

Modeliranje i optimiranje ekstrakcije enzima lipaza u vodenim dvofaznim sustavima

Bekavac, Nikša

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:395311>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-27**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, travanj 2024.

Nikša Bekavac

**MODELIRANJE I OPTIMIRANJE
EKSTRAKCIJE ENZIMA LIPAZA U
VODENIM DVOFAZNYM SUSTAVIMA**

Rad je izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ane Jurinjak Tušek (Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta), na Sveučilišta u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije pod komentorstvom doc. dr. sc. Anite Šalić.

Rad je napravljen u okviru projekta *Continuous protein extraction in a micro-extractor by aqueous two-phase systems promoted with natural deep eutectic solvents: from waste to valuable product(s)*, financiran od strane PhosAgro/UNESCO/IUPAC Partnership in Green Chemistry for Life (broj ugovora 4500461754) voditeljice doc. dr. sc. Anite Šalić.



ZAHVALA

Prvenstveno, želim zahvaliti doc. dr. sc. Aniti Šalić koja me nesebično primila u svoj laboratorij, te na svoj predanoj stručnoj pomoći, nepresušnim savjetima, uloženom vremenu i opranom posuđu tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Također, veliko hvala izv. prof. dr. sc. Ani Jurinjak Tušek na stalnoj dostupnosti, novim idejama, konstantnoj podršci i prenesenom znanju koje mi je pružila kao mentorica prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem svim djelatnicima Zavoda za reakcijsko inženjerstvo i katalizu te Laboratorija za Mjerenje, regulaciju i automatizaciju na susretljivosti, pruženoj pomoći, te prijateljskoj i ugodnoj radnoj atmosferi.

Također, hvala Miji Radović, mag. ing. hvala na ustupljenim podacima i bazama podataka eutektičkih otapala.

Hvala mojim dragim prijateljima koji su mi pružili podršku i pomoć, bez kojih bi sve ovo bilo teže i manje zabavno, a s kojim sam dijelio i dobro i loše tijekom studija – za sve suze i smijeh ovih nezaboravnih šest godina.

Najveću zaslugu za ovo postignuće pripisujem mojoj obitelji, ponajviše roditeljima što su mi omogućili da dođem do ovog trenutka sa svim neizmjernim razumijevanjem i strpljenjem. Hvala vam što ste me bezuvjetno bodrili i omogućili da studiram.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za procesno inženjerstvo
Laboratorij za mjerenje, regulaciju i automatizaciju

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Prehrambeno inženjerstvo

MODELIRANJE I OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE ENZIMA LIPAZA U VODENIM DVOFAZNIM SUSTAVIMA

Nikša Bekavac, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058214818

Sažetak: Ekstrakcija je ključni separacijski proces koji se primjenjuje u prehrambenoj, kemijskoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i drugim industrijama. Međutim, konvencionalna ekstrakcija suočava se s nizom nedostataka stoga se istraživanja sve više usmjeravaju prema alternativnim metodama zasnovanim na načelima zelene kemije. U ovom istraživanju, iskorištene su prednosti vodenih dvofaznih sustava na bazi eutektičkih otapala (DES) i mikroprotočnih sustava za ekstrakciju enzima lipaza iz *Aspergillus oryzae*. Pripravljeno je i karakterizirano 37 različitih DES-eva, te je ispitan njihov utjecaj na učinkovitost ekstrakcije i aktivnost enzima. Na temelju dobivenih rezultata razvijeni su modeli umjetnih neuronskih mreža u svrhu predviđanja optimalnih DES-eva. Dobiveni rezultati potvrđeni su u nizu neovisnih eksperimenata, a intenzifikacija procesa s optimalnim DES-om (kolin-klorid:etilen glikol 1:2) postignuta je provođenjem ekstrakcije u mikroekstraktor, rezultirajući učinkovitošću ekstrakcije od $96,47 \pm 0,87$ % i aktivnošću enzima od $99,20 \pm 0,64$ % pri vremenu zadržavanja od 0,59 min.

Ključne riječi: *Aspergillus oryzae*, eutektička otapala, lipaza, modeliranje, optimiranje

Rad sadrži: 69 stranica, 18 slika, 12 tablica, 118 literaturnih navoda, 2 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek

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

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Marina Cvjetko Bubalo (predsjednik)
2. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek (mentor)
3. doc. dr. sc. Anita Šalić (član)
4. izv. prof. dr. sc. Davor Valinger (zamjenski član)

Datum obrane: 19. travnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Process Engineering
Laboratory for Measurement, Control and Automatization

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

Graduate university study programme: Food Engineering

MODELING AND OPTIMIZATION OF LIPASE EXTRACTION IN AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEMS

Nikša Bekavac, univ. bacc. ing. techn. aliment.
0058214818

Abstract: Extraction is a key separation process utilized in the food, chemical, pharmaceutical, cosmetic, and other industries. However, conventional extraction faces a number of drawbacks, prompting research to focus on alternative methods based on the principles of green chemistry. In this study, the advantages of aqueous two-phase systems were exploited using deep eutectic solvents (DES) and microfluidic systems for the extraction of lipase from *Aspergillus oryzae*. Thirty-seven different DESs were synthesized and characterized, and their influence on extraction efficiency and enzyme activity was investigated. Based on the obtained results, artificial neural network models were developed to predict optimal DESs. The obtained results were confirmed in a series of independent experiments, and process intensification with the optimal DES (choline chloride:ethylene glycol 1:2) was achieved by conducting the extraction in a microextractor, resulting in extraction efficiency of $96,47 \pm 0,87$ % and enzyme activity of $99,20 \pm 0,64$ % at a retention time of 0,59 min.

Keywords: *Aspergillus oryzae*, deep eutectic solvents, lipase, modeling, optimization

Thesis contains: 69 pages, 18 figures, 12 tables, 118 references, 2 supplements

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in the Library of the University of Zagreb Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor

Co-mentor: Anita Šalić, PhD, Assistant professor, University of Zagreb Faculty of Chemical Engineering and Technology

Reviewers:

1. Marina Cvjetko Bubalo, PhD, Associate professor (president)
2. Ana Jurinjak Tušek, PhD, Associate professor (mentor)
3. Anita Šalić, PhD, Assistant professor (member)
4. Davor Valinger, PhD, Associate professor (substitute)

Thesis defended: April 19th, 2024

Sadržaj

1.	UVOD.....	1
2.	TEORIJSKI DIO.....	2
2.1.	EKSTRAKCIJA.....	2
2.2.	VODENI DVOFAZNI SUSTAVI	3
2.3.	EUTEKTIČKA OTAPALA.....	5
2.4.	LIPAZE	7
2.4.1.	Korištenje lipaza u proizvodnji biodizela.....	7
2.5.	MIKROPROTOČNI SUSTAVI	8
2.6.	UMJETNE NEURONSKE MREŽE	10
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1.	MATERIJALI.....	12
3.1.1.	Kemikalije	12
3.1.2.	Enzim lipaza	13
3.1.3.	Otopine i puferi	13
3.1.3.1.	<i>Kalij-kalij fosfatni pufer (pH = 7)</i>	13
3.1.3.2.	<i>Bradford reagens</i>	13
3.1.3.3.	<i>Kalij-kalij fosfatni pufer (pH = 7,4)</i>	13
3.1.4.	Uređaji	13
3.1.5.	Računalni programi	14
3.2.	METODE	14
3.2.1.	Priprava eutektičkih otapala	14
3.2.2.	Analiza fizikalnih svojstva pripremljenih eutektičkih otapala	15
3.2.2.1.	<i>Mjerenje gustoće eutektičkih otapala</i>	15
3.2.2.2.	<i>Mjerenje dinamičke viskoznosti eutektičkih otapala</i>	16
3.2.2.3.	<i>Mjerenje pH eutektičkih otapala</i>	16
3.2.2.4.	<i>Određivanje polarnosti eutektičkih otapala</i>	16
3.2.3.	Određivanje koncentracije proteina lineariziranom metodom po Bradfordu	16
3.2.4.	Određivanje aktivnosti lipaze iz <i>Aspergillus oryzae</i> u eutektičkim otapalima	17
3.2.5.	Analiza stabilnosti enzima lipaze.....	18
3.2.6.	Šaržna ekstrakcija lipaza eutektičkim otapalima.....	19
3.2.7.	Kontinuirana ekstrakcija enzima lipaze u mikroprotočnom sustava	19
3.2.8.	Sinteza biodizela.....	20

3.2.8.1. <i>Kemijska sinteza biodizela</i>	20
3.2.8.2. <i>Enzimaska sinteza biodizela</i>	20
3.2.9. <i>Određivanje koncentracije metilnih estera masnih kiselina i glicerola plinskom kromatografijom</i>	21
3.2.10. <i>Statistička analiza i matematičko modeliranje ekstrakcije enzima lipaze</i>	22
3.2.10.1. <i>Osnovna statistička analiza, raspodjela podataka i korelacijska matrica</i>	22
3.2.10.2. <i>Izračun σ-profila i deskriptora eutektičkih otapala</i>	23
3.2.10.3. <i>Modeliranje veze između učinkovitosti ekstrakcije te rezidualne aktivnosti i DES deskriptora</i>	23
3.2.10.4. <i>Procjena optimalnih vrijednosti DES deskriptora eutektičkih otapala za ekstrakciju lipaze vodenim dvofaznim sustavima</i>	24
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA EUTEKTIČKIH OTAPALA	26
4.1.1. pH vrijednost.....	28
4.1.2. Gustoća eutektičkih otapala	29
4.1.3. Viskoznost eutektičkih otapala	29
4.1.4. Polarnost eutektičkih otapala	30
4.1.5. σ -profili eutektičkih otapala	31
4.2. ŠARŽNA EKSTRAKCIJA ENZIMA LIPAZE EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	34
4.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPAZE U EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	39
4.3.1. <i>Praćenje skladišne stabilnosti enzima lipaza u fosfatnom puferu</i>	40
4.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE EKSTRAKCIJE ENZIMA LIPAZA EUTEKTIČKIM OTAPALIMA	42
4.4.1. <i>Analiza korelacija između varijabli</i>	42
4.4.2. <i>Razvoj i validacija linearnih regresijskih modela</i>	44
4.4.3. <i>Razvoj i validacija modela umjetnih neuronskih mreža</i>	48
4.4.4. <i>Optimiranje i odabir eutektičkog otapala na osnovu funkcije poželjnosti</i>	51
4.5. KONTINUIRANA EKSTRAKCIJA ENZIMA LIPAZA U MIKROPROTOČNOM SUSTAVU 54	
4.6. PROIZVODNJA BIODIZELA KATALIZIRANA ENZIMOM LIPAZA EKSTRAHIRANOM U EUTEKTIČKOM OTAPALU	55
5. ZAKLJUČCI	57
6. LITERATURA	58
PRILOG 1 – MATLAB kod	66
1.1. UVOZ PODATAKA	66

1.2. DISTRIBUCIJA PODATAKA	66
1.3. SPEARMAN KORELACIJSKA MATRICA	66
PRILOG 2 – Popis kratica i simbola	68

1. UVOD

Ekstrakcija je temeljni separacijski proces koji se koristi u prehrambenoj, kemijskoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i drugim industrijama. Konvencionalna ekstrakcija koja se danas koristi ima cijeli niz nedostataka, među kojima se ističu primjena toksičnih i često nerazgradivih otapala, gomilanje otpada i potreba za njihovim zbrinjavanjem, negativan utjecaj na okoliš, visoka potrošnja energije, zdravstveni i sigurnosni rizici itd. Osim negativnog utjecaja na okoliš i zdravlje ljudi, konvencionalna ekstrakcija često ima i nisku selektivnosti što rezultira smanjenom kvalitetom ekstrakta te smanjenoj održivosti cjelokupnog procesa. Sve to predstavlja veliki izazov u povećanju ekonomičnosti ekstrakcije i smanjenju negativnog utjecaja na okoliš. Zbog svega navedenog istraživanja se sve više okreću prema alternativnim metodama koje se temelje na principima zelene kemije. Jedna od takvih metoda je i kapljevinska ekstrakcija uz korištenje vodenih dvofaznih sustava (engl. *Aqueous two-phase systems*, *ATPS*). Glavna odlika te metode je fleksibilnost, niska cijena i jednostavno uvećanje procesa. Kao jedna od komponenti ATPS-a, sve se više koriste i eutektička otapala (engl. *Deep eutectic solvents*, *DES*), nova generacija otapala koja predstavljaju jedinstvenu skupinu zelenih, biorazgradivih i netoksičnih otapala s velikim potencijalom u ekstrakciji (Jeong i sur., 2015).

Osim primjene novih otapala i metoda, ekstrakcija se može dodatno poboljšati upotrebom opreme koja omogućava kontinuirani rad i intenzifikaciju procesa među kojima su posebno ističu mikroprotočni sustavi. Mikroprotočni sustavi, kao što su mikroekstraktori, sastoje od mreže kanala mikrometarskih dimenzija, a prednosti korištenja takvih sustava uključuje povećanu kontrolu procesa, smanjenu potrošnju otapala, te bržu i učinkovitiju ekstrakciju (Sackmann i sur., 2014).

S obzirom na to da kombinacija ATPS na bazi DES-eva i mikroprotočnih sustava nudi veliki potencijal u razvoju održive i učinkovite ekstrakcije, u ovom radu iskorištene su sve njihove prednosti u svrhu ekstrakcije enzima lipaza porijeklom iz *Aspergillus oryzae* iz vodenih medija. Nakon pripreme i karakterizacije (pH, gustoća, polarnost i viskoznost) 37 različitih DES-eva, za svaki DES, korištenjem COSMOtherm programa, odredit će se pripadajući σ -profil. U seriji šaržnih ekstrakcija ispitat će se utjecaj sastava ATPS na bazi spomenutih DES-eva, na učinkovitost ekstrakcije i aktivnost enzima lipaza. Na temelju σ -profila, bit će razvijeni modeli umjetnih neuronskih mreža s ciljem predviđanja učinkovitosti ekstrakcije i aktivnosti enzima lipaza u DES-evima. Na temelju razvijениh modela, predložit će se optimalni DES-evi, a rezultati će biti validirani u nizu neovisnih eksperimenata u šaržnim ekstraktorima. Kako bi se proces dodatno intenzificirao, ekstrakcija će biti provedena u mikroekstraktoru.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija predstavlja jednu od ključnih separacijskih metoda u različitim industrijama, stoga je danas gotovo nemoguće zamisliti proizvodni pogon u farmaceutskoj, prehrambenoj, kemijskoj, kozmetičkoj i drugim industrijama koji ne koristi ekstrakciju. Ekstrakcija podrazumijeva djelomično ili potpuno razdvajanje komponenti smjese tvari različite topivosti, tijekom kojeg je željena komponenta ekstrahirana otapalom selektivnim za specifičnu tvar (Poole, 2023). Odabir metode ovisi o strukturi sirovine, svojstvima ciljane komponente, ali i tehnološkim mogućnostima. Konvencionalna ekstrakcija, iako široko zastupljena, ima cijeli niz nedostataka među kojima su ističu smanjena učinkovitost, visoka potrošnja energenata, dugotrajnost postupaka, uporaba toksičnih otapala, toplinska razgradnja ekstrahiranih spojeva, negativni učinci na okoliš, dobivanje ekstrakata niže kvalitete itd. (Ince i sur., 2013; Alonso-Salces i sur., 2001). U današnje vrijeme, sa sve većim rastom potražnje za visokovrijednim proizvodima dobivenim održivim procesima, metode sve se više okreću zelenoj kemiji s ciljem poboljšanja učinkovitost, selektivnosti te ekološke prihvatljivosti.

Kako bi ekstrakcija bila što učinkovitija, metodu je često potrebno optimirati. Na učinkovitost ekstrakcije utječu odabir otapala i njegova fizikalno-kemijska svojstva među kojima su vrelište, pH, polarnost, reaktivnost, zapaljivost i stabilnost. Osim toga u obzir treba uzeti i dostupnost otapala te njegovu cijenu kao i mogućnost regeneracije kako bi proces učinili i ekonomski prihvatljivim (Cvjetko Bubalo i sur., 2014). Selektivnost otapala izravno je povezana s čistoćom i kvalitetom konačnog proizvoda (Cussler, 2009). Procesni uvjeti kao što su temperatura, tlak i vrijeme provedbe procesa isto su izrazito važni za postizanje maksimalne učinkovitosti kao i fizikalno-kemijska svojstva molekule koja se ekstrahira.

Ekstrakcije se s obzirom na agregatna stanja faza dijele na:

- ekstrakcija čvrsto-kapljevina,
- ekstrakcija plinovito-kapljevina i
- ekstrakcija kapljevina-kapljevina.

Ekstrakcija kapljevina-kapljevina, odnosno ekstrakcija otapalima, je separacijski proces koji uključuje dvije nemješljive kapljevite faze, a ekstrakcija željene tvari se provodi iz jedne faze u drugu. Na učinkovitost ekstrakcije tada utječu omjer korištenih tekućina, temperatura i odabir prikladnog otapala (Paiva i sur., 2014). Nedostaci ekstrakcije otapalima su duljina trajanja, nisko iskorištenje te relativno velika potrošnja otapala (Dawidowicz i sur., 2008). Jedan od primjera ekstrakcija kapljevina-kapljevina su i vodenih dvofazni sustavi.

Konvencionalna čvrsto-kapljevina ekstrakcija se često naziva i maceracija, a podrazumijeva difuzijski postupak tijekom kojeg jedna ili više komponenata, na osnovu razlike

u topljivosti i raspodjeli, prelazi iz čvrste sirovine u tekuće otapalo, dok se ekstrakcija plinovito-kapljevina zasniva na prolasku mobilne plinovite fazi kroz sloj tekućine (Rodinkov i sur., 2003).

2.2. VODENI DVOFAZNI SUSTAVI

Miješanjem dviju kapljevina sličnih fizikalno-kemijskih svojstava neće uvijek doći do formiranja jedne homogene faze tj. ne dolazi do njihovog potpunog miješanja. Posljedica toga je formiranje dviju kapljevinih faza, što čini ATPS. Ako su faze u termodinamičkoj ravnoteži, prisutan fenomen predstavlja ravnotežu kapljevina-kapljevina (engl. *Liquid-liquid equilibrium, LLE*), koja je važna za veliki broj industrijskih procesa. Formiranje dviju faza je zapravo funkcija entalpije hidratacije i entropije sustava. U tom slučaju, iako obje kapljevine imaju afinitet prema vodi, njihove entalpije hidratacije mogu se međusobno razlikovati, što rezultira s dvije različite termodinamičke mogućnosti. Prva mogućnost je, ako je energija sustava veća od razlike između entalpije hidratacije i entropije komponenata sustava, dolazi do formiranja jednofaznih sustava. Druga mogućnost je, ako je energija sustava niža, separacija komponenti postaje energetski povoljna, što rezultira formiranjem dviju faza u ravnoteži (Benavides i sur., 2011).

Raspodjela i formiranje dvije kapljevite faze najčešće se opisuje koeficijentom raspodjele K_p koji je jedan od najvažnijih veličina za dizajn ekstrakcije. Koeficijent raspodjele predstavlja odnos koncentracije otopljene komponente a u obje faze nakon uspostavljanja ravnoteže, što je vidljivo u jednadžbi 1:

$$K_p = \frac{w_a^e}{x_a^r} \quad [1]$$

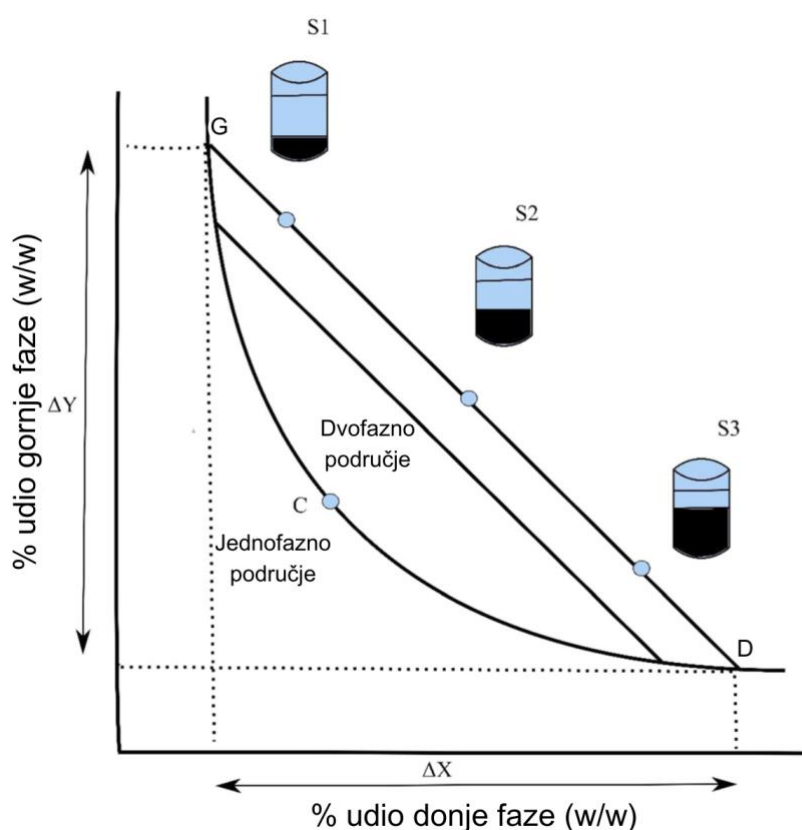
u kojoj x_a^e predstavlja maseni udio otopljene tvari a u ekstraktnoj fazi (e), a x_a^r predstavlja maseni udio otopljene tvari u rafinatnoj fazi (r). Ipak, kako bi se moglo predvidjeti ponašanje ATPS-a moraju se predvidjeti kompleksniji empirijski modeli. Jedan od najčešćih modela je Albertssonov model koji u obzir uzima šest čimbenika koji utječu na raspodjelu, a dat je sljedećim izrazom (jednadžba 2):

$$\ln K_p = \ln K^0 + \ln K_{el} + \ln K_{hfob} + \ln K_{hfil} + \ln K_{konf} + \ln K_{lig} \quad [2]$$

gdje su K_{el} , K_{hfob} , K_{hfil} , K_{konf} i K_{lig} redom koeficijenti raspodjele koji označavaju elektrokemijski, hidrofobni, hidrofilni, konformacijski i ligandni učinaka između sustava i tvari. K^0 predstavlja sve ostale učinke kao što su okolinski koji ovise o koncentraciji i vrsti soli, pH, temperaturi, koncentraciji, vrsti i molarnoj masi polimera i soli itd (Tubio i sur., 2009).

Formiranje ATPS-a odnosno njihov sastav se prikazuje faznim odnosno ravnotežnim dijagramima koji su jedinstveni za svaki sustav pri određenoj temperaturi i pH. Na apscisi dijagrama se prikazuje koncentracija polimera ili soli (udio jedne faze), a na ordinati

koncentracija drugog polimera ili otapala (udio druge faze). Područje mješljivosti odnosno homogeno i heterogeno područje su međusobno odijeljeni binodalnom krivuljom (slika 1, krivulja GCD). Duljina GD u dijagramu koja povezuje točke G i D naziva se spojna linija. Svi potencijalni sustavi (S1, S2, S3) imaju jednaki sastav u faznoj ravnoteži jer leže na istoj spojnoj liniji. Spojna linija se može opisati jednadžbom pravca koji prolazi kroz dvije točke (G i D), a određena je nagibom pravca (k) i duljinom (l) (Iqbal i sur., 2016).



Slika 1. Grafički prikaz faznog dijagrama vodenih dvofaznih sustava (prema Iqbal i sur., 2016)

Primjena ATPS-a u separacijskim procesima ima cijeli niz prednosti u odnosu na konvencionalne metode separacije, uključujući prijenos u veće mjerilo („*scale up*“), jednostavno rukovanje, brzu separaciju, nisku potrošnju energije, niske troškove, veću selektivnosti i biorazgradivosti (Lemes i sur., 2014). Osim toga, blagi separacijski uvjeti pogodni su i za separaciju osjetljivih biomolekula kao što su proteini (Dinis i sur., 2015, Yau i sur., 2015), fenolni spojevi (Xie i sur., 2022), alkaloidi (Jamehbozorg i Sadeghi, 2019) i prirodni pigmenti (Buarque i sur., 2022). Osnovni nedostaci ekstrakcije u ATPS-u su prije svega složenost mehanizama raspodjele biološkog materijala, nedovoljan broj adekvatnih matematičkih modela za definiranje koeficijenta raspodjele te niska produktivnost procesa.

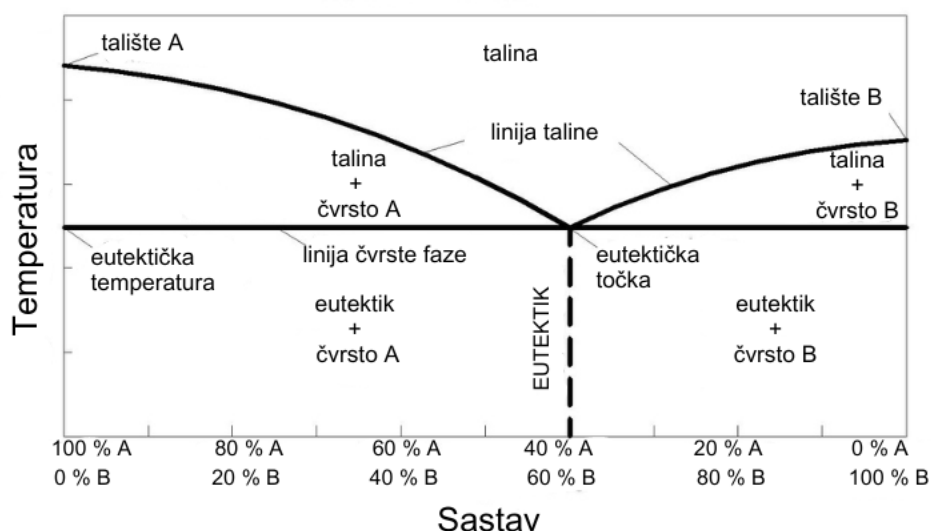
ATPS-i se najčešće pripremaju iz dva različita polimera ili polimera i soli ali se za formiranje ATPS koriste se i druge tvari kao što su ionske kapljevine i eutektičkih otapala, nova

ekološki prihvatljiva otapala (McQueen i Lai, 2019). Smatra se da bi istraživanja u ovom području trebala dovesti do značajnog poboljšanja ekstrakcije (Ma i sur., 2022).

2.3. EUTEKTIČKA OTAPALA

Eutektička otapala (engl. *Deep eutectic solvents, DES*) smatraju se zelenim otapalima nove generacije. Niske su toksičnost i hlapljivosti te su ekonomski isplativa, biorazgradiva i mogu se dobiti iz obnovljivih prirodnih izvora. DES-evi se dobivaju miješanjem dvije ili više komponenti koje zasebno imaju višu točku tališta nego što to ima njihova smjesa (Smith i sur., 2014). Do snižavanja točke tališta smjese dolazi uslijed formiranja vodikove veze između komponenti (Bernasconi i sur., 2017).

Naziv eutektik u nazivu DES-a se odnosi na smjesu spojeva koja u definiranom sastavu, ima jedinstveno i minimalno talište u faznom dijagramu (slika 2).



Slika 2. Fazni dijagram binarne eutektičke smjese (prema Bernasconi i sur., 2017)

Za pripremu DES-eva mogu se koristiti jeftine sirovine koje se dobivaju iz prirodnih izvora, a sama čistoća DES-a ovisi o čistoći pojedinačnih komponenti s obzirom na to da je učinkovitost sinteze 100 %. Tako visoka učinkovitost znači da u procesu nema generiranja otpada te ne postoji potreba za naknadnim pročišćavanjem pripremljenog otapala (Smith i sur., 2014, Abbott i sur., 2004, Abbott i sur., 2003). Osnovno načelo pripreme DES-eva je miješanje najmanje dvije komponente u određenom omjeru, gdje će jedna djelovati kao akceptor protona (engl. *Hydrogen bond acceptor, HBA*), a druga kao donor protona (engl. *Hydrogen bond donor, HBD*) (Harris, 2008). Priprava se odvija 1 - 2 sata uz miješanje i kontinuirano zagrijavanje smjese do

temperature ne više od 50 °C sve do formiranja homogene, stabilne kapljevine (Abbott i sur., 2004).

U dobivanju DES-eva kao HBA se uglavnom koriste aminokiselina betain (B) i kolin-klorid (ChCl). ChCl je dostupan jer se može dobiti jednostavnom ekstrakcijom iz biomase ili sintezom (Francisco i Kroon, 2012), dok se betain koristi kao jeftinija verzija dobivena najčešće ekstrakcijom iz šećerne repe. Kada se ChCl kombinira s nekim od HBD, fizikalna svojstva otapala su povoljnija nego onih otapala koja sadrže neku drugu kvaternu amonijevu sol, odnosno stvara se niža točka tališta, viskoznost takvih otapala je manja, a električna provodljivost veća (Kareem i sur., 2010). Kao i HBA, i za HBD se mogu koristiti jeftine molekule prirodnog porijekla kao karboksilne kiseline (Abbott i sur., 2004), alkoholi (Gorke i sur., 2008), urea, šećeri (Imperato i sur., 2005) i/ili organske kiseline (Savi i sur., 2018).

Osim toga, različitim kombinacijama HBD i HBA, kao i promjenama omjera njihovih količina, može se utjecati na svojstva eutektičkih otapala i tako ih prilagoditi primjeni u raznim područjima. Zbog toga se u DES-evi koriste u različite svrhe kao što su u organska sinteza (Handy i Lavander, 2013), ekstrakcija bioaktivnih spojeva (Wei i sur., 2015), priprema nanomaterijala (Anicai i sur., 2015), separacijski procesi (Owhe i sur., 2021), elektrokemija (Jhong i sur., 2009) te enzimski kataliziranim reakcijama (Huang i sur., 2014).

Ako se eutektičko otapalo sastoji od primarnih metabolita (ugljikohidrati, aminokiseline, nukleinske kiseline, organske kiseline) onda se koristi naziv prirodna eutektička otapala (engl. *Natural deep eutectic solvents, NADES*). Uočeno je da prirodni metaboliti koji su krutine na fiziološkoj razini, mogu prijeći u tekuću fazu ako se pomiješaju s određenim komponentama u specifičnom omjeru (Dai i sur., 2013). S time dolazi i hipoteza da takvi spojevi mogu djelovati kao otapalo za vodu i lipide u stanicama, čime bi se mogli objasniti brojni biološki procesi, poput biosinteze ili skladištenja različitih metabolita netopivih u vodi i makromolekulama. Jedan primjer takvog specifičnog ponašanja jest otkriće koje ukazuje na to da urea pokazuje denaturacijska svojstva za proteine u obliku vodene otopine, dok je denaturacija značajno smanjena prilikom formiranja eutektičkog otapala s ChCl. Ova otapala mogu stvoriti veze s površinskim ostacima enzima, čime eliminiraju mogućnost denaturacije i čine ih izuzetno stabilnim (Durand i sur., 2016).

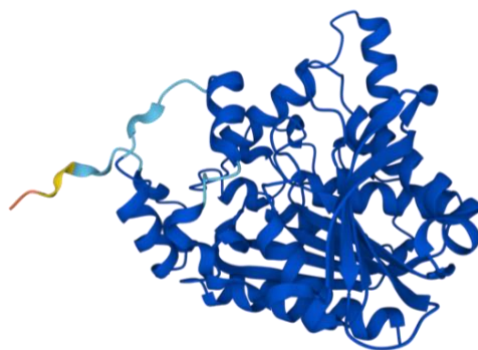
2.4. LIPAZE

Lipaze (E.C. 3.1.1.3.) su skupina enzima koji kataliziraju hidrolizu triglicerida (TAG) do slobodnih masnih kiselina, diglicerida i monoglicerida, te glicerola (Brockman, 2013). S obzirom na to da je hidroliza povratna reakcija, moguće je mijenjati smjer reakcije u smjeru sinteze estera promjenom reakcijskih uvjeta. Naime, lipaze kataliziraju i reakcije u kojima se acilna skupina modificira, što značajno povećava njihovu primjenu u industriji i čini ih jednim od najčešće korištenih enzima. Transesterifikacija podrazumijeva prijenos acilne skupine, pa ovisno o akceptoru razlikuju se četiri tipa enzimske transesterifikacije: alkoholiza, acidoliza, interesterifikacija i aminoliza (Reis i sur., 2009).

Katalitička aktivnost lipaze ne zahtijeva prisustvo kofaktora, što olakšava njihovu uporabu u industriji, a procesi u kojima sudjeluje lipaza se odvijaju u blagim reakcijskim uvjetima, uz smanjene energetske troškove, nastanak proizvoda bolje kvalitete i u većem prinosu, a sve skupa s manjim utjecajem na okoliš u odnosu na kemijski katalizirane reakcije (Kumar i sur., 2016).

Svojstva lipaza (supstratna specifičnost, optimalne vrijednosti pH i temperature) ovise o njihovom podrijetlu, a u biotehnološkoj, kemijskoj i prehrambenoj industriji najznačajnije su one mikrobnog podrijetla koje potječu iz kvasaca rodova *Candida*, bakterija rodova *Staphylococcus* i *Pseudomonas*, te plijesni *Penicillium*, *Aspergillus* i *Mucor*. Lipaze mikrobnog podrijetla imaju optimalan pH pri neutralnom ili blago lužnatom okruženju.

Enzim lipaza porijeklom iz plijesni *Aspergillus oryzae* (slika 3) pokazala je potencijal u sintezi biotina (Zheng i sur., 2009), α -lipoične kiseline (Yan i sur., 2009), stereoselektivne katalize hidrolize etil 2-(4-hidroksifenoiksi)-propanoata i analoga (Zheng i sur., 2013).



Slika 3. Kristalografska struktura enzima lipaza porijeklom iz *Aspergillus oryzae* (RCSB, 2022)

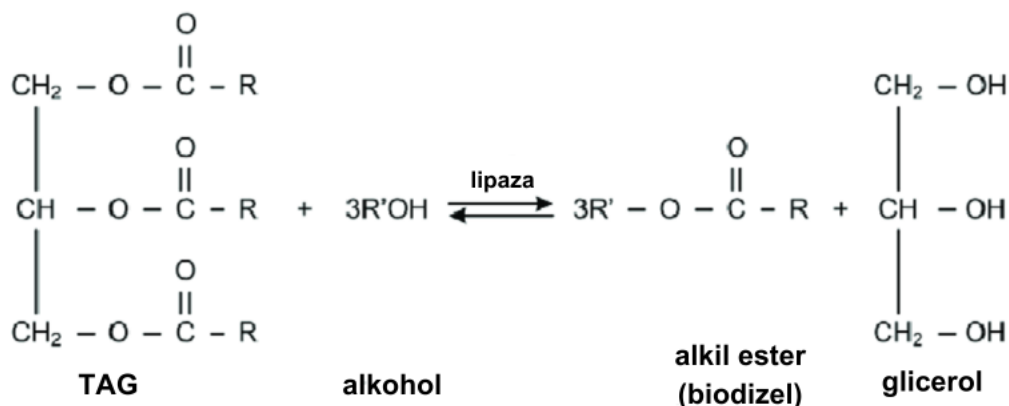
2.4.1. Korištenje lipaza u proizvodnji biodizela

Alternativna goriva za sagorijevanje u motorima postaju uvelike zanimljiva posljednjih godina zbog smanjenja rezervi fosilnih goriva u svijetu, ali i sa stajalište zaštite okoliša jer je

povećana potrošnja fosilnih goriva vodeći razlog zagađenja zraka i globalnog zagrijavanja. Kao moguća alternativa nameću se biogoriva, među kojima se posebno ističe biodizel. Biodizel je smjesa metilnih estera masnih kiselina (engl. *Fatty Acid Methyl Ester, FAME*) koji se proizvodi od biljnog i životinjskog ulja. Biodizel je biorazgradiv i netoksičan jer ne sadrži sumporne spojeve, pa pri sagorijevanju biodizela ne dolazi do stvaranja sumporovog(IV) oksida, a sagorijevanje je potpunije u odnosu na dizel iz nafte zbog prisutnosti kisika u strukturi FAME (Srivastava i Prasad, 2000).

Biodizel se najčešće proizvodi transesterifikacijom, gdje trigliceridi, uz prisutnost katalizatora, reagiraju s metanolom dajući FAME (biodizel) i glicerol kao nusprodukt (slika 4). Uz metanol, kao supstrat mogu se koristiti i drugi alkoholi kao etanol, propanol, butanol i amil-alkoholi, ali oni nisu naišli na široku promjenu zbog visoke cijene i složenih uvjeta transesterifikacije. Kemijska sinteza podrazumijeva katalizu kiselinama ili bazama.

Korištenjem enzima kao katalizatora, dobiva se biodizel s manje nečistoća i nusprodukata u odnosu na kemijsku sintezu (Knothe i Razon, 2017).



Slika 4. Reakcija sinteze alkil estera (biodizela) reakcijom triglicerida (TAG) i alkohola katalizirana enzimom lipaza (prema Gumba i sur., 2016)

Jedna od glavnih prepreka u korištenju enzimatske sinteze u industriji je visoka cijena enzima. Također, ovisno o izvoru, enzim lipaza ima različitu aktivnost, pa je ponekad potrebna visoka koncentracija enzima, vrijeme reakcije je dugo u odnosu na kemijsku sintezu biodizela, a prisutnost metanola inhibira enzim (Demirbas, 2008).

Osim u prisutnosti katalizatora, reakcija transesterifikacije može se provesti pri visokoj temperaturi ili tlaku (Gabremariam i Marchetti, 2017; Qiu i sur., 2010).

2.5. MIKROPROTOČNI SUSTAVI

Mikroprotočni sustavi su uređaji koji se sastoje od mreže mikrometarskih kanala unutar kojih se kontinuirano odvijaju fizikalno-kemijski procesi. Smanjenjem dimenzija osnovnih

strukturnih jedinica - mikrokanala na mikrometarske vrijednosti (10 do 1000 μm) i integriranjem različitih komponenti poput mikromješala i grijača, ostvaruje se niz prednosti u usporedbi s konvencionalnim reaktorima kao što su visoka učinkovitost procesa, energetska učinkovitost, bolji prijenos tvari i veći prinos proizvoda, kao i jednostavno upravljanje. Mikroprotočni sustavi se mogu koristiti za izvođenje složenih reakcija poput esterifikacije, kemijske hidrogenacije i sinteze sa slobodnim radikalima.

Osim toga, mikroprotočni sustavi predstavljaju optimalnu platformu za rad s reagensima koji su eksplozivni, toksični ili visoko cijenjeni, zahvaljujući malim količinama potrebnim za provođenje procesa, čime se osigurava smanjenje rizika u slučaju neželjenih događanja, poput eksplozija. Uz to, mikroprotočni sustavi mogu se integrirati s različitim mikrokomponentama poput pumpi, ventila, grijača, senzora i detektora. Ovi visoko integrirani sustavi, poznati kao *Lab-on-Chip* uređaji, omogućuju ne samo provedbu kemijskih reakcija već i karakterizaciju proizvoda unutar jedne kompaktne jedinice.

Kemijski i biokemijski procesi koji se provode u mikroprotočnim sustavima često su značajno različiti od onih u makroreaktorima, pružajući poboljšanu učinkovitost, produktivnost i sigurnost. Faktori poput preciznije kontrole procesnih uvjeta, reducirane potrošnje reaktanata i katalizatora, i optimalnih omjera međufazne površine prema volumenu, dovode do učinkovitijeg prijenosa tvari i energije, kao i smanjenje količine otpadnih tokova (Hessel i sur., 2004).

Za industrijsku primjenu, mikroprotočni sustavi imaju cijeli niz prednosti u vidu fleksibilnosti i povećanja zapremnine u odnosu na konvencionalne makrosustave. U svrhu uvećanja volumena i kapaciteta, mikroprotočni sustavi se mogu spajati u paralelnim ili serijskim spojevima, poznatim kao *numbering-up* ili *scaling-out*. Ova metoda je manje složena i troškovno učinkovitija u usporedbi s tradicionalnim pristupima povećanja proizvodnje (*scaling-up*), koji su često dugotrajni, skupi i izvedbeno zahtjevni (Ehrfeld i sur., 2000). Strategija paralelnog povezivanja više mikroprotočnih sustava poznata je kao *external numbering-up*. Ovaj pristup povećava kapacitet procesa i količinu proizvedenog materijala kroz povećanje broja operativnih jedinica. S druge strane, serijsko povezivanje elemenata unutar pojedinačnog mikroreaktora naziva se *internal numbering-up*. Ovo omogućava jedinstveni ulazni i izlazni tok, a broj jedinica koje se mogu povezati ograničen je padom tlaka u sustavu (Hessel i sur., 2005).

Dodatna prednost mikroprotočnih sustava je jednostavnost. Naime, u slučaju kvara ili prestanka rada jedne jedinice, proces se može nastaviti s minimalnim prekidima. Napredni mikroprotočni sustavi također omogućuju provedbu usporednih reakcija, uz paralelnu separaciju i analizu spojeva unutar jednog mikrokanala. Međutim, postoje i ograničenja u korištenju ovih sustava. Mikroprotočni sustavi još uvijek ne mogu zamijeniti sve konvencionalne procesne sustave posebno one u kojima je jedna od faza krutina. Također, mali promjeri

mikrokanala mogu biti osjetljivi na začepljenje, posebno pri radu s viskozim ili čvrstim medijima.

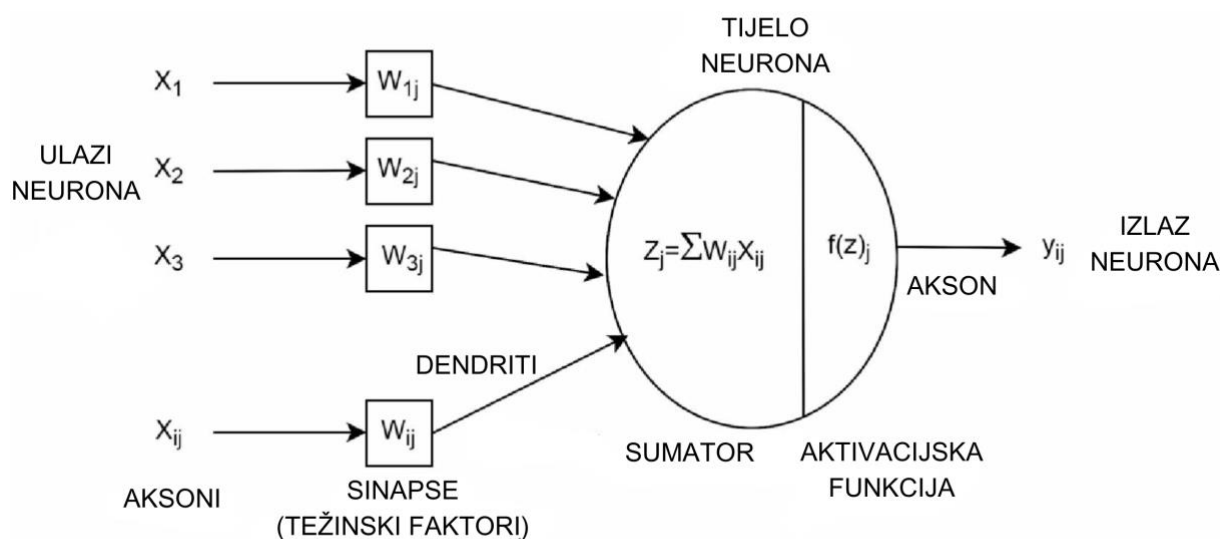
2.6. UMJETNE NEURONSKE MREŽE

Umjetne neuronske mreže (engl. *Artificial neural networks, ANNs*) su računalni modeli čiji je osnovni cilj simulacija mehanizama učenja i obrade podataka koji su inspirirani ljudskim mozgom, visoko kompleksnim i nelinearnim sustavom, sastavljenim od približno 100 milijardi neurona koji su međusobno povezani. Svaki pojedini neuron se sastoji od staničnog tijela, ili somata, koji agregira i analizira signale primljene putem dendritske mreže. Generirane informacije se nakon toga prenose do drugih neurona putem aksona preko specijaliziranih kontaktnih točaka poznatih kao sinapse (Rumelhart i McClelland, 1986).

Arhitektura umjetne neuronske mreže se obično sastoji od triju slojeva: ulaznog sloja, jednog ili više skrivenih slojeva i izlaznog sloja. Skriveni slojevi mogu imati različite topologije, uključujući potpuno povezane slojeve, konvolucijske slojeve, ponavljajuće slojeve i druge. Proces modeliranja često se provodi kroz fazu obučavanja, gdje se koristi algoritam povratne propagacije (engl. *backpropagation*) za ažuriranje težinskih koeficijenata na temelju razlike između stvarnih i predviđenih izlaza (Ibrahim i sur., 2022).

U umjetnim neuronskim mrežama, osnovni element za obradu informacija je sumator koji funkcionira kao ekvivalent some u biološkom neuronu. Sumator prikuplja i zbraja ulazne signale, slično kao što dendriti prenose signale prema somi u biološkom neuronu. Izlazna vrijednost sumatora analogna je aksonu biološkog neurona, koji služi kao komunikacijski kanal za prijenos informacija. Težinski koeficijenti u umjetnim neuronskim mrežama paralelni su sinaptičkim vezama u biološkim neuronima i određuju jačinu i tip interakcije između različitih neurona u mreži.

Strukturalno, neuronsku mrežu možemo prikazati kao usmjereni graf (slika 5) u kojem su čvorovi neuroni, a usmjerene strelice označavaju putanju protoka signala. Težinski koeficijenti mogu imati različite vrijednosti: nula označava odsutnost veze između neurona, pozitivna vrijednost implicira da jedan neuron pobuđuje drugi, dok negativna vrijednost ukazuje na inhibiciju. Veličina težinskog koeficijenta je izravno proporcionalna utjecaju koji jedan neuron ima na drugi. Drugim riječima, veći težinski koeficijent će rezultirati većim utjecajem jednog neurona na rad drugog što odgovara načinu na koji prave neuronske stanice pobuđuju jedne druge kroz sinapse. Aktivacijske funkcije preuzimaju ulogu praga osjetljivosti neurona, odnosno način reakcije na signal, izvršenje izmjene ulaznog signala i predaje drugim neuronima (Kusi i Kowalski, 2018).



Slika 5. Struktura umjetnog neurona (prema Okpo i sur, 2016)

Matematički, neuron prikazan na slici 5 može se opisati sljedećim jednadžbama:

$$z_j = \sum_{i=1}^n w_{ij} \cdot x_i \quad [3]$$

$$y_j = f(z_j + b_j) \quad [4]$$

u kojima su x_i ulazni signali neurona, w_{ij} težinski koeficijenti koji modificiraju ulazni signal, z_j linearni kombinator izlaza koji je funkcija ulaznog signala, $f(z_j)$ aktivacijska funkcija, b_i pomak (*bias*) i y_j izlazni signal neurona.

Umjetne neuronske mreže se sve više primjenjuju u modeliranju procesa zbog svoje sposobnosti aproksimacije složenih, nelinearnih odnosa koji se često javljaju u stvarnim sustavima. Tako npr. u procesima proizvodnje i kontrole kvalitete, ANN se mogu koristiti za modeliranje složenih odnosa između parametara procesa i krajnjeg proizvoda, čime se omogućava bolja kontrola i optimiranje proizvodnje (Cybenko, 1989; Hornik et al., 1989).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

Ovo poglavlje prikazuje materijale potrebne za pripravu i karakterizaciju eutektičkih otopala korištenih u radu, kao i opremu korištenu u seriji šaržnih ekstrakcija i mikroekstrakcija te računalne programe korištene za konstrukciju matematičkih modela umjetnih neuronskih mreža.

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korišteni u ovom radu nabavljeni su od sljedećih proizvođača:

- 2-propanol, HPLC čistoće (VWR Chemicals, Leuven, Belgija)
- Acetonitril $\geq 99,9$ % HPLC čistoće (Fisher Chemical, Geel, Belgija)
- Citratna kiselina, bezvodna, G.R. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Commassie Brillilant Blue G-250 (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švicarska)
- D(+)-glukoza bezvodna p.a. (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- D-fruktoza (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Dikalijev hidrogen fosfat (VWR Chemicals, Leuven, Belgija)
- Etanol (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Etilen glikol G.R. (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, Češka)
- Glicerol, redestilirani p.a. (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)
- Goveđi serumski albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Beč, Austrija)
- Kalijev dihidrogen fosfat (VWR Chemicals, Leuven, Belgija)
- Kolin klorid, 99 % (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgija)
- L(-)-Sorboza (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Malonska kiselina (Fisher Chemical, Geel, Belgija)
- Maltoza (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Metanol (VWR Chemicals, BDH Prolabo, Leicestershire, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Nile red (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Ortofosforna kiselina (VWR Chemicals, Randor, SAD)
- *p*-NPP (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD)
- Saharoza (Merck Milipore, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Njemačka)
- Saharoza G.R. (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Češka)
- Suncokretovo ulje (Zvijezda, Zagreb, Hrvatska)
- Tiourea p.a. (VWR Chemicals, Leuven, Belgija)
- Triton X-100 (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švicarska)

- Ultračista voda (FKIT, Zagreb, Hrvatska)
- Urea p.a. (Gram-mol d.o.o., Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Enzim lipaza

Korištena je komercijalno dostupna liofilizirana lipaza porijeklom iz *Aspergillus oryzae* (Sigma-Aldrich, St. Louis, SAD) u prahu, specifične aktivnosti 50 U/mg. Enzim je čuvan u hladnjaku na 4 °C do korištenja.

3.1.3. Otopine i puferi

3.1.3.1. Kalij-kalij fosfatni pufer (pH = 7)

Za pripremu 0,1 mol/L kalij-kalij fosfatnog pufera pH 7 potrebno je u 800 mL destilirane vode otopiti 6,31 g KH_2PO_4 i 9,343 g K_2HPO_4 . Nakon otapanja, pufer je potrebno homogenizirati i volumen nadopuniti do 1 L.

3.1.3.2. Bradford reagens

Za pripravu Bradford reagensa u boci od 1 L otapa se 100 mg boje Coomassie Brilliant Blue G-250 i miješa s 50 mL 85 % ortofosforne kiseline, 50 mL 95 % etanola, te se dopuni do oznake ultračistom vodom. Dobiveni reagens potrebno je odmah filtrirati kroz 0,45 μm filter (PTFE Syringe filter promjera 25 mm) te čuvati na 4 °C u boci koja sprječava prodiranje svjetla. Prije upotrebe reagens je potrebno zagrijati na 25 °C.

3.1.3.3. Kalij-kalij fosfatni pufer (pH = 7,4)

Za pripremu 0,01 mol/L kalij-kalij fosfatnog pufera pH 7,4 potrebno je najprije pripremiti 0,01 mol/L otopine KH_2PO_4 otapanjem 0,135 g soli KH_2PO_4 u 100 mL destilirane vode, te je potrebno pripremiti 0,01 mol/L otopine K_2HPO_4 otapanjem 0,174 g soli K_2HPO_4 . Otopine soli se miješaju do postizanja pH = 7,4 dodavanjem 0,01 mol/L otopine KH_2PO_4 u 0,01 mol/L otopinu K_2HPO_4 .

3.1.4. Uređaji

- Analitička vaga AUW120 (Shimadzu, Nagakyo-ku, Japan)
- Centrifuga Universal 320 R (Hettich, Beverly, SAD)
- Digitalna vaga EW1500-2M (Kern, Stuttgart, Njemačka)
- Plinski kromatograf s FID detektorom GC-2014 (Shimadzu, Nagakyo-ku, Japan)
- Klipne pumpe PHD 4400 Syringe Pump Series (Harvard Apparatus, Holliston, SAD)
- Magnetska miješalica s grijanjem MS-3000 (Biosan, Riga, Latvija)
- pH-elektroda Metrohm 914 (Metrohm, Herisau, Švicarska)
- UV-Vis spektrofotometar UV-1601 (Shimadzu, Nagakyo-ku, Japan)

- UV-Vis spektrofotometar UV-1800 (Shimadzu, Nagakyo-ku, Japan)
- Homogenizator Vibromix 10 (Tehnica, Podplat, Slovenija)
- Rotacijski viskozimetar ViscoqC 300-L (Anton Paar, Graz, Austrija)

3.1.5. Računalni programi

- BIOVIA TmoleX19 2021 (Dassault Systems, Pariz, Francuska)
- BIOVITA COSMOtherm 2020 (Dassault Systems, Pariz, Francuska)
- MATLab R2022b *akademska licenca* (MathWorks, Natick, SAD)
- Statistica 14.0. (Tibco Software Inc, Santa Clara, SAD)

3.2. METODE

U ovom poglavlju opisani su postupci korišteni za pripravu i karakterizaciju eutektičkih otapala, pripremu i provedbu šaržne i kontinuirane ekstrakcije enzima lipaza podrijetlom iz *Aspergillus oryzae* te metoda za određivanje aktivnosti enzima lipaza u pripremljenim DES-evima.

3.2.1. Priprava eutektičkih otapala

Eutektična otapala pripravljena su iz odabranih komponenti u potrebnom molarnom omjeru prikazanom tablici 1. U bocu je odvagana prethodno izračunata masa svake komponente eutektičkog otapala, a nakon dodatka vode u masenom omjeru od 5 do 40%, sadržaj je miješan na magnetskoj miješalici uz zagrijavanje do 50 °C kroz 2 sata tj. sve do potpunog otapanja i nastanka homogene prozirne kapljevine koja je ta svojstva zadržala i nakon hlađenja na 25 °C.

Tablica 1. Popis pripremljenih eutektičkih otapala te njihov sastav i udio vode

Oznaka	DES	Molarni udjeli	w (H ₂ O) (%)
1	ChCl:Fru	2,5:1	15
2	ChCl:Fru	2,5:1	30
3	ChCl:Fru	2,5:1	40
4	ChCl:MK	1:1	10
5	ChCl:Glc	2,5:1	10
6	ChCl:Sah	4:1	15
7	ChCl:Mal	4:1	20
8	ChCl:Pro:JK	1:1:1	25
9	ChCl:Sor	1:1	20
10	ChCl:Xyl	5:1	25
11	ChCl:LK	2:1	20

Tablica 1. Popis pripremljenih eutektičkih otapala te njihov sastav i udio vode - *nastavak*

Oznaka	DES	Molarni udjeli	w (H ₂ O) (%)
12	ChCl: Sor	2:3	20
13	ChCl: Xyl	2:1	20
14	ChCl: JK	1:1	20
15	ChCl: OK	1:1	0
16	ChCl: PG	1:4	0
17	ChCl: U: TU	1:1:1	10
18	ChCl: Glc	1:1	10
19	ChCl: Sah	2:1	10
20	ChCl: EG: TU	1:1:1	0
21	ChCl: U	1:2	5
22	ChCl: EG	1:2	0
23	ChCl: U: EG	1:2:2	0
24	ChCl: G: EG	1:1:1	0
25	ChCl: G	1:2	10
26	ChCl: U: EG	1:1:1	0
27	ChCl: PG: ZnCl ₂	1:4:0,02	0
28	ChCl: U	1:2	5
29	ChCl: EG	1:4	0
30	ChCl: U: Gly	1:2:2	0
31	ChCl: EG	1:3	0
32	ChCl: G	1:4	0
33	ChCl: G	1:3	0
34	ChCl: G	1:2	0
35	ChCl: Glc	2:1	10
36	ChCl: LK	1:1	20
37	ChCl: G: TU	1:1:1	10

*ChCl – kolin klorid, Fru – fruktoza, MK – malonska kiselina, Glc – glukoza, Mal – maltoza, Pro – prolin, JK – jabučna kiselina, Sor – sorbitol, Xyl – ksiloza, LK – limunska kiselina, OK – oksalna kiselina, PG – poliglikol, U – urea, TU – tiourea, Sah – saharoza, EG – etilen glikol, G – glicerol

3.2.2. Analiza fizikalnih svojstva pripremljenih eutektičkih otapala

3.2.2.1. Mjerenje gustoće eutektičkih otapala

Gustoća eutektičkih otapala određena je primjenom piknometra volumena 2 mL pri 25 °C. Na analitičkoj vagi određena je masa praznog, suhog i čistog piknometra, nakon čega se piknometar napuni eutektičkim otapalom i ponovno važe. Gustoća je izračunata na temelju razlike u masu između praznog i punog piknometra prema jednadžbi 5:

$$\rho = \frac{m_{pu} - m_{pr}}{V} = \frac{m_{DES}}{V} \quad [5]$$

u kojoj m_{DES} označava masu eutektičkog otapala dobivenu oduzimanjem mase punog (m_{pu}) i praznog (m_{pr}) piknometra, V je volumen piknometra (2 mL). Sva mjerenja su izvršena u tri paralele i izražena su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom.

3.2.2.2. Mjerenje dinamičke viskoznosti eutektičkih otapala

Dinamička viskoznost eutektičkih otapala izmjerena je na rotacijskom viskozimetru ViscoQC 300-L pri 25 °C. Sva mjerenja su izvršena u tri paralele i izražena su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom.

3.2.2.3. Mjerenje pH eutektičkih otapala

pH vrijednost eutektičkih otapala određena je s pomoću pH-metra Metrohm 914 uranjanjem sonde u otapalo. Sva mjerenja su izvršena u tri paralele i izražena su kao srednja vrijednost sa standardnom devijacijom.

3.2.2.4. Određivanje polarnosti eutektičkih otapala

Polarnost svakog pripremljenog eutektičkog otapala određena je s pomoću *Nile red* solvatokromne probe prema modificiranoj metodi opisanoj po Jeong i sur. (2017) te Ogihara i sur. (2004). Molekula boje *Nile red* (9-(dietilamino)-5H-benzo[a]fenoksazin-5-on) mijenja svoj maksimum apsorpcije ovisno o polarnosti okolnog otapala, stoga se često koristi u kvantitativnoj procjeni polarnosti uzoraka.

Početna (*stock*) otopina *Nile red* boje koncentracije 1 mg/mL etanola je 100 puta razrijeđena u etanolu i zatim dodana u eutektičko otapalo u omjeru 3:1. Apsorpcijski spektri u rasponu od 380 do 800 nm snimljeni su s pomoću UV-Vis spektrofotometra u kvarcnim kivetama. Prethodno je bitno napraviti kontrolu s polarnim (voda) i nepolarnim otapalom (heksan), te snimiti spektar slijepe probe u kojoj se koristi destilirana voda. Iz dobivenih spektara očita se maksimum apsorpcije (λ_{max}) za svaki uzorak koji se onda koristi za izračun molarne prijelazne energije (engl. *Molar transition energy*) (E_{NR}) prema jednadžbi 6:

$$E_{NR} = \frac{h \cdot c \cdot N \cdot A}{\lambda_{max}} \quad [6]$$

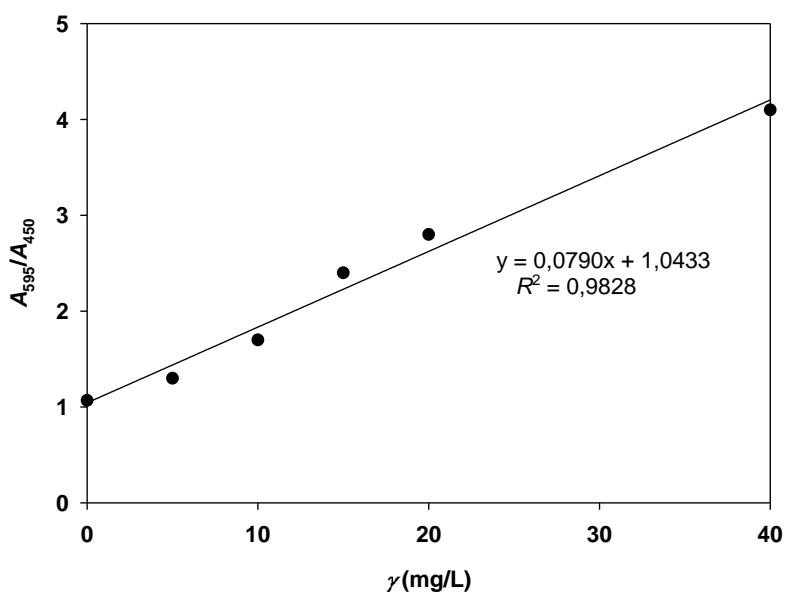
u kojoj je h Planckova konstanta ($6,62607004 \cdot 10^{-34}$ J/s), c brzina svjetlosti (299 792 458 m/s) i N_A Avogadrov broj ($6,022 140 76 \cdot 10^{23}$ 1/mol).

3.2.3. Određivanje koncentracije proteina lineariziranom metodom po Bradfordu

Za potrebe određivanja koncentracije proteina korištena je linearizirana metoda po Bradfordu koja se zasniva na vezivanju kiseloplavog kopolimera Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250), u kiseloj sredini u kojoj je ona u anionskom obliku, s amino skupinama proteina koje se nalaze u otopini koja se ispituje (Kielkopf i sur., 2020). Tijekom ove reakcije,

apsorpcijski maksimum za boju se pomjera od 465 nm na 595 nm, pri čemu se javlja vidljiva promjena boje otopine od smeđe do plave. Boja reagira s aminokiselinskim ostacima, prvenstveno arginina, ali i tirozina, histidina, lizina, triptofana i fenilalanina.

Kako bi se odredila koncentracija proteina u uzorcima, u plastičnu kivetu je dodana otopina proteina i Bradfordovog reagensa u omjeru 1:1, te je tako dobivena smjesa kratko homogenizirana. Nakon točno 5 min spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija pri $\lambda = 595$ nm i $\lambda = 450$ nm. Svi uzorci su analizirani u tri paralele. Koncentracija proteina u uzorcima dobivena je iz baždarnog dijagrama pri čemu je korišten omjer apsorbancija izmjerenih pri $\lambda = 595$ nm i $\lambda = 450$ nm (slika 6).



Slika 6. Baždarni pravac za određivanje koncentracija proteina lineariziranom metodom po Bradfordu

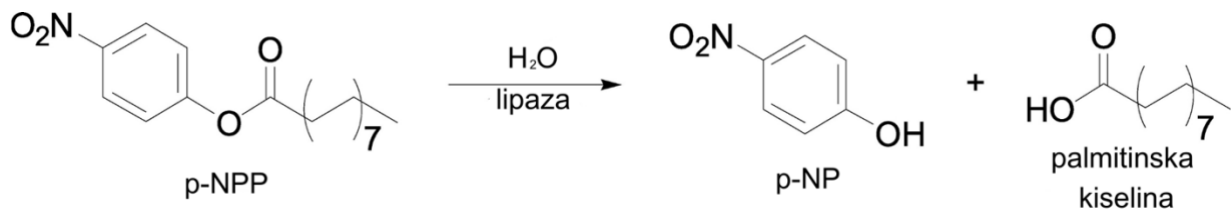
Koncentracija proteina u nepoznatim uzorcima određuje se prema jednažbi 7:

$$c = \frac{\frac{A_{595}}{A_{450}} - l}{k} \quad [7]$$

gdje je c koncentracija proteina u uzorku, A apsorbancija pri određenoj valnoj duljini, 595 i 450 nm, k nagib i l odsječak baždarnog pravca.

3.2.4. Određivanje aktivnosti lipaze iz *Aspergillus oryzae* u eutektičkim otapalima

Aktivnost komercijalnog enzima lipaza u ispitivanim eutektičkim otapalima određena je metodom početnih brzina na temelju provedbe reakcije hidrolize p -nitrofenilpalmitata (p -NPP) u šaržnom reaktoru (slika 7) (Sung i sur., 2016).



Slika 7. Reakcija hidrolize *p*-nitrofenilpalmitata (*p*-NPP) na *p*-nitrofenil (*p*-NP) i palmitinsku kiselinu katalizirana lipazom

U šaržni reaktor volumena 50 mL dodano je 9,4 mL 0,1 mol/L kalij-kalij fosfatnog pufera pH koji sadrži 10 % odabranog DES i 0,5 % Triton X-100 te 0,1 mL otopine enzima koncentracije 10 µg/mL. Reakcija je započeta dodatkom 0,5 mL 10 mmol/L otopine *p*-NPP otopljenog u izopropanolu. Test je proveden pri brzini miješanja od 120 rpm na magnetnoj miješalici pri temperaturi od 25 °C. Periodički (5, 10, 15, 25 i 30 min) je iz reaktora izuzeto 300 µL alikvota i razrijeđeno s 300 µL acetonitrila kako bi se zaustavila reakcija. Uzorak je centrifugiran (5 min, 14000 rpm, 25 °C) te mu je izmjerena apsorbancija pri valnoj duljini 405 nm u kvarcnoj kiveti promjera 1 cm. Na temelju dobivenih apsorbancija dobivena je ovisnost koncentracije nastalog *p*-NP-a o vremenu provedbe reakcije. Iz dobivenog nagiba pravca izračunata je rezidualna aktivnost enzima lipaza (R.A.) prema jednadžbi 8:

$$R.A. = \frac{dy_{\text{FAME}}}{dt} \cdot \frac{m_r}{m_E} \cdot \frac{1}{\gamma_E} \quad [8]$$

gdje nagib pravca predstavlja član $\frac{dy_{\text{FAME}}}{dt}$, a članovi m_r i m_E redom su masa reakcijske smjese i masa enzima u istoj. Isti postupak primijenjen je za ispitivanje aktivnosti lipaze u fosfatnom puferu koji je upotrijebljen umjesto eutektičkog otapala u istoj količini (10 %) za slijepu probu. Sva mjerenja su provedena u tri paralele.

3.2.5. Analiza stabilnosti enzima lipaze

Stabilnost enzima lipaza ispitana je kroz 64 dana mjerenjem hidrolitičke aktivnosti enzima čuvanog u 0,1 mol/L kalij-kalij fosfatnom puferu pH 7 pri 4 °C i 25 °C. U vremenskim intervalima, izmjerena je aktivnost enzima prema postupku opisanom u 3.2.4.

Gubitak aktivnost enzima lipaza je opisan kinetikom prvog reda prema jednadžbi 9:

$$\frac{d[R.A.]}{dt} = -k_d \cdot R.A. \quad [9]$$

gdje k_d , predstavlja konstantu deaktivacije, a R.A. je rezidualna aktivnost lipaze (%) koja se računa se kao postotak aktivnosti enzima u odnosu na inicijalnu aktivnost enzima (nulti dan pri 25 °C). Vrijednost konstante deaktivacije enzima prilikom čuvanja na 4 °C i na 25 °C procijenjena je primjenom programskog paketa Statistica 14.0.

3.2.6. Šaržna ekstrakcija lipaza eutektičkim otapalima

Kako bi se formirao ATPS na bazi DES-a potrebna je sol topljiva u vodi u visokoj koncentraciji, a u tu svrhu je korišten kalijev dihidrogenfosfat. Za provedbu šaržne ekstrakcije enzima lipaze porijeklom iz plijesni *Aspergillus oryzae* potrebno je pripremiti početnu otopinu enzima koncentracije 0,1 mg/mL otapanjem enzima u otopini K_2HPO_4 , u kojoj je koncentracija soli mijenjana u rasponu od 0,6 do 0,8 g/mL. U epruvetama volumena 15 mL pomiješano je 1,3 g analiziranog eutektičkog otapala s 2 mL početne otopine enzima u soli. Pripremljene smjese homogenizirane su u inkubacijskoj tresilici kroz 30 min pri brzini miješanja od 400 rpm i temperaturi 25 °C. Nakon homogenizacije, smjesa je centrifugirana 5 minuta pri 4000 rpm i temperaturi 25 °C nakon čega je, u slučaju nastanka dvije faze, izmjeren volumen rafinatne i ekstraktne faze. Faze su međusobno odvojene pomoću šprice i igle kako bi se izbjeglo miješanje te je u svakoj od faza izmjerena koncentracija proteina metodom po Bradfordu. U nastalom dvofaznom sustavu je gornji sloj (ekstraktna faza) eutektičko otapalo s ekstrahiranim enzimom lipaza, a donji (rafinatna faza) otopina K_2HPO_4 sa zaostalim enzimom. Učinkovitost ekstrakcije enzima E (jednadžba 10) i koeficijent raspodjele K_p (jednadžba 11) računaju se na temelju volumena faza i koncentracije enzima u svakoj od faza izračunate:

$$E = \frac{\gamma_{P,E} \cdot V_E}{\gamma_{P,E} \cdot V_E + \gamma_{P,R} \cdot V_R} \cdot 100 \% \quad [10]$$

$$K_p = \frac{\gamma_{P,E}}{\gamma_{P,R}} \quad [11]$$

u kojima su $\gamma_{P,E}$ masena koncentracija proteina u ekstraktnoj fazi (mg/mL), $\gamma_{P,R}$ masena koncentracija proteina u rafinatnoj fazi (mg/mL), V_E volumen ekstraktne faze (mL) i V_R volumen rafinatne faze (mL).

Za svaki ekstrakcijski sustav, jednadžbom 12 izračunat je i koeficijent R , koji predstavlja omjer volumena ekstraktne (V_E) i rafinatne faze (V_R):

$$R = \frac{V_E}{V_R} \quad [12]$$

3.2.7. Kontinuirana ekstrakcija enzima lipaze u mikroprotočnom sustava

Za provođenje kontinuirane ekstrakcije enzima u mikroprotočnom sustava korišten je mikroekstraktor od teflonske cijevi duljine 30 cm i promjera 1000 μ m izveden s dva ulaza u obliku slova „T“. Za uvođenje dviju kapljevutih faza ((i) eutektičko otapalo, (ii) otopina soli K_2HPO_4 i lipaze) korištene su klipne pumpe. Eksperimenti su provedeni pri ukupnim protocima u rasponu od 200 μ L/min do 4000 μ L/min. Omjeri protjecanja kapljivih faza u mikroekstraktorima bili su podešeni na 1:1,5 kako bi se osiguralo da na izlazu omjer volumena faza bude kao u šaržnom reaktoru. Nakon sakupljanja uzorka na izlazu, smjesa je centrifugirana 5 minuta pri

4000 rpm i temperaturi 25 °C nakon čega je, u slučaju nastanka dvije faze, izmjeren volumen rafinatne i ekstraktne faze. Faze su međusobno odvojene pomoću šprice i igle kako bi se izbjeglo miješanje te je u svakoj od faza izmjerena koncentracija proteina metodom po Bradfordu. U nastalom dvofaznom sustavu je gornji sloj (ekstraktna faza) eutektičko otapalo s ekstrahiranim enzimom lipaza, a donji (rafinatna faza) otopina K₂HPO₄ sa zaostalim enzimom. Učinkovitost ekstrakcije enzima i koeficijent raspodjele izračunati su korištenjem jednadžbi 10 i 11.

3.2.8. Sinteza biodizela

3.2.8.1. Kemijska sinteza biodizela

Kemijska sinteza biodizela provedena je u tikvici volumena 10 mL iz 60 mg jestivog suncokretovog ulja, 4 mL izooktana i 200 µL otopine kalijevog hidroksida u metanolu koncentracije 2 mol/L. Smjesa je dobro homogenizirana i ostavljena da reagira na 25 °C. Nakon bistrenja smjese, odvojen je donji sloj koji sadrži glicerol te je u gornji dodan 1 g natrijeva hidrogenkarbonata monohidrata zbog neutralizacije. Nakon neutralizacije, 500 µL uzorka je pomiješano s 500 µL 0,5 mol/L HCl. Tako pripremljen uzorak centrifugiran je 5 min pri 14000 rpm te temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja uzorak je razrijeđen 1000x i profiltriran kroz 42/25 filter (nesterilni PVDF Syringe filteri, pora: 0,45(µm), promjer:4(mm)) u vijalu za analizu na plinskom kromatografu. Ukupno su pripremljene 3 paralele.

3.2.8.2. Enzimska sinteza biodizela

Sinteza biodizela iz suncokretovog ulja s metanolom provedena je u šaržnom reaktoru uz enzim lipaza porijeklom iz *Aspergillus oryzae* kao biokatalizatorom. U tri šaržna reaktora volumena 250 mL s dvostrukom stijenkom dodano je ulje i metanol u omjerima prema tablici 2.

Tablica 2. Sadržaj reaktora za proizvodnju biodizela

Reaktor	Stehiometrijski omjer	m (ulje) (g)	m (metanol) (g)
1	1:3,2	45,83	5,72
2	1:90	45,83	157,19
3	1:3,2	45,83	5,72

Reakcijske smjese miješane su pomoću magnetne miješalice (600 rpm), pri konstantnoj temperaturi od 40 °C primjenom vanjskog termostata. Nakon 20 minuta miješanja i termostatiranja reakcijske smjese, reakcija je pokrenuta dodavanjem enzima lipaze u DES-u koncentracije 0,01 mol/L (4,58 g) u reaktor 1 i 2, te dodavanjem enzima lipaza u 0,01 mol/L otopini kalij-kalij-fosfatnog pufera pH 7,4 (4,58 g) u reaktoru 3.

U definiranim vremenskim intervalima uzorci su izuzimani iz bioreaktora te su pripremani za analizu na način da je 500 μ L uzorka pomiješano s 500 μ L 0,5 mol/L HCl za deaktivaciju enzima i zaustavljanje reakcije. Tako pripremljen uzorak centrifugiran je 5 min pri 14000 rpm te temperaturi od 4 °C. Nakon centrifugiranja iz gornjeg sloja otpipetirano je 150 μ L uzorka te 1000x razrijeđeno u etanolu. Uzorak je ponovno homogeniziran te profiltriran kroz 42/25 filter (nesterilni PVDF Syringe filteri, pore: 0.45 μ m, promjer: 4 mm) u vijalu za analizu na plinskom kromatografu. Za svaki uzorak pripremljene su tri paralele koje su dalje analizirane.

3.2.9. Određivanje koncentracije metilnih estera masnih kiselina i glicerola plinskom kromatografijom

Koncentracija metilnih estera masnih kiselina i glicerola određeni su na plinskom kromatografu s plameno-ionizirajućim detektorom (engl. *Flame Ionization Detector, FID*) i kapilarnom kolonom (dužina 30 m, unutarnji promjer 0,53 mm i debljina filma 1,00 μ m) prema metodi opisanoj u radu Budžaki i sur (2015). Kromatografski uvjeti korišteni u mjerenju priloženi su u tablici 3.

Tablica 3. Kromatografski uvjeti mjerenja koncentracije estera masnih kiselina i glicerola plinskom kromatografijom

Kolona	Zebron ZB-Wax GC	
Plin nosač	Dušik	
Protok plina nosača	1,97 mL 1/min	
Temperaturni program	Početna temperatura	180 °C
	Brzina zagrijavanja	5 °C 1/min
	Konačna temperatura	230 °C
	Temperatura FID detektora	240 °C
Trajanje analize	15 min	

Kako bi se provela identifikacija i kvantifikacija spojeva, nužno je pratiti retencijsko vrijeme, odnosno vrijeme potrebno određenom spoju da prođe kroz kromatografski sustav. U tablici 4 prikazana su retencijska vremena različitih estera masnih kiselina karakterističnih za suncokretovo ulje:

Tablica 4. Retencijska vremena estera masnih kiselina

Ester	t_R (min)
Palmitinske kiseline	7,740
Stearinske kiseline	10,590
Oleinske kiseline	10,867
Linolne kiseline	11,575

Iskorištenje procesa enzimatske sinteze biodizela (η) računa se prema jednadžbi 13:

$$\eta = \frac{c_E}{c_K} \cdot 100 \quad [13]$$

u kojoj c_E predstavlja izmjerenu koncentraciju FAME dobivenu enzimskom, a c_K kemijskom sintezom.

3.2.10. Statistička analiza i matematičko modeliranje ekstrakcije enzima lipaze

3.2.10.1. Osnovna statistička analiza, raspodjela podataka i korelacijska matrica

Sva mjerenja fizikalno-kemijskih svojstava DES-eva, rezidualne aktivnosti lipaze, učinkovitosti ekstrakcije i koeficijenta raspodjele provedena su u tri paralele i osnovna statistička analiza (srednja vrijednost i standardna devijacija) provedena je u programskom paketu Statistica 14.0.

Korelacije između eksperimentalnih podataka analizirane su primjenom Spearmanove korelacijske matrice u programskom paketu MATLAB R2022b. Spearmanov koeficijent korelacije (ρ) je neparametarske prirode, a računa se prema jednadžbi 14:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^N d_i^2}{N^3 - N} \quad [14]$$

U kojoj N označava broj podataka, d_i kvadrat razlike rangova prve (nezavisne) i druge (zavisne) varijable. Kada je određivana značajnost koeficijenta korelacije, kao granična vrijednost značajnih i neznčajnih koeficijenata uzeta je 0,05, odnosno ako je $p < 0,05$ korelacija je značajna, a ako je $p > 0,05$ koeficijent korelacije nije značajan.

Cjelokupni korišteni kod za uvoz podataka, distribuciju podataka i izradu Spearman korelacijske matrice u programu MATLAB su u prilogu 1.

3.2.10.2. Izračun σ -profila i deskriptora eutektičkih otapala

Svi spojevi korišteni za pripremu DES-eva prethodno su optimirani geometrijski i energetski u programu BIOVIA TmoleX19 2021 (Dassault Systems, Pariz, Francuska). Kvantno-kemijski proračuni izvedeni su koristeći teoriju funkcionalne gustoće (engl. *Density functional theory, DFT*). Kako bi se stvorila pojednostavljena baza podataka, za svaku molekulu odabran je i korišten za daljnje proučavanje najzastupljeniji neionizirani konformer s najmanjom energijom. U slučaju da molekula ima dva ili više iona (npr. CHCl_3), postupa se kao i s ionskim parovima. Njihove strukture optimirane su prema Abranches i sur. (2019). Softverom generirana COSMO datoteka za svaku optimiziranu molekulu sadrži krivulju σ -profila koja pruža kvantitativnu reprezentaciju površinskog naboja polarne molekule na skali polariteta. HBA su karakterizirani pikovima u regiji negativnog potencijala, HBD u regiji pozitivnog potencijala, a nepolarne molekule pikovima u regiji potencijala oko nule.

Za izračun σ -profila smjese, koristi se izračun prema jednadžbi 15:

$$\sigma_n = \sigma_{ns1} \cdot K_1 + \sigma_{ns2} \cdot K_2 + \sigma_{ns3} \cdot K_3 + \sigma_{nH_2O} \cdot K_4 \quad [15]$$

u kojoj je σ_n profil smjese, a σ_{nsn} redom profili samostalnih komponenti pomnoženi s njihovim molarnim udjelom K_n (mol/mol) unutar smjese.

Kako bi se definirali molekularni deskriptori za sve sastojke DES-a, krivulje σ -profila za svaki HBA, HBD i vodu podijeljene su u 10 regija. Širina svake regije je $0,005 \text{ e}/\text{Å}^2$, pokrivajući raspon od $-0,025$ do $+0,025 \text{ e}/\text{Å}^2$. Područja ispod krivulje integrirana su zasebno za svaki definirani raspon, što je postignuto zbrajanjem ordinatnih vrijednosti točaka σ -profila kako je predstavljeno u softveru BIOVIA COSMOtherm. Ordinatne vrijednosti koje leže na granicama podijeljene su na pola, a svaka polovica pripisana je jednoj od susjednih regija. Tako su izračunati S_{mix}^i deskriptori σ -profila kao numeričke vrijednosti podijeljenih 10 područja.

3.2.10.3. Modeliranje veze između učinkovitosti ekstrakcije te rezidualne aktivnosti i DES deskriptora

Modeliranje veze između učinkovitosti ekstrakcije te rezidualne aktivnosti i DES deskriptora provedeno je na temelju pretpostavke da navedene izlazne varijable mogu opisati kao funkcije S_{mix}^i deskriptora σ -profila i njihovih fizikalno-kemijskih svojstava prema jednadžbi 16:

$$E(R.A.) = f(\text{pH}, \rho, \eta, E_{NR}, S_{\text{mix}}^1, S_{\text{mix}}^2, S_{\text{mix}}^3, S_{\text{mix}}^4, S_{\text{mix}}^5, S_{\text{mix}}^6, S_{\text{mix}}^7, S_{\text{mix}}^8, S_{\text{mix}}^9, S_{\text{mix}}^{10}) \quad [16]$$

Na osnovu korelacijske matrice, odabrane su četiri ulazne varijable koje imaju značajnu korelaciju i s učinkovitošću ekstrakcije i s rezidualnom aktivnošću, a to su redom pH , S_{mix}^1 , S_{mix}^7 ,

i S_{mix}^8 . Veza između zavisnih i nezavisnih varijabli opisana je primjenom linearnih (jednadžba 17) regresijskih modela te primjenom modela umjetnih neuronskih mreža.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot pH + \beta_2 \cdot S_{mix}^1 + \beta_3 \cdot S_{mix}^7 + \beta_4 \cdot S_{mix}^8 \quad [17]$$

gdje je Y izabrana izlazna varijabla, odnosno učinkovitost ekstrakcije ili rezidualna aktivnost, β_0 odsječak na ordinati, odnosno parametar slobodnog člana, a $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_k$ parcijalni koeficijenti nagiba pravca, a nalaze uz odabrane ulazne varijable X_1, X_2, \dots, X_k . Za procjenu parametara linearnog regresijskog modela (jednadžba 17) korištena je metoda najmanjih kvadrata koja minimizira sumu kvadratnih razlika između izmjerenih i predviđenih vrijednosti u programu

Veza između zavisnih i nezavisnih varijabli opisana je također primjenom modela umjetnih neuronskih mreža. U programskom paketu Statistica 14.0 razvijene su višeslojne perceptronske neuronske mreže (eng. *Multiple Layer Perceptron, MLP*) umjetne neuronske mreže. ANN modeli sadržavali su ulazni sloj, skriveni sloj i izlazni sloj. Ulazni sloj je imao četiri neurona ($pH, S_{mix}^1, S_{mix}^7, i S_{mix}^8$), izlazni sloj je imao dva neurona (učinkovitost ekstrakcije i rezidualna aktivnost), a broj neurona u skrivenom sloju algoritma je varirao između 4 i 13. Za aktivacijske funkcije skrivenog sloja i izlaznog sloja nasumično su odabrane funkcija identiteta, logistička funkcija, tangens hiperbolna i eksponencijalna aktivacijska funkcija. Za razvoj ANN model skup podataka podijeljen je u omjeru 70:30 na skup podataka za kalibraciju i skup podataka za predviđanje. Osim toga, skup podataka kalibracije podijeljen je na 70 % za treniranje mreža, 15 % za testiranje mreža i 15 % za provjeru valjanosti modela (validacija modela). Za treniranje modela korišten je algoritam povratne propagacije. Primjenjivost razvijenih kalibracijskih modela procijenjena je s pomoću koeficijenta determinacije za kalibraciju (R_{kal}^2), prilagođenog koeficijenta determinacije za kalibraciju ($R_{kal}^2_{adj}$) i korijena srednje kvadratne pogreške za kalibraciju (engl. *Root Mean Square Error, RMSE*). Učinkovitost predviđanja modela procijenjena je na temelju koeficijenta determinacije za predviđanje (R_{pred}^2), prilagođenog koeficijenta determinacije za kalibraciju ($R_{pred}^2_{adj}$), korijena srednje kvadratne pogreške za predviđanje (*RMSEP*), standardne pogreške predviđanja (engl. *Standard Error of Prediction, SEP*), omjer predviđanja i odstupanja (engl. *Ratio of Prediction to Deviation, RPD*) i omjera raspona pogreške (engl. *Ratio of the Error Range, RER*) (Fearn, 2002).

3.2.10.4. Procjena optimalnih vrijednosti DES deskriptora eutektičkih otapala za ekstrakciju lipaze vodenim dvofaznim sustavima

Utjecaj S_{mix} deskriptora σ -profila na učinkovitost ekstrakcije i rezidualnu aktivnost enzima lipaze podrijetlom iz *Aspergillus oryzae* opisan je modelom odzivnih površina prema jednadžbi 18:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{10} \beta_i \cdot (S_{mix}^i)_i + \sum_{i=1}^{10} \beta_{ii} \cdot (S_{mix}^i)_i^2 + \sum_{i=1}^9 \sum_{j=i+1}^{10} \beta_{ij} \cdot (S_{mix}^i)_i \cdot (S_{mix}^i)_j \quad [18]$$

gdje je Y izabrana izlazna varijabla, odnosno učinkovitost ekstrakcije ili rezidualna aktivnost, a β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} regresijski koeficijenti odsječka na y-osi, linearnog, kvadratnog i interakcijskih članova. Optimalne vrijednosti S_{mix}^i deskriptora σ -profila procijenjene su u programu Statistica 14.0 primjenom funkcije poželjnosti.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Enzim lipaza jedan je od najkorištenijih enzima u industriji. Stoga ne čudi činjenica da se i dalje istražuju metode ekstrakcije koje bi povećale učinkovitost ekstrakcije kao i nekonvencionalna otapala koja će povećati stabilnost enzima.

U ovom istraživanju provedena je ekstrakcija enzima lipaza porijeklom iz *Aspergillus oryzae* korištenjem ATPS na bazi DES-eva. U prvom dijelu istraživanja pripravljeno je 37 DES-eva. Svi DES-evi su karakterizirani (pH, gustoća, polarnost i viskoznost) te je za svaki DES, korištenjem COSMOtherm programa, određen pripadajući σ -profil. U seriji šaržnih ekstrakcija ispitan je utjecaj sastava APTS na bazi DES-eva na učinkovitost ekstrakcije i aktivnost enzima lipaza. Na temelju σ -profila, razvijeni su modeli umjetnih neuronskih mreža s ciljem predviđanja učinkovitosti ekstrakcije i aktivnosti enzima lipaza u različitim DES-evima. Na temelju rezultata modela, predloženi su optimalni DES-evi, a rezultati su potvrđeni u nizu neovisnih eksperimenata u šaržnim ekstraktorima. Kako bi se proces dodatno intenzificirao, ekstrakcija je provedena u mikroekstraktoru. Na samom kraju, enzim lipaza ekstrahiran u DES-u korišten je u proizvodnji biodizela.

4.1. PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA EUTEKTIČKIH OTAPALA

Kao što je navedeno u uvodu, s obzirom na veliki broj potencijalnih HBD i HPA, kao i njihovih omjera u smjesi, moguće je pripremiti jako veliki broj različitih DES-eva. Sastav DES-a značajno utječe na svojstva smjese pa je stoga nužno suziti izbor potencijalnih DES-eva s obzirom na dostupnu literaturu. Kriteriji koji su uzeti u obzir prilikom odabira bili su učinkovitost ekstrakcije drugih proteina, sigurnost pri rukovanju, biorazgradivost te održivost i pristupačnost cijena. Kao HBA za sva pripremu svih DES-eva korišten je bezvodni ChCl zbog dostupnosti. A osim toga ChCl se smatra lako biorazgradivom soli jer se razgradi do 93 % u periodu od 14 dana. Naime, prema smjericama Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (OECD) spojevi koji postignu stupanj razgradnje od 60 % kroz 10 dana tijekom 28-dnevnog testa treba smatrati „lako biorazgradivim” (OECD, 1994). Kao HBD u ovom istraživanju su korišteni fruktoza (Hayyan i sur., 2012), malonska kiselina (Al-Wahaibi i sur., 2019), glukoza (Hayyan i sur., 2013), citratna kiselina (Yusuf i sur., 2021), saharoza (Miranda-Molina 2019), prolin, jabučna kiselina (Dai i sur., 2015), sorbitol (Salido-Fortuna i sur., 2021), ksiloza (Biernacki i sur., 2020), oksalna kiselina (de Sousa i sur., 2022), urea, tiourea (Li i sur., 2023), etilen glikol, poliglikol (Zhu i sur., 2019), cinkov klorid (Tamaddon i sur., 2023) i glicerol (Almar i sur., 2016).

Na temelju odabranih HBA i HBD pripravljeno je ukupno 37 DES-eva, te je svakom određena pH vrijednost, gustoća, viskoznost i polarnost. Izmjerena fizikalno-kemijska svojstva prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Fizikalno-kemijska svojstva pripremljenih DES-eva

Oznaka	pH	ρ (g/mL)	η (mPas)	E_{NR} (kcal/mol)	Oznaka	pH	ρ (g/mL)	η (mPas)	E_{NR} (kcal/mol)
1	3,79 ± 0,01	1,214 ± 0,029	614,70 ± 4,24	49,98	20	3,24 ± 0,01	1,125 ± 0,042	409,80 ± 8,49	50,16
2	4,11 ± 0,01	1,173 ± 0,013	51,75 ± 1,61	49,90	21	4,74 ± 0,01	1,179 ± 0,041	657,65 ± 64,98	50,34
3	4,68 ± 0,01	1,141 ± 0,024	24,17 ± 4,96	49,64	22	4,51 ± 0,01	1,106 ± 0,039	40,09 ± 2,81	50,87
4	0,00 ± 0,00	1,217 ± 0,019	110,40 ± 4,86	48,17	23	6,73 ± 0,01	1,155 ± 0,033	700,65 ± 42,78	50,47
5	3,05 ± 0,00	1,197 ± 0,045	849,53 ± 16,97	50,43	24	4,86 ± 0,01	1,148 ± 0,041	619,05 ± 34,72	50,83
6	5,07 ± 0,04	1,203 ± 0,046	605,70 ± 8,49	50,38	25	3,85 ± 0,01	1,184 ± 0,050	401,80 ± 2,83	50,12
7	3,81 ± 0,01	1,165 ± 0,044	77,53 ± 4,56	50,29	26	6,62 ± 0,09	1,150 ± 0,051	506,90 ± 27,58	50,74
8	3,34 ± 0,01	1,217 ± 0,046	333,60 ± 13,86	50,83	27	7,59 ± 0,01	1,057 ± 0,027	60,15 ± 3,16	51,10
9	2,12 ± 0,04	1,221 ± 0,042	539,70 ± 21,21	50,43	28	10,49 ± 0,01	1,172 ± 0,049	512,20 ± 3,54	50,29
10	3,16 ± 0,04	1,150 ± 0,045	37,91 ± 1,61	49,81	29	3,72 ± 0,01	1,176 ± 0,005	35,57 ± 2,66	50,56
11	1,13 ± 0,01	1,205 ± 0,042	371,07 ± 34,09	48,17	30	4,18 ± 0,01	1,186 ± 0,033	689,60 ± 0,00	50,29
12	3,51 ± 0,01	1,337 ± 0,007	391,70 ± 18,53	49,94	31	3,69 ± 0,01	1,098 ± 0,053	30,46 ± 0,15	50,74
13	2,85 ± 0,01	1,218 ± 0,020	65,68 ± 1,75	50,25	32	4,95 ± 0,01	1,202 ± 0,044	583,03 ± 15,28	50,34
14	0,73 ± 0,01	1,209 ± 0,049	69,88 ± 1,26	47,97	33	5,76 ± 0,01	1,179 ± 0,066	509,70 ± 7,07	50,43
15	-0,40 ± 0,01	1,187 ± 0,002	358,40 ± 21,21	47,85	34	3,54 ± 0,01	1,186 ± 0,028	538,03 ± 15,27	50,52
16	4,02 ± 0,01	1,049 ± 0,042	60,78 ± 4,95	51,06	35	5,41 ± 0,01	1,153 ± 0,061	45,49 ± 4,82	49,85
17	7,51 ± 0,04	1,184 ± 0,035	44,64 ± 0,13	49,59	36	0,36 ± 0,01	1,218 ± 0,018	122,07 ± 3,93	48,01
18	3,42 ± 0,00	1,191 ± 0,020	51,27 ± 2,81	50,07	37	7,06 ± 0,02	1,168 ± 0,053	252,10 ± 3,39	49,64
19	1,59 ± 0,01	1,213 ± 0,065	439,80 ± 39,60	51,42					

4.1.1. pH vrijednost

pH DES-eva ima značajan utjecaj na aktivnost i stabilnost enzima. Enzimi obično pokazuju optimalnu aktivnost pri određenoj pH-vrijednosti, a promjene u pH DES-eva mogu izazvati promjene u konformaciji enzima, što rezultira smanjenjem ili povećanjem enzimske aktivnosti. Također, pH otapala može utjecati na stabilnost enzima jer viši ili niži pH od optimalnog može dovesti do denaturacije enzima i gubitka njegove funkcije. Osim toga, pH otapala može utjecati i na interakciju enzima s njegovim supstratom, jer enzimi često zahtijevaju specifičnu kiselinsko-baznu okolinu za optimalnu aktivnost. Stoga, odabir DES-a s određenom pH vrijednosti može biti ključna za poboljšanje učinkovitosti enzimatskih reakcija (Nielsen, 2009).

U tablici 5 prikazani su rezultati mjerenja pH vrijednosti svih pripremljenih DES-eva. Kao što je vidljivo sastav otapala, uključujući prisutnost kiselina ili baza, igra ključnu ulogu u pH vrijednost DES-eva. Primjerice, DES-evi kod kojih je HBD organska kiselina zabilježene su niže vrijednosti pH, najčešće manje od 3. DES s tako niskim pH vrijednostima nije pogodan medij za mnoge enzimatske reakcije jer najčešće dovodi do denaturacije enzima odnosno smanjenja katalitičke aktivnosti. Međutim, zbog svoje kiselosti često su poželjni u provedbi ekstrakcije drugih bioloških komponenti poput kurkuminoida (Rachmaniach i sur., 2018), fenola (Santos-Martin i sur., 2023) i antocijanina (Grillo i sur., 2020). DES-evi koji su pripremljeni od CHCl_3 i šećernih alkohola kao donora vodikove veze su najčešće blago kiseli. Povećanjem udjela vode povećava se pH vrijednost kiselih otapala, dok s druge strane kod bazičnih otapala povećanje udjela vode rezultira sniženjem pH vrijednost.

Najniža vrijednost pH od $-0,4 \pm 0,01$ izmjerena je u otapalu $\text{CHCl}_3:\text{OK}$ 1:1, što se slaže s literaturnim izvorima koji se bave proučavanjem kiselih eutektičkih otapala (Qin i sur., 2020). S obzirom na to da se pH izražava kao $-\log[\text{H}^+]$, u slučaju kada je koncentracija vodikovih iona veća od 1 mol/L, moguća je negativna pH vrijednost. Ovakve pH vrijednosti su visoko korozivne, denaturiraju enzime i nisu primjenjive u industriji (Masson i Lushchekina, 2022).

Eutektičko otapalo $\text{CHCl}_3:\text{U}$ 1:2 imalo je najveću izmjerenu pH vrijednost $10,49 \pm 0,01$. Iako je urea slaba kiselina, visoka pH vrijednost u DES-u s ureom može se objasniti razgradnjom uree i otpuštanjem amonijaka prilikom pripreme eutektičkih otapala, odnosno povećanjem temperature smjese, što ju čini lužnatom zbog bazičnih svojstava amonijaka (Simeonov i Carlos, 2016).

Svaki enzim ima različitu optimalnu pH vrijednosti pri kojoj je najaktivniji. Optimalni pH za aktivnost enzima lipaze je pri 6,5, stoga će velike varijacije od optimalne vrijednosti rezultirati denaturacijom enzima uslijed promjena u konformacijskoj strukturi uzrokovanih formiranjem ili

prekidom ionskih interakcija, posebice u regijama koji sadrže amino i karboksilne skupine zbog utjecaja okoline, kiselina ili baza (Maharani i sur., 2020).

4.1.2. Gustoća eutektičkih otapala

Gustoća eutektičkih otapala igra ključnu ulogu u ekstrakciji. Poznavanje gustoće eutektičkih otapala neophodno je za učinkovitu separaciju faza u ATPS, odnosno ako su dvije faze koje formiraju ATPS jednake ili slične gustoće neće doći do njihovog razdvajanja. Osim toga, što je gustoća otapala veća, jače su veze između molekula otapala kao i van der Waalove i elektrostatske interakcije, koje utječu na prijenos tvari i učinkovitost ekstrakcije.

U tablici 5. prikazane su izmjerene vrijednosti gustoće za sve pripravljene DES-eve. Kao što je vidljivo, sva pripravljena eutektička otapala imaju vrijednost gustoće veću od vode pri 25 °C. Otapalo ChCl:PG 1:4 ima najnižu vrijednost gustoće $1,049 \pm 0,042$ g/mL, što odgovara s literaturnim navodima u kojima se navodi da DES-evi na bazi polietilen glikola pri 25 °C imaju gustoću 1,0673 g/mL (Ijadar, 2020). Najveća gustoća izmjerena je za eutektičko otapalo ChCl: Sor 2:3 s 20 % vode (w/w) i to $1,337 \pm 0,007$ g/mL. Usporedbom ostalih vrijednosti vidljivo je da različiti HBD stvaraju DES-eve različitih gustoća, a te razlike se mogu objasniti različitim slaganjem molekula unutar strukture otapala. Pretpostavka je da uslijed HBA i HBD interakcija u DES-evima nastaju veće ili manje šupljine čija veličina utječe na gustoću DES-a (Cotroneo-Figueroa i sur., 2022). Osim toga, prisutnost vode značajno utječe na smanjenje gustoće DES-eva.

4.1.3. Viskoznost eutektičkih otapala

Uobičajeno je da su DES-evi i druge ionske kapljevine viskozni od organskih otapala i vode. Mreža vodikovih veza u DES-evima, ali i spomenutih van der Waalovih interakcija rezultiraju visokom viskoznošću DES-eva, odnosno smanjenom pokretljivošću slobodnih čestica u takvim sustavima (Alcalde i sur., 2015). U praksi, viskoznost ima utjecaj na transport, miješanje, ekstrakciju, uklanjanje i ponovnu uporabu DES-eva. Iz tablice 5 vidljivo je da je većina pripremljenih eutektičkih otapala vrlo viskozna pri 25 °C u odnosu na vodu, čija viskoznost pri 20 °C i atmosferskom tlaku iznosi 1,0016 mPas (Berstad i sur., 1988).

Od pripravljenih eutektičkih otapala najmanju viskoznost ima ChCl:Fru 2,5:1 s 40 % vode (w/w) s vrijednošću $24,17 \pm 4,96$ mPas, dok je najveća izmjerena bila $849,53 \pm 16,97$ % u otapalu ChCl:Glc 5:2 s 10 % vode (w/w). Uz ChCl:Fru 2,5:1 s 40 % vode (w/w) niska viskoznost zabilježena je i u DES-evima ChCl:EG 1:2 i ChCl:Glc 2:1 s 10 % vode (w/w). Naime za tehnološke procese poželjna su otapala sa što manjom viskoznošću pri 25 °C jer se na taj način postiže značajna ušteda energije, a i ekstrakcija je povoljna za stabilnost temperaturno

osjetljivih molekula. Ipak, za uspješnu primjenu u tehnološkim procesima, moguće je smanjiti viskoznost DES-eva dodatkom vode, što je vidljivo u primjeru DES-a ChCl:Fru 2,5:1 gdje se viskoznost smanjuje povećanjem udjela vode s 15 % na 30 % (w/w). S obzirom na to da dodavanje vode u eutektička otapala ne izaziva kemijsku reakciju (Abbott i sur. 2004), razrjeđivanje eutektičkih otapala vodom omogućuje kvantitativno prilagođavanje viskoznosti i drugih fizikalno-kemijskih svojstava, kao što su vodljivost, polarnost i gustoća čime se olakšava njihova primjena u ulozi otapala (Khandelwal i sur. 2016).

4.1.4. Polarnost eutektičkih otapala

Polarnost je ključno svojstvo koje određuje hoće li otapalo otopiti određenu tvar, a za učinkovito korištenje DES-eva u industriji, kao zamjene tradicionalnim organskim otapalima, nužno je poznavati njihovu polarnost (Tang i sur., 2020). Za određivanje polarnosti DES-ova koriste se različite ljestvice, uključujući ljestvicu betainske boje, Kamlet-Taftove parametre i ljestvicu polarnosti *Nile* crvene boje. U ovom radu polarnost je određena s pomoću *Nile* crvene boje, lipofilnog bojila koja pokazuje velike pomake valne duljine maksimalne apsorbancije uslijed polarnosti otapala, stoga se kod ove metode, mjeri apsorpcijski maksimum UV/Vis spektrofotometrom i se iz nje računa E_{NR} vrijednost (jednadžba 6). Što je vrijednost E_{NR} manja, otapalo je polarnije. U ovom istraživanju najveća polarnost zabilježena je za DES ChCl:OK 1:1, čija se polarnost pripisuje funkcionalnim skupinama oksalne kiseline, odnosno prisutnosti dviju visokopolarnih karboksilnih skupina. Najmanje polaran DES jest ChCl:Sah (2:1, 10 %), što se slaže s prethodnim istraživanjima gdje je utvrđeno da su otapala na bazi šećera manje polarna (Dai i sur., 2013).

S obzirom na to da se radi o solvatokromnoj metodi, razlika u polarnosti vidljiva je već golim okom i promatranjem nastalog obojenja, gdje su polarni (hidrofilni) uzorci obojeni ljubičasto-plavo, a nepolarni (hidrofobni) uzorci obojeni ružičastim nijansama (slika 8).



Slika 8. Usporedba obojenosti metodom *Nile red* nepolarnog (lijevo) i polarnog (desno) uzorka (vlastita fotografija)

Kao i druga svojstva, polarnost DES-ova ovisi o donoru i akceptoru vodikove veze te o njihovom omjeru. Najpolarniji DES-ovi su oni na bazi organskih kiselina, dok su najmanje polarni oni na bazi šećera i polialkohola. U posljednje vrijeme sve se više razvijaju hidrofobna nisko temperaturna eutektička otapala, što omogućava dizajniranje DES-eva širokog raspona polarnosti (Makoš i sur., 2020). Polarnost DES-ova se može mijenjati razrjeđivanjem s vodom, vrlo polarnim otapalom, što rezultira povećanjem polarnosti.

4.1.5. σ -profili eutektičkih otapala

σ -profili mogu se koristiti za predviđanje i analizu mnogih svojstava smjesa, uključujući termodinamičke parametre poput entalpije, entropije i Gibbsove energije, stabilnost kemijskih veza, reaktivnost i katalitička svojstva ali i za procjenu termodinamičkih svojstava poput topljivosti, koeficijenta razdvajanja i koeficijenta raspodjele, analizu i optimiranje kemijskih procesa koji uključuju otapala (Ferrarrini i sur., 2018). Također, mogu biti korisni u analizi kemijskih reakcija, identificiranju potencijalnih katalizatora i dizajniranju novih materijala s određenim svojstvima. Osim toga, σ -profili pružaju informacije o elektrostatičkom potencijalu otopine, polarizabilnosti i drugim elektroničkim svojstvima koja su ključna za razumijevanje učinkovitosti otapanja i predviđanje ponašanja spoja u otopini. Velika prednost metode je to što je metoda neovisna o eksperimentalnim podacima (Eckert i Klamt, 2002). σ -profili izvode se iz kvantno-kemijskih proračuna provedenih na otopini koristeći COSMO metodu koja aproksimira otapalo s promjenjivom dielektričnom konstantom i računa svojstva otopine uzimajući u obzir elektrostatičke interakcije između otopine i otapala. Profili dobiveni iz programa COSMOtherm opisuju zapravo raspodjelu gustoće elektrona u molekuli otopine. σ -profili za svaki DES u ovom istraživanju su izračunati prema jednadžbi 15, te su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Izračunati σ -profili za korištena eutektička otapala

Oznaka	σ_1	σ_2	σ_3	σ_4	σ_5	σ_6	σ_7	σ_8	σ_9	σ_{10}
1	0,0055	4,4308	13,1683	32,5156	19,1068	6,2985	7,5033	13,5744	16,7129	0,2981
2	0,0023	5,5434	11,3473	15,7063	9,2846	4,3124	5,5043	8,7362	11,8222	0,4601
3	0,0016	5,7878	10,9471	12,0131	7,1266	3,8761	5,0651	7,6732	10,7477	0,4957
4	0,8268	5,4848	12,1125	25,6896	16,4751	6,3767	9,5543	16,1101	12,2607	0,2627
5	0,0245	4,8179	13,3233	31,5018	19,6016	6,3684	7,2955	13,8644	16,8507	0,2981
6	0,0154	5,7233	13,1349	25,8168	15,3039	5,5788	6,4409	12,0608	15,8560	0,4623
7	0,0225	5,5828	12,3521	21,8234	12,5946	5,0220	6,6703	10,6772	13,9656	0,4246
8	0,4131	6,0616	10,2219	13,2532	13,1962	6,5727	7,1386	10,2527	9,4013	0,5480
9	0,0267	6,8470	12,6572	19,0855	11,5491	5,7619	7,1702	10,8169	13,5684	0,4303
10	0,0085	5,4861	11,5890	18,3160	10,5742	4,3753	5,8549	9,6680	12,5578	0,4291
11	0,5156	5,9436	11,6783	19,2801	11,7695	5,6332	8,1826	11,5220	12,0339	0,4071
12	0,0315	7,3197	12,7536	18,0600	11,2617	6,1080	7,5669	11,0195	13,1918	0,4359
13	0,0121	5,4754	11,9055	21,0606	12,3180	4,8540	6,4682	10,8104	13,1499	0,3959
14	0,7024	6,1016	10,9255	18,9016	11,7233	6,3201	8,7234	12,3822	10,7709	0,3768
15	3,2992	4,5761	10,9240	39,5723	23,1882	9,7325	14,9857	20,7904	15,0798	0,0262
16	0,0040	2,9508	8,8910	26,8902	40,0905	16,5040	8,0162	11,7376	13,3252	0,0325
17	0,0023	7,0421	14,8727	18,8739	10,9471	8,9061	8,5027	12,9238	13,0265	0,2567
18	0,0417	6,1351	13,3236	27,5138	19,6523	7,7753	8,5887	14,9952	14,6628	0,3000
19	0,0312	6,9365	14,5184	30,2958	19,2897	7,5339	8,1195	15,2234	17,2430	0,4980
20	0,0037	6,2004	13,3335	31,3184	22,6317	11,3015	11,1474	16,9118	14,3085	0,0186
21	0	5,2833	17,2255	23,0796	13,8118	9,0312	6,6363	12,1342	17,0107	0,2221

Tablica 6. Izračunati σ -profilii za korištena eutektička otapala - *nastavak*

Oznaka	σ_1	σ_2	σ_3	σ_4	σ_5	σ_6	σ_7	σ_8	σ_9	σ_{10}
22	0	2,5396	10,4734	35,5459	30,1835	8,5328	7,5334	13,1351	16,4120	0,0198
23	0	4,5281	14,4786	24,9347	21,2790	10,3401	7,5623	12,5532	15,3794	0,0807
24	0,0043	3,8809	11,7298	35,3254	32,3869	10,2332	8,2438	15,3468	16,8021	0,0225
25	0,0052	5,6740	11,8048	22,4826	21,6330	8,3137	6,9968	12,6329	13,6298	0,2459
26	0	3,7754	14,7611	31,7979	23,4728	9,5593	7,4109	13,5096	17,8206	0,0760
27	0,0913	2,5575	9,7793	31,7401	39,1212	15,1488	8,1493	12,5211	15,3599	0,0348
28	0	5,2833	17,2255	23,0796	13,8118	9,0312	6,6363	12,1342	17,0107	0,2221
29	0	2,5370	10,4792	35,5773	30,1879	8,5298	7,5325	13,1404	16,4260	0,0198
30	0,0052	6,1379	15,9876	24,6717	23,9225	12,3808	8,4148	15,2080	15,8487	0,0839
31	0,0000	2,8525	9,7725	31,7692	29,6531	8,8888	7,6419	12,4987	14,7320	0,0158
32	0,0104	6,2600	12,3589	28,9401	34,6147	13,1839	9,4119	17,4155	14,6443	0,0197
33	0,0093	5,5935	12,7638	32,9070	34,6011	12,3810	9,1180	17,5097	16,2843	0,0232
34	0,0087	5,2240	12,9883	35,1061	34,5936	11,9359	8,9552	17,5619	17,1934	0,0251
35	0,0284	5,1162	13,3238	30,6021	19,6156	6,6878	7,5890	14,1219	16,3561	0,2985
36	0,9997	5,8143	10,2971	14,4260	8,5250	4,9504	7,3664	9,9402	10,3317	0,4106
37	0,0049	7,0705	12,8233	20,4509	16,0613	9,0663	8,8259	13,7364	12,2290	0,2370

4.2. ŠARŽNA EKSTRAKCIJA ENZIMA LIPAZE EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Konvencionalni separacijski procesi kao kromatografija, elektroforeza, precipitacija često su su komplicirani i dugi, a na kraju rezultiraju niskim prinosima (Pina i sur., 2014). Glavna prednost ekstrakcije u odnosu na druge separacijske procese je što omogućava selektivnu separaciju komponenata iz kompleksnih smjesa. Ekstrakcija također omogućava izdvajanje ciljanih komponenti čak i u kompleksnim smjesama. Ekstrakcija kapljevine – kapljevine jedan je od najčešće korištenih ekstrakcija. Ipak, kada govorimo o ekstrakciji proteina bitno je paziti u izboru ekstrakcijskog sredstva jer odabir krivog otapala može dovesti do gubitka enzimske aktivnosti (Walter i Johansson, 2000). Vodeni dvofazni sustavi na bazi DES-eva smatraju se pogodnim za ekstrakciju odnosno pročišćavanje proteina. U ovom istraživanju ekstrakcijski sustav činilo je jedno of pripremljenih DES-eva i otopina enzima lipaza u soli K_2HPO_4 . Provedeno je ukupno 111 eksperimenta s 37 eutektičkih otapala i tri koncentracije soli u rasponu koncentracija 0,6 - 0,8 g/L. U sustavima u kojima su se formirale dvije faze, koncentracije proteina u obje faze određene su Bradford testom te su izračunate učinkovitosti ekstrakcije enzima lipaza, omjer volumena ekstraktne i rafinatne faze kao i koeficijenti raspodjele. Dobiveni rezultati prikazani su u tablici 7.

Tablica 7. Rezultati šaržne ekstrakcije enzima lipaze iz *Aspergillus oryzae* eutektičkim otapalima

Oznaka	$Y_{K_2HPO_4}$ (mg/mL)	K_P (-)	E (%)	R (-)	Oznaka	$Y_{K_2HPO_4}$ (mg/mL)	K_P (-)	E (%)	R (-)
1	0,6	$12,87 \pm 3,52$	$86,09 \pm 2,93$	0,5	7	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7	$13,16 \pm 0,02$	$86,81 \pm 0,02$	0,5		0,7	$2,84 \pm 0,34$	$58,54 \pm 2,82$	1
	0,8	$9,88 \pm 5,62$	$77,88 \pm 1,01$	0,5		0,8	$11,66 \pm 0,99$	$90,21 \pm 8,51$	0,6
2	0,6	Nema formiranja faza			8	0,6	Taloženje proteina		
	0,7	$13,25 \pm 4,13$	$76,14 \pm 5,71$	0,3		0,7			
	0,8	$3,01 \pm 0,90$	$59,47 \pm 7,23$	0,5		0,8			
3	0,6	Nema formiranja faza			9	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7	Nema formiranja faza				0,7	Nema formiranja faza		
	0,8	$0,51 \pm 0,22$	$48,45 \pm 1,88$	0,5		0,8	$275,95 \pm 28,41$	$95,15 \pm 0,48$	0,1
4	0,6	Taloženje proteina			10	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7					0,7	$2,94 \pm 0,31$	$59,43 \pm 2,55$	0,5
	0,8					0,8	$4,02 \pm 1,05$	$61,87 \pm 9,23$	0,5
5	0,6	$0,89 \pm 0,34$	$30,06 \pm 7,86$	0,5	11	0,6	Taloženje proteina		
	0,7	$0,96 \pm 0,22$	$32,28 \pm 4,92$	0,5		0,7			
	0,8	$0,71 \pm 0,05$	$26,14 \pm 0,50$	0,5		0,8			
6	0,6	Nema formiranja faza			12	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7	$1,25 \pm 6,75$	$89,54 \pm 3,51$	0,5		0,7	Nema formiranja faza		
	0,8	$0,25 \pm 0,03$	$24,51 \pm 2,43$	0,4		0,8	Nema formiranja faza		

Tablica 7. Rezultati šaržne ekstrakcije enzima lipaze iz *Aspergillus oryzae* eutektičkim otapalima – nastavak

Oznaka	$Y_{K_2HPO_4}$ (mg/mL)	K_P (-)	E (%)	R (-)	Oznaka	$Y_{K_2HPO_4}$ (mg/mL)	K_P (-)	E (%)	R (-)
13	0,6	Nema formiranja faza			20	0,6	$0,74 \pm 0,27$	$41,42 \pm 8,77$	1
	0,7	$2,04 \pm 0,05$	$50,40 \pm 0,50$	0,5		0,7	$7,27 \pm 2,39$	$84,56 \pm 3,46$	1
	0,8	$10,82 \pm 1,95$	$75,39 \pm 11,05$	0,5		0,8	$0,38 \pm 0,07$	$48,58 \pm 4,69$	0,6
14	0,6	Taloženje proteina			21	0,6	$1,38 \pm 0,31$	$65,30 \pm 10,92$	1
	0,7					0,7	$3,89 \pm 1,39$	$80,83 \pm 5,59$	1,2
	0,8					0,8	$5,24 \pm 0,09$	$81,82 \pm 0,25$	0,8
15	0,6	Taloženje proteina			22	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7					0,7	$4,00 \pm 0,25$	$80,00 \pm 0,98$	1
	0,8					0,8	$9,01 \pm 3,90$	$89,76 \pm 7,24$	1,3
16	0,6	$2,83 \pm 0,67$	$73,50 \pm 5,39$	1	23	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7	$15,42 \pm 7,88$	$85,03 \pm 6,31$	1		0,7	Nema formiranja faza		
	0,8	$0,36 \pm 0,13$	$47,65 \pm 8,16$	0,9		0,8	$2,60 \pm 0,79$	$65,41 \pm 6,92$	0,75
17	0,6	$7,38 \pm 2,15$	$87,56 \pm 3,00$	1	24	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7	$7,26 \pm 1,06$	$87,80 \pm 1,57$	1		0,7	Nema formiranja faza		
	0,8	$7,11 \pm 4,21$	$81,26 \pm 9,27$	0,7		0,8	Nema formiranja faza		
18	0,6	Nema formiranja faza			25	0,6	Taloženje proteina		
	0,7	Nema formiranja faza				0,7	Nema formiranja faza		
	0,8	Nema formiranja faza				0,8	Nema formiranja faza		

Tablica 7. Rezultati šaržne ekstrakcije enzima lipaze iz *Aspergillus oryzae* eutektičkim otapalima – nastavak

Oznaka	$Y_{K_2HPO_4}$ (mg/mL)	K_P (-)	E (%)	R (-)	Oznaka	$Y_{K_2HPO_4}$ (mg/mL)	K_P (-)	E (%)	R (-)
19	0,6	Nema formiranja faza			26	0,6	$1,23 \pm 0,23$	$70,83 \pm 3,87$	2
	0,7	Nema formiranja faza				0,7	$1,72 \pm 0,48$	$73,65 \pm 0,43$	1,4
	0,8	Nema formiranja faza				0,8	$5,39 \pm 3,71$	$77,70 \pm 12,44$	0,8
27	0,6	Taloženje proteina			32	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7					0,7	Nema formiranja faza		
	0,8					0,8	Nema formiranja faza		
28	0,6	Nema formiranja faza			33	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7	$1,37 \pm 0,31$	$57,33 \pm 5,23$	1		0,7	Nema formiranja faza		
	0,8	$2,93 \pm 0,47$	$63,53 \pm 3,46$	0,75		0,8	Nema formiranja faza		
29	0,6	Nema formiranja faza			34	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7	Nema formiranja faza				0,7	Nema formiranja faza		
	0,8	Nema formiranja faza				0,8	Nema formiranja faza		
30	0,6	Nema formiranja faza			35	0,6	Nema formiranja faza		
	0,7	Nema formiranja faza				0,7	Nema formiranja faza		
	0,8	Nema formiranja faza				0,8	$0,10 \pm 0,01$	$5,77 \pm 0,66$	0,2
31	0,6	Nema formiranja faza			36	0,6	Taloženje proteina		
	0,7	Nema formiranja faza				0,7			
	0,8	Nema formiranja faza				0,8			
					37	0,6	Nema formiranja faza		
						0,7	$3,19 \pm 1,98$	$66,27 \pm 14,61$	0,71
						0,8	$3,99 \pm 1,41$	$63,66 \pm 14,67$	0,5

Kao što je vidljivo iz dobivenih rezultata, učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza kreće se od $5,77 \pm 0,66$ % do $95,15 \pm 0,48$ %. Najniža učinkovitost ekstrakcije zabilježena je u sustavu ChCl:Glc 2:1 s 10 % vode (w/w) pri koncentraciji K_2HPO_4 od 0,8 g/L, dok je najviša zabilježena korištenjem otapala ChCl: Sor 1:1 s 20 % vode (w/w). Prema Dias i sur. (2022), DES na bazi ChCl i sorbitolom ima najkompaktniju strukturu među svim DES-evima ispitanim u ovom istraživanju što je vjerojatno i razlog dobre učinkovitosti. Međutim, iako je učinkovitost ekstrakcije u ovom sustavu bila najveća, omjer volumena ekstraktne i rafinatne faze je najniži i iznosi tek 0,1 što značajno otežava separaciju ekstraktne faze od rafinatne.

Iz dobivenih rezultata također je vidljivo kako u mnogim sustavima nije došlo do razdvajanja faza tj. nije došlo do formiranja APTS. Na razdvajanje faza u ATPS-u utječu različiti faktori kao što su sastav i polarnost DES-eva, te koncentracija i sastav soli (Zafarani-Moattar i sur., 2012). Mehanizam putem kojeg sol utječe na formiranje ATPS nije dobro proučen (Grilo i sur., 2016). Međutim, općenito se zna da tri sile djeluju na kapljevину tijekom razdvajanja faza: gravitacijska, sila uzgona i trenje, a ravnoteža između ovih sila određuje kretanje kapljevina. Gravitacijska sila ovisi o gustoći kapljevine, dok sila uzgona i trenja ovise o svojstvima protoka faza (Asenjo i Andrews, 2012). Prema literaturi, najvažniji čimbenik koji utječe na formiranje faza u ATPS na bazi DES-eva je hidrofilnost eutektičkog otapala (Li i sur., 2016). Što je DES hidrofilniji, to je potrebna veća količina soli kako bi došlo do razdvajanja faza. Spomenuto je vidljivo npr. kod DES-eva na bazi glicerola. Naime, glicerol je jako polaran i hidrofilan spoj koji može stvarati jake vodikove veze s vodom što posljedično onemogućava stvaranje ATPS (Dumas i sur., 2020). Isto je uočeno i u DES-evima koji sadrže glukozu. Kako bi se stvorio DES na bazi šećera često je potrebno dodavati veće količine vode, što ih opet čini polarnima.

Osim sustava u kojima nije došlo do formiranja faza, primijećeno je da u nekima došlo do taloženja proteina. Radi se o DES-evima koji se sastoje od kiselina kao što su jabučna, oksalna i citratna. Pojava se može objasniti fizikalno-kemijskim promjenama okoline proteina s obzirom na to da su aminokiselinski nastavci osjetljivi na promjene u pH (Kishore i sur., 2012). Kiseli uvjeti pojačavaju hidrofobne interakcije između proteina, čime dolazi do narušavanja native strukture proteina, odnosno denaturiranja i međusobnog reagiranja hidrofobnih nastavaka različitih molekula proteina, što dovodi do stvaranja agregata i taloženja (Alberts i sur., 2002).

4.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI LIPAZE U EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

Kako bi se odabrao što prikladniji ATPS na bazi DES-eva, osim učinkovitosti ekstrakcije bitno je očuvati aktivnost enzima u DES-u. Vrijednosti R.A. za lipazu u pripremljenim eutektičkim otapalima i fosfatnom puferu prikazani su u tablici 8.

Tablica 8. Rezidualna aktivnost enzima lipaza (R.A.) u eutektičkim otapalima

Oznaka	R.A. (%)	Oznaka	R.A. (%)
pufer	100,00 ± 1,46	20	45,14 ± 1,12
1	57,34 ± 0,99	21	49,57 ± 0,15
2	85,75 ± 0,44	22	102,22 ± 0,85
3	84,04 ± 0,78	23	50,51 ± 1,67
4	5,46 ± 1,34	24	82,68 ± 1,01
5	82,59 ± 0,72	25	99,14 ± 1,75
6	87,54 ± 0,98	26	80,89 ± 1,93
7	99,15 ± 1,94	27	0,00 ± 0,00
8	0,00 ± 0,00	28	37,11 ± 0,92
9	99,20 ± 0,64	29	63,59 ± 0,26
10	87,12 ± 0,37	30	100,68 ± 1,51
11	0,00 ± 0,00	31	87,03 ± 0,48
12	86,77 ± 1,19	32	89,33 ± 1,61
13	88,82 ± 0,98	33	104,10 ± 1,89
14	16,08 ± 0,34	34	77,90 ± 0,61
15	0,00 ± 0,00	35	82,94 ± 2,78
16	61,60 ± 0,96	36	56,52 ± 1,37
17	51,62 ± 0,50	37	32,45 ± 1,09
18	72,44 ± 0,92		
19	62,73 ± 1,80		

Analizom rezultata, iz Tablice 8 vidljivo da u većini eutektičkih otapala enzim lipaza porijeklom iz *Aspergillus oryzae* pokazuje hidrolitičku aktivnost. Rezidualna aktivnost lipaze u DES-evima u odnosu na pufer kreće se u rasponu od 0 % do 104,10 %. U većini DES-eva zabilježen je pad aktivnost enzima lipaza u odnosu na njegovu aktivnost u puferu, odnosno vodenom mediju. U većini slučajeva radi se o DES-evima na bazi organskih kiselina i uree, što upućuje najvjerojatnije na denaturaciju enzima (Fang, 2015).

Međutim, u nekoliko DES-eva, ChCl:Mal 4:1 s 20 % vode (w/w), ChCl: Sor 1:1 s 20 % vode (w/w) , ChCl:EG 1:2, ChCl:U:G 1:2:2 i ChCl:G 1:3 aktivnost enzima lipaza ostala je

očuvana. Posljedica visoke aktivnosti jest stvaranje stabilnih vodikovih veza eutektičkog otapala s površinskim aminokiselinskim ostacima enzima, što dovodi do stabilizacije enzima i povećanja aktivnosti (Monhemi i sur., 2014).

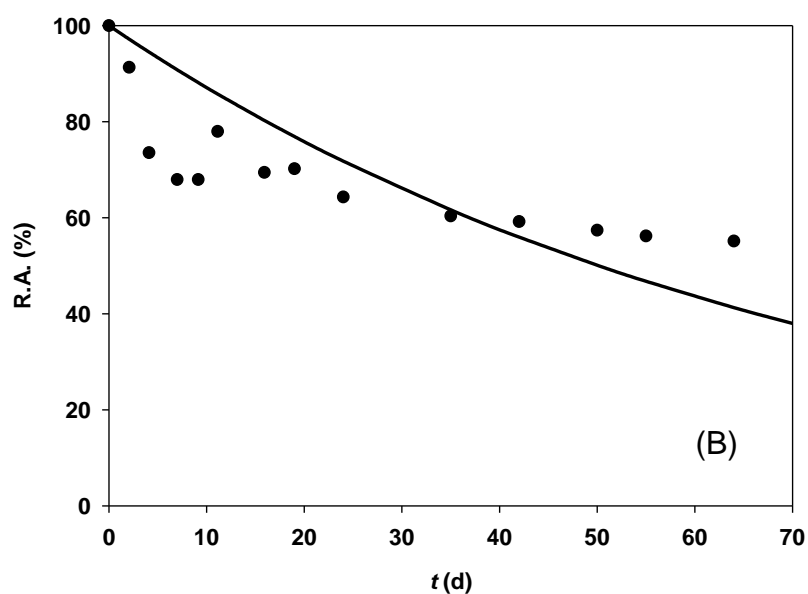
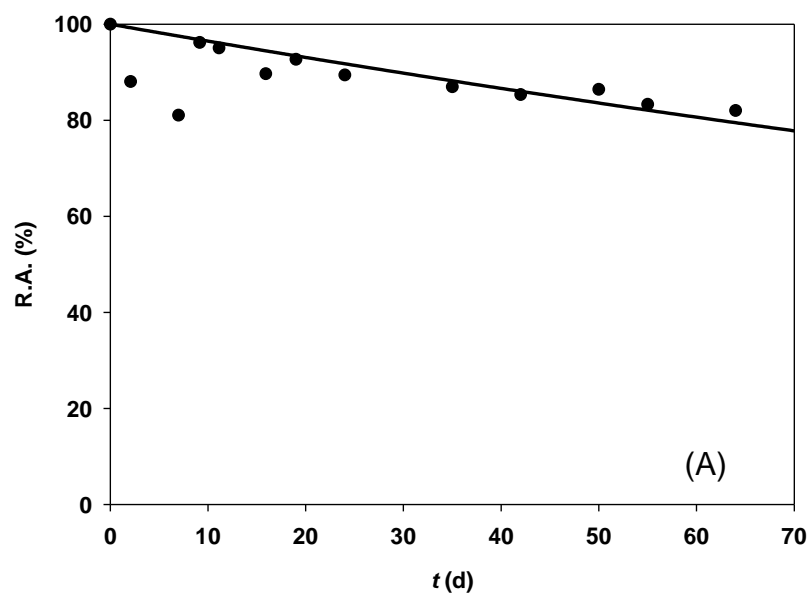
4.3.1. Praćenje skladišne stabilnosti enzima lipaza u fosfatnom puferu

Osim aktivnosti enzima, za uporabu posebice u industriji, neophodno je poznavati i stabilnost tijekom vremena u konstantnim uvjetima temperature (Holm i sur., 2018). Kako bi se ustanovila termička stabilnost lipaze, enzim je inkubiran u fosfatnom puferu na 25 °C (sobna temperatura) i 4 °C (hladnjak) kroz 64 dana. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 9A i 9B. Kao što je vidljivo enzim lipaza pri 25 °C brže gubi aktivnost u mjerenom vremenu u odnosu na onaj čuvan pri 4 °C. Nakon 64 dana, gubitak aktivnosti na sobnoj temperaturi iznosi 44,9 %, dok u hladnjaku je enzim izgubio tek 18,0 %, što potvrđuje da je deaktivacija enzima kroz vrijeme sporija pri nižim temperaturama.

U programu Statistica 14.0 procijenjene su brzine deaktivacije enzima prema modelu kinetike prvog reda kako bi se kvantitativno usporedila brzina deaktivacije enzima. Brzina deaktivacije enzima za 4 °C procijenjen je na $0,0036 \pm 0,0007$ 1/d, dok je za 25 °C procijenjena na vrijednost $0,0138 \pm 0,0020$ /d. T-vrijednost 5,2285, odnosno 6,9063 s p-vrijednostima nižim od 0,001 ukazuju na visoku statističku značajnost. Dobiveni rezultati usporedbe matematičkog modela i eksperimentalnih podataka nalazi se na slici 9.

Tablica 9. Brzine deaktivacije enzima prema modelu kinetike prvog reda za opis deaktivacije enzima lipaze skladištenog u puferu

Temperatura	brzina deaktivacije ± standarda pogreška (1/d)	t- vrijednost	p- vrijednost
4 °C	$0,0036 \pm 0,0007$	5,2285	<0,0001
25 °C	$0,0138 \pm 0,0020$	6,9063	<0,0001



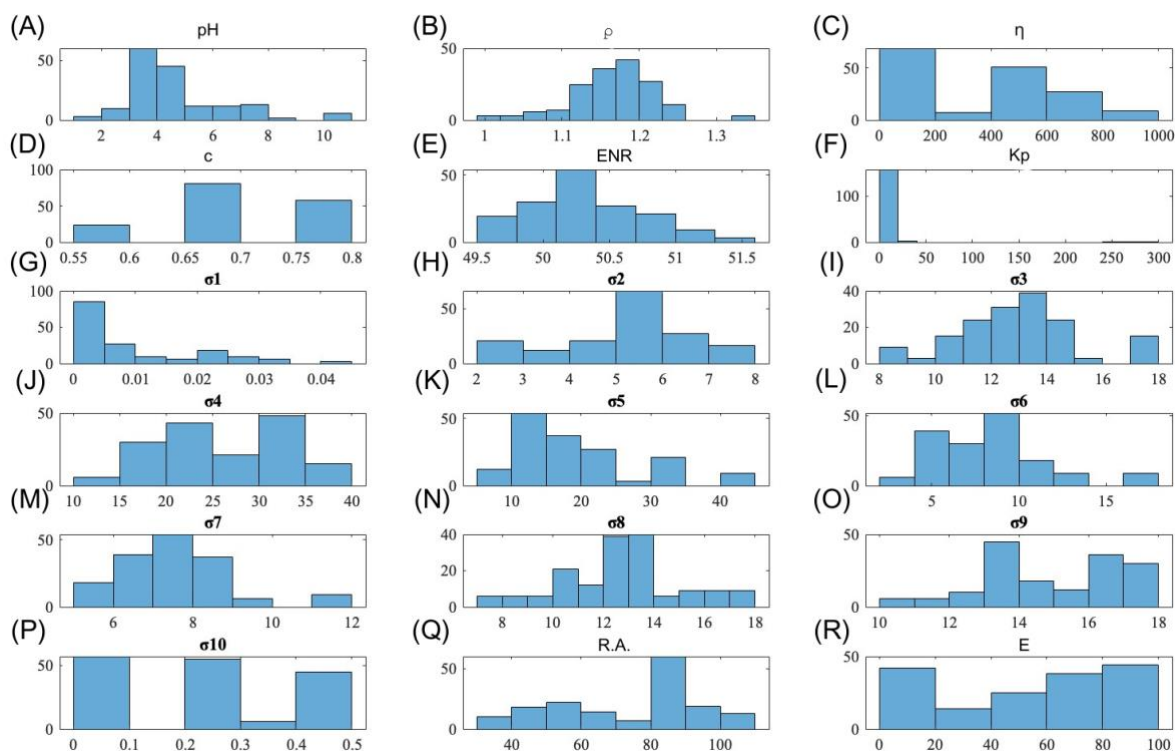
Slika 9 Usporedba modelom previđenih i eksperimentalno određenih vrijednosti promjenu rezidualne aktivnosti enzima skladištenog pri 25 °C (A) i 4 °C (B)

Dobiveni rezultati slažu se s literaturnim navodima u kojoj je navedeno kako enzim lipaza periodu od 90 dana gubi gotovo 30 % aktivnosti kada je otopljen u puferu. Dulje očuvanje aktivnost moguće je provođenjem imobilizacije enzima na nosačima (Maghraby i sur., 2023) ili korištenjem DES-eva, gdje se aktivnost očuva pri temperaturama do 37 °C tijekom 3 mjeseca (Sang Lee i sur., 2018).

4.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE EKSTRAKCIJE ENZIMA LIPAZA EUTEKTIČKIM OTAPALIMA

4.4.1. Analiza korelacija između varijabli

S obzirom na to da učinkovitost ekstrakcija enzima ovisi od velikog broja procesnih varijabli (pH, gustoća, viskoznost, koncentracija soli, σ -profili...) u razvoja prediktivnih modela analizirane su korelacije između nezavisnih i zavisnih varijabli. U prvom koraku povedena je analiza raspodjele distribucije podataka. Rezultati su prikazani na slici 10.

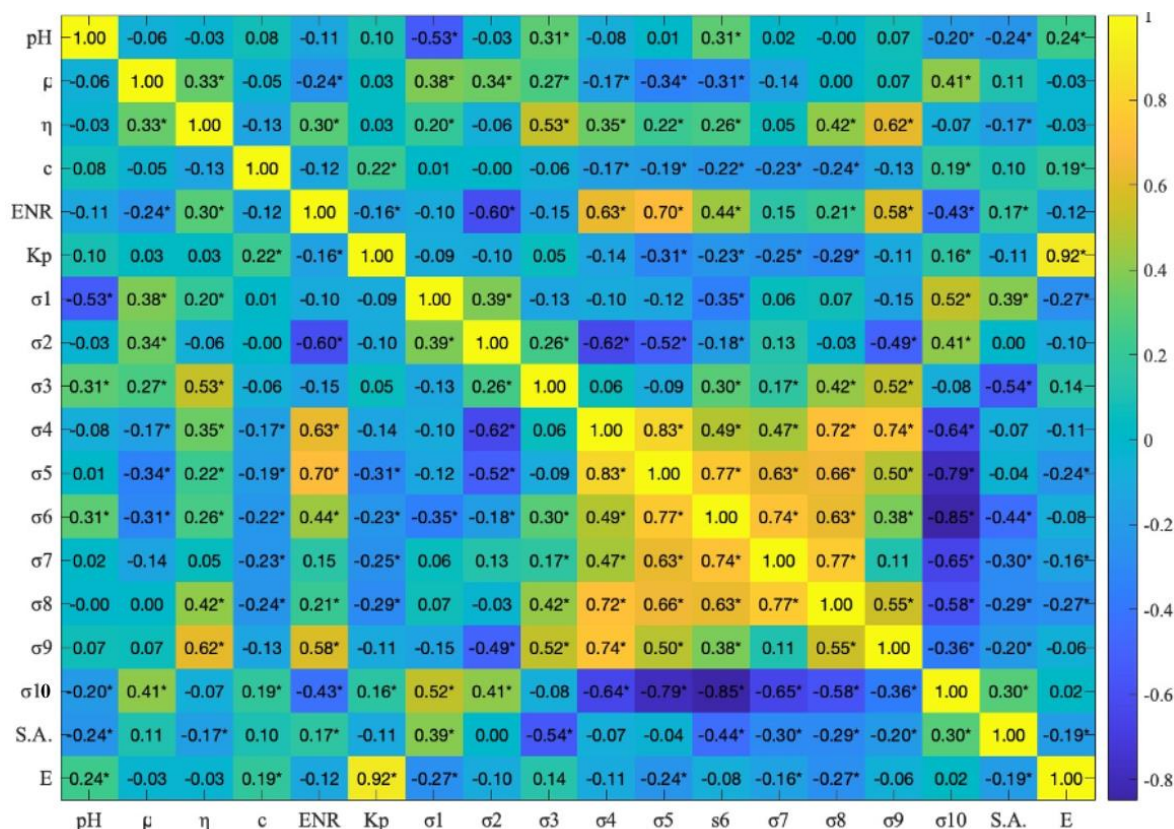


Slika 10. Distribucija učestalosti izmjerenih eksperimentalnih podataka: pH vrijednost (A), gustoća (B), viskoznost (C), koncentracija soli (D), polarnost (E), koeficijent razdiobe (F), σ_1 - σ_{10} (G-P), rezidualna aktivnost (Q) i učinkovitost ekstrakcije (R)

Kako bi se razvio pouzdan prediktivni model, potrebno je analizirati korelaciju između varijabli koje će se koristiti u istome. Ponekad je u istraživanju bitno prepoznati način na koji više varijabli međusobno utječe jedna na drugu. Za to se u statistici koriste korelacijske matrice, tablice koje prikazuju korelacijske koeficijente između varijabli. Kako bi se odabrao pravi tip korelacijske matrice, potrebno je odrediti distribuciju podataka, koja je provedena u programskom paketu MATLAB R2022b.

Ovisno o distribuciji podataka, može se koristiti jedan od dva tipa korelacijskih matrica: Pearsonova ili Spearmanova matrica. Pearsonova korelacijska matrica koristi se ako podaci

imaju normalnu distribuciju, dok se Spearmanova koristi ako odnos među varijablama nije linearan, odnosno distribucija nije normalna. Oba tipa koriste se za razumijevanje veza između varijabli i identifikaciju uzoraka u podacima. Na slici 10 vidljivo je da raspodjela podataka nije normalna za sve varijable, stoga se koristi Spearmanova korelacijska matrica (slika 11). Spearmanov korelacijski koeficijent temelji se na rangju varijabli umjesto na samim vrijednostima, što ga čini boljim odabirom kod pojave ekstremnih vrijednosti. Redovi i stupci matrice predstavljaju promatrane varijable, a brojčana vrijednost na presjeku određenog reda i stupca predstavlja koeficijent korelacije između varijabli. Matrica na dijagonali ima vrijednost 1 jer je svaka varijabla sama sa sobom u potpunoj korelaciji, a s obje strane dijagonale je matrica simetrična, odnosno podaci iznad i ispod nje su za isti par varijabli jednaki. Značajne korelacije pored brojčane vrijednosti imaju oznaku „*“, što znači da je $p < 0,05$. Na osnovu toga, s učinkovitošću ekstrakcije bitno su korelirani pH (0,24), c (0,19), K_p (0,92), σ_1 (-0,27), σ_3 (0,17), σ_5 (-0,27), σ_8 (-0,25) i R.A. (-0,19), dok su s rezidualnom aktivnosti korelirani pH (-0,24), η (-0,17), E_{NR} (0,17), σ_1 (0,40), σ_3 (-0,54), σ_6 (-0,40), σ_7 (-0,31), σ_8 (-0,29), σ_9 (-0,21), σ_{10} (0,30) i E (-0,19).



Slika 11. Spearman korelacijska matrica za eksperimentalne podatke

Vidljivo je da određeni σ -profili značajno utječu i na učinkovitost ekstrakcije lipaze i na aktivnosti enzima u DES-u. Stoga, kao signifikantne varijable za opisivanje modela u kojem su zavisne varijable učinkovitost ekstrakcije i aktivnost odabrani su pH, $S_{mix}^1(\sigma_1)$, $S_{mix}^7(\sigma_7)$ i $S_{mix}^8(\sigma_8)$ s obzirom na to da pokazuju značajnu korelaciju i s rezidualnom aktivnošću i s učinkovitošću ekstrakcije enzima.

4.4.2. Razvoj i validacija linearnih regresijskih modela

Linearni regresijski model je jednostavan za razumijevanje i implementaciju, a pretpostavlja linearni odnos koji se ne javlja uvijek u sustavima, posebice u viševarijabilnim sustavima (Rodrigues del Agulia i Benitez-Parejo, 2011).

S obzirom na to da konstrukcija linearnog modela omogućava analizu samo jedne zavisne varijable, za učinkovitost ekstrakcije i rezidualne aktivnost su razvijena po dva modela: jedan koji za nezavisne varijable ima one koje su značajne samo za tu nezavisnu varijablu, te drugi koji uzima u obzir varijable koje su značajne za obje varijable. Vrijednosti regresijskih koeficijenata razvijenih linearnih modela te vrijednosti koeficijenata za procjenu učinkovitost predviđanja modela prikazni su u tablici 10.

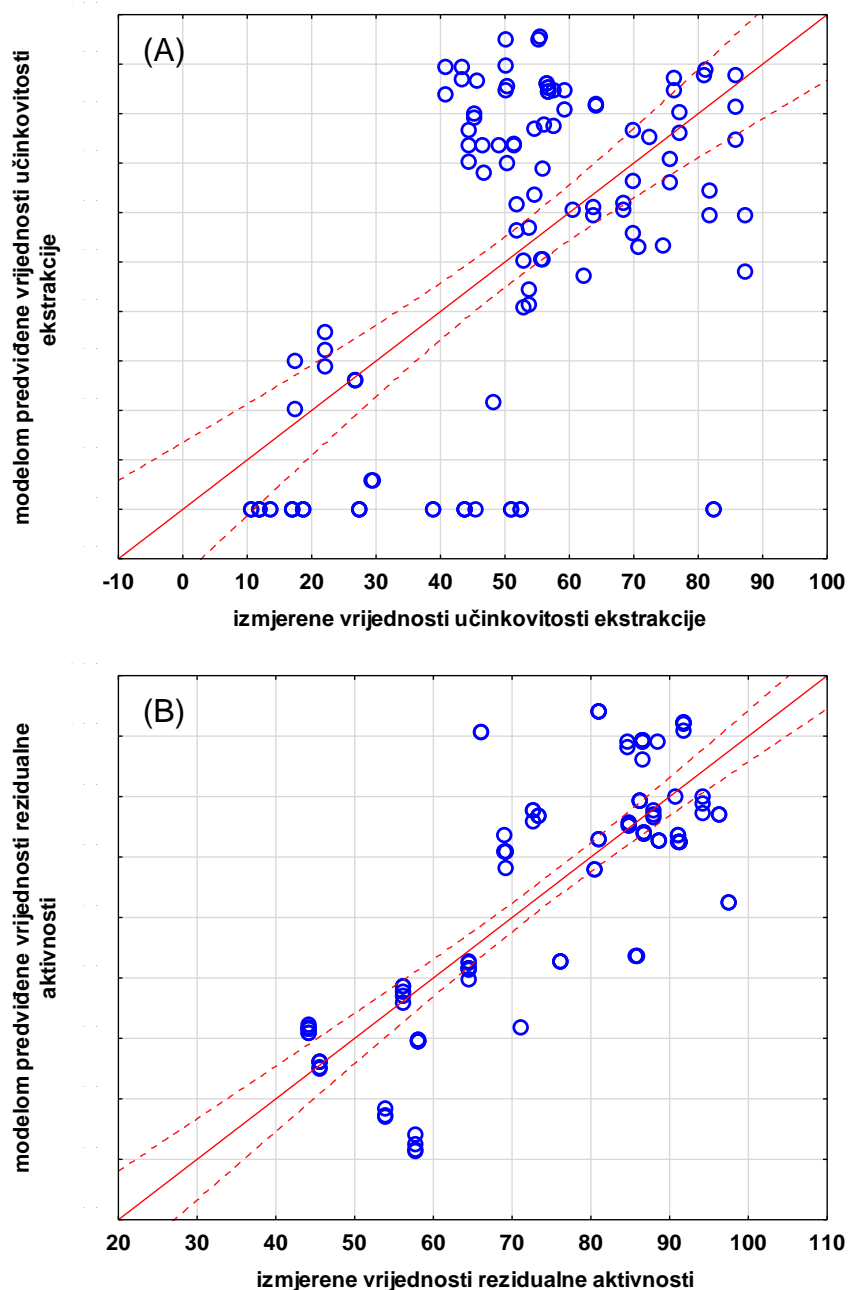
Prikladnost razvijenih linearnih regresijskih modela za predviđanje učinkovitosti ekstrakcije i rezidualne aktivnosti lipaze primjenom vodenih dvofaznih sustava temeljenim na DES-evima je procijenjena korištenjem koeficijenta determinacije za predviđanje (R_{pred}^2), korištenjem omjera predviđanja i odstupanja (RPD) i omjera raspona pogreške (RER). Prema Henseleru i sur. (2009), Hair i sur. (2013) i Hussain et al. (2018) model s R_{pred}^2 vrijednost od 0,75 smatra se značajnim, model s R_{pred}^2 vrijednost od 0,50 smatra se umjerenim, dok se model s R_{pred}^2 vrijednost od 0,26 smatra se slabim. Nadalje, modeli s $RPD < 1,4$ smatraju se nepouzdanima, oni s RPD u rasponu od 1,4 do 2 smatraju se pouzdanim, dok se modeli s $RPD > 2$ opisuju kao izvrsni modeli (Chang i sur., 2001). Modeli s $RER > 4$ prihvatljivi su za analizu podataka, modeli s $RER > 10$ mogu se koristiti za kontrolu kvalitete, a modeli s $RER > 15$ mogu se koristiti za kvantifikaciju (Sim i sur., 2023). Rezultati pokazuju da je najbolje slaganje između modela i eksperimenta dobiveno za predviđanje rezidualne aktivnosti na temelju zasebnih značajnih varijabli ($R_{\text{pred}}^2 = 0,684$, $R_{\text{pred}}^2_{\text{adj}} = 0,594$, $RMSEP = 11,803$ %, $SEP = 1,074$, $RPD = 1,775$ i $RER = 5,709$), nakon čega slijedi model za predviđanje rezidualne aktivnosti na temelju zajedničkih značajnih varijabli ($R_{\text{pred}}^2 = 0,318$, $R_{\text{pred}}^2_{\text{adj}} = 0,278$, $RMSEP = 14,322$ %, $SEP = 4,076$, $RPD = 1,612$ i $RER = 3,977$) dok je najlošije slaganje između modela i eksperimenta dobiveno za predviđanje učinkovitost ekstrakcije na temelju zajedničkih značajnih varijabli ($R_{\text{pred}}^2 = 0,094$, $R_{\text{pred}}^2_{\text{adj}} = 0,034$, $RMSEP = 28,494$ %, $SEP = 8,067$, $RPD = 0,559$ i $RER = 1,581$).

Stoga se na temelju R_{pred}^2 samo višestruki linearni model razvijen za predviđanje rezidualne aktivnosti na temelju zasebnih značajnih varijabli se može smatrati umjereno prikladnim. Na temelju RPD vrijednosti samo se model razvijen za predviđanje rezidualne aktivnosti na temelju zasebnih značajnih varijabli te model za predviđanje rezidualne aktivnosti na temelju zajedničkih značajnih varijabli mogu smatrati pouzdanima. S druge strane, na temelju vrijednosti RER , samo višestruki linearni model razvijen za predviđanje rezidualne aktivnosti na temelju zasebnih značajnih varijabli se može biti korišten za probir. Sve ostale modele potrebno je unaprijediti.

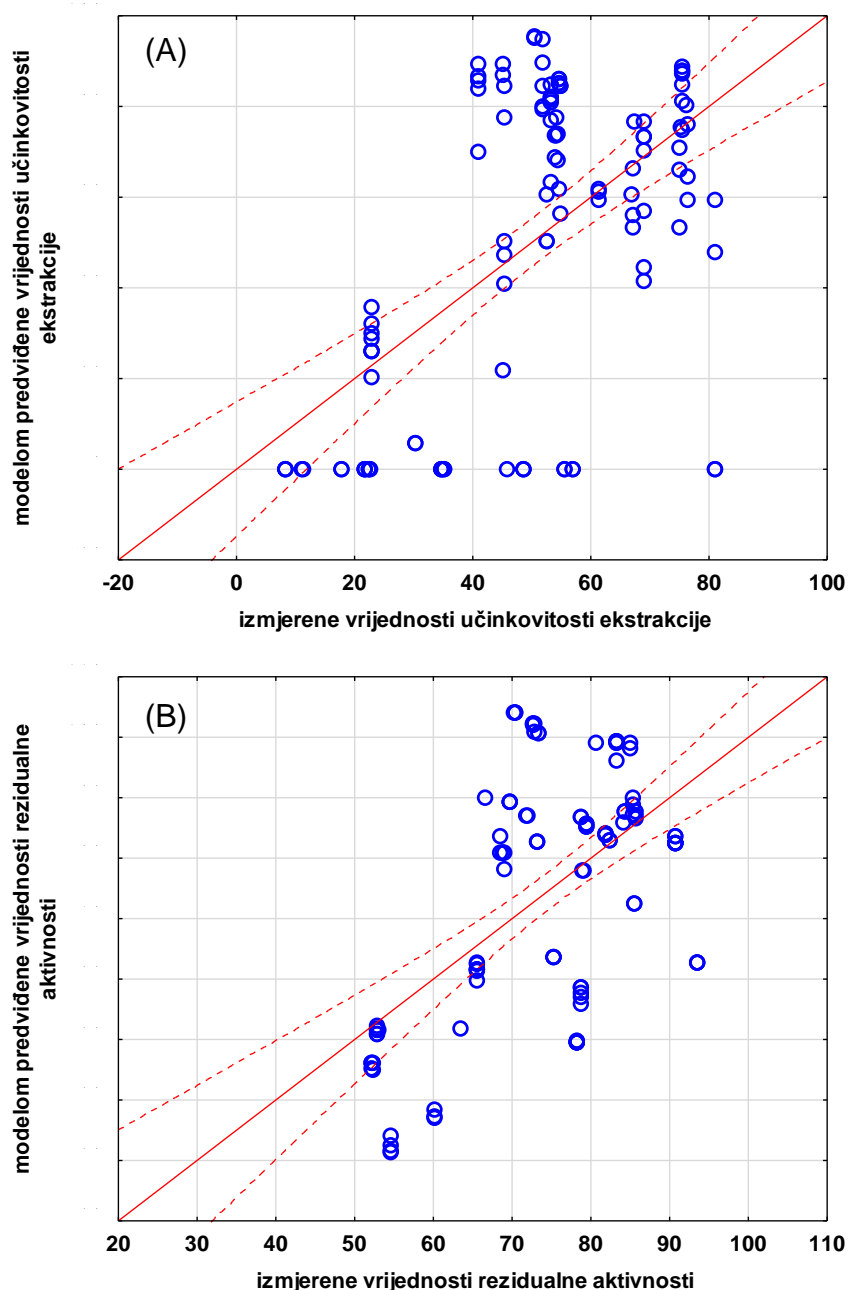
Tablica 10. Koeficijenti i statistička analiza linearnog regresijskog modela za predviđanje rezidualne aktivnosti i učinkovitosti ekstrakcije lipaze

Izlazna varijabla	Oznaka	Koeficijent ± standardna pogreška	Kalibracija					Predviđanje					
			R_{kal}^2	$R_{kal}^2_{adj}$	RMSE	F-vrijednost	p-vrijednost	R_{pred}^2	$R_{pred}^2_{adj}$	RMSEP	SEP	RPD	RER
Učinkovitost ekstrakcije (zajedničke značajne varijable)	b_0	92,438 ± 19,056	0,316	0,291	26,441	12,602	p<0,001	0,094	0,034	28,494	2,067	0,559	1,581
	b_1 (pH)	3,783 ± 1,752											
	b_2 (S ₁)	-514,649 ± 290,678											
	b_3 (S ₇)	11,613 ± 4,163											
	b_4 (S ₈)	-11,057 ± 2,254											
Rezidualna aktivnost (zajedničke značajne varijable)	b_0	121,852 ± 11,244	0,323	0,298	16,656	12,993	p<0,001	0,318	0,278	14,322	8,076	1,612	3,977
	b_1 (pH)	-3,133 ± 171,522											
	b_2 (S ₁)	339,998 ± 2,456											
	b_3 (S ₇)	-10,803 ± 1,033											
	b_4 (S ₈)	3,531 ± 1,330											
Učinkovitost ekstrakcije (zasebne značajne varijable)	b_0	54,549 ± 37,906	0,361	0,325	28,162	10,08	p<0,001	0,127	0,003	32,1636	4,552	1,064	3,002
	b_1 (pH)	1,998 ± 1,829											
	b_2 (C)	47,434 ± 41,524											
	b_3 (S ₁)	-872,741 ± 312,256											
	b_4 (S ₅)	-0,956 ± 0,386											
	b_5 (S ₇)	11,902 ± 4,064											
	b_6 (S ₈)	-8,546 ± 2,385											
Rezidualna aktivnost (zasebne značajne varijable)	b_0	-671,852 ± 276,949	0,634	0,599	12,874	17,879	p<0,001	0,684	0,594	11,803	1,704	1,775	5,7090
	b_1 (pH)	-0,568 ± 0,991											
	b_2 (η)	0,001 ± 0,007											
	b_3 (E _{NR})	19,983 ± 5,971											
	b_4 (S ₁)	1039,734 ± 201,785											
	b_5 (S ₃)	0,379 ± 1,209											
	b_6 (S ₆)	-4,969 ± 0,979											
	b_7 (S ₇)	-22,675 ± 3,246											
	b_8 (S ₈)	9,675 ± 1,919											
	b_9 (S ₉)	-10,095 ± 2,047											
	b_{10} (S ₁₀)	-138,109 ± 24,797											

Na slikama 12 i 13 prikazane su usporedbe eksperimentalnih vrijednosti i linearnim regresijskim modelima predviđenih vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije (12A, 13A) i rezidualne aktivnosti (12B, 13B) koji su konstruirani s nezavisnim varijablama izabranim za taj model. Vidljivo je jasno odstupanje eksperimentalnih podataka od razvijenih linearnih. Najbolje slaganje između eksperimenta i modela vidljiv je kod opisa rezidualne aktivnosti u kojem su nezavisne varijable odabrane specifično samo za određivanje aktivnosti (slika 13B).



Slika 12. Grafički prikaz ovisnosti eksperimentalnih vrijednosti i linearnim modelom predviđenih vrijednosti za učinkovitost ekstrakcije (A) i rezidualnu aktivnost (B) u kojima su nezavisne varijable jednake za obje zavisne varijable (pH , S_{mix}^1 , S_{mix}^7 i S_{mix}^8)



Slika 13. Grafički prikaz ovisnosti eksperimentalnih vrijednosti i linearnim modelom predviđenih vrijednosti za učinkovitost ekstrakcije (A) i rezidualnu aktivnost (B) u kojima su nezavisne varijable značajne isključivo za rezidualnu aktivnost (pH , η , E_{NR} , S_{mix}^1 , S_{mix}^3 , S_{mix}^6 , S_{mix}^7 , S_{mix}^8 , S_{mix}^9 , S_{mix}^{10}), odnosno učinkovitost ekstrakcije (pH , c , K_p , S_{mix}^1 , S_{mix}^3 , S_{mix}^5 , S_{mix}^8)

4.4.3. Razvoj i validacija modela umjetnih neuronskih mreža

Iako su osnovni principi ekstrakcije dobro poznati, teško je razviti prediktivni model koji bi se uspješno koristio za simulaciju rada u industrijskim uvjetima. Primjena umjetnih neuronskih mreža u određenoj situaciji značajno ovisi od sposobnosti generalizacije, kao i od kvalitete ulaznih podataka i parametara procesa treniranja modela. Sposobnost generalizacije

predstavlja mogućnost neuronskih mreža da daju točan odziv i za vrijednosti ulaznih varijabli koje nisu bili predstavljeni mreži tijekom procesa učenja (Markovic i sur., 2018). U suštini, ANN su simulacije sposobne modelirati kompleksne i nelinearne sustave s velikim brojem međusobno povezanih parametara. Ne zahtijevaju detaljne informacije nego koriste raspoložive podatke i predviđaju odnose između ulaznih i izlaznih varijabli. U ovom radu razvijeni su modeli umjetnih neuronskih mreža simultani opis i predviđanje učinkovitosti ekstrakcije i rezidualne aktivnosti enzima na temelju sljedećih ulaznih varijabli: pH, S^1_{mix} , S^7_{mix} , i S^8_{mix} . Svojstva triju najboljih mreža izabranih na temelju njihovih karakteristika za opis odabranih izlaznih varijabli prikazani su u tablici 11.

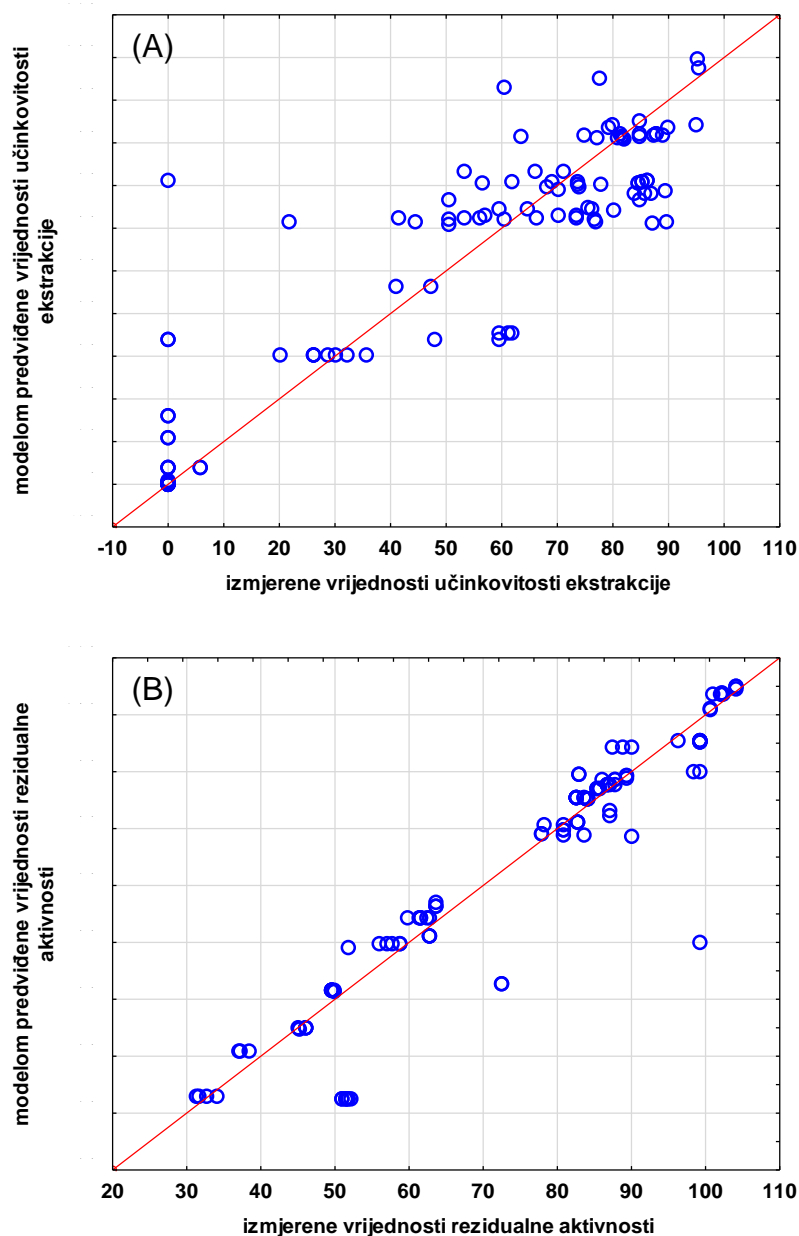
Tablica 11. Karakteristike odabranih neuronskih mreža za opis učinkovitosti ekstrakcije i rezidualne aktivnosti na osnovu DES deskriptora

Oznaka mreže	Preciznost treniranja Pogreška treniranja	Preciznost testiranja Pogreška testiranja	Preciznost validacije Pogreška validacije	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
MLP 4-8-2	0,9209 136,1016	0,9463 93,3184	0,9475 107,3400	Eksponecijalna	Eksponecijalna
MLP 4-9-2	0,9556 72,5796	0,9567 75,7015	0,9244 147,3932	Logistička funkcija	Funkcija identiteta
MLP 4-10-2	0,9578 73,1201	0,9636 75,0191	0,9281 194,8172	Tanges hiperbolni	Funkcija identiteta

Kao što je vidljivo iz tablice 11, sve tri izabrane neuronske mreže karakterizira visoka vrijednost koeficijenta determinacije za treniranje, testiranje i validaciju. Optimalna arhitektura mreže odabrana je uzimajući i obzir ne samo koeficijente determinacije i pogreške treniranja, testiranja i validacije već i broj neurona u skrivenom sloju. Manji broj neurona u skrivenom sloju znači jednostavniju mrežu, a time i pouzdaniji model. Na temelju tih kriterija za daljnju analizu podataka izabrana je mreža MLP 4-9-3, koja se smatra najpovoljnijom za opis učinkovitosti ekstrakcije i rezidualne aktivnosti na osnovu DES deskriptora ($R^2_{\text{treniranje}} = 0,9556$, $RMSE_{\text{treniranje}} = 72,5796$, $R^2_{\text{testiranje}} = 0,9812$, $RMSE_{\text{testiranje}} = 75,7015$, $R^2_{\text{validacija}} = 0,9244$, $RMSE_{\text{validacija}} = 0,9244$). Izabrana mreža imala je 4 neurona u ulaznom sloju, 9 neurona u skrivenom sloju i 2 neurona u izlaznom sloju (tablica 11). Četiri ulazne varijable bile su prethodno spomenute; pH, S^1_{mix} (σ_1), S^7_{mix} (σ_7) i S^8_{mix} (σ_8). Skrivena aktivacijska funkcija izabranog ANN modela bila je logistička funkcija, dok je izlazna aktivacijska funkcija bila funkcija identiteta. Izabrana ANN mreža opisala je opis učinkovitosti ekstrakcije i rezidualne aktivnosti na osnovu DES deskriptora s visokom preciznošću ($R^2_{\text{validacija}} > 0,9100$) (tablica 12 i slika 14). Prema Le Man i sur., model se smatra pouzdanim ukoliko je koeficijent determinacije veći od 0,75 (Le Man i sur., 2010).

Tablica 12. Koeficijenti determinacije ANN modela za opis učinkovitosti ekstrakcije i rezidualne aktivnosti na osnovu DES deskriptora

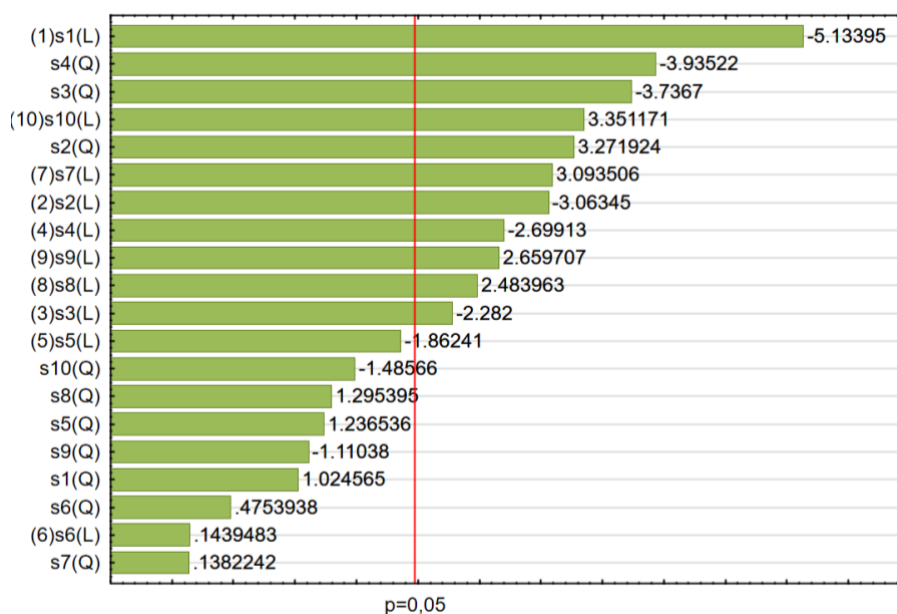
	Učinkovitost ekstrakcije			Rezidualna aktivnost		
	Preciznost treniranja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije	Preciznost treniranja	Preciznost testiranja	Preciznost validacije
MLP 4-9-2	0,9328	0,9247	0,9105	0,9495	0,9679	0,9307



Slika 14. Grafički prikaz ovisnosti eksperimentalnih vrijednosti i ANN modelom predviđenih vrijednosti za učinkovitost ekstrakcije (A) i rezidualnu aktivnost (B) u kojima su nezavisne varijable jednake za obje zavisne varijable (pH , S_{mix}^1 , S_{mix}^7 i S_{mix}^8)

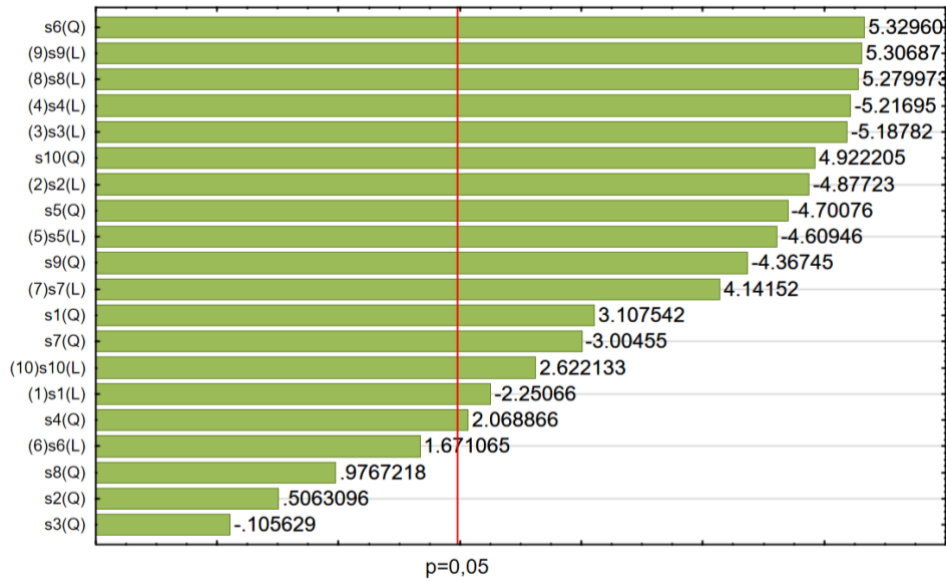
4.4.4. Optimiranje i odabir eutektičkog otapala na osnovu funkcije poželjnosti

Kako bi se ustanovile optimalne vrijednosti DES deskriptora za dobivanje najviših vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije i rezidualne aktivnosti simultano, definiranje optimalnih σ -profila za provođenje eksperimenata u mikroprotočnom sustavu analizirano je funkcijom poželjnosti na temelju modela odzivnih površina. Utjecaj koeficijenata modela odzivnih površina na učinkovitosti ekstrakcije i rezidualnu aktivnost lipaze analiziran je primjenom Pareto dijagrama (slika 15). P-vrijednost manja od 0,005 upućuje da je zanemariv učinak deskriptora na odgovor, čime se ukazuje na razinu značajnosti pojedinih deskriptora na učinkovitost ekstrakcije, odnosno rezidualnu aktivnosti. Vidljivo je da S1 ima najviši linearni (L) efekt na učinkovitost ekstrakcije.



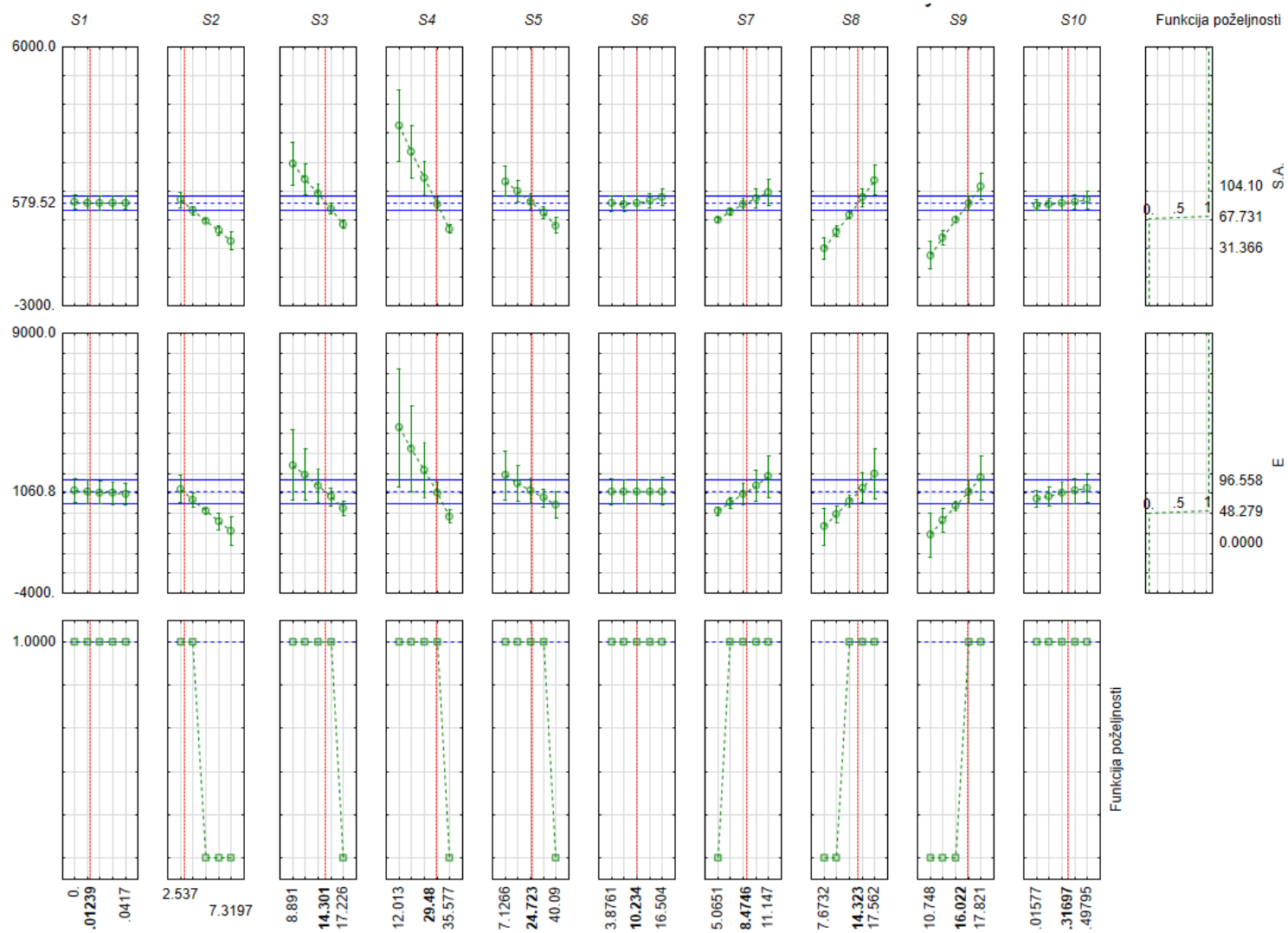
Slika 15. Pareto dijagram utjecaja izabranih nezavisnih varijabli na učinkovitosti ekstrakcije. (L) predstavlja linearnu, a (Q) kvadratnu interakciju varijabli

Iz Pareto dijagrama za učinkovitost ekstrakcije (slika 16) vidljivo je da veći broj deskriptora ima značajan doprinos modelu, što je u skladu s korelacijskom matricom i prethodno provedenim istraživanjem. Najveći doprinos za određivanje optimalnih vrijednosti rezidualne aktivnosti imaju S6, i to kvadratni, dok približne vrijednosti imaju s linearnim efektom S9 i S8.



Slika 16. Pareto dijagram utjecaja izabranih nezavisnih varijabli na rezidualnu aktivnosti. (L) predstavlja linearnu, a (Q) kvadratnu interakciju varijabli

Optimiranje vrijednosti DES deskriptora za dobivanje najviših vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije i rezidualne aktivnosti simultano na temelju profila poželjnosti dobivenih iz modela odzivnih površina provedeno je primjenom funkcije poželjnosti. Korištena je skala poželjnosti u rasponu od 0 (nepoželjno) do 1 (vrlo poželjno). Profili predviđenih vrijednosti i funkcija poželjnosti prikazani su na slici 17. Na temelju funkcije poželjnosti odabrani su značajni σ -profili te njihove optimalne vrijednosti za postizanje maksimalne rezidualne aktivnosti i učinkovitost ekstrakcije, a redom su iznosili $S_{mix}^1 = 0,01239$, $S_{mix}^7 = 8,4746$ i $S_{mix}^8 = 14,323$, te je pretražena interna baza podataka u kojoj je pronađeno eutektičko otapalo s najsličnijim vrijednostima, a to je ChCl:EG 1:2.

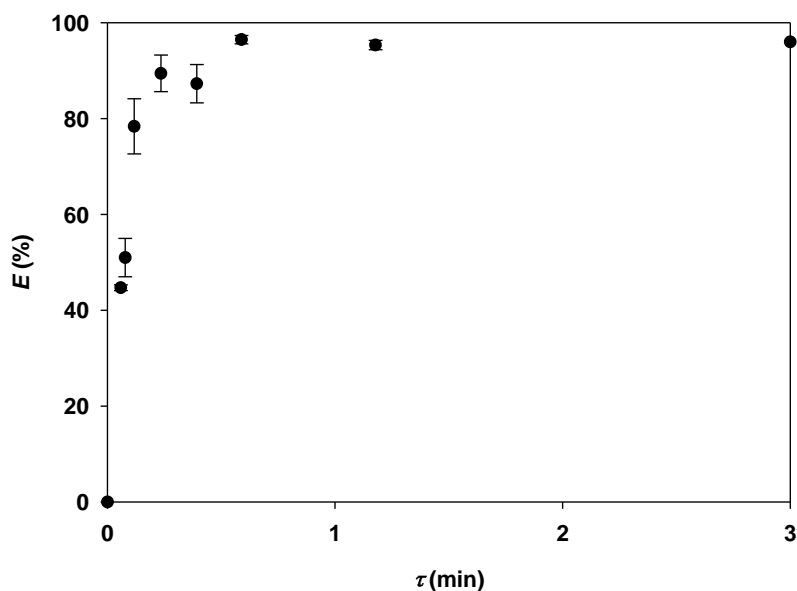


Slika 17. Profili predviđenih vrijednosti i funkcije poželjnosti za učinkovitost ekstrakcije i rezidualnu aktivnost

4.5. KONTINUIRANA EKSTRAKCIJA ENZIMA LIPAZA U MIKROPROTOČNOM SUSTAVU

Nakon ekstrakcije u šaržnom ekstraktoru, provedena su ispitivanja u kontinuiranom mikroprotočnom sustavu kako bi se ekstrakcija enzima lipaze u DES intenzificirao tj. skratilo vrijeme postupka ekstrakcije. Na temelju predikcije razvijenih modela za formiranje vodenog dvofaznog sustava korišteno je eutektičko otpalo $\text{ChCl}:\text{EG}$ 1:2 i otopina soli K_2HPO_4 u koncentraciji 0,8 g/L. Eksperiment je proveden u mikroekstraktoru izrađenom od teflonske cijevi s dva ulaza „T“ oblika duljine 30 cm i promjera 1000 μm .

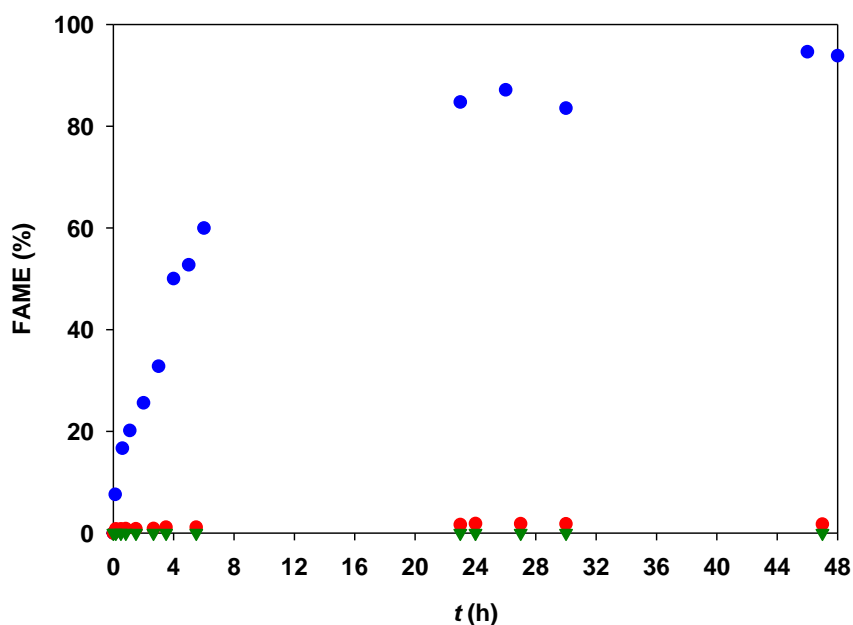
Utvrđeni optimalni omjer volumnih protoka enzima lipaze u otopini soli i DES-a je bio 1:1,5 kako bi na izlazu omjer razdvojenih faza odgovarao šaržnom sustavu. Ispitan je utjecaj vremena zadržavanja (τ) na učinkovitost ekstrakcije, a rezultati su vidljivi na slici 17. Najviša učinkovitost ekstrakcije postignuta je pri vremenu zadržavanja $\tau = 0,59$ min i iznosila je $96,47 \pm 0,87$ %. Učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza ovim eutektičkim otapalom u kontinuiranom sustavu povećana je u odnosu na šaržni u kojem je iznosila $89,76 \pm 7,24$ %, što znači da je proces uspješno intenzificiran s obzirom na to da je za šaržni postupak ekstrakcije trajao 30 minuta, a imao je manju učinkovitost.



Slika 17. Utjecaj vremena zadržavanja na učinkovitost ekstrakcije enzima lipaza u mikroekstraktoru ($L = 30$ cm, $d = 1000$ μm)

4.6. PROIZVODNJA BIODIZELA KATALIZIRANA ENZIMOM LIPAZA EKSTRAHIRANOM U EUTEKTIČKOM OTAPALU

Na samom kraju istraživanja provedena je sinteza biodizela iz suncokretovog ulja i metanola uz enzim lipazu ekstrahiranu u DES kao katalizator. Na slici 18 prikazana je ovisnost iskorištenja FAME o vremenu za reakciju kataliziranu enzimom lipaza otopljenim u fosfatnom puferu i ekstrahiranom u DES. Kao što je vidljivo, u reakciji transesterifikacije, korištenjem enzima lipaza otopljenog u fosfatnom puferu biodizel je proizveden nakon 46 h. S druge strane, kada je reakciji sinteze biodizela korišten enzimom ekstrahiran u ChCl:EG 1:2 nije došlo do sinteze biodizela.



Slika 18. Usporedba enzimatske sinteze biodizela katalizirana enzimom lipaza u puferu u stehiometrijskom omjeru ulja i metanola 1:3,2 (●), eutektičkom otapalu ChCl:EG 1:2 u stehiometrijskom omjeru 1:3,2 (●) i u suvišku metanola 1:90 (▲)

Razlog niskom iskorištenju vjerojatno je metanol koji ima utjecaj na jakost interakcija HBD s HBA s obzirom na to da uzrokuje promjene u vezama koje formira HBD djelujući kao drugi donorski spoj u strukturi DES-a (Aravena i sur., 2023). Narušavanjem strukture DES-a dolazi do prisutnosti metanola u neposrednom kontaktu s lipazom, te se aktivnost enzima smanjuje s dva mehanizma: prvi se odnosi na narušavanje tercijarne strukture enzima praćeno ireverzibilnom denaturacijom enzima, dok drugi podrazumijeva djelovanje organskih otapala u

ulozi kompetitivnih inhibitora lipaze (Graber i sur., 2007). Osim toga, jednom kada metanol postane dio DES-a postaje nedostupan u reakciji kao drugi supstrat i reakcija staje.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata, može se zaključiti sljedeće:

1. Uspješno je pripravljeno i karakterizirano (pH, gustoća, viskoznost, polarnost, σ -profili) 37 različitih eutektičkih otapala. Pomoću pripremljenih otapala provedena je šaržna ekstrakcija vodenim dvofaznim sustavima enzima lipaza porijeklom iz plijesni *Aspergillus oryzae*. Najveća postignuta učinkovitost ekstrakcije ($95,15 \pm 0,48$ %) postignuta je u eutektičkom otapalu ChCl: Sor 1:1 s 20 % vode (w/w).
2. Aktivnost enzima lipaza u nekim eutektički otapalima ChCl: Mal 4:1 s 20 % vode (w/w), ChCl: Sor 1:1 s 20 % vode (w/w), ChCl: EG 1:2, ChCl: U: G 1:2:2 i ChCl: G 1:3 ostala je očuvana tj. zabilježene su iste aktivnosti kao u fosfatnom puferu.
3. Skladišna stabilnost enzima lipaza opisana je kinetikom prvog reda na temperaturama od 4 °C i 25 °C, pri čemu su određene konstante deaktivacije $k = 0,00359$ 1/d za 4 °C i $k = 0,01383$ 1/d pri 25 °C.
4. Konstruirani su linearni i model umjetnih neuronskih mreža na osnovu eksperimentalnih podataka za procjenu učinkovitosti ekstrakcije i aktivnosti enzima lipaza u eutektičkim otapalima. Linearni modeli se nisu pokazali zadovoljavajućim u procjeni zavisnih varijabli. Model umjetnih neuronskih mreža s preciznosti treniranja od 0,9556 se može smatrati pouzdanim.
5. Funkcijom poželjnosti utvrđeni su optimalni σ -profili eutektičkog otapala za provođenje ekstrakcije i očuvanje rezidualne aktivnosti enzima, te oni za signifikantne profile iznose $S_{mix}^1 = 0,01239$, $S_{mix}^7 = 8,4746$ i $S_{mix}^8 = 14,323$.
6. Ekstrakcija je intenzificirana u mikroekstraktoru s eutektičkim otapalom ChCl: EG 1:2 i otopinom soli K_2HPO_4 u koncentraciji 0,8 g/L. U odnosu na šaržnu ekstrakciju, ekstrakcija u mikroekstraktoru skraćena je s 30 min na 0,59 min, a učinkovitost ekstrakcije povećana je s $89,76 \pm 7,24$ % na $96,47 \pm 0,87$ %.
7. Biodizel nije proizveden korištenjem enzima lipaza ekstrahiranim u DES ChCl: EG 1:2.

6. LITERATURA

Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK (2004) Deep Eutectic Solvents Formed between Choline Chloride and Carboxylic Acids: Versatile Alternatives to Ionic Liquids. *J Am Chem Soc* **126**, 9142–9147. <https://doi.org/10.1021/ja048266>

Abbott AP, Capper, G., Davies, DL, Rasheed RK, Tambyrajah V (2003) Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures Electronic supplementary information (ESI) available: spectroscopic data. *ChemComm* **1**, 70–71. <https://doi.org/10.1039/b210714g>

Abranches DO, Larriba M, Silva LP, Melle-Franco M, Palomar JF, Pinho SP, Coutinho JAP (2019) Using COSMO-RS to design choline chloride pharmaceutical eutectic solvents. *Fluid Ph Equilib* **497**, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.06.005>

Al-Wahaibi I, Al-Wahaibi Y, Al-Hajri R, Jibril B, Shuwa S (2019) The novel use of malonic acid-based deep eutectic solvents for enhancing heavy oil recovery. *Int J Oil Gas Coal Tech* **20**, 31–54. <https://doi.org/10.1504/IJOGCT.2019.096493>

Alcalde R, García G, Atilhan M, Aparicio S (2015) Systematic Study on the Viscosity of Ionic Liquids: Measurement and Prediction. *Ind Eng Chem Res* **54**, 10918–10924. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.5b02713>

Alonso-Salces RM, Korta E, Barranco A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F (2001) Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple. *J. Chromatogr. A* **933**, 37–43. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01212-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01212-2)

Anicai L, Petica A, Patroi D, Marinescu V, Prioteasa P, Costovici S (2015) Electrochemical synthesis of nanosized TiO₂ nanopowder involving choline chloride based ionic liquids. *Mater Sci Eng B* **199**, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2015.05.005>

Aravena P, Cea-Klapp E, Gajardo-Parra NF, Held C, Garrido JM, Canales RI (2023) Effect of water and hydrogen bond acceptor on the density and viscosity of glycol-based eutectic solvents. *J Mol Liq* **389**, 122856. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122856>

Asenjo JA, Andrews BA (2012) Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. *J Chromatogr A* **1238**, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.049>

Benavides J, Rito-Palomares M, Asenjo JA (2011) Aqueous Two-Phase Systems. *Comp Biotech* 697–713. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00124-0>

Bernasconi, R, Panzeri G, Accogli A, Liberale F, Nobili L, Magagnin L (2017). Electrodeposition from Deep Eutectic Solvents. *Prog Dev Liq* **17** 12–45. <https://doi.org/10.5772/64935>

Berstad DA, Knapstad B, Lamvik M, Skjølvik PA, Tørklep K, Øye HA (1988). Accurate measurements of the viscosity of water in the temperature range 19.5–25.5°C. *Phy A Stat Mech App* **151**, 246–280. [https://doi.org/10.1016/0378-4371\(88\)90015-5](https://doi.org/10.1016/0378-4371(88)90015-5)

Biernacki K, Souza HKS, Almeida CMR, Magalhae AL, Gonclaves MP (2020) Physicochemical Properties of Choline Chloride-Based Deep Eutectic Solvents with Polyols: An Experimental and Theoretical Investigation. *ACS Sustainable Chem Eng* **8**, 18712–18728. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c08288>

Brockman HL (2013) Lipases. *Enc Biol Chem* 729–732. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00118-3>

Buarque F, Gautério G, Coelho M, Lemes A, Ribeiro B (2022) Aqueous Two-Phase Systems Based on Ionic Liquids and Deep Eutectic Solvents as a Tool for the Recovery of

Non-Protein Bioactive Compounds—A Review. *Proc* **11**, 31. <https://doi.org/10.3390/pr11010031>

Budžaki S (2015) Enzyme-catalysed Biodiesel Production from Edible and Waste Cooking Oils. *Chem Biochem Eng Quart* **29**, 329–333. <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2015.2177>

Chang CW, Laird DA, Mausbach MJ, Hurburgh CR (2001) Near—Infrared Reflectance Spectroscopy—Principal Components Regression Analyses of Soil Properties. *Soil Sci Soc Am J* **65**, 480–490.

Cotroneo V, Gajardo P, López-Porfiri P, Leiva A, Gonzalez-Miquel M, Garrido J, Canales, RI (2021) Hydrogen bond donor and alcohol chain length effect on the physicochemical properties of choline chloride based deep eutectic solvents mixed with alcohols. *J Mol Liquid* **345**, e116986. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116986>.

Cussler EL (2009) Diffusion. *Cam Uni Press* **12**, 100-112. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511805134>

Cvjetko Bubalo M, Radošević K, Radojčić Redovniković I, Halambek J, Gaurina Srček V (2014) A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids. *Ecotox Envir Safety* **99**, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.10.019>.

Cybenko G (1989) Approximation by superpositions of a sigmoidal function. *Math Control Signals Syst* **2**, 303–314. <https://doi.org/10.1007/BF02551274>

Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi Y (2015) Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem* **187** <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.123>.

Dai Y, Witkamp GJ, Verpoorte R, Choi YH (2013) Natural Deep Eutectic Solvents as a New Extraction Media for Phenolic Metabolites in *Carthamus tinctorius* L. *Anal Chem*, **85**, 6272–6278. <https://doi.org/10.1021/ac400432p>

Dawidowicz A, Rado E, Wianowska D, Madrarowicz M, Gawdzik J (2008) Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta* **76**, 878–884. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.050>

de Sousa ASB, Lima RP, Alves da Silva MC, Moreira DN, Pintado MME, de Melo Silva S (2022) Natural deep eutectic solvent of choline chloride with oxalic or ascorbic acids as efficient starch-based film plasticizers. *Polymer* **259**, e125314. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.125314>.

Demirbas A (2008) Biodiesel. *Sprin Lon* 132-135. <https://doi.org/10.1007/978-1-84628-995-8>

Dias CGC, Oliveira Farias F, Cazolato Gaioto R, Kaspchak E, Conceição da Costa M, Igarashi-Mafra L, Mafra MR (2022) Thermophysical characterization of deep eutectic solvents composed by D-sorbitol, xylitol or D(+)-xylose as hydrogen bond donors. *Jour Mol Liq* **354**, 118801. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118801>

Dinis TB, Passos H, Lima DLD, Esteves VI, Coutinho JAP, Freire MG (2015) One-step extraction and concentration of estrogens for an adequate monitoring of wastewater using ionic-liquid-based aqueous biphasic systems. *Green Chem* **17**, 2570–2579. <https://doi.org/10.1039/C5GC00077G>

Dumas F, Roger E, Rodriguez J, Benyahia L, Benoit JP (2020) Aqueous Two-Phase Systems: simple one-step process formulation and phase diagram for characterisation. *Colloid Polym Sci* **298**, 1629–1636. <https://doi.org/10.1007/s00396-020-04748-8>

Durand E, Villeneuve P, Bourlieu-lacanal C, Carrière F (2021) Natural deep eutectic solvents: Hypothesis for their possible roles in cellular functions and interaction with

membranes and other organized biological systems. *Adv Bot Res* **97**, 133–158. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2020.09.005>

Eckert F, Klamt A. (2002) Fast solvent screening via quantum chemistry: COSMO-RS approach. *AIChE J* **48**, 369–385. <https://doi.org/10.1002/aic.690480220>

Ehrfeld W, Hessel V, Löwe H (2000) Microreactors. *Wiley* **1**, 143-172 <https://doi.org/10.1002/3527601953>

Fang Y (2015) Thermodynamic Principle Revisited: Theory of Protein Folding. *Adv in Biosc Biotech* **6**, 37–48. <https://doi.org/10.4236/abb.2015.61005>

Fearn T (2002) Assessing Calibrations: SEP, RPD, RER and R2. *NIR news* **13**, 12-18 <https://doi.org/10.1255/nirn>.

Ferrarini F, Flôres GB, Muniz AR, de Soares RP (2018) An open and extensible sigma-profile database for COSMO-based models. *AIChE J* **64**, 3443–3455. <https://doi.org/10.1002/aic.16194>

Francisco M, van den Bruinhorst, A, Kroon MC (2013) Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): A New Generation of Designer Solvents. *Angew Chem Int Ed* **52**, 3074–3085. <https://doi.org/10.1002/anie.201207548>

Gebremariam SN, Marchetti JM (2017) Biodiesel production technologies: review. *AIMS Energy* **5**, 425-457. <https://doi.org/10.3934/energy.2017.3.425>

Gómez E, Requejo PF, Tojo E, Macedo EA (2019) Recovery of flavonoids using novel biodegradable choline amino acids ionic liquids based ATPS. *Fluid Ph Equilib* **493**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2019.03.024>

Gorke JT, Srienc F, Kazlauskas RJ (2008) Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem Comm* **10**, 1235. <https://doi.org/10.1039/b716317g>

Graber M, Irague R, Rosenfeld E, Lamare S, Franson L, Hult K (2007) Solvent as a competitive inhibitor for *Candida antarctica* lipase B. *BBA Proteins Proteom* **1774**, 1052–1057. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.05.013>

Grillo G, Gunjević V, Radošević K, Redovniković IR, Cravotto G (2020) Deep Eutectic Solvents and Nonconventional Technologies for Blueberry-Peel Extraction: Kinetics, Anthocyanin Stability, and Antiproliferative Activity. *Antioksidansi* **9**, e1069. <https://doi.org/10.3390/antiox9111069>

Grilo AL, Raquel Aires-Barros M, Azevedo AM (2016). Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. *Sep Purif Rev* **45**, 68–80. <https://doi.org/10.1080/15422119.2014.983128>

Gumba RE, Saallah S, Misson M, Ongkudon CM, Anton A (2016) Green biodiesel production: a review on feedstock, catalyst, monolithic reactor, and supercritical fluid technology. *Biofuel Res J* **3**, 431–447. <https://doi.org/10.18331/BRJ2016.3.3.3>

Hair JF, Ringle CM, Sarstedt M (2013) Partial Least Squares Structural Equation Modeling: Rigorous Applications, Better Results and Higher Acceptance. *Long Range Plann* **46**, 1–12

Handy S, Lavender K (2013) Organic synthesis in deep eutectic solvents: Paal–Knorr reactions. *Tetrahedron Lett* **54**, 4377–4379. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.05.122>

Harris TK (2008) The mechanistic ventures of triosephosphate isomerase. *IUBMB Life* **60**, 195–198. <https://doi.org/10.1002/iub.43>

Hayyan A, Mjalli FS, Alnashef IM, Al-Wahaibi T, Al-Wahaibi YM, Hashim MA (2012) Fruit sugar-based deep eutectic solvents and their physical properties. *Thermochimica Acta* **541**, 70-75. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2012.04.030>

- Hayyan A, Mjalli FS, Alnashef IM, Al-Wahaibi YM, Al-Wahaibi T, Hashim MA (2013) Glucose-based deep eutectic solvents: Physical properties. *J Mol Liquid* **178**, 137-141. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.11.025>
- Henseler J, Ringle CM, Sinkovics RR (2009) The Use of Partial Least Squares Path Modeling in International Marketing. *Adv Int Mark* **20**, 277–319
- Hessel V, Hardt S, Löwe H (2004) Chemical Micro Process Engineering. *Wiley* **3**, 125-127. <https://doi.org/10.1002/3527603042>
- Hessel V, Löwe H, Schönfeld F (2005) Micromixers—a review on passive and active mixing principles. *Chem Eng Sci* **60**, 2479–2501. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2004.11.033>
- Hornik K, Stinchcombe M, White H (1989) Multilayer feedforward networks are universal approximators. *Neural Net* **2**, 359–366. [https://doi.org/10.1016/0893-6080\(89\)90020-8](https://doi.org/10.1016/0893-6080(89)90020-8)
- Huang ZL, Wu BP, Wen Q, Yang TX, Yang Z (2014) Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *J Chem Tech Biotech* **89**, 1975–1981. <https://doi.org/10.1002/jctb.4285>
- Hussain S., Fangwei Z, Siddiqi AF, Ali Z, Shabbir MS (2018) Structural Equation Model for Evaluating Factors Affecting Quality of Social Infrastructure Projects. *Sustainability* **10**, e1415
- Ibrahim W, Candra H, Isyanto H (2022) Voice Recognition Security Reliability Analysis Using Deep Learning Convolutional Neural Network Algorithm. *J EI Tech* **6**, e12705 <https://doi.org/10.1111/exsy.12705>
- Ijardar SP (2020) Deep eutectic solvents composed of tetrabutylammonium bromide and PEG: Density, speed of sound and viscosity as a function of temperature. *J Chem Therm* **140**, 105897. <https://doi.org/10.1016/j.jct.2019.105897>
- Imperato G, Eibler E, Niedermaier J, König B (2005) Low-melting sugar–urea–salt mixtures as solvents for Diels–Alder reactions. *Chem Commun* **9**, 1170–1172. <https://doi.org/10.1039/B414515A>
- Ince AE, Sahin S, Sumnu (2013) Extraction of phenolic compounds from melissa using microwave and ultrasound. *Tur J Agr For* **37**, 69-75. <https://doi.org/10.3906/tar-1201-1>
- Iqbal M, Tao Y, Xie S, Zhu Y, Chen D, Wang X, Huang L, Peng D, Sattar A, Shabbir MAB, Hussain HI, Ahmed S, Yuan Z (2016) Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. *Biol Proc On* **18**, 18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>
- Jamehbozorg B, Sadeghi R (2019) Extractions of Alkaloids Codeine and Caffeine with [Bmim][BF₄]/Carbohydrate Aqueous Biphasic Systems as a Novel Class of Liquid–Liquid Extraction Systems. *J Chem Eng Data* **64**, 916–925. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.8b00678>
- Jeong KM, Ko J, Zhao J, Jin Y, Yoo DE, Han SY, Lee J (2017) Multi-functioning deep eutectic solvents as extraction and storage media for bioactive natural products that are readily applicable to cosmetic products. *J Clean Prod* **151**, 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.038>
- Jeong KM, Lee MS, Nam MW, Zhao J, Jin Y, Lee DK, Kwon SW, Jeong JH, Lee J (2015) Tailoring and recycling of deep eutectic solvents as sustainable and efficient extraction media. *J Chromatogr A* **1424**, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.10.083>
- Jhong HR, Wong DSH, Wan CC, Wang YY, Wei TC (2009) A novel deep eutectic solvent-based ionic liquid used as electrolyte for dye-sensitized solar cells. *Electrochem Comm* **11**, 209–211. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2008.11.001>

- Kareem MA, Mjalli FS, Hashim MA, AlNashef IM (2010) Phosphonium-Based Ionic Liquids Analogues and Their Physical Properties. *J Chem Eng Data* **55**, 4632–4637. <https://doi.org/10.1021/je100104v>
- Khandelwal S, Tailor YK, Kumar M (2016) Deep eutectic solvents (DESs) as eco-friendly and sustainable solvent/catalyst systems in organic transformations. *J Mol Liquid* **215**, 345–386. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.12.015>
- Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL (2020) Bradford Assay for Determining Protein Concentration. *Cold Spring Harb Protoc* **2020**, <https://doi.org/10.1101/pdb.prot102269>
- Kim SH, Park S, Yu H, Kim JH, Kim HJ, Yang YH, Kim YH, Kim KJ, Kan E, Lee SH (2016) Effect of deep eutectic solvent mixtures on lipase activity and stability. *J Mol Cat B Enzymatic* **128**, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.03.012>
- Kishore D, Kundu S, Kayastha AM (2012) Thermal, Chemical and pH Induced Denaturation of a Multimeric β -Galactosidase Reveals Multiple Unfolding Pathways. *PLoS ONE*. **7**, e50380. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050380>
- Knothe G, Razon LF (2017) Biodiesel fuels. *Prog Energy and Comb Sci* **58**, 36–59. <https://doi.org/10.1016/j.pecs.2016.08.001>
- Kowalski PA, Kusy M (2018) Sensitivity Analysis for Probabilistic Neural Network Structure Reduction. *IEEE Trans Neural Net and Learning Sys* **29**, 1919–1932 <https://doi.org/10.1109/TNNLS.2017.2688482>.
- Kumar A, Dhar K, Kanwar SS, Arora PK (2016) Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. *Biol Proc Online* **18**, 2. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0033-2>
- Le Man H, Behera SK, Park HS (2010) Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. *Int J Envir Sci Tech* **7**, 157–164. <https://doi.org/10.1007/BF03326127>
- Lemes AC, Machado JR, Brites ML, Luccio M, Kalil SJ (2014) Design Strategies for Integrated β -Galactosidase Purification Processes. *Chem Eng Tech* **37**, 1805–1812. <https://doi.org/10.1002/ceat.201300433>
- Li Y, Li Y, Li H (2023) Insights into the tribological behavior of choline chloride—urea and choline chloride—thiourea deep eutectic solvents. *Friction* **11**, 76–92. <https://doi.org/10.1007/s40544-021-0575-4>
- Ma S, Li F, Tan Z (2022) Recyclable aqueous two-phase system formed by two temperature-responsive polymers for the chiral resolution of mandelic acid enantiomers. *J Mol Liquid* **352**, 118738. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118738>
- Maghraby YR, El-Shabasy RM, Ibrahim AH, Azzazy HMES (2023) Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega* **8**, 5184–5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>
- Makoś P, Słupek E, Gębicki J (2020) Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques – A review. *Microchem J* **152**, 104384. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104384>
- Markovic R, Grintal E, Wölki D, Frisch J, van Treeck C (2018) Window opening model using deep learning methods. *Build environ* **145**, 319–329. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2018.09.024>
- Masson P, Lushchekina S (2022) Conformational Stability and Denaturation Processes of Proteins Investigated by Electrophoresis under Extreme Conditions. *Mol* **27**, 6861. <https://doi.org/10.3390/molecules27206861>

- McQueen L, Lai D (2019) Ionic Liquid Aqueous Two-Phase Systems From a Pharmaceutical Perspective. *Front Chem* **7**, 135. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00135>
- Miranda-Molina A, Xolalpa W, Strompen S, Arreola-Barroso R, Olvera L, López-Munguía A, Castillo E, Saab-Rincon G (2019) Deep Eutectic Solvents as New Reaction Media to Produce Alkyl-Glycosides Using Alpha-Amylase from *Thermotoga maritima*. *Int J Mol Sci* **20**, 5439. <https://doi.org/10.3390/ijms20215439>
- Nielsen JE (2009) Analyzing Enzymatic pH Activity Profiles and Protein Titration Curves Using Structure-Based pKa Calculations and Titration Curve Fitting. *Meth Enzym* **454**, 233–258. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03809-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03809-3)
- OECD (2006) Revised Introduction to the OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 3. <https://doi.org/10.1787/9789264030213-en>
- Ogihara W, Aoyama T, Ohno H (2004) Polarity Measurement for Ionic Liquids Containing Dissociable Protons. *Chem Lett* **33**, 1414–1415. <https://doi.org/10.1246/cl.2004.1414>
- Okpo EE, Dosunmu A, Odagme BS (2016) Artificial Neural Network Model for Predicting Wellbore Instability. *SPE Ann Int Conf* **15**. <https://doi.org/10.2118/184371-MS>
- Owhe OE, Kumar Narendra, Lynam JG (2021) Lignin extraction from waste biomass with deep eutectic solvents: Molecular weight and heating value *Biocat Agricult Biotech* **32**, e101949. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.101949>.
- Paiva A, Craveiro R, Aroso I, Martins M, Reis Rui L, Duarte A (2014). Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sust Chem Eng.* **2**, 1063–1071. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>.
- Pina AS, Lowe CR, Roque ACA (2014) Challenges and opportunities in the purification of recombinant tagged proteins. *Biotech Adv* **32**, 366–381. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.001>
- Poole CF (2023) Selectivity evaluation of extraction systems. *J Chromatogr A. Apr* **26**, 1695. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.463939>
- Qin H, Hu X, Wang J, Cheng H, Chen L, Qi Z (2020) Overview of acidic deep eutectic solvents on synthesis, properties and applications. *Green En Environ* **5**, 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.03.002>
- Qiu Z, Zhao L, Weatherley L (2010) Process intensification technologies in continuous biodiesel production. *Chem Eng Process* **49**, 323–330. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2010.03.005>
- Rachmaniah O, Fazriyah L, Seftiyani N, Rachimoellah M (2018) Tailoring Properties of Acidic Types of Natural Deep Eutectics Solvents (NADES): Enhanced Solubility of Curcuminoids from *Curcuma zedoaria*. *MATEC Web of Conferences* **156**, e01011. <https://doi.org/10.1051/mateconf/201815601011>.
- Reis P, Holmberg K, Watzke H, Leser ME, Miller R (2009) Lipases at interfaces: A review. *Adv Colloid Interface Sci* **147**, 237–250. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2008.06.001>
- Rodinkov OV, Moskvina LN, Zykin IA (2003) Gas-Chromatographic Determination of Gaseous Hydrocarbons in Aqueous Solutions Using Chromatomembrane Gas Extraction. *J Anal Chem* **58**, 71–76 <https://doi.org/10.1023/A:1021894400769>
- Rodrigues del Aguila MM, Benitez-Parejo N (2011) Simple linear and multivariate regression models. *Allergolog Immunopatholog* **39**, 159-173. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2011.02.001>

- Rodríguez del Águila MM, Benítez-Parejo N (2011) Simple linear and multivariate regression models. *Allergol Immunopath* **39**, 159–173. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2011.02.001>
- Rumelhart D E, McClelland JL (1986) Parallel Distributed Processing. *MIT Press* **4**, 56. <https://doi.org/10.7551/mitpress/5236.001.0001>
- Sackmann EK, Fulton AL, Beebe DJ (2014) The present and future role of microfluidics in biomedical research. *Nature* **507**, 181–189. <https://doi.org/10.1038/nature13118>
- Salido-Fortuna S, Casado N, Cadstro Puyana M, Marina ML (2021) Use of choline chloride-D-sorbitol deep eutectic solvent as additive in cyclodextrin-electrokinetic chromatography for the enantiomeric separation of lacosamide. *Microchem J* **160**, 205669 <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105669>.
- Sang Lee M, Lee K, Nam MW, Jeong KM, Lee JE, Kim NW, Yin Y, Lim SY, Yoo DE, Lee J, Jeon JH (2018) Natural deep eutectic solvents as a storage medium for human interferon- α 2: a green and improved strategy for room-temperature biologics. *J Ind Eng Chem* **65**, 343-348. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.05.005>.
- Sang Lee M, Lee K, Nam MW, Jeong KM, Lee JE, Kim NW, Yin Y, Lim SY, Yoo DE, Lee J, Jeon JH (2018) Natural deep eutectic solvents as a storage medium for human interferon- α 2: a green and improved strategy for room-temperature biologics. *J Ind Eng Chem* **65**, 343-348. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.05.005>.
- Santos-Martin M, Cuber Cardoso J, Gonzales RD, Cortes Trivino E, Sayago A, Urbano J (2023) Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from blueberry leaves using natural deep eutectic solvents (NADES) for the valorization of agrifood wastes. *Biomass Bioener* **175**, e106882. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2023.106882>
- Savi LK, Dias MCGC, Caprine D, Waszcynskyj N, Ribani RH, Haminiuk CWI (2019) Natural deep eutectic solvents (NADES) based on citric acid and sucrose as a potential green technology: a comprehensive study of water inclusion and its effect on thermal, physical and rheological properties. *Int J Food Sci Technol* **54**, 898-907. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14013>
- Sim J, McGoverin C, Oey I, Frew R, Kebede B (2023) Near-Infrared Reflectance Spectroscopy Accurately Predicted Isotope and Elemental Compositions for Origin Traceability of Coffee. *Food Chem* **12** 11-24
- Simeonov SP, Afonso CAM (2016) Basicity and stability of urea deep eutectic mixtures. *RSC Adv* **6**, 5485–5490. <https://doi.org/10.1039/C5RA24558C>
- Smith EL, ba AP, Ryder KS (2014) Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem Rev* **114**, 11060–11082. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
- Srivastava A, Prasad R (2000) Triglycerides-based diesel fuels. *Renew Sustain Energy Rev* **4**, 111–133.
- Tammadon F, amahdi-AmahAbadi E, Noorbala MR (2023) ZnCl₂:ChCl:2urea as a new ternary deep eutectic for clean production of high content zwitterionic micro- or nano-cellulose by passing to the binary DES of ZnCl₂:2urea. *J Mol Liquid* **387**, e122552 <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.122662>
- Tang W, An Y, Row KH (2020) Recoverable deep eutectic solvent-based aniline organic pollutant separation technology using choline salt as adsorbent. *J Mol Liquid* **306**, 112910. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.112910>

- Tubio G, Picó GA, Nerli BB (2009) Extraction of trypsin from bovine pancreas by applying polyethyleneglycol/sodium citrate aqueous two-phase systems. *J Chromatogr B* **877**, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.11.016>
- Wei ZF, Wang XQ, Peng X, Wang W, Zhao CJ, Zu YG, Fu YJ (2015) Fast and green extraction and separation of main bioactive flavonoids from *Radix Scutellariae*. *Ind Crops Prod* **63**, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.10.013>
- Xie G, Shen J, Luo J, Dandan Li, Tao Y, Changinan S, Yongbin H (2022) Simultaneous extraction and preliminary purification of polyphenols from grape pomace using an aqueous two-phase system exposed to ultrasound irradiation: Process characterization and simulation. *Front Nutr* **9**, 99375 <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.993475>
- Yan H, Wang Z, Chen L (2009) Kinetic resolution of α -lipoic acid via enzymatic differentiation of a remote stereocenter. *J Ind Microbiol Biotech* **36**, 643–648. <https://doi.org/10.1007/s10295-009-0531-1>
- Yau YK, Ooi CW, Ng EP, Lan JCW, Ling TC, Show PL (2015) Current applications of different type of aqueous two-phase systems. *Bioresour Bioprocess* **2**, 49. <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0078-0>
- Yusuf B, Astaty S, Ardana M, Herman H, Ibrahim A, Rijai L, Nainu F, Ahmad I (2021) Optimizing Natural Deep Eutectic Solvent Citric Acid-Glucose Based Microwave-Assisted Extraction of Total Polyphenols Content from *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Bulb. *Indonesian J Chem* **21**, 797. <https://doi.org/10.22146/ijc.58467>
- Zafarani-Moattar MT, Nemati-Kande E, Soleimani A (2012) Study of the liquid–liquid equilibrium of 1-propanol+manganese sulphate and 2-propanol+lithium sulphate aqueous two-phase systems at different temperatures: Experiment and correlation. *Fluid Ph Equilib* **313**, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2011.10.004>
- Zheng JY, Wu JY, Zhang YJ, Wang, Z (2013) Resolution of (R, S)-ethyl-2-(4-hydroxyphenoxy) propanoate using lyophilized mycelium of *Aspergillus oryzae* WZ007. *J Mol Catal B Enzym* **97**, 62–66. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.07.016>
- Zhu S, Xu J, Cheng H, Gao J, Jiang X, Li C (2019) Poly(ethylene glycol) Diacid-Based Deep Eutectic Solvent with Excellent Denitrogenation Performance and Distinctive Extractive Behavior. *ACS Publication* **9**, e1021. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.9b02463>

PRILOG 1 – MATLAB kod

1.1. UVOZ PODATAKA

```
opts = spreadsheetImportOptions("NumVariables", 18);
opts.Sheet = "Sheet1";
opts.DataRange = "A2:S164";
opts.VariableNames = ["pH", "VarName2", "VarName3", "c", "ENR", "Kp", "VarName7",
"VarName8", "VarName9", "VarName10", "VarName11", "VarName12", "VarName13",
"VarName14", "VarName15", "VarName16", "SA", "E", "StdevViskoznost"];
opts.VariableTypes = ["double", "double", "double", "double", "double", "double", "double",
"double", "double", "double", "double", "double", "double", "double", "double",
"double", "double", "string"];
opts = setvaropts(opts, "StdevViskoznost", "WhitespaceRule", "preserve");
opts = setvaropts(opts, "StdevViskoznost", "EmptyFieldRule", "auto");
podaci = readtable("podaci.xlsx", opts, "UseExcel", false);
clear opts
```

1.2. DISTRIBUCIJA PODATAKA

```
figure;
for i = 1:18
    subplot(6,3,i);
    histogram(podaci(:,i));
    title(['Column ', num2str(i)]);
end
```

1.3. SPEARMAN KORELACIJSKA MATRICA

```
podaci_array = table2array(podaci);
[Rho, Pval] = corr(podaci_array, 'Type', 'Spearman', 'Tail', 'both');
figure;
imagesc(Rho);
colormap('jet');
colorbar;
title('Spearman Correlation Matrix');
```

```
ax = gca;
ax.XTick = 1:size(Rho, 2);
ax.YTick = 1:size(Rho, 1);
ax.XTickLabel = NB1.Properties.VariableNames;
ax.YTickLabel = NB1.Properties.VariableNames;
for i = 1:size(Rho, 1)
    for j = 1:size(Rho, 2)
        if Pval(i, j) < 0.05
            text(j, i, sprintf('%.2f*', Rho(i, j)), 'HorizontalAlignment', 'center', 'VerticalAlignment',
'middle');
        else
            text(j, i, sprintf('%.2f', Rho(i, j)), 'HorizontalAlignment', 'center', 'VerticalAlignment', 'middle');
        end
    end
end
end
```

PRILOG 2 – Popis kratica i simbola

ANN – umjetna neuronska mreža

ATPS – vodeni dvofazni sustavi

DES – eutektičko otapalo

EG – etilen glikol

FAME – metilni esteri masnih kiselina

FID – plameno-ionizirajući detektor

Fru – fruktoza

G – glicerol

GC – plinska kromatografija

Glc – glukoza

HBA – akceptor vodikove veze

HBD – donor vodikove veze

JK – jabučna kiselina

LK – limunska kiselina

Mal – maltoza

MK – malonska kiselina

NADES – prirodno eutektičko otapalo

OK – oksalna kiselina

PEG – polietilen glikol

PG – poliglikol

Pro – prolin

R.A. – rezidualna aktivnost enzima

RER – omjer raspona pogreške

RMSE – korijen srednje kvadratne pogreške

RMSEP - korijen srednje kvadratne pogreške za predviđanje

RPD – omjer predviđanja i odstupanja

Sah – saharoza

SEP – standardna pogreška predviđanja

Sor – sorbitol

TU – tiourea

U – urea

Xyl – ksiloza

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja, Nikša Bekavac, izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.
