzed by Laccase in Different Reactors

*Roberto Šimunović*

#### Summary:

Gallic acid is a non-toxic and naturally abundant phenolic compound. It can be used as a substrate for the production of polyconjugated semiconducting polymers and dyes in laccase-catalyzed bioprocess. In this work the study of laccase-catalyzed oxidation of gallic acid in different reactor types was performed. Initial experiments were performed in a batch reactor using different initial concentrations of gallic acid, laccase and oxygen and in repetitive cycles experiments (6 cycles). The reaction was then investigated in a Y shaped glass microreactor with internal volume of 9.5  $\mu\text{L}$  and microreactor with micromixer with initial volume of 2  $\mu\text{L}$ . Laccase was fed from one inlet while gallic acid was fed from the other inlet. Different residence time (constant flow rates of 10, 30 and 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), gallic acid and laccase concentrations were tested. Results have shown that laccase has high operational stability at all reactor conditions. Furthermore, it was confirmed that substrate inhibition occurs and oxygen is not a rate-limiting reactant. In a batch reactor, a 98% conversion was reached after 40 min (0.1 mg/mL laccase, 0.1 mM gallic acid). The conversion time was reduced to solely 15 min when the laccase was increased five fold. Significant conversion improvements were obtained in the microreactor with 44% conversion of gallic acid just after 29 s (0.1 mg/mL laccase, 0.1 mM gallic acid). Higher conversion, up to 99%, were obtained when the laccase was increased five fold.

**Key words:** galic acid, laccase, oxidation, microreactor, batch reactor

*Graduate thesis was supported by the Croatian Science Foundation under the project "Development of a sustainable integrated process for the production of bioactive isolates from food industry residues" (POPI-WinCEco) (IP-2018-01-1227)*

**Thesis contains:** Figures: 35  
Pages: 50  
Tables: 6  
References: 22

**Original in:** Croatian

**Defense committee:**

1.	<i>Mirela Planinić</i> , PhD, full prof.	chair person
2.	<i>Marina Tišma</i> , PhD, associate prof.	supervisor
3.	<i>Ana Bucić-Kojić</i> , PhD, full prof.	member
4.	<i>Sandra Budžaki</i> , PhD, associate prof.	stand-in

**Defense date:** September 24, 2019

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

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Enzimski katalizirani procesi u kotlastom reaktoru .....</b>	<b>4</b>
2.1.2. Općenito o kotlastom reaktoru .....	4
2.1.3. Prednosti i nedostaci kotlastog reaktora.....	5
<b>2.2. Enzimski katalizirani procesi u mikroreaktorima .....</b>	<b>7</b>
2.2.1. Općenito o mikroreaktorima .....	7
2.2.2. Prednosti mikroreaktora .....	8
2.2.3. Podjela mikroreaktora .....	9
2.2.4. Struktura, izvedba i svojstva mikroreaktora .....	9
2.2.5. Uvećanje procesa kod mikroreaktora .....	11
<b>2.3. Galna kiselina .....</b>	<b>12</b>
<b>2.4. Lakaze .....</b>	<b>14</b>
<b>2.5. Oksidacija fenolnih spojeva katalizirana lakazom .....</b>	<b>16</b>
<b>2.6. Osnovne karakteristike polimera topivih u vodi .....</b>	<b>16</b>
2.6.1. Polimerni materijali.....	16
2.6.2. Polimeri topivi u vodi .....	18
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Zadatak .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. Materijali i metode .....</b>	<b>21</b>
3.2.1. Popis kemikalija.....	21
3.2.2. Aparatura .....	21
3.2.3. Metode.....	24

3.2.4. Analitičke metode .....	29
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
4.1. Rezultati istraživanja kinetike oksidacije galne kiseline lakazom metodom početnih brzina.....	32
4.2. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u kotlastom reaktoru s aeracijom i bez dodatne aeracije .....	32
4.3. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u reaktoru s prihranjivanjem .....	34
4.4. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u mikroreaktoru .....	35
4.5. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u mikroreaktoru s mikromikserom .	39
4.6. Istraživanje stabilnosti otopine galne kiseline pri različitim temperaturama skladištenja .....	43
4.7. Istraživanje stabilnosti enzima lakaza pri različitim temperaturama skladištenja ...	45
<b>5. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>47</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>49</b>

## Popis kratica, simbola i oznaka

### OZNAKE:

$c$	množinska koncentracija tvari (mM)
$d$	promjer kivete (cm)
Fr	Froudeova značajka
$n$	broj okretaja (okr min <sup>-1</sup> )
$n$	broj molova tvari (mol)
Nu	Nusseltova značajka
Pr	Prandtlova značajka
$r_s$	brzina reakcije (U mL <sup>-1</sup> )
Re	Reynoldsova značajka
$t$	vrijeme (min)
$T$	temperatura (°C)
V.A.	volumna aktivnost enzima (U cm <sup>-3</sup> )
$V_r$	reakcijski volumen (cm <sup>3</sup> )
$V_E$	volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm <sup>3</sup> )
$\gamma_E$	masena koncentracija enzima (mg cm <sup>-3</sup> )
$\tau$	vrijeme zadržavanja (s)
$\nu$	volumni protok (μL min <sup>-1</sup> )
$\Delta A/\Delta t$	promjena apsorbancije u vremenu (min <sup>-1</sup> )

KRATICE:

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)
HAA	3-hidroksiantranilat
HBT	1-hidroksibenzotriazol
SCI-RED	obojeni produkt oksidacije $\alpha$ -naftola katalizirane lakazom
U	međunarodna jedinica enzimске aktivnosti ( $\mu\text{mol min}^{-1}$ )

SIMBOLI:

$\Delta$	promjena
$\lambda$	valna duljina (nm)
$\epsilon$	ekstincijski koeficijent ( $\text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).



*Zahvaljujem se mojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Marini Tišmi na posvećenom vremenu, poticanju i brojnim savjetima tijekom izrade ovog diplomskog rada. Veliko hvala na pristupačnosti i strpljenju u svakom trenutku.*

*Zahvaljujem se asistenticama Gordani Šelo mag. ing. proc. i Marti Ostožić mag. ing. proc. na izdvojenom vremenu i pomoći tijekom rada u laboratoriju.*

*Hvala svim mojim prijateljima i prijateljicama na podršci i ohrabrenju.*

*Posebna zahvala mojim roditeljima, bratu i ostaloj obitelji koji su mi uvijek bili bezuvjetna potpora i pomoć tijekom cijelog studija te su mi omogućili da ostvarim svoj cilj.*

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Razvoj održivog integriranog procesa proizvodnje biološki aktivnih izolata iz proizvodnih ostataka prehrambene industrije“ (POPI-WinCEco)  
(IP-2018-01-1227)

## **1. UVOD**

Galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) je niskomolekularni polifenol koji pripada skupini fenolnih kiselina. Jaki je antioksidans te ima široku primjenu u zaštiti od oksidativnih oštećenja. Planarna je molekula koju čine aromatski prsten, tri hidroksilne skupine i karboksilna skupina gdje su hidroksilne skupine, jedna u odnosu na drugu, na aromatskom prstenu vezane u orto položaju.

Lakaze su enzimi koji pripadaju u skupinu oksidoreduktaza. U svom katalitičkom centru sadrže atome bakra te prema tome pripadaju metaloenzimima. Jedni su od najpoznatijih industrijskih biokatalizatora, a najpoznatiji izvor lakaza su gljive bijelog truljenja, primjerice *Trametes versicolor*. Za katalitičko djelovanje im je potreban samo kisik iz zraka pri čemu kao jedini nusprodukt nastaje voda. Uzimajući u obzir kemijsku strukturu galne kiseline i činjenicu da lakaze mogu oksidirati fenolne spojeve, galna kiselina je dobar supstrat za enzim lakazu. Prema literaturi, produkt oksidacije galne kiseline kataliziran lakazom je poligalat.

Enzimski katalizirani procesi s ciljem proizvodnje industrijski važnih produkata u industriji se najčešće provode u šaržnim uvjetima, no u novije vrijeme, sve se više teži upotrebi mikoreaktora. Mikoreaktori su sustavi malih dimenzija napravljeni tehnikama mikroinženjerstva i mikrotehnologije. Čini ih mreža mikrokanala, reda veličine od 10  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$ , urezanih u čvrstu pločicu napravljenju od različitih materijala. Najveća prednost mikoreaktora je, osim postizanja većih brzina reakcija, što se tijekom provedbe procesa koriste iznimno male količine kemikalija, što utječe na smanjenje ukupnih troškova, ali i redukciju otpadnih struja procesa.

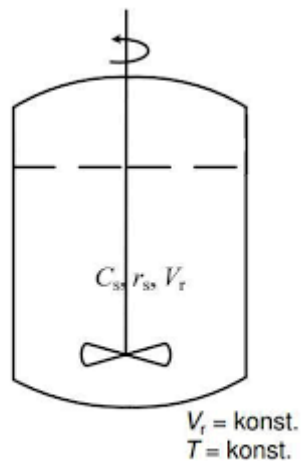
Zadatak ovog rada bio je provesti oksidaciju galne kiseline kataliziranu lakazom u kotlastom reaktoru s mješalom volumena 50  $\text{cm}^3$  u šaržnim i ponovljivim šaržnim uvjetima, te u mikoreaktoru volumena 9,5  $\mu\text{L}$  i u mikoreaktoru s ugrađenim mikromikserom volumena 2  $\mu\text{L}$ .

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Enzimski katalizirani procesi u kotlastom reaktoru

### 2.1.2. Općenito o kotlastom reaktoru

Idealni kotlasti reaktor (**Slika 1**) pripada zatvorenim sustavima reaktora u kojima tijekom reakcije nema izmjene tvari s okolinom. Najčešće je izveden u obliku zatvorenog kotla opremljen miješalicom čime se postiže idealno miješanje odnosno homogenost sustava. Ovisnost veličina stanja (sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije, količina oslobođene ili utrošene energije) o vremenu je jedna od karakteristika idealnog kotlastog reaktora. Unutar reaktora, temperatura i volumen reakcijske smjese (3/4 ukupnog volumena reaktora) su stalni i nezavisni o vremenu. Ovaj tip reaktora se primjenjuje u istraživanjima kinetike reakcije u homogenim sustavima, najčešće u kapljevitoj fazi.



Slika 1 Shema kotlastog reaktora za provedbu enzimski kataliziranih reakcija ( $c_s$  – koncentracija supstrata,  $r_s$  – reakcijska brzina,  $V_r$  – reakcijski volumen) (Tišma, 2016.)

Pretpostavke za postavljanje matematičkog modela procesa su da je u reaktoru ostvareno idealno miješanje, da su sve veličine stanja zavise o vremenu i da nema promjene volumena reakcijske smjese. Matematički model reaktora općenito se sastoji od bilance tvari i izraza za brzinu reakcije. Bilanca supstrata u kotlastom reaktoru definirana je slijedećom jednačinom:

$$(-r_s) \cdot V = -\frac{\Delta n_s}{\Delta t}$$

U kotlastom reaktoru u kojem sudjeluje jedan supstrat i nastaje jedan produkt, uz pretpostavku da reaktanti nestaju brzinom reakcije  $r_s$  kojom produkt ujedno nastaje, bilanca tvari se opisuje slijedećim jednadžbama:

$$\frac{\Delta c_s}{\Delta t} = -r_s$$

$$\frac{\Delta c_p}{\Delta t} = r_s$$

### 2.1.3. Prednosti i nedostaci kotlastog reaktora

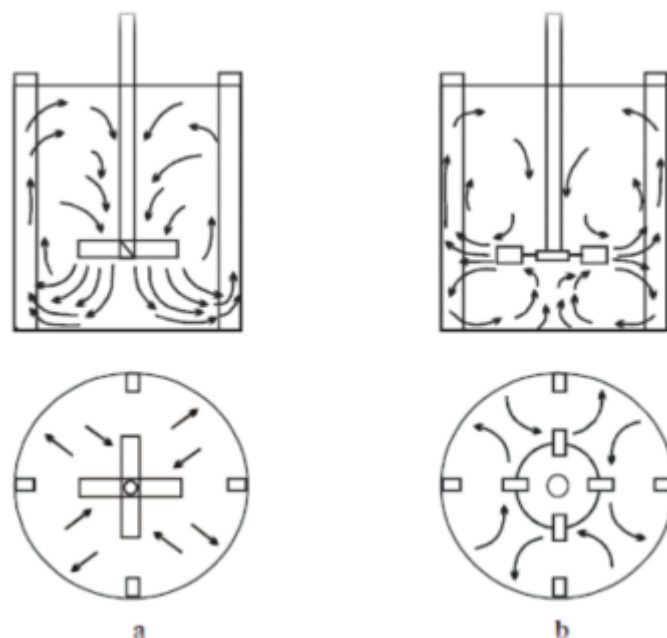
Izbor pogodnog reaktora za provođenje reakcije ovisi o mnogo čimbenika kao što su kapacitet proizvodnje, cijena sirovine, ekološki zahtjevi, investicijski troškovi, a najviše o vrsti kemijske reakcije koja se provodi. Kako bi se pravilno odabrao reaktor potrebno je što detaljnije poznavati fizičke i kemijske osobine reakcija, od kojih su najvažnije:

- a) kemizam reakcije: osnovne informacije o samoj reakciji, reaktantima i produktima, mehanizmu reakcije i procesnim uvjetima;
- b) termodinamika reakcije: reakcijska entalpija, konstante ravnoteže za povratne reakcije i ravnotežne i adijabatske konverzije te njihove ovisnosti o temperaturi i tlaku;
- c) podaci o kinetici reakcije: izrazito je važno poznavati kinetički model i vrijednosti kinetičkih konstanti;
- d) podaci o fizičkim svojstvima sudionika u reakciji: osnovne fizičke značajke (gustoća, viskoznost, toplinski kapacitet itd.), svojstva fluida i sustava kao cjeline (bezdimenzijske značajke, Re, Nu, Pr, Fr itd.), definiranje prijenosa tvari i topline (koeficijenti prijenosa tvari i difuzije, koeficijenti toplinske vodljivosti i prijenosa topline, itd.);
- e) podaci o katalizatorima: gustoća katalizatora, poroznost, raspodjela veličina pora, aktivna površina, selektivnost, sastav, mehaničke karakteristike, itd.

Jedna od prednosti kotlastog reaktora je prilagodljivost promjeni reakcijskih uvjeta što znači da se dodavanje reaktanata može jednostavno količinski i vremenski programirati, temperatura se može lako programirati tako da bude optimalna tijekom reakcije s obzirom na selektivnost jednog produkta, a vrijeme trajanja reakcije moguće je po potrebi skratiti.

Također, još jedna prednost kotlastog reaktora je mogućnost dobre i jednolične suspenzije vrlo sitnih čestica katalizatora u kapljevitoj fazi čime se postiže dobar kontakt s reaktantima i postiže se velika aktivna površina.

Najvažnija osobina kotlastog reaktora je postizanje homogenosti reakcijske smjese odgovarajućim mješalom. S obzirom na reaktorski prostor, dobrim miješanjem uz homogenost sastava se postiže i izoternost sustava. Da bi se postiglo dobro miješanje potrebno je odabrati odgovarajuće miješalo s odgovarajućim dimenzijama te ga pravilno smjestiti unutar reaktora. Postoji mnogo vrsta miješala, njihov izbor se često zasniva na kvalitativnim i iskustvenim pravilima. Najznačajnija miješala koja se koriste kod kemijski kataliziranih reakcija su turbinska i propelerska miješala. Najzastupljenija vrsta miješala za miješanje svih kapljevina i rijetkih suspenzija izuzev vrlo viskoznih sustava su turbinska, a najčešća su sa zakrivljenim ili ravnim lopaticama ili unutar kućišta. Upotrebom ove vrste miješala postiže se radijalno miješanje fluida (**Slika 2b**), za razliku od propelerskih miješala kojim se postiže aksijalno miješanje (**Slika 2a**) naročito ako su u reaktor ugrađene nepokretne lopatice. Propelerska miješala su pogodna za miješanje kapljevina s manjom viskoznošću.



Slika 2 Prikaz a) aksijalnog i b) radijalnog toka kapljevine u reaktoru (Bartolović, 2014.)

Uz ove dvije vrste miješala još se koriste i sidrasta miješala, lopatasta, pužna i zavojna miješala.

Kako bi se spriječilo nastajanje vrtloga ili rotacije cijele reakcijske smjese u reaktor se ugrađuju tzv. nepokretne lopatice. U manje posude se ugrađuje četiri, a u veće šest odbojnika.

Osim odabira samog miješala, na strujanje fluida unutar reaktora utječe i mjesto na kojemu se odabrano miješalo nalazi i mjesto ulaza reakcijske smjese. Kako bi se postiglo bolje miješanje ulaz materijala treba biti što bliže centru miješala (Gomzi, 2009.).

Sve karakteristike do sada napisane uglavnom se odnose na reaktore u kojima se provode kemijski katalizirani proces. Kada se u kotlastom reaktoru provode enzimski katalizirane reakcije, često se koristi terminologija „enzimski reaktor ili enzimski bioreaktor“.

Enzimi su biokatalizatori koji ubrzavaju biokemijske reakcije snižavanjem Gibbsove slobodne energije aktivacije. Prvi korak u enzimskoj katalizi je stvaranje enzim-supstrat kompleksa (ES) čime se stvara novi reakcijski put sa nižom energijom prijelaznog stanja od one kada se reakcija odvija bez enzima. Biokatalizatori ubrzavaju povratne (reverzibilne) reakcije, ali ne mijenjaju položaj ravnoteže reakcije.

Kriteriji za odabir adekvatnog bioreaktora za enzimski katalizirane procese su: tip reakcijskog medija, tip kinetike (s ili bez inhibicije, tip inhibicije i slično) i oblik biokatalizatora (slobodan ili imobiliziran). Osim kotlastog reaktora, za provedbu enzimski kataliziranih reakcija koriste se i protočno-kotlasti, kolonski s nepokretnim slojem, reaktor s membranskim modulom, reaktor s fluidiziranim slojem, kolonski reaktor s povratnim tokom, reaktor s membranskim modulom i povratnim tokom, protočno kotlasti reaktor s integriranom ultrafiltracijskom jedinicom, reaktor s ravnom ultrafiltracijskom membranom i reaktorska kaskada.

## **2.2. Enzimski katalizirani procesi u mikroreaktorima**

### **2.2.1. Općenito o mikroreaktorima**

Suvremena istraživanja u području mikrotehnologije i mikroinženjerstva usmjerena su ka razvoju novih i usavršavanju postojećih mikroreaktorskih sustava. Mikroreaktore čini mreža



mikrokanala, reda veličine od 10  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$ , urezanih u čvrstu pločicu koja može biti napravljena od različitih materijala. Mali promjer kanala omogućava laminarno strujanje kapljevine u mikrosustavu, što je jedna od prednosti mikroreaktora u odnosu na makrosustave. Dobar omjer volumena i međufazne površine reaktora omogućuje učinkovit prijenos tvari i topline. Zahvaljujući malim dimenzijama, koriste se male količine reaktanta i katalizatora. Zbog navedenih prednosti, otpadne procesne struje znatno su smanjene u odnosu na ostale reaktore. Smanjenjem veličine mikrosustava također se smanjuje potreba za velikim procesnim prostorima čime se povećava učinkovitost, produktivnost i sigurnost procesa. Povezivanjem procesnih jedinica (eng. numbering-up) pojednostavljen je prijenos u veće mjerilo (eng. scale-up), a time su i smanjeni troškovi projektiranja te vrijeme prijenosa u industrijsko mjerilo.

U današnje vrijeme postoje mikroreaktori u kojima je moguće u jednom mikrokanalu istovremeno provesti niz reakcija, separacija i analiza komponenata zbog čega postoje razlike u kemijskim i biokemijskim procesima između mikrosustava i velikih reakcijskih sustava. Zbog malog promjera kanala, uz veliki broj prednosti, mikrosustavi imaju niz nedostataka. Jedan od glavnih nedostataka je nemogućnost rada s viskozim i čvrstim komponentama koje dovode do začepjenja mikrokanala. Danas, još uvijek, se ne mogu upotrijebiti kao zamjena za sve reaktorske sustave (Šalić i sur., 2010.).

### **2.2.2. Prednosti mikroreaktora**

Osnovne razlike između mikroreaktora i ostalih klasičnih reaktora su:

1. Laminarno strujanje kapljevine u mikroreaktoru u odnosu na tok strujanja u makroskopskim reaktorima
2. U reakcijama gdje je prijenos tvari i topline važan čimbenik, mikroreaktori imaju prednost zbog kratkog puta prijenosa tvari i topline
3. Mikroreaktori imaju izrazito velik omjer površine i ukupnog volumena. Smanjenjem promjera reaktora omjer površine i volumena raste. Omjer površine i volumena za mikroreaktore je u rasponu veličina od  $10^3 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$  do  $10^5 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ , dok je ta vrijednost za makroskopske reaktore oko  $10^2 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ .
4. Veći utjecaj stijenke kanala na strujanje fluida nego kod makroskopskih reaktora

Prijenos tvari unutar mikroreaktora izrazito je bitan faktor zbog toga što brzina reakcije ne ovisi samo o koncentraciji reaktanata nego i o brzini prijenosa između faza, povratno miješanje se može umanjiti, a vrijeme zadržavanja precizno postaviti. Problem postavljanja procesnog modela mikrosustava znatno je olakšan laminarnim strujanjem kapljevine unutar mikrokanala. Smanjenjem promjera mikrokanala postaju važni drugi čimbenici: difuzija tvari, karakteristike površine stijenke mikrokanala i prijenos topline. Način strujanja ovisi o Reynoldsovoj konstanti koja ovisi o dimenzijama mikrokanala. Smanjenjem specifične dimenzije mikrokanala smanjuje se Reynoldsova značajka ( $Re$ ), a strujanje u reaktoru prelazi u laminarno (Šalić i sur., 2010.).

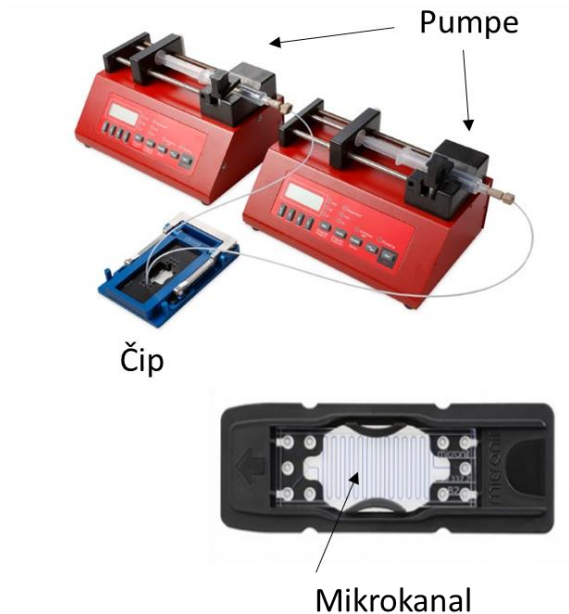
### **2.2.3. Podjela mikroreaktora**

Ovisno o vrsti reakcije mikroreaktore dijelimo u dvije skupine, one u kojima se odvijaju kemijske reakcije i one u kojima se provode biokemijske reakcije. Većina mikroreaktora je razvijena tako da udovoljava zahtjevima objema vrstama reakcija. Za provođenje biokemijskih reakcija najčešće se primjenjuju enzimski mikroreaktori u kojima je enzim najčešće imobiliziran na nosače ili na stijenke mikrokanala. Osim imobiliziranih enzima moguća je i primjena slobodnih, neimobiliziranih enzima. Ova vrsta enzimatskih mikroreaktora se može podijeliti u tri skupine, ovisno o funkciji koju obavljaju. Prvoj skupini pripadaju mikroreaktori koji se upotrebljavaju za kvantitativno i kvalitativno određivanje komponenata kompleksnih struktura što otežava njihovo analiziranje. Drugoj skupini pripadaju mikroreaktori namijenjeni procjeni kinetičkih parametara enzimskih procesa, a u treću mikroreaktori u kojima se provode enzimski katalizirani procesi (Šalić i sur., 2010.).

### **2.2.4. Struktura, izvedba i svojstva mikroreaktora**

Mikroreaktori su građeni od mikrokanala koji predstavljaju njegovu osnovnu strukturnu jedinicu. Dva su oblika mikrokanala: kružni ili pravokutni. Površina poprečnog presjeka mikrokanala je vrlo mala, a iznosi od nekoliko  $\mu\text{m}^2$  do nekoliko  $\text{mm}^2$ . Ovisno o kasnijoj primjeni, postoje različite tehnike izrade mikrokanala (mokra jetkanje, fotolitografija, lijevanje u kalupe). Hrapavost površine mikrokanala uvelike ovisi o primjenjenim tehnikama izrade i samom materijalu u koji se mikrokanal urezuje. Ovisno o hrapavosti površine, za istu brzinu strujanja, mogu nastati različiti oblici strujanja fluida što direktno utječe na

karakteristike provedenog procesa (Šalić i sur., 2010.). Na **Slici 3** je dan prikaz jednog mikroreaktorskog sustava.



Slika 3 Osnovne strukturne jedinice mikroreaktorskog sustava: mikrokanal, čip i pumpe

Pravokutne pločice, u koje se urezuju mikrokanali, nazivaju se elementi mikroreaktora koji mogu biti izvedeni s nekoliko ulaznih/izlaznih procesnih tokova. Njihovo spajanje/razdvajanje u zajedničke/odvojene tokove se provodi pomoću "Y" ili "T"-spojnica. Element mikrokanala ugrađuje se u kućište opremljeno otvorima za spajanje vanjskih cijevi s mikrokanalom. Ovako spojeni elementi tvore mikroreaktorski čip. Ovim spajanjem povećava se stabilnost sustava, omogućava se jednostavno i sigurno spajanje elemenata s pumpama za dovod fluida te spajanje dvaju ili više elemenata serijski ili paralelno. Više se čipova međusobno može povezati u ćeliju s ciljem povećanja ukupnog protoka i učinkovitosti mikroreaktorskog sustava. Pri tome se često, primjerice u jednom čipu provodi miješanje procesnih struja, u drugom reakcija, u trećem separacija, u četvrtom koncentriranje, a peti čip služi kao detektor. Elemente je moguće povezati ili serijski ili paralelno stoga postoje mikroreaktori s više tisuća međusobno povezanih elemenata. Elementi i ćelije ne mogu samostalno djelovati stoga se povezuju s preciznim visokotlačnim pumpama (najčešće klipnim) i različitim detektorima (Šalić i sur., 2010.).

Mikroreaktori uz brojne prednosti imaju i niz nedostataka. Visoka cijena izrade, mali protok i izostanak smanjenja troškova pri uvećanju procesa neki su od nedostataka ovih sustava. Najveći nedostatak je činjenica da ne mogu zamijeniti sve postojeće industrijske sustave. Zbog malog promjera mikrokanala, pri radu s viskoznim i čvrstim sustavima može doći do njihovog začepljenja. Osim toga, kako bi se osigurao stabilan protok, potrebno je upotrijebiti pumpe bez pulsa ili s malim pulsom čija je cijena znatno visoka (Hajdari Gretić i sur., 2017.).

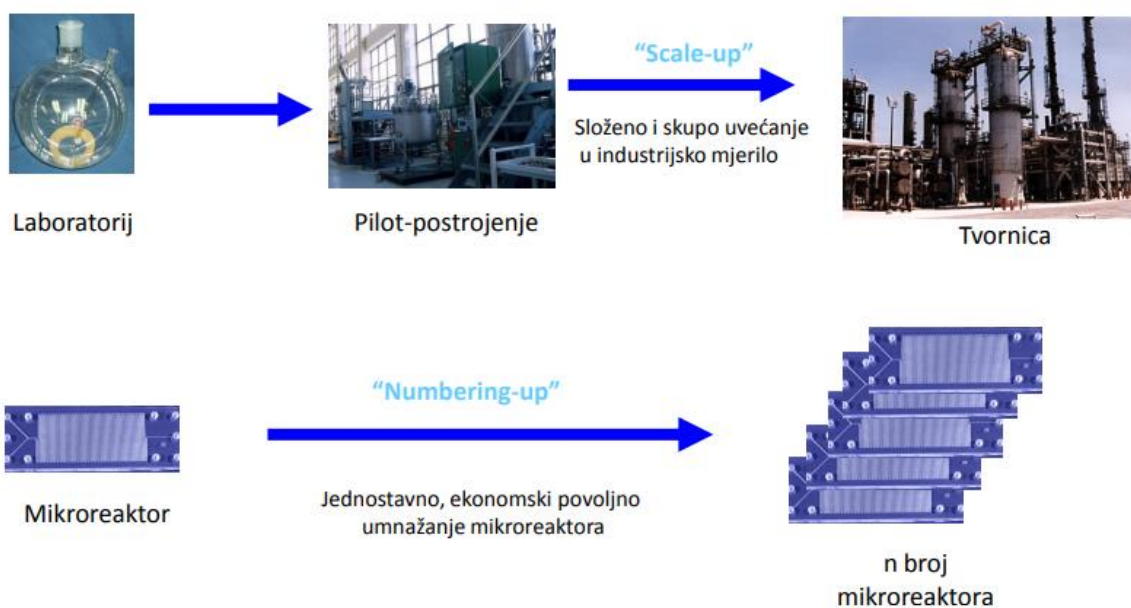
### **2.2.5. Uvećanje procesa kod mikroreaktora**

Postoje dva osnovna pristupa uvećanju procesa kod mikroreaktora:

1. Vanjsko povećanje broja strukturnih jedinica (eng. external numbering-up)
2. Unutarnje povećanje broja strukturnih jedinica (eng. internal numbering-up)

Paralelnim povezivanje više čipova s jednim elementom odnosi se na vanjsko povećanje, a unutarnje povećanje podrazumijeva serijsko povezivanje više elemenata unutar jednog čipa i uključuje jedan zajednički spremnik za produkt. Ograničen broj jedinica koje se mogu ugraditi na jedan čip glavni je nedostatak unutarnjeg povećanja. Takvo povezivanje elemenata uzrokuje izrazito veliki pad tlaka u sustavu. Iako vanjsko uvećanje zauzima više prostora i ekonomski je, zbog proizvodnje i utroška materijala za izradu čipova, manje isplativa, češće se primjenjuje nego unutarnje uvećanje (Šalić i sur., 2010.).

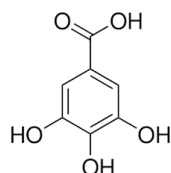
Usporedba procesa uvećanja mjerila za makro i mikro sustave, prikazana je na **Slici 4**.



Slika 4 Usporedba metodologije uvećanja procesa kod makrosustava i mikroreaktora (Tišma, 2008.)

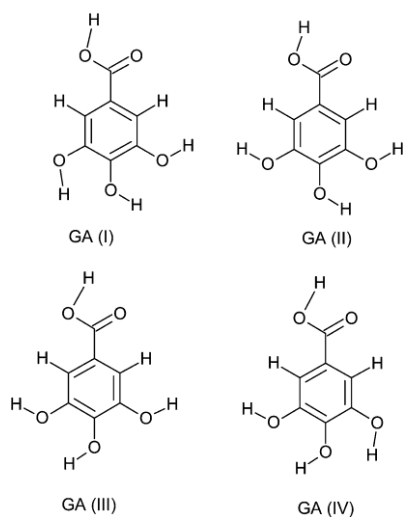
### 2.3. Galna kiselina

Galna kiselina (3,4,5-trihidroksibenzojeva kiselina) pripada skupini fenolnih kiselina, široko je rasprostranjena u prirodi, jaki je antioksidans te ima primjenu u zaštiti od oksidativnih oštećenja. Može se koristiti kao sredstvo protiv raka te posjeduje antigljivične, antibakterijske, antivirusne, antialergijske, antimelanogene, antituberkularne, antimutagene, anticelularne, imunomodulatorne aktivnosti. Prisutna je u mnogim biljkama te se u slobodnom obliku ili kao derivat može nalaziti u raznim izvorima hrane kao što su orašasti plodovi, čaj, grožđe, hrastova kora, med, različite bobice. U biljnom tkivu nalazi se u esterskom obliku te kao ester s glikozidima šećera, poliolima i fenolima. Na galnu kiselinu unutar biljnog tkiva mogu utjecati vanjski podražaji kao što su UV zračenje, kemijski stresori i mikrobnе infekcije. Zbog važnosti galne kiseline kao antioksidansa u hrani, kontrolom njene proizvodnje i akumulacije u biljkama može se povećati nutritivna vrijednost usjeva određenih vrsta (Badhani i sur., 2015.).



Slika 5 Molekulska struktura galne kiseline

Galna kiselina je planarna molekula koju čine aromatski prsten, tri hidroksilne skupine i karboksilna skupina (**Slika 5**). Jedna u odnosu na drugu, hidroksilne skupine su na aromatski prsten vezane u orto položaju. Ovisno o orijentaciji spojene karboksilne i hidroksilnih grupa, galna kiselina može imati brojne konformacije. Promatranjem kristalne strukture, ovisno o orijentaciji hidroksilne skupine oko prstena galne kiseline, ustanovljeno je da postoje četiri stabilne konformacije (**Slika 6**) od kojih je najstabilnija ona koja ima sva tri vodikova atoma hidroksilnih skupina orijentiranih u istom smjeru (**Slika 6 (I)**). Galna kiselina može tvoriti i intra (između hidroksilnih skupina) kao i intermolekularne vodikove veze. Molekularna struktura značajno utječe na antioksidativnu aktivnost fenolnih kiselina. Prema tome, nekoliko faktora kao što su broj i položaj hidroksilne skupine, prisutnost drugih funkcionalnih skupina i njihov položaj u odnosu na hidroksilne skupine utječu na antioksidativnu i antiradikalnu aktivnost (Badhani i sur., 2015.).



Slika 6 Konformacije galne kiseline (Badhani i sur., 2015.)

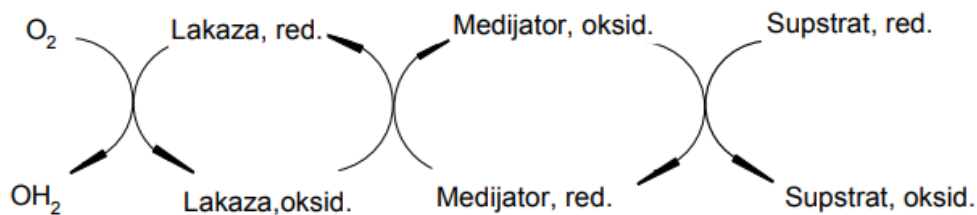
## 2.4. Lakaze

Lakaze (benzendiol: kisik oksidoreduktaze, EC 1.10.3.2.) su izvanstanični enzimi koji u svom katalitičkom centru sadrže više atoma bakra te prema tome pripadaju metaloenzimima (Nyanhongo i sur., 2007.). Pripadaju enzimskoj skupini oksidoreduktaza, a s obzirom na porijeklo mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: lakaze porijeklom iz viših biljaka i lakaze porijeklom iz gljiva. Raširenija i zastupljenija skupina enzima lakaze su porijeklom iz gljiva, najčešće iz gljiva bijelog truljenja, učinkovitih razgrađivača lignina (Riva, 2006.; Desai i Nityanand, 2011.). Osim iz ova dva izvora, izolirane su i okarakterizirane lakaze iz bakterija i kukaca (Singh i sur., 2009.; Desai i Nityanand, 2011.).

Lakaze pripadaju i skupini glikoproteina. Ugljikohidratna komponenta glikoproteina čini 10-45 % mase enzima što najvjerojatnije pridonosi stabilnosti samog proteina. Uključuje ugljikohidrate poput glukoze, fruktoze, galaktoze, manoze, arabinoze i heksozamina (Yaropolov i sur., 1994.).

Poznato je da lakaze sudjeluju u procesima nastajanja spora kod gljiva, tvorbi melanina, oksidaciji voća i povrća, u procesu sklerotizacije kod kukaca, zaštiti biljaka protiv kukaca i mikroorganizama. Sudjeluju u biosintezi i razgradnji lignina, pri čemu uglavnom oksidiraju fenolne podjedinice lignina.

Fenolne podjedinice lignina koje čine 10-15 % lignina moguće je razgraditi lakazom, dok im je za razgradnju nefenolnih spojeva i velikih molekula poput lignina potrebna pomoć nekih niskomolekularnih spojeva (medijatora) (**Slika 7**): 3-hidroksiantranilat (HAA), 1-hidroksibenzotriazol (HBT) i 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) (ABTS) (Kunamneni i sur., 2008.; Janeš, 2009.; Majeau i sur., 2010.; Desai i Nityanand, 2011.).



Slika 7 Katalitički ciklus lakaze – medijator oksidacijskog sustava (Kunamneni i sur., 2008.; Desai i Nityanand, 2011.; Tišma, 2008.)

Lakaze zbog svoje sposobnosti kataliziranja mnogo reakcija i ekološke prihvatljivosti imaju široku primjenu u industriji: u zaštiti okoliša (bioremedijacija), analitici, posebice u dijagnostici, industriji pulpe i papira, farmaciji, kozmetičkoj industriji, prehrambenoj te drugim industrijama. Uspješna primjena u spomenutim industrijama zahtijeva proizvodnju velikih količina lakaze. Optimizacijom uvjeta fermentacije nastoje se smanjiti troškovi proizvodnje lakaze što u industrijskoj primjeni predstavlja jedno od temeljnih istraživanja (Couto i Toca-Herrera, 2007.).

Procesi izbjeljivanja pulpe, upotrebom lakaze, u industriji pulpe i papira ekološki je prihvatljivije u odnosu na standardne procese izbjeljivanja pomoću kemikalija na bazi klora (Gadd, 2001.).

Zbog upotrebe kisika i svoje visoke katalitičke konstante primjenjuju se u enzimskim imuno testovima (EIA). U raznim industrijama poput industrije plastike, boja i lijekova te papira i pulpe, lakaze se koriste kao biosenzori za detekciju raznih fenolnih spojeva što je izrazito važno za zaštitu okoliša (Kunamneni i sur., 2008.; Desai i Nityanand, 2011.).

U kozmetičkoj industriji, u svrhu poboljšanja izbjeljivanja zubi mogu se primijeniti kao sastavni dio paste za zube. Za sprječavanje ili smanjenje iritacije kose mogu biti sastavni dio boje za kosu te su takve boje prihvatljivije u odnosu na klasične boje koje sadrže vodikov peroksid kao oksidirajuće sredstvo (Desai i Nityanand, 2011.).

U svrhu produljenja roka trajanja hrane i poboljšanja kvalitete, u prehrambenoj industriji, lakaze se koriste kako bi spriječile nepoželjne promjene poput gubitka boje, mutnoće, promjene okusa i mirisa hrane i pića (Minussi i sur., 2002.).



## 2.5. Oksidacija fenolnih spojeva katalizirana lakazom

Svojstvo specifičnosti prema točno određenom supstratu, koje posjeduje većina enzima, nije karakteristika enzima lakaza. Lakaze mogu katalizirati oksidacije velikog broja različitih supstrata, kao što su *o*-, *p*-difenoli, polifenoli, aminofenoli, poliamini, arildiamini, aromatski amini, lignin, pojedini anorganski ioni, različiti nefenolni supstrati, askorbinska kiselina, itd.

**Tablica 1** prikazuje pregled fenolnih spojeva koji su u znanstvenim istraživanjima korišteni kao supstrati za lakazu u različitim reaktorskim sustavima.

Tablica 1 Tablični pregled objavljenih podataka oksidacije fenolnih spojeva katalizirane lakazom

Supstrat	Tip reaktora	Produkt	Referenca
L- DOPA	kotlasti	nije detektiran	Tišma M. i sur., 2008.
L- DOPA	mikroreaktor	nije detektiran	Tišma M. i sur., 2009.
DOPA	kotlasti	dimer	Gavrilaš S. i sur., 2012.
Katehol	kotlasti	poli-kondenzacijski tetramer	Gavrilaš S. i sur., 2012.
Katehin	kotlasti	poli-kondenzacijski proizvodi visokih molekulskih masa	Gavrilaš S. i sur., 2012.
$\alpha$ -naftol	kotlasti	SCI-RED	Giacobelli V.G. i sur., 2018.
Galna kiselina	kotlasti	polimer	López J. i sur., 2013.
Koniferilni alkohol	kotlasti	nije detektiran	Tišma i sur., 2009.
Rezorcinol	kotlasti	nije detektiran	Xuejiao Sun i sur., 2013.
Hidrokinon	kotlasti	<i>p</i> -benzokinon	Xuejiao Sun i sur., 2013.

Prema literaturi, produkt oksidacije galne kiseline kataliziran lakazom je polimer topiv u vodi koji se može primjenjivati kao poluvodič ili kao bojilo (Lopez i sur., 2013.) U sljedećem poglavlju navedene su osnovne karakteristike polimera topivih u vodi.

## 2.6. Osnovne karakteristike polimera topivih u vodi

### 2.6.1. Polimerni materijali

Tehnički upotrebljive tvari kojima osnovu čini polimer nazivaju se polimerni materijali. Ubrajaju se među najvažnije tehničke materijale današnjice. Kako bi se poboljšala njihova svojstva, uz polimere dodaju im se brojni dodatci. Različitim metodama, često i u kombinaciji

s drugim polimerima ili s drugim vrstama materijala, prerađuju se u gotove proizvode. Razvoj polimernih materijala proteklog stoljeća ubrzao je i napredak raznih područja ljudske djelatnosti. Služe kao zamjena za uobičajene materijale, keramiku, drvo, metale i staklo. Njihova primjena u raznim industrijama (kemijska industrija, elektroindustrija, elektronička industrija, ambalaža, transport, brodogradnja, avionska industrija, građevinarstvo, poljoprivredna i razne druge industrije) je prijeko potrebna i nezamjenjiva.

Polimerni se materijali mogu svrstati u 3 grupe:

1. Prirodni polimerni materijali
2. Modificirani prirodni polimerni materijali
3. Sintetski polimerni materijali

Celuloza je najvažniji prirodni polimerni materijal, a vrlo su važni i vuna, svila, prirodni kaučuk, prirodne smole, kazein, masna ulja te različiti anorganski polimeri (najčešće silikati). Celulozni derivati, kazeinski derivati, derivirani prirodni kaučuk (klorirani poliizopren) pripadaju grupi modificiranih prirodnih polimernih materijala.

Kemijskim reakcijama, od monomera dobivenih uglavnom iz nafte, zemnog plina ili ugljena, proizvode se sintetski polimerni materijali koji se s obzirom na svoju primjenu dijele na poliplaste, elastomere, sintetska vlakna i pomoćne polimerne materijale.

Poliplasti su polimerni materijali koji se primjenjuju u čvrstom stanju kao amorfni i kristalni polimeri, ali se tijekom preradbe nalaze u kapljevitom i gumastom stanju. Najčešće su to konstrukcijski polimerni materijali i folije. Pomoćni polimerni materijali, u obliku otopina ili disperzija, se obično upotrebljavaju u proizvodnji ljepila, lakova i premaza te sredstava za obradbu kože, papira i tekstila. Vlakna i pomoćni polimerni materijali uglavnom su također poliplasti, koji se razlikuju od ostalih poliplasta zbog posebnog načina preradbe čime se postižu karakteristična primjenska svojstva.

Allcock H R, Lampe F W: Contemporary Polymer Chemistry:

[http://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/polimerni\\_materijali\\_sve.pdf](http://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/polimerni_materijali_sve.pdf) [7.8.2019.]

## 2.6.2. Polimeri topivi u vodi

Jedan od primjera polimera topivih u vodi su vodotopive polimerne smole. Ovakvi polimeri mogu se otopiti ili nabubriti u vodi u obliku vodene otopine ili disperzije. Njihova molekulska struktura sadrži veliki broj hidrofilnih skupina koje se mogu podijeliti u 3 kategorije:

1. Kationska skupina (amino skupine)
2. Anionska skupina (karboksilne kiseline, skupine sulfonske, sumporne i fosforne kiseline)
3. Polarna ne ionska skupina (hidroksilne skupine, skupine amina etera, amida)

Polarne su molekule te uz hidrofilne skupine sadrže i hidrofobne.

Polimeri topivi u vodi mogu se podijeliti u tri karakteristične skupine:

1. Prirodni polimeri topivi u vodi (škrob, celuloza, želatina)
2. Kemijski modificirani prirodni polimeri topivi u vodi (modificirani škrob i celuloza, karboksimetil škrob, hidroksimetil celuloza, karboksimetil celuloza)
3. Sintetski polimeri topivi u vodi (poliakrilamid, hidrolizirani poliakrilamid, polivinil pirolidon)

[http://hr.swewe.net/word\\_show.htm/?67693\\_1&Vodotopivi\\_polimer](http://hr.swewe.net/word_show.htm/?67693_1&Vodotopivi_polimer) [7.8.2019.]

Vodotopivi polimeri imaju širok spektar sposobnosti, a samim time i veliki raspon primjene u hrani, farmaceutskoj i tekstilnoj industriji te preradi vode i ulja.

Na stabilnost polimera topivih u vodi, veliki utjecaj ima temperatura, uzrokujući fizikalne i kemijske promjene tijekom grijanja, što rezultira promjenama svojstava polimera. Prva faza degradacije uključuje pucanje kovalentne kemijske veze u glavnom ili bočnom lancu. Ovisno o kemijskoj strukturi i obliku upotrebe (kruto ili tekuće stanje), svaka vrsta polimera može proći različite reakcije degradacije.

Karboksimetil celuloza jedan je od najčešće korištenih derivata celuloze dobiven reakcijom alkalne celuloze i natrijeva kloracetata. Anionski je polimer koji se obično koristi kao natrijeva sol (De Morais i sur., 2018).

Sintetski polimeri topivi u vodi su tvari koje se u vodi otapaju, raspršuju ili nabubre i na taj način, u obliku gela ili emuzija, mijenjaju fizikalna svojstva vodenih sustava. Polimerni lanci, koji sadrže hidrofilne skupine, su ponavljajuće jedinice ovih polimera. Hidrofilne skupine, koje su supstituenti ili su ugrađene u kostur lanca, mogu biti neionske, anionske, kationske i amfoterne (Kadajji i Betageri, 2011.)

Općenito, glavni lanci ove vrste polimera imaju veliku energiju disocijacije te ih nije lako depolimerizirati, osim dugotrajnim toplinskim procesima.

U skupinu sintetskih polimera topivih u vodi spadaju poliakrilamidi s fleksibilnim polimernim lancima čiji su glavni dijelovi monomeri akrilamida. Okosnica se sastoji od ugljiko-ugljičnih veza koje pružaju veću stabilnost strukture u odnosu na polisaharide s acetalnim vezama na glavnom lancu. Mogu se proizvesti polimerizacijom slobodnih radikala ili kopolimerizacijom između monomera akrilamida i s dva ili više monomera (De Morais i sur., 2018).

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Zadatak

Zadatak ovog rada bio je provesti oksidaciju galne kiseline kataliziranu lakazom u šaržnim i ponovljivim šaržnim uvjetima (kotlasti reaktor s mješalom) te u kontinuiranim uvjetima (mikroreaktor y-oblika i mikroreaktor y-oblika s ugrađenim mikromikserom).

### 3.2. Materijali i metode

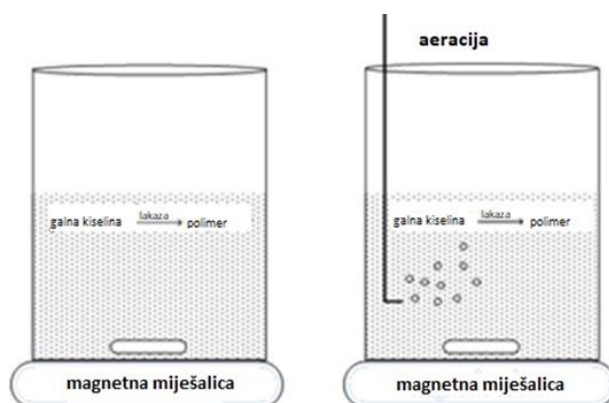
#### 3.2.1. Popis kemikalija

Galna kiselina (Sigma Aldrich, Njemačka), lakaza iz *Trametes versicolor* (Sigma Aldrich, Njemačka), 99,5 % ledena octena kiselina (Macron, Njemačka), kalijev acetat (Sigma Aldrich, Njemačka), natrijev hidroksid ( $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) (KEFO, Slovenija), klorovodična kiselina, 37 % (Carlo erba, Francuska), amonijev sulfat (Gram mol, Hrvatska), acetonitril (J. T. Baker, Nizozemska), metanol (J. T. Baker, Poljska), glicin (Fisher Chemical, Velika Britanija), ABTS (Sigma Aldrich, Kina).

#### 3.2.2. Aparatura

##### 3.2.2.1. Kotlasti reaktor

Oksidacija galne kiseline provedena je u šaržnim i ponovljivim šaržnim uvjetima u staklenoj čaši koja je predstavljala kotlasti reaktor, volumena  $100 \text{ cm}^3$ . Za osiguravanje homogenosti sustava korištena je magnetna mješalica. Za mjerenje koncentracije otopljenog kisika korištena je kisikova elektroda (Al200xi, Aqualytic, Njemačka). Shematski prikaz procesa dan je na **Slici 8**.



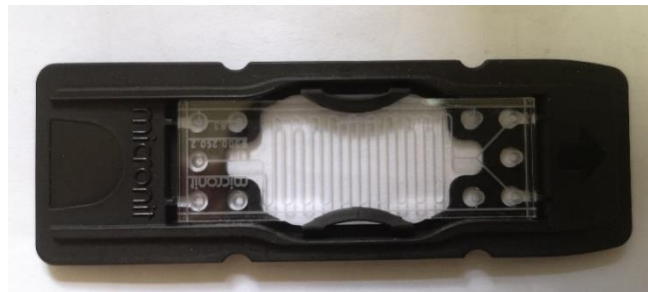
Slika 8 Shematski prikaz procesa oksidacije galne kiseline katalizirane lakazom u kotlastom reaktoru s aeracijom i bez aeracije

### 3.2.2.2. Mikroreaktorski sustavi

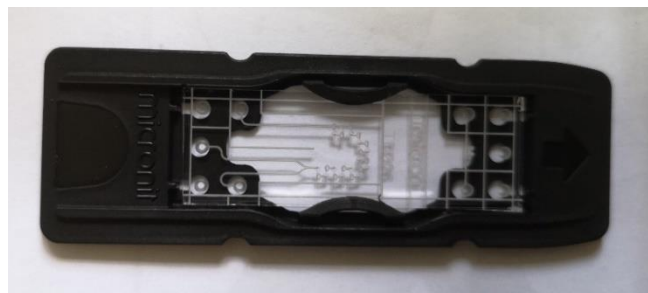
**Slika 9** prikazuje dva mikroreaktorska sustava (mikrokanal i mikrokanal s ugrađenim mikromikserom) u kojima je provedena oksidacija galne kiseline. Ovi reaktorski sustavi napravljeni su od borosilikatnog stakla i polipropilena. Prema podacima proizvođača, volumen mikrokanala bio je  $9,5 \mu\text{L}$ , te je imao sljedeće dimenzije: duljina 250 mm, širina  $300 \mu\text{m}$  i visina  $150 \mu\text{m}$ . Prema podacima proizvođača, volumen mikrokanala s mikromikserom bio je  $2 \mu\text{L}$ , te je imao sljedeće dimenzije: širina  $200 \mu\text{m}$  i visina  $150 \mu\text{m}$ . Uz pretpostavku da se radi o kvadru, iz formule za volumen kvadra, izračunata je duljina (66 mm).

Oba reaktora su imala y – oblik ulaznih kanala (2 ulaza, jedan ulaz za dovod supstrata, a drugi za dovod enzima u mikrokanale) i jedan izlaz. Cjevčica na izlazu je bila duljine 4 cm i volumena  $31,4 \mu\text{L}$ . Stoga je ukupni volumen prvog sustava bio  $40,9 \mu\text{L}$ , a drugog  $33,4 \mu\text{L}$ . Za dovođenje galne kiseline i enzima lakaza u mikroreaktorske sustave korištene su 2 pumpe (NE-300 Just Infusion™ Syringe Pump) koje mogu raditi pri različitim volumnim protocima ( $0,73 \mu\text{L h}^{-1} - 1257 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$ ). Za potrebe zaustavljanja reakcije, uzorak je na izlazu iz mikrokanala hvatan u HCl ( $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ).

a)



b)



Slika 9 a) mikrokanal i b) mikromikser

### 3.2.2.3. Kapljevinski kromatograf visokog učinka (HPLC)

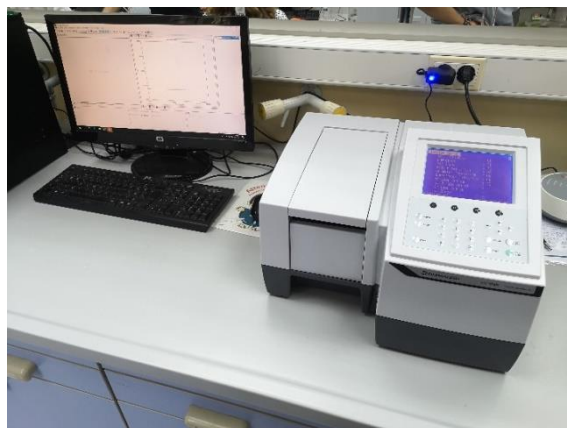
Za određivanje koncentracije galne kiseline korišten je kapljevinski kromatograf visokog učinka (Nexera XR, Shimadzu, Japan). Uređaj se sastoji od vakuum otplinjača (DGU-20A5R), dvije binarne pumpe (A & B) (LC-20ADXR), automatskog uzorkivača (SIL-20ACXR), kolonske pećnice (CTO-20AC), PDA detektora (SPD-M20A), detektora indeksa loma (RID-20A), kontrolera (CBM-20A) te računala i odgovarajućeg softvera za upravljanje i obradu podataka (LabSolution). Obradivanje uzoraka je provođeno pri valnoj duljini 271 nm na koloni Kinetex® C18 Phenomenex (100 x 4,6 mm, 2,6 μm).



Slika 10 Kapljevinski kromatograf visokog učinka (HPLC)

### 3.2.2.4. Spektrofotometar

Mjerenje početne reakcijske brzine i određivanje aktivnosti enzima lakaza provedeno je spektrofotometrijski na UV-VIS spektrofotometru (UV-1280, Shimadzu).



Slika 11 Spektrofotometar



### 3.2.2.5. Ultrazvučna kupelj

Za degasiranje mobilnih faza potrebnih za HPLC korištena je ultrazvučna kupelj (Elmasonic P, Elma).



Slika 12 Ultrazvučna kupelj

### 3.2.3. Metode

#### 3.2.3.1. Mjerenje početne reakcijske brzine oksidacije galne kiseline katalizirane lakazom u kiveti spektrofotometra

Početa reakcijska brzina mjerena je spektrofotometrijski. Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti pri valnoj duljini 383 nm. U kivetu je dodano 1000  $\mu\text{L}$  pripremljene galne kiseline određene koncentracije (1  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; 3  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; 5  $\text{mmol dm}^{-3}$ ; 10  $\text{mmol dm}^{-3}$ ) i 50  $\mu\text{L}$  enzima lakaze. Koncentracija lakaze u kiveti je bila 0,5  $\text{mg cm}^{-3}$ . Metoda traje 100 s. Iz vrijednosti  $dA/dt$  izračunata je volumna aktivnost prema slijedećoj jednadžbi:

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

gdje su  $V_r$  ukupni volumen uzorka u kiveti ( $\text{cm}^3$ ),  $\epsilon$  ekstinkcijski koeficijent  $\epsilon_{420} = 0,036 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ,  $d$  promjer kivete ( $d = 1 \text{ cm}$ ),  $V_E$  volumen dodanog enzima ( $\text{cm}^3$ ),  $\frac{dA}{dt}$  promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) ( $\text{min}^{-1}$ ), V.A. volumna aktivnost ( $\text{U mL}^{-1}$ ). 1U je internacionalna jedinica za mjerenje aktivnosti enzima i predstavlja onu jedinicu enzimske aktivnosti potrebnu za oksidaciju 1  $\mu\text{mol}$  supstrata u 1 minuti.

Na temelju eksperimentalnih podataka koji su dobiveni u obliku ovisnosti enzimske aktivnosti odnosno reakcijske brzine o koncentraciji supstrata (istraživanje enzimske kinetike metodom početnih brzina) procijenjeni su kinetički parametri. Parametri su procijenjeni nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu i metodu najmanjih kvadrata koje su sadržane u programskom paketu SCIENTIST. Rezultati dobiveni pomoću matematičkog modela su uspoređeni sa eksperimentalnim podacima te su po potrebi ponovno proračunati u programu sve dok nije postignuta minimalna pogreška između eksperimentalnih i procijenjenih vrijednosti. Razlika između vrijednosti eksperimentalnih podataka i onih proračunatih pomoću modela je dana kao suma kvadrata odstupanja.

### **3.2.3.2. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u kotlastom reaktoru u šaržnim uvjetima s aeracijom i bez dodatne aeracije**

Procesi oksidacije galne kiseline katalizirani lakazom provedeni su kotlastom reaktoru pri sljedeći uvjetima:  $V$  (reakcijske smjese) = 55 cm<sup>3</sup>,  $c_{0,galna\ kiseline}$  = 0,106 mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{0,kisik}$  = 0,16 mmol dm<sup>-3</sup>,  $\gamma_{lakaza}$  = 0,099 mg cm<sup>-3</sup>,  $T$  = 27 °C, pH = 5,0. Reakcijska smjesa miješana je na magnetnoj miješalici pri konstantnom broju okretaja,  $n$  = 320 okr<sup>-1</sup>.

Provedena su dva pokusa, u prvom pokusu reakcijska smjesa je kontinuirano aerirana kisikom iz zraka, a u drugom pokusu reakcijska smjesa nije bila dodatno aerirana. U pokusima bez dodatne aeracije zrakom, kisik je u reakcijsku smjesu dolazio iz zraka samo kroz granični sloj atmosfera / reakcijska smjesa, dok je u pokusima uz dodatnu aeraciju zrakom reakcijska smjesa konstantno aerirana zrakom. Početna koncentracija otopljenog kisika u pokusu bez dodatne aeracije i u pokusu uz dodatnu aeraciju bila je približno ista i iznosila je 0,16 mmol dm<sup>-3</sup>. Uzorci su uzorkovani u pravilnim vremenskim intervalima tijekom trajanja pokusa ( $t$  = 180 min) i analizirani na HPLC-u. U oba pokusa kontinuirano je mjerena koncentracija otopljenog kisika i pH reakcijske smjese.

### **3.2.3.3. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u kotlastom reaktoru u ponovljivim šaržnim uvjetima s aeracijom i bez dodatne aeracije**

Ponovljivi šaržni pokus (6 ciklusa) proveden je pri istim procesnim uvjetima kao i šaržni pokus:  $V$  (reakcijske smjese) = 55 cm<sup>3</sup>,  $c_{0,galna\ kiseline}$  = 0,106 mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{0,kisik}$  = 0,16 mmol dm<sup>-3</sup>,  $\gamma_{lakaza}$  = 0,099 mg cm<sup>-3</sup>,  $T$  = 27 °C, pH = 5,0. Reakcijska smjesa miješana je na magnetnoj

miješalici pri konstantnom broju okretaja,  $n = 320 \text{ okr}^{-1}$ . Ovaj pokus je proveden bez dodatne aeracije.

Nakon 30 minuta, kad je u reaktoru postignuta približno 100 %-tna konverzija galne kiseline, u reaktor je dodana svježa otopina galne kiseline tako da je njezina koncentracija bila jednaka početnoj koncentraciji na početku pokusa. Ukupno je provedeno 6 ciklusa, a ukupno reakcijsko vrijeme bilo je 360 minuta.

#### **3.2.3.4. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u mikroreaktoru**

Prije pokusa oksidacije galne kiseline s lakazom u mikroreaktoru i mikroreaktoru s ugrađenim mikromikserom, napravljena su četiri preliminarna istraživanja:

1. U prvom preliminarnom istraživanju, ispitan je utjecaj zaustavljanja enzimske reakcije hvatanjem uzorka na izlazu iz reaktora u led i hvatanjem uzorka u 0.1 M HCl. Dokazano je da hvatanjem uzorka u ledu reakcija nije u potpunosti zaustavljena, te da se u svim ispitanim uvjetima postiže 100-% konverzija, odnosno da enzim nije u potpunosti izgubio svoju aktivnost prilikom promjene temperature. Nadalje, dokazano je da se hvatanjem uzorka u HCl-u reakcija u potpunosti zaustavlja te su svi daljnji eksperimenti provedeni na takav način hvatanja uzorka na izlazu iz mikroreaktora.
2. U drugom istraživanju, s ciljem provjere uspješnosti sustava dotoka supstrata i enzima, te miješanja unutar reaktora, mjerena je koncentracija galne kiseline na ulazu i izlazu iz reaktora na način da su u reaktor jednakim protokom ulazile otopina galne kiseline s jedne strane, te otopina pufera s druge strane (0,1 mol dm<sup>-3</sup> acetatni pufer, pH=5,0). Pokusi su provedeni pri 2 volumna protoka: 50 μL min<sup>-1</sup> i 30 μL min<sup>-1</sup>. Koncentracija uzorka galne kiseline na izlazu iz reaktora analizirana je na HPLC-u nakon što bi prošlo minimalno četiri prostorna vremena zadržavanja u reaktoru. Dokazano je da je na izlazu iz mikroreaktora koncentracija galne kiseline pri oba ispitana vremena zadržavanja bila duplo manja čime su stečeni preduvjeti za daljnji rad.
3. U trećem preliminarnom istraživanju, ispitan je način razrjeđivanja uzorka prije analize na HPLC-u. Naime, u odgovarajućem softveru za upravljanje i obradu podataka (LabSolution), baždarne krivulje za određivanje koncentracije galne kiseline

su u rasponu od 0 do 30 mg dm<sup>-3</sup> te je prije analize na HPLC uređaju potrebno dodatno razrijediti uzorak. Pripremljene su otopine galne kiseline u koncentracijama od 0,05, 0,1, 1, 3 mmol dm<sup>-3</sup>, te su uzroci hvatani u volumen HCl-a (od 50 μL do 750 μL) s ciljem postizanja razrjeđenja od 2, 10 i 30 puta. Rezultati su pokazali da se ovaj način razrjeđivanja može primjenjivati za potrebe daljnjih analiza.

- U četvrtom preliminarnom istraživanju, ispitan je utjecaj koncentracije kisika na brzinu reakcije. Provedena su dva eksperimenta, na način da u prvom pokusu otopine galne kiseline i lakaze nisu bile zasićene kisikom iz zraka, a u drugom pokusu, ove otopine su bile zasićene kisikom. Kako je pokazano da kisik nema utjecaja na brzinu reakcije, svi daljnji pokusi provedeni su bez dodatne aeracije otopine supstrata i enzima.

Na temelju preliminarnih istraživanja i na temelju provedenih istraživanja u kotlastom reaktoru, kreiran je prvi eksperimentalni plan (**Tablica 2**).

Pokusi oksidacije galne kiseline lakazom u mikroreaktoru su provedeni s različitom početnom koncentracijom galne kiseline (0,05 mmol dm<sup>-3</sup>; 0,1 mmol dm<sup>-3</sup>; 1 mmol dm<sup>-3</sup>; 3 mmol dm<sup>-3</sup>; 5 mmol dm<sup>-3</sup>), i dvije različite koncentracije lakaze (0,1 mg cm<sup>-3</sup> i 0,5 mg cm<sup>-3</sup>). Svi pokusi provedeni su pri 27 °C i pH 5.

Tablica 2. Eksperimentalni plan provedbe pokusa u mikroreaktoru

POKUS	$C_{0, GA}$ [mol dm <sup>-3</sup> ]	$\gamma_{lakaza}$ [mg cm <sup>-3</sup> ]	$\nu_1$ [μL min <sup>-1</sup> ]	$\nu_2$ [μL min <sup>-1</sup> ]	$\nu_{uk}$ [μL min <sup>-1</sup> ]	$\tau$ [s]
1	0,050	0,1	50	50	100	5,70
			30	30	60	9,48
			10	10	20	28,5
			5	5	10	57,0
2	0,108	0,1	50	50	100	5,70
			30	30	60	9,48
			10	10	20	28,5
			5	5	10	57,0
3	1,046	0,1	50	50	100	5,70
			30	30	60	9,48
			10	10	20	28,5

			5	5	10	57,0
4	0,050	0,5	50	50	100	5,70
			30	30	60	9,48
			10	10	20	28,5
			5	5	10	57,0
5	0,108	0,5	50	50	100	5,70
			30	30	60	9,48
			10	10	20	28,5
			5	5	10	57,0
6	1,046	0,5	50	50	100	5,70
			30	30	60	9,48
			10	10	20	28,5
			5	5	10	57,0

### 3.2.3.5. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u mikroreaktoru s mikromikserom

Pokusi oksidacije galne kiseline lakazom u mikroreaktoru s ugrađenim mikromikserom, provedeni su s različitom početnom koncentracijom galne kiseline ( $0,06 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $0,7 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), i dvije različite koncentracije lakaze ( $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ ). Svi pokusi provedeni su pri  $27 \text{ }^\circ\text{C}$  i pH 5.

Tablica 3 Eksperimentalni plan provedbe pokusa u mikroreaktoru s mikromikserom

POKUS	$C_{0, GA}$ [ $\text{mol dm}^{-3}$ ]	$\gamma_{\text{lakaza}}$ [ $\text{mg cm}^{-3}$ ]	$V_1$ [ $\mu\text{L min}^{-1}$ ]	$V_2$ [ $\mu\text{L min}^{-1}$ ]	$V_{uk}$ [ $\mu\text{L min}^{-1}$ ]	$\tau$ [s]
1	0,064	0,1	50	50	100	1,2
			30	30	60	2,0
			10	10	20	6,0
			5	5	10	12,0
2	0,153	0,1	50	50	100	1,2
			30	30	60	2,0
			10	10	20	6,0
			5	5	10	12,0
3	0,748	0,1	50	50	100	1,2
			30	30	60	2,0
			10	10	20	6,0
			5	5	10	12,0
4	0,064	0,5	50	50	100	1,2
			30	30	60	2,0
			10	10	20	6,0
			5	5	10	12,0
5	0,153	0,5	50	50	100	1,2
			30	30	60	2,0
			10	10	20	6,0

6	0,748	0,5	5	5	10	12,0
			50	50	100	1,2
			30	30	60	2,0
			10	10	20	6,0
			5	5	10	12,0

### 3.2.3.6. Istraživanje stabilnosti otopine galne kiseline pri različitim temperaturama skladištenja

Otopina galne kiseline koncentracije  $1 \text{ mmol dm}^{-3}$  skladištena je pri 3 različite temperature ( $T = +4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $+25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) tijekom 26 dana. Mjerenje koncentracije galne kiseline mjereno je u pravilnim vremenskim intervalima, a uzorci za HPLC analizu su pripremljeni na dva različita načina: *a*) galna kiselina je razrijeđena u acetatnom puferu ( $\text{pH} = 5,0$ ); *b*) galna kiselina je razrijeđena u HCl-u ( $c = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ )

### 3.2.3.7. Istraživanje stabilnosti enzima lakaza pri različitim temperaturama skladištenja

Pripremljene su dvije suspenzije enzima, u *a*)  $3,2 \text{ mol dm}^{-3}$  amonijevom sulfatu i *b*) acetatnom puferu,  $\text{pH} = 5,0$ . Ovako pripremljene suspenzije skladištene su pri 3 različite temperature ( $T = +4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $+25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) tijekom 42 dana. Aktivnost enzima mjerena je u pravilnim vremenskim razmacima koristeći metodu opisanu u poglavlju 3.2.4.1.

## 3.2.4. Analitičke metode

### 3.2.4.1. Mjerenje aktivnosti enzima lakaza

Aktivnost enzima lakaza mjerena je spektrofotometrijski. Mjerenja su provedena u kvarcnoj kivetu volumena  $1 \text{ cm}^3$  i pri valnoj duljini  $420 \text{ nm}$ . U kivetu je dodano  $990 \text{ }\mu\text{L}$  otopine ABTS-a i  $10 \text{ }\mu\text{L}$  enzima lakaza, a mjerena je dinamička promjena apsorbancije s vremenom tijekom  $100 \text{ s}$ . Iz vrijednosti  $dA/dt$  izračunata je volumna aktivnost prema slijedećoj jednadžbi:

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

### 3.2.4.2. Mjerenje koncentracije galne kiseline

Koncentracija galne kiseline mjerena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (Nexera XR UHPLC, Shimadzu). Kako bi se mobilne faze degasirale korištena je

ultrazvučna kupelj (Elmasonic P 120 H, Elma). Mjerenja su provedena gradijentnom metodom prema slijedećim uvjetima:

- Detektor: PDA (SPD – M20A)
- Kolona: Kinetex® C18 Phenomenex (100 x 4,6 mm, 2,6 µm)
- Eluent A: acetonitril : metanol = 50:50
- Eluent B: 1% CH<sub>3</sub>COOH (octena kiselina)
- Vrijeme trajanja analize: 3 min
- Tlak: 231 bar
- Valna duljina: 271 nm
- Volumni protok mobilne faze: 1 cm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>
- Temperatura kolonske pećnice: 30 °C
- Volumen injektiranja uzorka: 20 µL

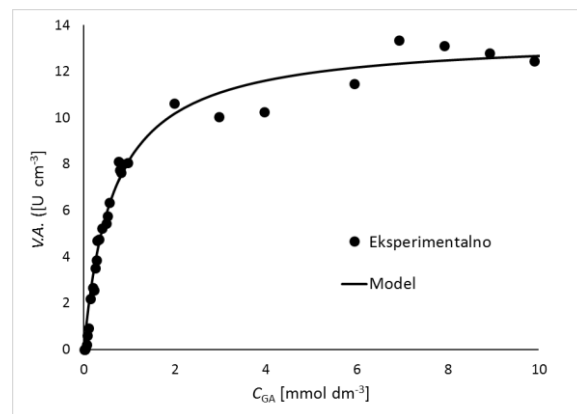
Prije analize, uzorci su pripremljeni na način da su profiltrirani u vijalice, na mikrofilteru promjera 0,45 µm.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**



#### 4.1. Rezultati istraživanja kinetike oksidacije galne kiseline lakazom metodom početnih brzina

Rezultati istraživanja kinetike oksidacije galne kiseline lakazom, prikazani su kao ovisnost početne reakcijske brzine izražene kao volumna aktivnost enzima o različitim koncentracijama galne kiseline (**Slika 13**). Iz eksperimentalnih podataka nelinearnom regresijom su procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara, Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) i maksimalna brzina reakcije ( $V_m$ ) (Tablica 4.)



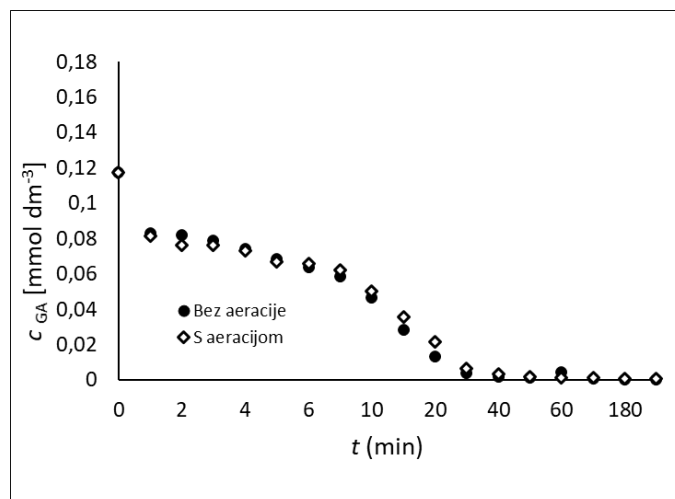
Slika 13 Ovisnost volumne aktivnosti enzima o koncentraciji galne kiseline u reakciji oksidacije galne kiseline katalizirane lakazom (acetatni pufer, pH 5,0,  $T = 27$  °C,  $\gamma_{lakaza} = 0,099$  mg cm<sup>-3</sup>,  $V_r = 1,01$  cm<sup>3</sup>)

Tablica 4 Rezultati procjene kinetičkih parametara za reakciju oksidacije galne kiseline kataliziranu lakazom

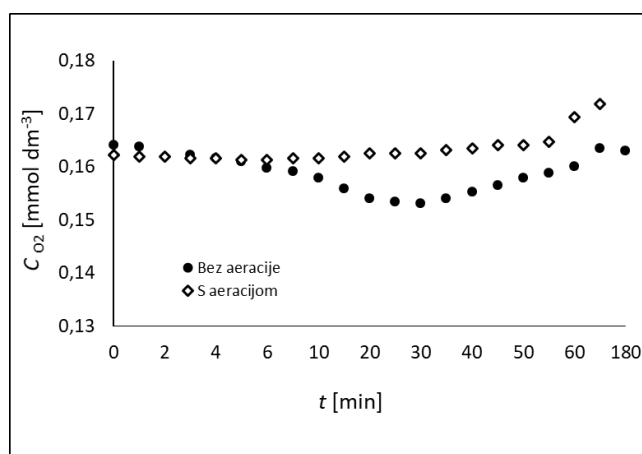
Parametar	Jedinica	Vrijednost
$V_m$	U cm <sup>-3</sup>	$13,17 \pm 2,39$
$K_m$	mmol dm <sup>-3</sup>	$0,65 \pm 0,21$

#### 4.2. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u kotlastom reaktoru s aeracijom i bez dodatne aeracije

Rezultati promjene koncentracije galne kiseline o vremenu u pokusima bez i s dodatnom aeracijom prikazani su na **Slici 14**, a rezultati promjene koncentracije kisika o vremenu u pokusima bez i s dodatnom aeracijom prikazani su na **Slici 15**.



Slika 14 Ovisnost koncentracije galne kiseline o vremenu tijekom pokusa oksidacije galne kiseline katalizirane lakazom u kotlastom reaktoru s i bez dodatne aeracije (Početni uvjeti:  $c_{O_2} = 0,163 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{GA} = 0,118 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{lakaza}} = 0,099 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )



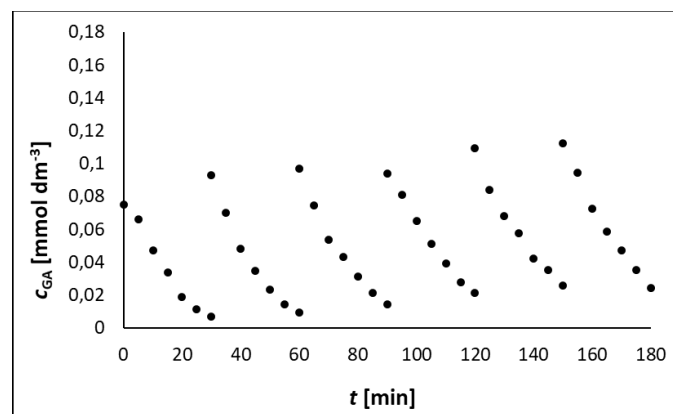
Slika 15 Ovisnost koncentracije kisika o vremenu tijekom pokusa oksidacije galne kiseline katalizirane lakazom u kotlastom reaktoru s i bez dodatne aeracije ( $c_{O_2} = 0,163 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{GA} = 0,118 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{lakaza}} = 0,099 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se 100 %-tna konverzija galne kiseline u kotlastom reaktoru postiže nakon 30 minuta u oba provedena pokusa, s ili bez dodatne aeracije. Koncentracija kisika u pokusu bez dodatne reakcije tijekom prvih 30 minuta reakcije se smanjuje, što znači da se kisik troši u reakciji. Dokaz tome je da, nakon 30 minuta, kada u reakcijskoj smjesi nema više galne kiseline, koncentracija otopljenog kisika raste i doseže svoju početnu vrijednost, koja odgovara maksimalnoj koncentraciji otopljenog kisika u

reakcijskoj smjesi pri danim procesnim uvjetima. U pokusu s dodatnom aeracijom, vidljivo je da se koncentracija kisika tijekom prvih 30 minuta trajanja pokusa ne mijenja. No, ako se usporede konverzije galne kiseline u oba pokusa, vidljivo je da je vrijeme potrebno za potrošnju galne kiseline u oba slučaja jednako, što znači da je koncentracija kisika u oba pokusa bila dovoljna, odnosno nije utjecala na brzinu reakcije.

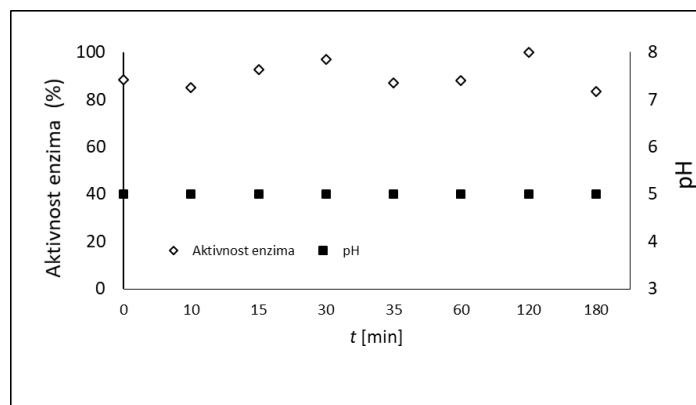
#### 4.3. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u reaktoru s prihranjivanjem

Slika 16 prikazuje rezultate oksidacije galne kiseline katalizirane lakazom u reaktoru s prihranjivanjem. Pokus je proveden na način da je svakih 30 minuta tijekom 180 minuta dodavana nova količina galne kiseline u reakcijsku smjesu s ciljem da njezina koncentracija na početku svakog ciklusa bude jednaka koncentraciji galne kiseline na početku eksperimenta.



Slika 16 Ovisnost koncentracije galne kiseline o vremenu katalizirane lakazom u kotlastom reaktoru s prihranjivanjem (Početni uvjeti:  $c_{GA} = 0,075 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $y_{\text{lakaza}} = 0,099 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )

Tijekom reakcijskog vremena mjereno je pH reakcijske smjese te volumna aktivnost enzima. pH reakcijske smjese bio je konstantan tijekom cijelog vremena trajanja eksperimenta, a enzim nije izgubio aktivnost, odnosno aktivnost enzima je tijekom trajanja eksperimenta bila približno jednaka. Rezultati mjerenja prikazani su na Slici 17.

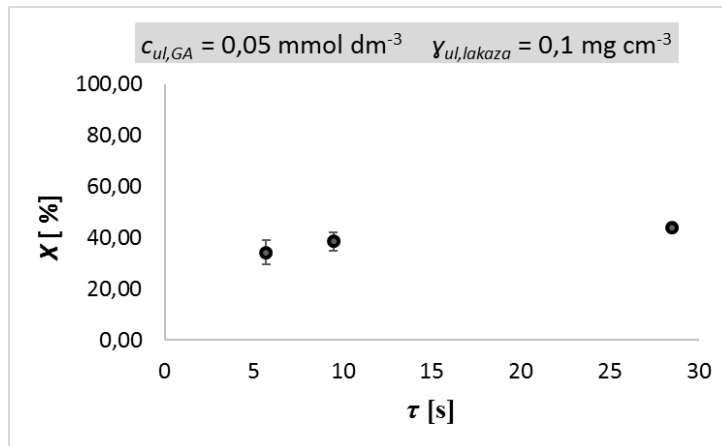


Slika 17 Aktivnost enzima izražena kao relativna vrijednost i pH reakcije smjese tijekom trajanja repetitivnog pokusa (Početni uvjeti:  $c_{GA} = 0,075 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{lakaza}} 0,099 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )

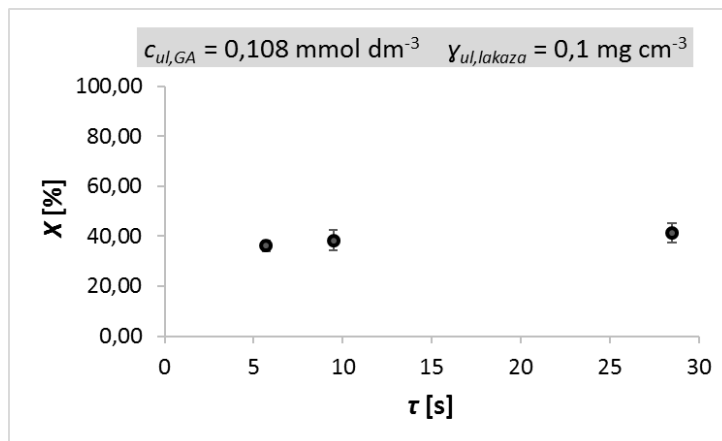
#### 4.4. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u mikroreaktoru

Reakcija je istraživana u mikroreaktoru sljedećih dimenzija: duljina 250 mm, širina 300  $\mu\text{m}$  i visina 150  $\mu\text{m}$ . Istraživan je utjecaj pet različitih početnih koncentracija galne kiseline (0,050  $\text{mmol dm}^{-3}$ , 0,108  $\text{mmol dm}^{-3}$ , 1,046  $\text{mmol dm}^{-3}$ , 1,353  $\text{mmol dm}^{-3}$  i 2,367  $\text{mmol dm}^{-3}$ ) te dvije različite koncentracija lakaze (0,1  $\text{mg cm}^{-3}$  i 0,5  $\text{mg cm}^{-3}$ ) na konverziju galne kiseline pri različitim vremenima zadržavanja (5,7 s, 9,48 s, 28,5 s).

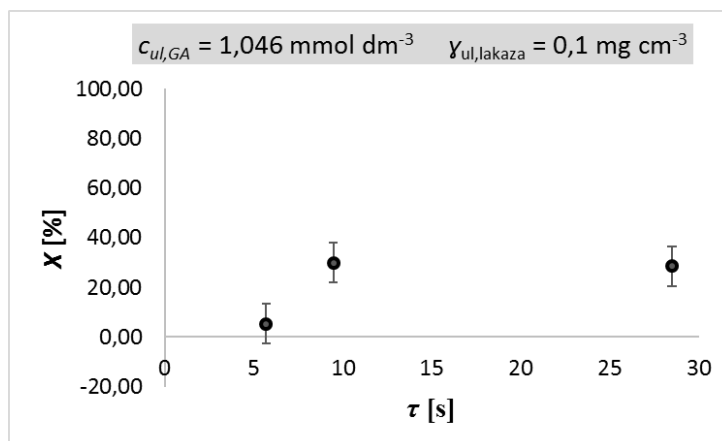
Rezultati pokusa provedenih s nižom koncentracijom lakaze (0,1  $\text{mg cm}^{-3}$ ) prikazani su na **Slikama 18 –20**, a rezultati pokusa s višom koncentracijom lakaze (0,5  $\text{mg cm}^{-3}$ ) prikazani su na **Slikama 21 –23**. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost pet mjerenja  $\pm$  standardna devijacija. S obzirom da u oba provedena pokusa kada su korištene najviše početne koncentracije galne kiseline (1,353  $\text{mmol dm}^{-3}$  i 2,367  $\text{mmol dm}^{-3}$ ) nije došlo do konverzije, ovi rezultati nisu grafički prikazani.



Slika 18 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )

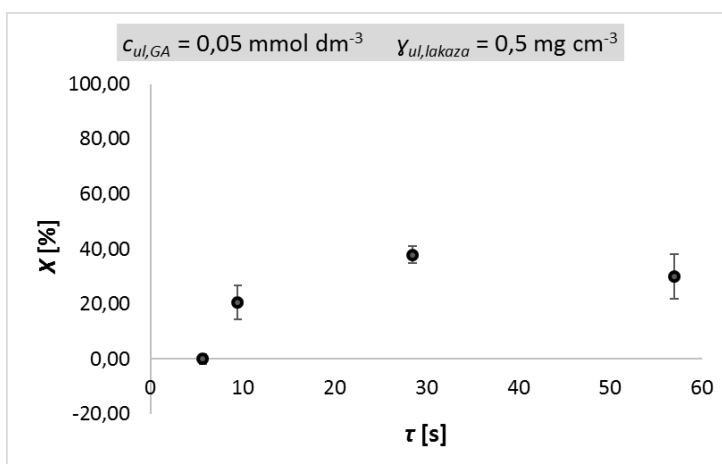


Slika 19 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 0,108 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )

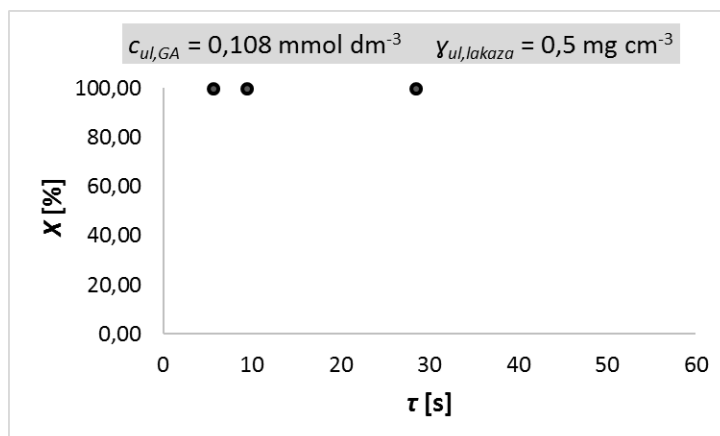


Slika 20 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 1,046 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )

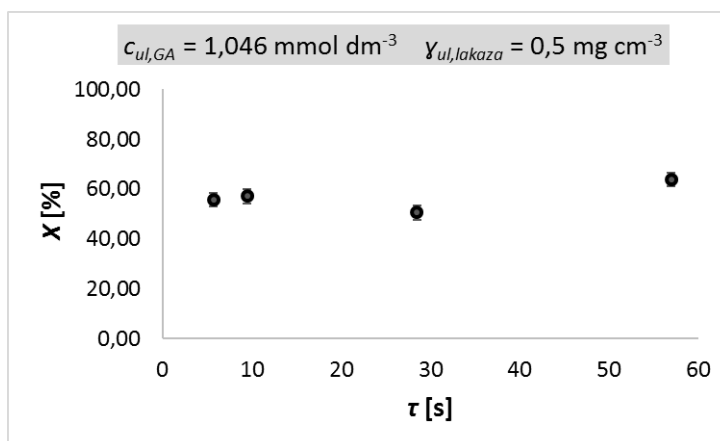
Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se tijekom sva tri ispitana vremena zadržavanja (5,7 s, 9,48 s, 28,5 s) postižu konverzije u rasponu od 34,19 do 44,04 %) kada su korištene dvije niže koncentracije supstrata (0,05 i 0,1  $\text{mmol dm}^{-3}$ ). Kada je korištena koncentracija 1  $\text{mmol dm}^{-3}$  nakon 5,7 s postignuta je 3,46 % konverzija, dok su pri duljim vremenima zadržavanja ostvarene veće konverzije ( $X = 30,01 \%$ ,  $\tau = 9,48 \text{ s}$ ;  $X = 28,52 \%$ ,  $\tau = 28,5 \text{ s}$ ). Dakle, upotrebom više koncentracije galne kiseline, postignute se niže konverzije. Kao što je već prethodno u tekstu navedeno, upotrebom još viših koncentracija galne kiseline, konverzija je bila nula u ispitanim vremenima zadržavanja.



Slika 21 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )



Slika 22 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 0,108 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{ul,lakaza} = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )



Slika 23 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 1,046 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{ul,lakaza} = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )

Kada je korištena pet puta viša koncentracija enzima, prema očekivanju, postignute su i veće konverzije, što je prikazano na **Slikama 21-23**. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se tijekom sva četiri ispitana vremena zadržavanja (5,7 s, 9,48 s, 28,5 s, 57,0 s) ostvaruju konverzije u rasponu od 50,6 do 63,8 % kada je korištena 1  $\text{mmol dm}^{-3}$  početna koncentracija supstrata dok je pri deset puta nižoj početnoj koncentraciji supstrata ( $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) postignuta 100 %-tna konverzija. Kada je korištena najniža koncentracija ( $0,05 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) nakon 5,7 s nije došlo do konverzije, dok su pri duljim vremenima zadržavanja ostvarene slijedeće konverzije:  $X = 20,56 \%$ ,  $\tau = 9,48 \text{ s}$ ;  $X = 37,94 \%$ ,  $\tau = 28,5 \text{ s}$ ;  $X = 29,97 \%$ ,  $\tau = 57,0 \text{ s}$ .

Radi preglednije usporedbe, u **Tablici 5** su prikazani rezultati konverzije galne kiseline u eksperimentima provedenim pri najduljem vremenu zadržavanja ( $\tau = 28,5$  s) s dvije različite koncentracije lakaze.

Tablica 5 Konverzija galne kiseline nakon 28,5 sekundi u mikrokanalu pri različitim početnim koncentracijama galne kiseline i različitim koncentracijama lakaze

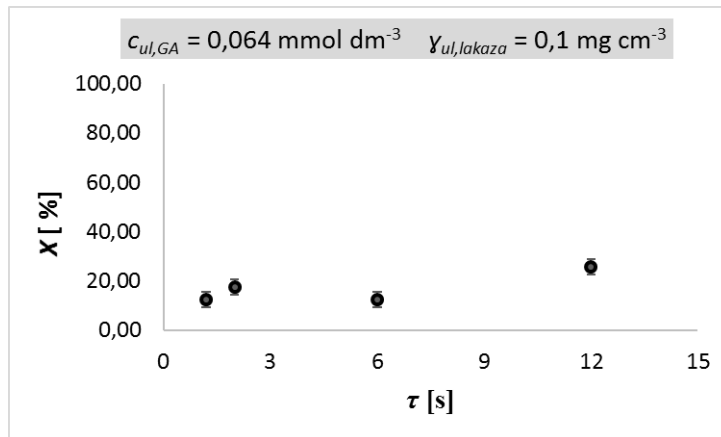
$C_{ul,GA}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$Y_{ul,lakaza}$ [mg cm <sup>-3</sup> ]	X [%]
0,050	0,1	44,04
0,108	0,1	41,37
1,046	0,1	28,16
1,353	0,1	0
2,367	0,1	0
0,050	0,5	37,94
0,108	0,5	99,79
1,046	0,5	50,56
1,353	0,5	0
2,367	0,5	0

#### 4.5. Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom u mikroreaktoru s mikromikserom

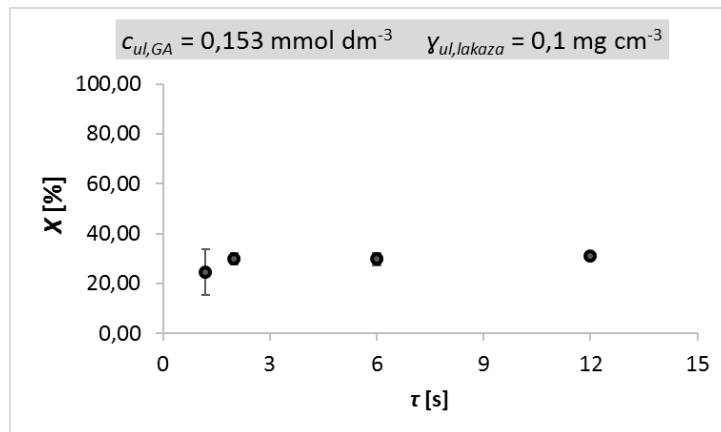
Ukupni volumen mikroreaktora s mikromikserom bio je 33,4  $\mu$ L, a volumen samog mikrokanala 2  $\mu$ L. Pokusi su provedeni u mikroreaktoru s mikromikserom dimenzija: 200  $\mu$ m širina i dubina 150  $\mu$ m, pri različitim vremenima zadržavanja (1,2 s, 2,0 s, 6,0 s, 12,0 s), pri različitim koncentracijama galne kiseline (0,064 mmol dm<sup>-3</sup>, 0,153 mmol dm<sup>-3</sup>, 0,748 mmol dm<sup>-3</sup>, 2,829 mmol dm<sup>-3</sup> i 4,249 mmol dm<sup>-3</sup>) i pri dvije različite koncentracije lakaze (0,1 mg cm<sup>-3</sup> i 0,5 mg cm<sup>-3</sup>).

Rezultati oksidacije galne kiseline katalizirane lakazom (0,1 mg cm<sup>-3</sup>) u mikroreaktoru s mikromikserom prikazani su na **Slikama 24 – 25**, a rezultati oksidacije galne kiseline katalizirane lakazom (0,5 mg cm<sup>-3</sup>) u mikroreaktoru s mikromikserom prikazani su na **Slikama 26-28**. U ovom sustavu, kada su korištene visoke koncentracije galne kiseline (2,829 mmol dm<sup>-3</sup> i 4,249 mmol dm<sup>-3</sup>) nije došlo do konverzije.

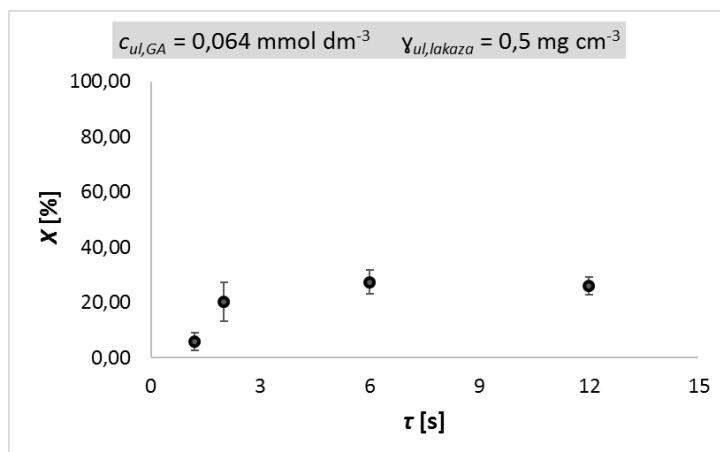




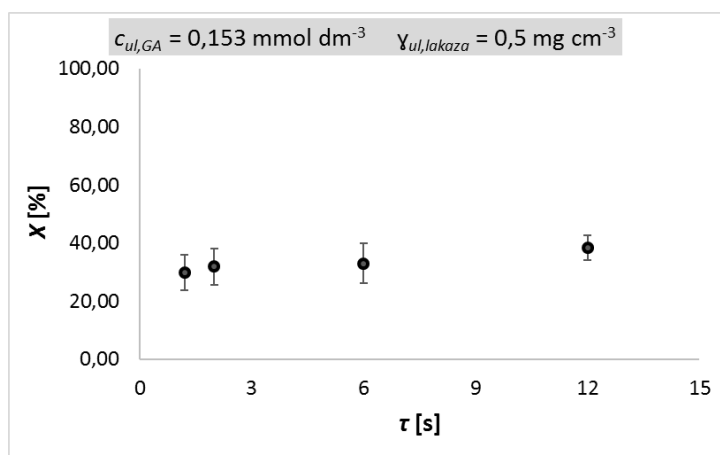
Slika 24 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu s mikromikserom (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 0,064 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{ul,lakaza} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )



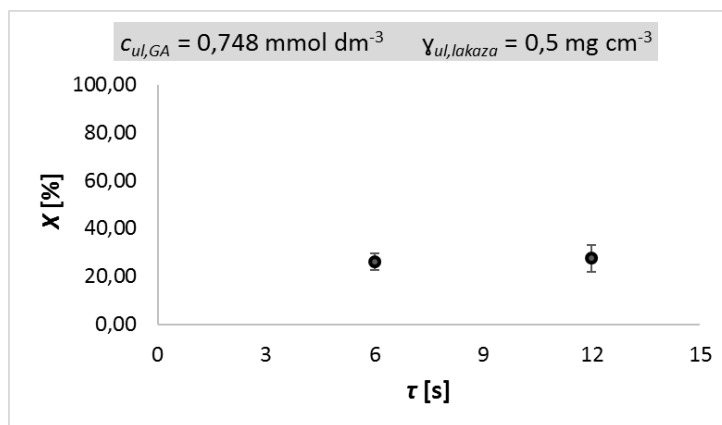
Slika 25 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu s mikromikserom (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 0,153 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{ul,lakaza} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )



Slika 26 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu s mikromikserom (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 0,064 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{ul,lakaza} = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )



Slika 27 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu s mikromikserom (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 0,153 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{ul,lakaza} = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )



Slika 28 Ovisnost konverzije galne kiseline o vremenu zadržavanja u mikrokanalu s mikromikserom (Početni uvjeti:  $c_{ul,GA} = 0,748 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{lakaza} = 0,5 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 5,0$ )

Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da se pri različitim početnim koncentracijama supstrata (0,05, 0,1 i 1  $\text{mmol dm}^{-3}$ ) za isto vrijeme zadržavanja (12,0 s) postiže približno jednaka konverzija galne kiseline (oko 30 %).

Radi preglednije usporedbe, u **Tablici 6** su prikazani rezultati konverzije galne kiseline u eksperimentima provedenim pri najduljem vremenu zadržavanja ( $\tau = 12,0 \text{ s}$ ) s dvije različite koncentracije lakaze.

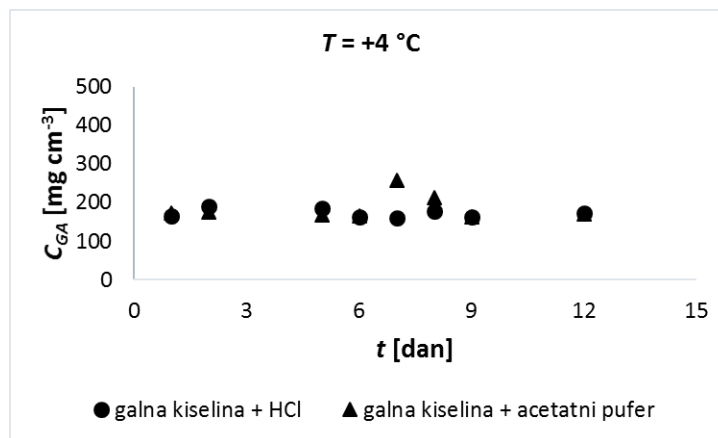
Tablica 6 Konverzija galne kiseline nakon 12,0 sekundi u mikrokanalu s mikromikserom pri različitim početnim koncentracijama galne kiseline i enzima lakaze koncentracije 0,1  $\text{mg cm}^{-3}$  i 0,5  $\text{mg cm}^{-3}$

$c_{ul,GA}$ [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]	$\gamma_{ul,lakaza}$ [ $\text{mg cm}^{-3}$ ]	$X$ [%]
0,064	0,1	25,90
0,153	0,1	30,91
2,829	0,1	0
4,249	0,1	0
0,064	0,5	25,98
0,153	0,5	38,40
0,748	0,5	27,51
2,829	0,5	0
4,249	0,5	0

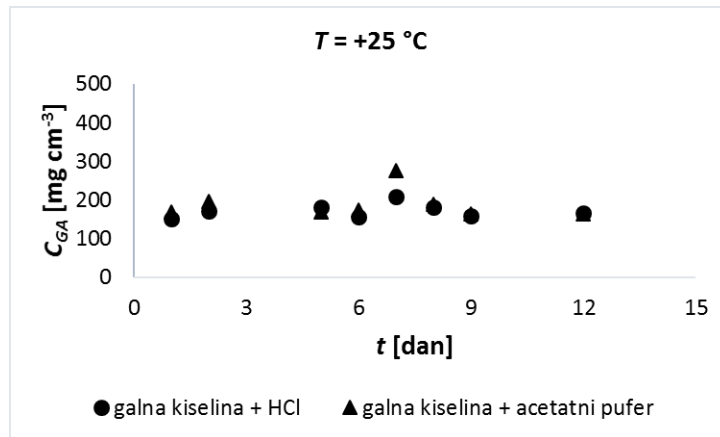
#### 4.6. Istraživanje stabilnosti otopine galne kiseline pri različitim temperaturama skladištenja

Kako bi se istražila stabilnost otopine galne kiseline tj. kako bi se isključio utjecaj skladištenja pripremljenih otopina galne kiseline pri različitim temperaturama na mogućnost spontanog raspadanja, istraživanje je provedeno na način da je pripremljena otopina galne kiseline skladištena pri tri različite temperature (+4 °C, +25 °C, -20 °C) te prije analize na HPLC uređaju razrijeđena na dva različita načina, u 0,1 M HCl-u i u acetatnom puferu.

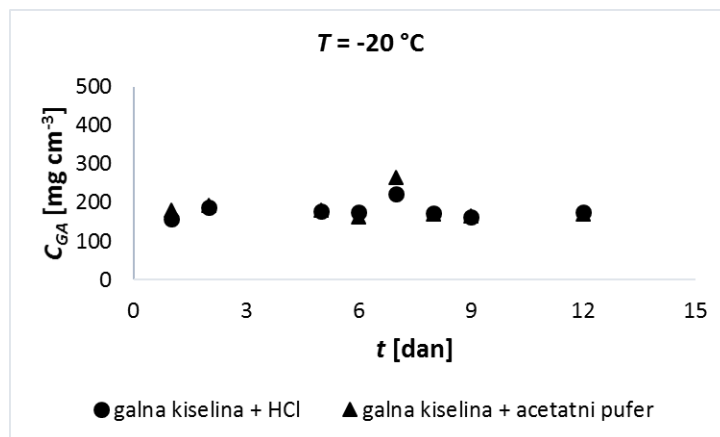
Iz rezultata prikazanih na slikama **29–31**, vidljivo je da je otopine galne kiseline pripremljene na oba načina (u acetatnom puferu i u kloridnoj kiselini) stabilne tijekom 12 dana skladištenja pri +4 °C, +25 °C, -20 °C.



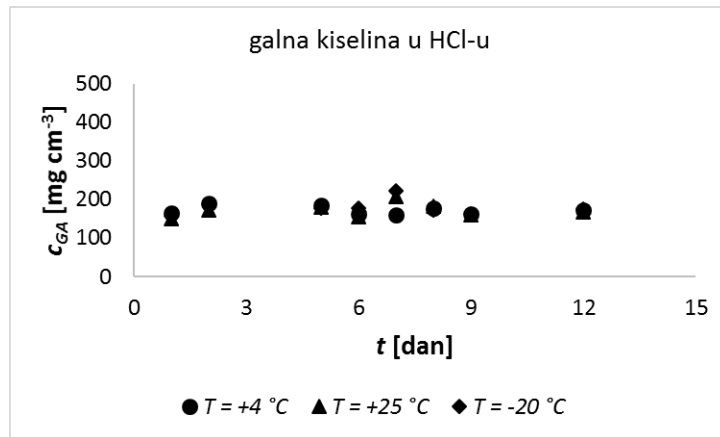
Slika 29 Ovisnost koncentracije galne kiseline razrijeđene u HCl-u i acetatnom puferu o vremenu skladištenja pri temperaturi  $T = +4$  °C



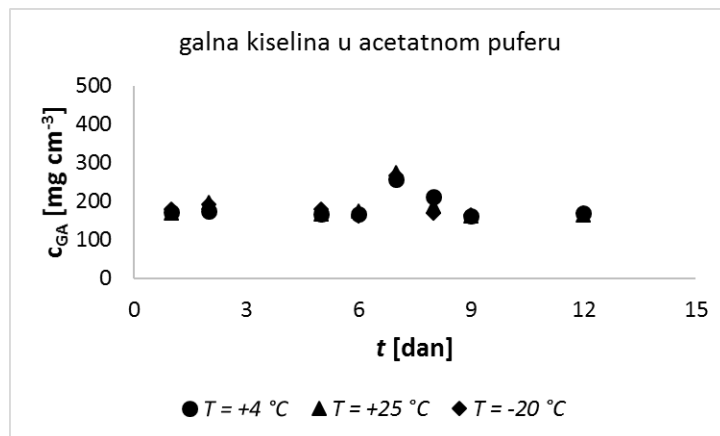
Slika 30 Ovisnost koncentracije galne kiseline razrjeđene u HCl-u i acetatnom puferu o vremenu skladištenja pri temperaturi  $T = +25\text{ }^{\circ}\text{C}$



Slika 31 Ovisnost koncentracije galne kiseline razrjeđene u HCl-u i acetatnom puferu o vremenu skladištenja pri temperaturi  $T = -20\text{ }^{\circ}\text{C}$



Slika 32 Ovisnost koncentracije galne kiseline razrjeđene u HCl-u o vremenu skladištenja pri tri temperature skladištenja ( $T = +4\text{ °C}$ ,  $+25\text{ °C}$ ,  $-20\text{ °C}$ )

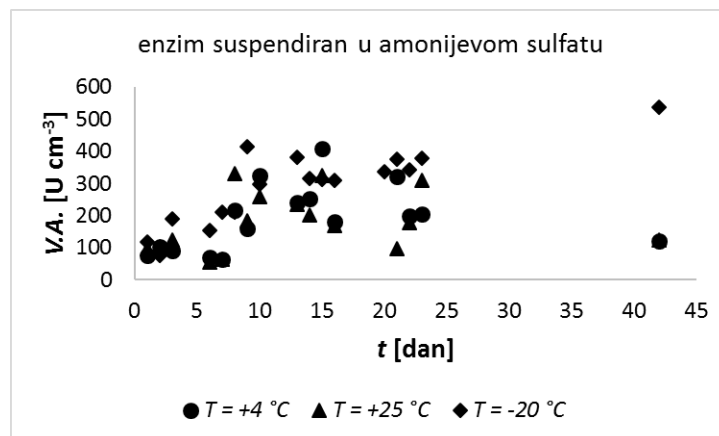


Slika 33 Ovisnost koncentracije galne kiseline razrjeđene u acetatnom puferu o vremenu skladištenja pri tri temperature skladištenja ( $T = +4\text{ °C}$ ,  $+25\text{ °C}$ ,  $-20\text{ °C}$ )

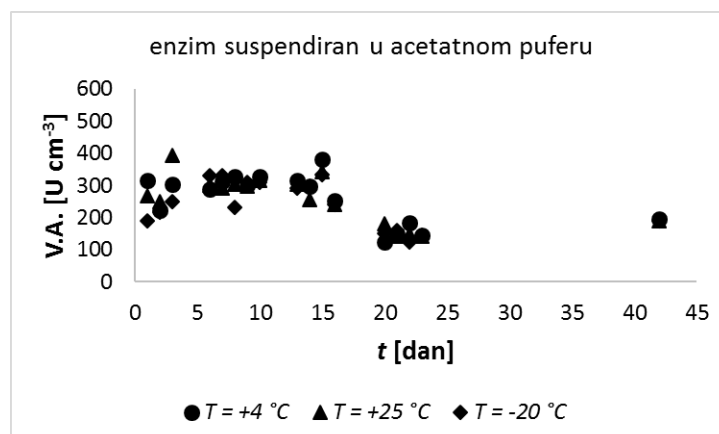
#### 4.7. Istraživanje stabilnosti enzima lakaza pri različitim temperaturama skladištenja

Suspenzija enzima pripravljena je na 2 načina. Prvi način: enzim lakaza suspendirana u amonijevom sulfatu. Drugi način: enzima lakaza suspendirana u acetatnom puferu. Obje suspenzije enzima su pripravljene tako da im je koncentracija jednaka ( $1\text{ mg/mL}$ ). Ovakvo pripravljene suspenzije enzima skladištene su na tri temperature ( $+4\text{ °C}$ ,  $+25\text{ °C}$ ,  $-20\text{ °C}$ ).

Rezultati istraživanja stabilnosti suspenzije lakaze u amonijevom sulfatu pri tri različite temperature prikazani su na **Slici 34**, a rezultati istraživanja stabilnosti suspenzije lakaze u acetatnom puferu, prikazani su na **Slici 35**.



Slika 34 Ovisnost volumne aktivnosti enzima suspendiranog u amonijevom sulfatu o vremenu skladištenja pri tri temperature skladištenja ( $T = +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )



Slika 35 Ovisnost volumne aktivnosti enzima suspendiranog u acetatnom puferu o vremenu skladištenja pri tri temperature skladištenja ( $T = +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $+25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da skladištenje enzima otopljenog u acetatnom puferu pri sve tri različite temperature bez gubitka aktivnosti može trajati 15 dana. Nadalje, primjećeno je da do značajnog porasta aktivnosti enzima pripremljenog u amonijevom sulfatu pri skladištenju pri sve tri ispitane temperature. U oba slučaja, tijekom 40 dana skladištenja nije došlo do gubitka aktivnosti.

## **5. ZAKLJUČCI**



Na temelju postignutih rezultata mogu se donijeti sljedeći zaključci:

Istraživanjem kinetike oksidacije galne kiseline katalizirane enzimom lakaza, metodom početnih brzina i nelinearnom regresijom su procijenjene vrijednosti Michaelisove konstante  $K_m$  te maksimalna brzina reakcije  $V_m$  za galnu kiselinu i one iznose:  $K_m = 0,65 \pm 0,21 \text{ mmol dm}^{-3}$   
 $V_m = 13,17 \pm 2,39 \text{ U cm}^{-3}$ .

Oksidacija galne kiseline katalizirana lakazom uspješno je provedena u šaržnim i ponovljivim šaržnim uvjetima u kotlastom reaktoru, te u kontinuiranim uvjetima, u dva tipa mikroreaktora.

U kotlastom reaktoru bez dodatne aeracije ostvarena je 100 %-tna konverzija galne kiseline nakon 30 minuta.

Istraživanjem utjecaja dodatka kisika na brzinu reakcije (pokus oksidacije galne kiseline u kotlastom reaktoru s dodatnom aeracijom), pokazano je da koncentracija kisika ne utječe na brzinu reakcije, odnosno i u ovom pokusu je nakon 30 minuta ostvarena 100 %-tna konverzija galne kiselina.

Dokazano je da se enzim može uspješno, bez gubitka aktivnosti, koristiti tijekom 180 minuta provedbe reakcije u ponovljivim šaržnim uvjetima (6 ciklusa).

Za isti postotak konverzije potrebno je puno kraće vrijeme u mikrokanalu nego u kotlastom reaktoru pri istim početnim reakcijskim uvjetima. Kod šaržnih pokusa 100 %-tna konverzija se postiže nakon 30 minuta, a mikrokanalima je za to potrebno nekoliko sekundi.

Dokazano je da je galna kiselina stabilna u otopinama HCl-a ( $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) i pufera (acetatni pufer) tijekom 12 dana skladištenja pri tri skladišne temperature ( $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $+25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Dokazano je da je enzim, suspendiran u amonijevom sulfatu ( $3,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i acetatnom puferu ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ), stabilan tijekom 15 dana skladištenja pri tri ispitane temperature skladištenja ( $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $+25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

## **6. LITERATURA**

- Allcock H R, Lampe F W: Contemporary Polymer Chemistry: [http://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/polimerni\\_materijali\\_sve.pdf](http://tehnika.lzmk.hr/tehnickaenciklopedija/polimerni_materijali_sve.pdf) [7.8.2019.]
- Badhani B, Sharma N, Kakkar R: Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. *Royal society of chemistry* 5: 27540–27557, 2015.
- Bartolović V, Utjecaj brzine vrtnje dvaju turbinskih mješala na kinetičke parametre kristalizacije boraksa, Magistarski rad, Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu, 2014.
- Couto S R, Toca-Herrera J L: Laccases production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology Advances* 25: 558 – 569, 2007.
- De Morais S C, Cardoso O R, de Carvalho Balaban R: Thermal stability of water-soluble polymers in solution. *Journal of Molecular Liquids* 265: 818–823, 2018.
- Desai S S, Nityanand C.: Microbial Laccases and their Applications: A Review. *Asian Journal of Biotechnology* 3: 98 – 124, 2011.
- Gadd G M: Fungi in bioremediation. Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 2001.
- Hajdari Gretić Z, Rahelić T, Vrsaljko D: Materijali za izradu mikroreaktora. *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske*, 66: 633-640, 2017.
- Janeš K: Rast *Trametes versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja. Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2010.
- Kadajji V G, Betageri G V: Water Soluble Polymers for Pharmaceutical Applications. *Polymers*, 3(4), 1972–2009, 2011.
- Kunamneni A, Camarero S, Garcia-Burgos C, Plou F J, Ballesteros A, Alcalde M: Engineering and applications of fungal laccase for organic synthesis. *Microbial Cell Factories* 7: 1475 – 2859, 2008.
- López J, Hernández-Alcántara José M, Roquero P, Montiel C, Shirai K, Gimeno M, Bárzana E: *Trametes versicolor* laccase oxidation of gallic acid toward a polyconjugated semiconducting material. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 97: 100–105, 2013.
- Majeau J-A, Brar S K, Tyagi R D: Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresource Technology* 101: 2331 – 2350, 2010.
- Minussi R C, Pastore G M, Duran N: Potential applications of laccase in the food industry, *Trends in Food Science & Technology* 13: 205 – 216, 2002.
- Piontek K, Antorini M, Choinowski T: Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological and Chemistry* 277: 37663 – 37669, 2002.
- Riva S: Laccases, blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology* 24, 219 – 226, 2006.

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, *Kemija u Industriji* 59(5): 227-248, 2010.

Tišma M: Oksidacija fenolnih spojeva lakazom iz *Trametes versicolor* u različitim tipovima reaktora. Magistarski rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2008.

Tišma M: Shema kotlastog reaktora, Interna predavanja: Kemijski i biokemijski reaktori, Prehrambeno – tehnološki fakultet Osijek, 2016.

Yaropolov A I, Skorobogat'ko O V, Vartanov S S, Varfolomeyev S D: Laccase: Properties, Catalytic Mechanism and Applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 94: 257 – 280, 1994.

[http://hr.swewe.net/word\\_show.htm/?67693\\_1&Vodotopivi\\_polimer](http://hr.swewe.net/word_show.htm/?67693_1&Vodotopivi_polimer) (preuzeto 7.8.2019)