# Biotransformacija fenola lakazom u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru

**Rahelić, Tin**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:888728

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-20**

FKITMCMXIX

*Repository / Repozitorij:*

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tin Rahelić

# ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tin Rahelić

# BIOTRANSFORMACIJA FENOLA LAKAZOM U SUSTAVIMA VODA-ORGANSKO OTAPALO U MIKROREAKTORU

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Bruno Zelić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Bruno Zelić
izv. prof. dr. sc Nenad Bolf
izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar

Zagreb, rujan 2015.

## Sažetak

Mikroreaktori sa svojim tipičnim dimenzijama mikrokanala u području 10 μm – 500 μm karakterizirani su mnogo većom međufaznom površinom u odnosu na konvencionalne reaktorske sustave. Posljedično se zbog ovoga ostvaruje intenzivniji prijenos tvari i topline što doprinosi povećanju konverzije te nastajanje manje količine sporednih produkata. Također su zbog malog reaktorskog volumna za provedbu eksperimnta potrebne male količine kemikalija. Osim ovoga upotrebom mikroreaktora povećavaju se doseg reakcije i sigurnost provedbe procesa.

U ovom radu provedena je biotransformacija fenola enzimom lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* u mikroreaktoru. Konverzija i kinetički parametri jednosupstratne Michaelis-Menteničine kinetike procijenjeni u mikroreaktoru uspoređeni su s onima dobivenim pokusima preovedenim u kotlastom reaktoru. Biotransformacija fenola provedena je u tri različita dvofazna sustava voda-organsko otapalo (diklormetan, heksan i toluen) pri čemu je enzim lakaza bio u vodenoj fazi, a fenol u organskom otapalu. U svakom od promatranih sustava provedena je analiza stabilnosti enzima lakaze.

Za svaki od analiziranih sustava voda-organsko otapalo provedena je i analiza profila strujanja u mikrokanalu pri različitim protocima i omjerima vode i organskog otapala. Zaključeno je da je kod malih vrijednosti Reynoldsova broja do Re = 1,2 i kapilarnog broja do Ca = $1{,}3 \cdot 10^{-4}$ dominantno segmentirano strujanje, dok se kod Reynoldsovih brojeva većih od Re = 1,3 i kapilarnih brojeva većih od Ca = $2{,}1 \cdot 10^{-4}$ razvija paralelno strujanje. U šaržnom reaktoru postignute su sljedeće maksimalne konverzije: $X_{\text{voda-diklormetan}}$ = 28,49 %, $X_{\text{voda-heksan}}$ = 23,46 % i $X_{\text{voda-toulen}}$ = 32,79 % dok su u mikroreaktoru za vrijeme zadržavanja $\tau$ = 240 s postignute sljedeće konverzije: $X_{\text{voda-diklormetan}}$ = 79,28 %, $X_{\text{voda-heksan}}$ = 77,05 % i $X_{\text{voda-toulen}}$ = 79,28 %. Procijenjene vrijednosti maksimalnih brzina reakcije biotransformacije fenola enzimom lakaza u mikroreaktoru su približno 100 puta veće od onih procijenjenih u kotlastom reaktoru za pojedino otapalo. Kao najpogodnije otapalo za provedbu reakcije u kotlastom reaktoru i mikroreaktoru pokazao se toluen jer su u pokusima provedenim u sustavu voda-toluen procijenjeni najveća maksimalna brzina reakcije i najveći afinitet prema enzimu lakazi te je postignuta najveća konverzija.



**Ključne riječi:** mikroreaktori, lakaza, biotransformacija, profili strujanja, Michaelis-Menteničina kinetika

## Summary

Microreactors with typical dimension of microchannels in range of 10 μm to500 μm are characterized with much greater interfacial area in comparison to conventional reactors. As a result there is much more intense mass and heat transfer what leads to larger conversions and smaller quantities of byproducts. Also, because of small reaction volume conducting the experiment requires small quantities of chemicals. Additionally, the use of microreactors increases conversion and process safety.

In this work biotransformation of phenol using laccase from *Trametes versicolor* in a microreactor was performed. Conversion and kinetic parameter of single substrate Michaelis-Menten kinetics were estimated for microreactor experiments and compared with those obtained in a batch reactor. Biotransformation of phenol was conducted in three different two-phase systems water-organic solvent (dichloromethane, hexane, and toluene). Enzyme laccase was in aqueous phase and toluene in organic solvent. In every system analysis of laccase stability was performed.

For every of the analyzed water-organic solvent systems flow patterns in microchannel with different flows and different water to organic solvent ratio were analyzed. It was concluded that in small Reynolds numbers up to Re = 1.2 and capillary numbers up to $Ca = 1.3 \cdot 10^{-4}$ segmented flow patterns are dominant, while parallel profile is developed at Reynolds numbers larger than Re = 1.3 and capillary numbers larger than $Ca = 2.1 \cdot 10^{-4}$. In batch rector maximal conversion of $X_{\text{water-dichloromethane}} = 28.49$ %, $X_{\text{water-hexane}} = 23.46$ % and $X_{\text{water -toluene}} = 32.79$ % were reached while in a microreactor for residence time $\tau = 240$ s conversion of $X_{\text{water-dichloromethane}} = 79.28$ %, $X_{\text{water-hexane}} = 77.05$ % and $X_{\text{water-toluene}} = 79.28$ % were reached. Values of estimated maximal reaction rate of laccase catalyzed phenol biotransformation were approximately 100 fold higher than ones estimated in a batch reactor for every solvent. Toluene was the most suitable solvent for the reaction in the batch and the microreactor because in performed experiments in water-toluene systems maximal reaction rate was estimated, the affinity of enzyme laccase was also maximal and consequently the maximal conversion was achieved.

**Key words:** microreactors, laccase, biotransformation, flow profiles, Michaelis-Menten kinetics.

# SADRŽAJ:

1. UVOD ..... 1

**2. OPĆI DIO ..... 2**

2.1. Mikroreaktori ..... 2

2.1.1. Struktura, izvedba i podjela mikroreaktora ..... 2

2.1.2. Strujanje u mikrokanalu u sustavu voda-organsko otapalo ..... 4

2.1.3. Biotransformacije u mikroreaktorima ..... 5

2.2. Lakaze ..... 6

2.2.1. Struktura i mehanizam djelovanja lakaza ..... 6

2.3. Fenolni spojevi ..... 7

2.4. Michaelis-Menteničina enzimska kinetika ..... 8

**3. EKSPERIMENTALNI DIO ..... 10**

3.1. Materijali ..... 10

3.1.1. Kemikalije ..... 10

3.1.2. Puferi i otopine ..... 10

3.1.3. Oprema, uređaji i programski paketi ..... 12

3.2. Metode rada ..... 12

3.2.1. Analitičke metode ..... 12

*3.2.1.1. Mjerenje aktivnosti enzima lakaze* ..... 12

*3.2.1.2. Mjerenje koncentracije fenola* ..... 13

3.2.2. Provedba mjerenja ..... 14

*3.2.2.1. Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru* ..... 14

*3.2.2.2. Biotransformacija fenola u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru* . 15

*3.2.2.3. Analiza profila strujanja u sustavu voda-organsko otapalo u mikroreaktoru* ..... 15

*3.2.2.4. Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru* ..... 16

*3.2.2.5. Biotransfromacija fenola u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru* ..... 16

3.2.3. Matematički model procesa biotransformacije fenola ..... 17

*3.2.3.1. Matematički model procesa biotransformacije fenola u kotlastom reaktoru* ..... 17

*3.2.3.2. Matematički model procesa biotransformacije fenola u mikroreaktoru* ..... 18

**4. REZULTATI I RASPRAVA ..... 20**

4.1. Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru ... 20

4.2. Biotransformacija fenola u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru ..... 22

4.3. Analiza profila strujanja sustava voda-organsko otapalo u mikroreaktoru ..... 24

4.4. Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru ..... 34

4.5. Biotransfromacija fenola u sustavima voda-organsko otapalo u mikrorekatoru ..... 35

**5. ZAKLJUČCI ..... 39**

**6. LITERATURA ..... 40**

**7. PRILOZI ..... 42**

**ŽIVOTOPIS**

# 1. UVOD

Smanjenje dimenzija konvencionalnog reaktorskog sustava za nekoliko redova veličine na mikro razinu pokazalo je brojne prednosti. Kod provođenja reakcija u mikroreaktorima dolazi do intenzivnog prijenosa tvari i energije što za posljedicu ima veće konverzije i nastajanje manje količine sporednih produkata u odnosu na konvencionalne makrosustave.[1] Zbog navedenih prednosti mikroreaktori imaju široku primjenu, od kemijske industrije do biotehnologije. U posljednjih desetak godina sve je intenzivnija primjena mikroreaktora za provedbu biotransformacija. Kemijske reakcije katalizirane klasičnim kemijskim katalizatorima su obično nespecifične, tijekom njihove provedbe u pravilu se odvijaju i sporedne reakcije, a uobičajeno je korištenje za okoliš štetnih kemikalija. Nasuprot tome enzimi su kao katalizatori specifični, biorazgradivi su, a reakcije koje kataliziraju se provode u blažim uvjetima. U procesima biotransformacija u mikoreaktorima enzimi se mogu koristiti u suspendiranom i/ili imobiliziranom obliku. Izbor enzima ovisi o vrsti reakcije koja se želi provoditi, a posebno su zanimljivi enzimi koji nisi specifični za pojedini supstrat. U tu skupinu enzima spadaju i lakaze koje imaju sposobnost oksidiranja različitih supstrata iz skupine fenolnih spojeva.

U ovom radu provedena je biotransformacija fenola lakazom porijeklom iz *Trametes versicolor* u sustavima voda-organsko otapalo (diklormetan, heksan i toulen) u mikroreaktoru. Provedena je analiza profila strujanja za tri sustava voda - organsko otapalo u mikroreaktoru pri različitim protocima i omjerima protoka vodene i organske faze. Ispitana je stabilnost enzima lakaze u izabranim sustavima voda-organsko otapalo, procjenjeni su parametri Michaelis-Menteničinog kinetičkog modela te su u svrhu ocjene postavljenog matematičkog modela procesa provedeni pokusi biotransformacije fenola u šaržnom reaktoru i u mikroreaktoru.

# 2. OPĆI DIO

## 2.1. Mikroreaktori

Mikroreaktori su obično definirani kao reakcijski sustavi koji su barem djelomično ili u cijelosti proizvedeni primjenom mikrotehnologije i preciznog inženjerstva. Osnovna strukturna jedinica mikroreaktora je mikrokanal tipičnih dimenzija 10 μm – 500 μm$^2$, odnosno dimenzija ispod 1 mm.[3]

Smanjenjem dimenzija za nekoliko redova veličine u odnosu na postojeće makrosustave dolazi do bolje izmjene tvari i energije tijekom reakcije što značajno doprinosi povećanju učinkovitosti, produktivnosti i sigurnosti procesa. Zbog velikog omjera međufazne površine prema volumenu mikroreaktora prijenos topline je učinkovit, pa su mikroreaktori pogodni za provedbu izrazito egzotermnih/endotermnih reakcija te čak i inače eksplozivnih reakcija. Također, temperatura se u mikroreaktorima može precizno kontrolirati. Male dimenzije osnovne strukturne jedinice mikroreaktora – mikrokanala smanjuju otpor prijenosu tvari i topline. Manji su također i koncentracijski i temperaturni gradijenti kakvi postoje u konvencionalnim reaktorima, koji su odgovorni za nastajanje sporednih produkata, smanjenje produktivnosti procesa, trovanje katalizatora, nastajanje lokalnih područja s povišenom temperaturom i slično.[1]

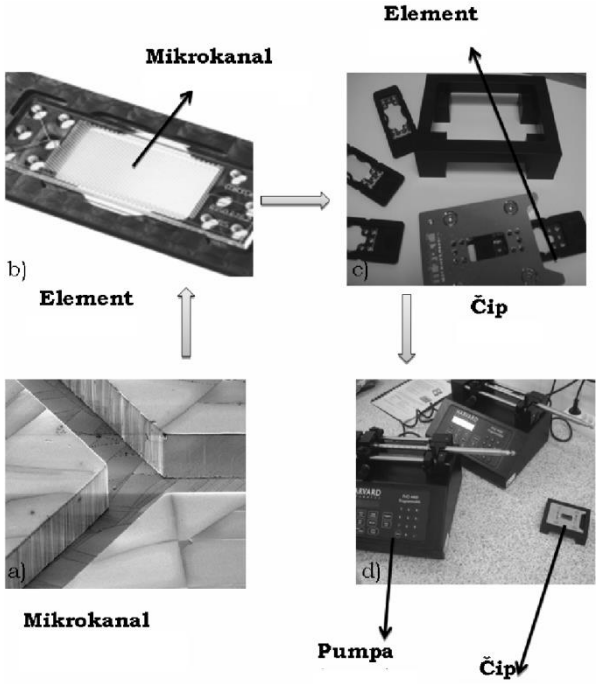
Najveća motivacija za upotrebu mikroreaktora je povećanje dosega reakcija i sigurnost provedbe procesa. Zbog upotrebe malih količina kemikalija i intenzivnog prijenosa tvari i energije mikrosustavi su posebno pogodni za reakcije u kojima se koriste izrazito zapaljivi ili toksični reaktanti.

Upotreba mikroreaktora u većem mjerilu se jednostavno provodi povećanjem broja strukturnih jedinica (eng. *numbering-up*) koje je znatno jednostavnije od skupog, dugotrajnog i često kompliciranog klasičnog uvećanja procesa (eng. *scale-up*).

### 2.1.1. Struktura, izvedba i podjela mikroreaktora

Konstrukcija mikroreaktorskog sustava izvedena je prema hijerarhijskom načelu, veće jedinice su sastavljene od manjih podjedinica.[3] Najmanja i osnovna jedinica mikroreaktora je mikrokanal. Mikrokanal može biti pravokutnog ili kružnog poprečnog presjeka. Mikrokanali se urezuje u pogodan materijal, najčešće staklo, zbog njegove dobre kemijske otpornosti te zbog mogućnosti vizualnog praćenja procesa. Mikrokanal se može izvesti i u mnogim drugim materijalima poput keramike, nehrđajućeg čelika, silicija, polimernih materijala. Svaki od njih ima različita svojstva što uključuje različite metode i cijenu izrade mikrokanala, različite

izdržljivosti s obzirom na temperaturu, tlak, kemijsku stabilnost i toplinsku vodljivost.[4] Mikrokanal urezan u noseći materijal se naziva element. Elementi mikroreaktora mogu biti izvedeni s nekoliko ulaznih/izlaznih procesnih tokova koji se spajaju/razdvajaju u zajedničke/odvojene tokove pomoću "Y" ili "T"-spojnica. Element sastavljen od mikrokanala ne može funkcionirati bez cjevčica za dovod i odvod procesnih struja pa se element stavlja u kućište opremljeno s otvorima koji omogućuju spajanje kapilarnih cjevčica sa samim mikrokanalom. Kućište omogućava jednostavno i sigurno spajanje elemenata s pumpama za dovod fluida i detektorima te spajanje dvaju ili više elemenata serijski ili paralelno. Element mikroreaktora ugrađen u kućište često se naziva i mikroreaktorski čip (slika 1).



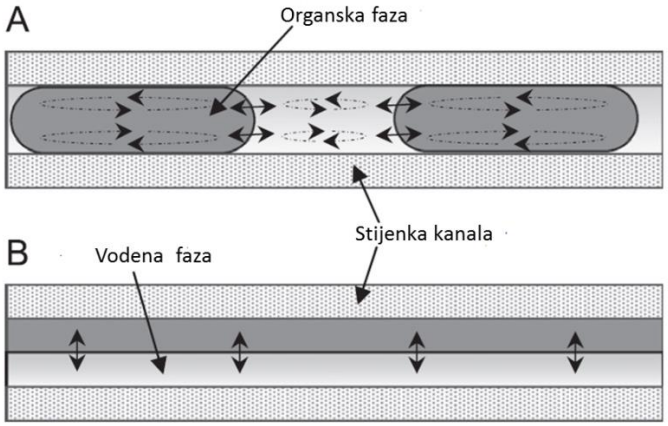

**Slika 1.** Osnovne strukturne jedinice mikroreaktorskog sustava.[1]

S obzirom na procese koji se odvijaju u mikroreaktoru, mikroreaktore možemo podijeliti na one kojima se provode kemijske reakcije i one u kojima se provode biokemijske reakcije. Bez obzira na specifičnosti kemijskih i biokemijskih reakcija mnogi mikroreaktori mogu se primijeniti u oba slučaja. Mikroreaktori u kojima se provode biokemijske reakcije mogu se podijeliti u tri skupine: oni koji služe za kvalitativno i kvantitativno određivanje komponenata kompleksnih struktura npr. proteina i glukoze. U drugu skupinu spadaju mikoreaktori koji služe za procjenu kinetičkih parametara enzimskih procesa, a u treću oni za provedbu enzimski kataliziranih sinteza.[1]

### 2.1.2. Strujanje u mikrokanalu u sustavu voda-organsko otapalo

Dobro razumijevanje hidrodinamike u višefaznim sustavima vrlo je važno jer različiti oblici strujanja utječu na prijenos tvari, a samim time direktno na konverziju i selektivnost kemijske reakcije.[5]

Osnovni oblici strujanja u mikrokanalima mikroreaktora u sustavu dviju kapljevina koje se miješaju su segmentirano i paralelno strujanje. Kod segmentiranog oblika strujanja prisutna su dva mehanizma prijenosa tvari (i) unutarnja cirkulacija unutar svakog segmenta i (ii) difuzija na granici faza između svakog segmenta zbog razlike u koncentraciji. Kod paralelnog oblika strujanja pretpostavlja se da do prijenosa tvari između faza dolazi isključivo difuzijom (slika 2).[6]




**Slika 2**. Oblici strujanja u mikrokanalu u sustavu kapljevina-kapljevina: (A) segmentirano strujanje, (B) paralelno strujanje.[6]

Oblik strujanja koja će se razviti u mikrokanalu zavisi o mnogo faktora; srednjoj prividnoj linearnoj brzini strujanja pojedine faze, omjeru brzina protjecanja pojedine faze, svojstvima kapljevina, geometriji te materijalu od kojeg je izrađen mikrokanal.[5] Najvažnije sile koje opisuju profile strujanje u sustavu kapljevina-kapljevina najjednostavnije se analiziraju stavljanjem u omjere preko bezdimenzijskih značajki (tablica 1).

**Tablica 1**. Bezdimenzijske značajke i njihovo značenje

| Bezdimenzijska značajka | Značenje |
|---|---|
| Reynoldsova značajka $\mathrm{Re} = \frac{v \cdot \rho \cdot d}{\mu}$ | omjer inercijske i viskozne sile |
| Kapilarni broj $\mathrm{Ca} = \frac{v \cdot \mu}{\sigma}$ | omjer viskozne sile i površinske napetosti |
| Weberova značajka $\mathrm{We} = \frac{v^2 \cdot \rho \cdot d}{\sigma}$ | omjer unutarnje sile i površinske napetosti |
| Fourierova značajka $\mathrm{Fo} = \frac{t \cdot D}{r^2}$ | omjer realnog vremena i vremena potrebnog za postizanje stacionarnog stanja |
| Pecletova značajka $Pe = \frac{d^2 \cdot v}{D \cdot L}$ | omjer prijenosa tvari konvekcijom i molekularnom difuzijom |

### 2.1.3. Biotransformacije u mikroreaktorima

Prethodno navedene prednosti mikroreaktora (npr. veliki omjer površine i volumena, primjena malih količina reaktanata i katalizatora, kratko vrijeme zadržavanja tvari u reaktoru, itd.) doprinose njihovoj primjeni u biotransformacijama. U različitim biotransformacijskim procesima zabilježene su prednosti primjenom mikroreaktora: povećanje konverzije za nekoliko puta u odnosu na reakciju provedenu u kotlastom reaktoru, jednostavna separacija faza na izlazu iz mikroreaktora te mala količina enzima i supstrata potrebna za provođenje jednog eksperimenta.[7]

Jedna od prvih biotransformacija provedenih u mikroreaktoru u dvofaznom sustavu bila je razgradnja *p*-klorfenola pomoću enzima lakaze. Lakaza je u ovom rekacijskom sustavu bila suspendirana u vodenom mediju, dok je *p*-klorfenol bio otopljen u organskoj fazi.[8] Provedene su također i biotransformacije drugih fenolnih spojeva (npr. katehola i L-DOPA-e) primjenom enzima lakaze.[9] Osim ovog sustava u literaturi postoje i drugi primjeri primjene mikroreaktora za provedbu biotransformacija kao što su primjerice sinteza izopentilacetata pomoću suspendirane lipaze[10] te polimerizacija $\varepsilon$-kaprolaktona u polikaprolakton katalizirana imobiliziranom lipazom.[11]

Kako bi precizno opisali enzimsku biotransformaciju potrebno je definirati kinetiku procesa. Za procese koji se provode u makroreaktorima, kinetika reakcija se određuje metodom početnih brzina. No primjena te metode nije uvijek moguća; npr. kinetiku brze reakcije hidrogeniranja je često teško proučavati u kotlastom reaktoru zbog sporog prijenosa tvari koji je posljedica geometrijskih karakteristika ovog sustava i značajnog utjecaja difuzije na ukupnu brzinu reakcije. Upotrebom mikroreaktora za provedbu takvih reakcija povećava se brzina prijenosa tvari što može osigurati da ukupnu brzinu reakcije određuje samo kinetika procesa odnosno da se zbog smanjenog utjecaja difuzije na ukupnu brzinu reakcije mogu odrediti prave vrijednosti kinetičkih parametra reakcijskog sustava.[12]

## 2.2. Lakaze

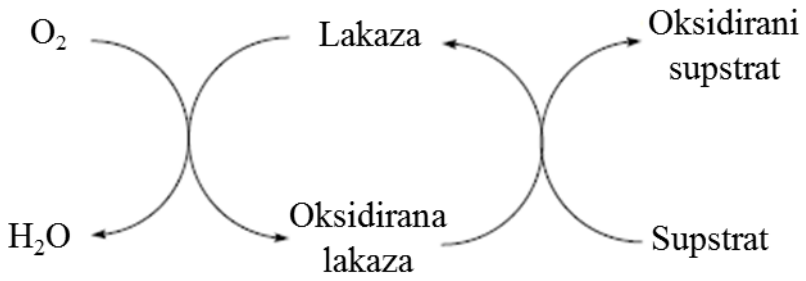
Lakaze su jedna od rijetkih skupina enzima proučavanih već krajem 19. stoljeća. Široko su rasprostranjene među višim biljkama i gljivama, a također su pronađene i u bakterijama i insektima. Sudjeluju u mnogim biološkim procesima, kao što su razgradnja prirodnih polimera poput lignina te procesi lignifikacije kod zacjeljenja kore drveta.

Lakaze su postale zanimljive u zadnjih nekoliko desetljeća zbog sposobnosti oksidiranja različitih supstrata posebice fenolnih spojeva. Konvencionalne tehnologije oksidacije su nespecifične i karakterizirane odvijanjem sporednih reakcija te upotrebom za okoliš štetnih kemikalija. Oksidacije pomoću enzima imaju bitne prednosti; enzimi su specifični i biorazgradivi, a same rekcije su provode u blažim uvjetima. Stoga se lakaze upotrebljavaju u obradi industrijskih otpadnih voda papirne, tekstilne i petrokemijske industrije, bioremedijaciji onečišćenog tla te stabilizaciji vina i pića. Lakaze se također primjenjuju kao katalizatori u proizvodnji protutumorskih lijekova te sastojaka kozmetičkih proizvoda. Također nalaze svoju primjenu u sintezi polimera te u razvoju biosenzora.[13]

### 2.2.1. Struktura i mehanizam djelovanja lakaza

Molekule lakaze kao aktivni holoenzimski oblik su dimeri ili tetrameri glikoproteina. Monomer lakaze obično sadrži četiri atoma bakra koja svrstavamo u tri tipa prema njihovim karakteristikama u UV/VIS spektroskopiji i elektron-paramagnetskoj rezonantnoj spektroskopiji. Molekularna masa monomera kreće se od 50 do 100 kDa. Izoelektrična točkom monomera je kod pH-vrijednosti 4,0. Reakcije koje kataliziraju lakaze odvijaju se mehanizmom monoelektronske oksidacije molekule supstrata u odgovarajući reaktivni radikal. Atomi bakra imaju glavnu ulogu u katalitičkom mehanizmu. Bakar tipa I se reducira

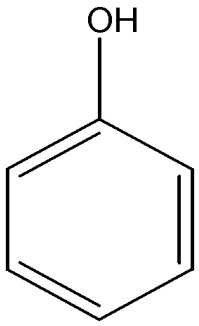
supstratom koji se oksidira. Elektron se odmah prenosi s bakra tipa I na bakar tipa II te na bakar tipa III pri čemu dolazi do redukcije kisika u molekulu vode. Lakaza koristi kisik kao akceptor elektrona kako bi odvojila proton s hidroksilne skupine fenola (slika 3).[14]




**Slika 3**. Mehanizam djelovanja lakaze

## 2.3. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi ili fenoli čine skupinu aromatskih organskih spojeva sastavljenih od aromatskog ugljikovodičnog prstena na koji je vezana jedna ili više hidroksilnih skupina. Fenolni spojevi su široko upotrebljavani u mnogim industrijama, pri proizvodnji pesticida, lijekova, guma, boja i plastika. Fenolni spojevi poput fenola (slika 4) i *p*-metilfenola mogu nastati prirodnim procesima prilikom razgradnje organskih tvari, a biljke i gljive mogu sintetizirati klorirane fenole.[15]




**Slika 4.** Strukturna formula fenola

Fenol se koristi u proizvodnji epoksidnih smola i najlona, ljepila, boja, tinta i guma te farmceutskih proizvoda. U kontakt s fenolom dolazi se najviše prilikom pušenja duhanskih proizvoda, udisanja zraka onečišćenog enolom te u manjoj mjeri prilikom konzumiranja dimljene hrane. Zbog antiseptičkog djelovanja fenol e u malim količinama koristi i u medicinske svrhe, a pritom nisu zabilježene nuspojave.[16]

Fenol je bezbojna kristalična tvar karakterističnog mirisa, topljiva u vodi i organskim otapalima. Osnovna fizikalna i kemijska svojstva fenola dana su u tablici 2.

**Tablica 2.** Svojstva fenola

| | |
|---|---|
| CAS broj | 108-95-2 |
| Molekulska formula | $C_6H_5O$ |
| Molarna masa | 94,11 g $mol^{-1}$ |
| Točka taljenja | 41 °C |
| Točka vrenja | 182 °C |
| Topljivost u vodi | 83 g $L^{-1}$ (na 25°C ) |

## 2.4. Michaelis-Menteničina enzimska kinetika

Michaelis-Menteničin kinetički model bazira se na sljedećem mehanizmu (jednadžba 1):

$$E + S \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_3} E + P \qquad [1]$$

Prvi korak ovog mehanizma je nastajanje enzim-supstrat kompleksa (ES), koji se može ponovno raspasti na enzim (E) i supstrat (S) ili može doći do prevođenja supstrata u produkt (P) pri čemu se enzim (E) ne mijenja. U mnogim laboratorijskim eksperimentima enzima ima daleko manje nego supstrata. U takvim uvjetima moguća je pretpostavka da je početna brzina nastajanja kompleksa jednaka brzini raspada kompleksa na produkt i enzim, odnosno da je koncentracija enzim-supstrat kompleksa konstantna (jednadžba 2):

$$k_1 \cdot [E] \cdot [S] = (k_2 + k_3) \cdot [ES] \qquad [2]$$

odnosno (jednadžba 3):

$$[E] \cdot [S] = \frac{(k_2 + k_3)}{k_1} \cdot [ES] = K_m \cdot [ES] \qquad [3]$$

Ukoliko se prethodna jednadžba uvrsti u bilancu tvari za koncentraciju slobodnog enzima ([E] = [$E_u$] – [ES]), dobiva se slijedeći izraz (jednadžba 4):

$$\frac{[\mathrm{ES}]}{[\mathrm{E_u}]} = \frac{\mathrm{S}}{K_m + \mathrm{S}} \qquad [4]$$

Maksimalna moguća brzina reakcije je postignuta kada je enzim maksimalno zasićen supstratom, odnosno kada je ukupna koncentracija enzima u obliku enzim-supstrat kompleksa, te je u tim uvjetima brzina reakcije dana jednadžbom 5:

$$v_{\max} = k_3 \cdot [\mathrm{E_u}] \qquad [5]$$

U ostalim uvjetima, odnosno kad enzim nije potpuno zasićen brzina reakcije je dana jednadžbom 6:

$$v = k_3 \cdot [\mathrm{ES}] \qquad [6]$$

iz čega proizlazi jednadžba 7:

$$\frac{[\mathrm{ES}]}{[\mathrm{E_u}]} = \frac{\mathrm{v}}{\mathrm{v_{max}}} \qquad [7]$$

Izjednačavanjem desnih strana jednadžbi 4 i 7 dobiva se Michaelis-Menteničina jednadžba (jednadžba 8):

$$v = v_{\max} \cdot \frac{\mathrm{S}}{K_m + \mathrm{S}} \qquad [8]$$

Kinetički parametri su maksimalna brzina reakcije $v_{\max}$ i konstanta zasićenja $K_m$.

Konstanta $K_m$ predstavlja odnos konstanti brzine nastajanja i razgradnje enzim-supstrat kompleksa (jednadžba 9).

$$K_m = \frac{k_3 + k_2}{k_1} \qquad [9]$$

U mnogim je slučajevima brzina razgradnje enzim-supstrat kompleksa na slobodni enzim i supstrat mnogo veća od konverzije u produkte ($k_2 >> k_3$) stoga u tom slučaju $K_m$ postaje jednak omjeru $k_2/k_3$ odnosno konstanti razlaganja kompleksa na enzim i supstrat. Stoga recipročna vrijednost $K_m$ ima blisku vezu s afinitetom vezanja supstrata za enzim. Naime, što je afinitet enzima prema supstratu veći to je $K_m$ manji i obrnuto.[17]

# 3. EKSPERIMENTALNI DIO

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Kemikalije

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- ABTS (2,2'-azino-di(3-etilbenztiazolon-6-sulfonska kiselina), Sigma Aldrich, Njemačka
- acetonitril, Mallinckrodt Baker B.V., Nizozemska
- diklormetan, Kemika, Hrvatska
- fenol, Fluka, SAD
- glicin, Sigma Aldrich, Njemačka
- heksan, Merck KGaA, Njemačka
- kalijev dihidrogenfosfat, Sigma Aldrich, Njemačka
- klorovodična kiselina 36,5%, Kemika, Hrvatska
- lakaza porijeklom iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* (0,82 U $mg^{-1}$), Sigma Aldrich, Njemačka
- natrijev hidrogenfosfat dihidrat, Kemika, Hrvatska
- natrijev hidroksid, T.T.T. d.o.o., Hrvatska
- natrijev klorid, Kemika, Hrvatska
- toluen, Kemika, Hrvatska
- trifluoroctena kiselina 90 %, Sigma Aldrich, Njemačka

Sve kemikalije korištene u ovom radu bile su p.a., a voda korištena za pripravu otopina bila je destilirana i redestilirana.

### 3.1.2. Puferi i otopine

- 0,2 mol $dm^{-3}$ fosfatni pufer, pH 6,6

Fosfatni pufer je pripremljen miješanjem vodenih otopina natrijevog hidrogenfosfat dihidrata (7,56 g u 100 $cm^3$ destilirane vode) i kalijevog dihidrogenfosfata (8,35 g u 100 $cm^3$ destilirane vode).

- 0,1 mol $dm^{-3}$ NaCl-glicin pufer, pH 4,5

NaCl-glicin pufer je pripremljen otapanjem 0,75 g glicina i 0,59 g natrijevog klorida u 100 $cm^3$ destilirane vode, a pH-vrijednost je podešena zakiseljavanjem s 1 mol $dm^{-3}$ otopinom klorovodične kiseline na pH 4,5.

- otopine fenola

  Otopine fenola različitih koncentracija pripremljene su otapanjem fenola u odabranim organskim otaplima.

- suspenzije enzima lakaze

  Suspenzije enzima lakaze pripremljene su resuspendiranjem enzima lakaze u 0,2 mol $dm^{-3}$ fosfatnom puferu, pH 6,6. Suspenzija enzima lakaze je prije uporabe termostatirana na 25 °C kroz 10 minuta.

- mobilna faza za HPLC

  Otopina A: 1000 $cm^3$ redestilirane vode
  1 $cm^3$ triflouroctene kiseline

  Otopina B: 200 $cm^3$ redestilirane vode
  800 $cm^3$ acetonitrila
  0,95 $cm^3$ triflouroctene kiseline

  Otopina A i otopina B miješane su u volumnom omjeru 66 : 34.

- otopina ABTS-a

  Otopina ABTS-a pripremljena je otapanjem 0,16 g ABTS-a u 100 $cm^3$ NaCl-glicin pufera, pH 4,5.

- 1 mol $dm^{-3}$ otopina natrijevog hidroksida

  Vodena otopina natrijevog hidroksida pripremljena je otapanjem 4 g NaOH u 100 $cm^3$ destilirane vode.

- 1 mol $dm^{-3}$ otopina klorovodične kiseline

  Vodena otopina klorovodične kiseline pripremljena je miješanjem 4,24 $cm^3$ 36,5 % HCl s 45,76 $cm^3$ destilirane vode.

### 3.1.3. Oprema, uređaji i programski paketi

U ovom radu korištena je slijedeća oprema, te slijedeći uređaji i programski paketi:

- filter (Chromafil Xtra, PA-20/25, Macherey – Nagel, Njemačka)
- kamera (Ednet Digital Microscope, Ednet,Njemačka )
- kapljevinski kromatograf visoke djelotvornosti (Shimadzu, Japan)
- klipne pumpe (PHD 4400 Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, SAD) klipovi za pumpe (8 mL, Harvard Apparatus, SAD)
- magnetska mješalica (Ika-Combing, Njemačka)
- Mathematica 10.0., Wolfram Research, SAD
- Microsoft Excel, Microsoft Corporation, SAD
- mikroreaktori (Micronit Microfluidics B.V., Nizozemska)
- pH metar (Lab 860, Schott Instruments Analytics, Njemačka)
- SigmaPlot 12.0, Systat Software Inc., SAD
- spektrofotometar (UV 1601, Shimazdu, Japan)
- program za kameru (Ednet Digital Microscope, Ednet,Njemačka)

## 3.2. Metode rada

### 3.2.1. Analitičke metode

#### *3.2.1.1. Mjerenje aktivnosti enzima lakaze*

Aktivnost enzima lakaze mjerena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda$ = 420 nm u kvarcnoj kiveti volumena $V$ = 1 cm$^3$. U kivetu je dodano 0,1 cm$^3$ uzorka enzima i 0,9 cm$^3$ otopine ABTS-a, prethodno termostatirane na temperaturi $T$ = 25 °C. Sva mjerenja su provođena u vremenu od $t$ = 60 s pri čemu su iz dobivene dinamičke promjene apsorbancije izračunavane volumne aktivnosti enzima lakaze prema jednadžbi 10:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon_{420} \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \qquad [10]$$

gdje su:

$V_r$ ukupni volumen uzorka u kiveti (cm$^3$),

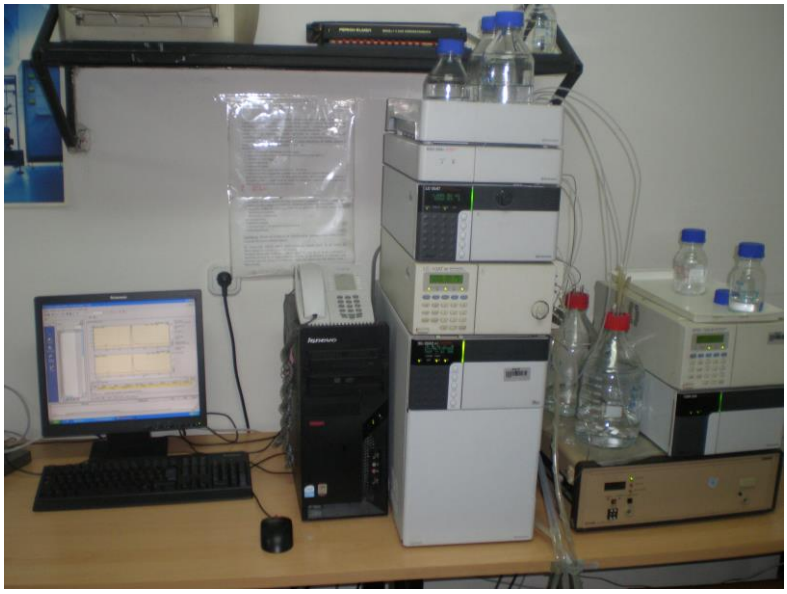
$V_E$ volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (cm$^3$),

$\varepsilon_{420}$ ekstincijski koeficijent ($\varepsilon_{420}$ = 0,036 dm$^3$ μmol$^{-1}$ cm$^{-1}$),

| | |
|---|---|
| $d$ | širina kivete ($d$ = 1 cm), |
| $\Delta A/\Delta t$ | promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) ($min^{-1}$), |
| *V.A.* | volumna aktivnost enzima (U $cm^{-3}$), pri čemu 1 U predstavlja jedinicu enzimske aktivnosti, odnosno onu aktivnost enzima koja je potrebna da se oksidira 1 μmol $dm^{-3}$ supstrata u minuti. |

### *3.2.1.2. Mjerenje koncentracije fenola*

Koncentracija fenola u svim pokusima mjerena je HPLC-om (slika 5) pri temperaturi $T$ = 30 °C na koloni s reverznom fazom $C_{18}$, dimenzija 250 mm · 4 mm · 5 μm (LiChrospher 5u RP-18 100 A, Phenomenex, SAD) pri valnoj duljini $\lambda$ = 280 nm. Vrijeme zadržavanja za fenol bilo je $\tau$ = 7,415 min, a primjer kromatograma dan je u Prilogu 1. Kao mobilna faza korištene su dvije otopine; otopina A i otopina B u omjeru 66 : 34 s ukupnim protokom 1 $cm^3$ $min^{-1}$.



**Slika 5.** HPLC korišten za određivanje koncentracije fenola

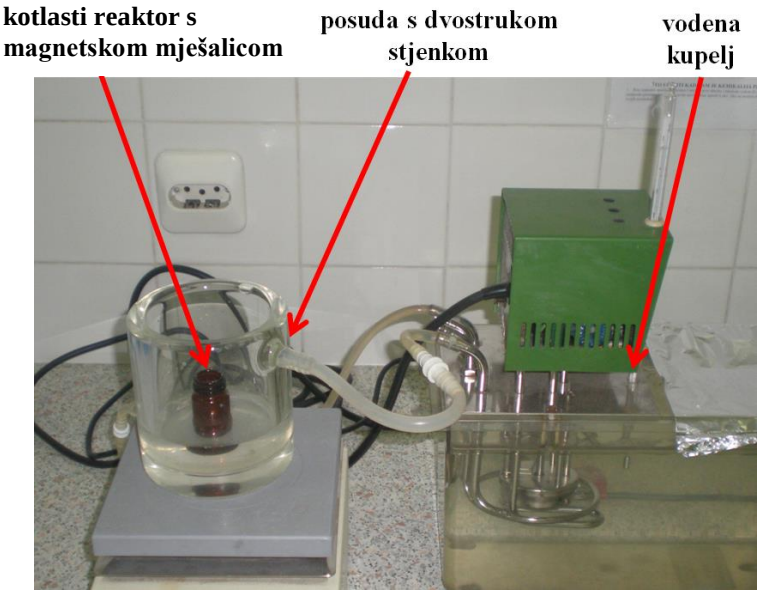
Otopina A pripremljena je miješanjem redestilirane vode i trifluoroctene kiseline, a otopina B miješanjem redestilirane vode, acetonitirila i trifluoroctene kiseline. Standardne otopine fenola poznatih koncentracija u odabranim organskim otapalima (diklormetan, heksan i toulen) pripravljene su miješanjem otopina fenola s natrijevol lužinom ($c_{NaOH}$ =1 mol $dm^{-3}$) u omjeru 1 : 1 u svrhu dobivanja baždarnog pravca (Prilozi 2-4). Prije analize na HPLC-u

uzorci su razrijeđeni 100 puta acetonitrilom i profiltrirani kroz filtar Chromafil Xtra, PA-20/25 (Macherey-Nagel, Njemačka).

### 3.2.2. Provedba mjerenja

#### *3.2.2.1. Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru*

Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo provedena je u kotlastom reaktoru. Korišten je stakleni kotlasti reaktor volumena $V$ = 15 $cm^3$ opremljen magnetskom miješalicom (slika 6).




**Slika 6**. Aparatura za provedbu pokusa u sustavima voda-organsko otapalo u šaržnom reaktoru

Svi eksperimenti su provedeni pri konstantnoj temperaturi od $T$ = 25 °C. Pripremljena je suspenzija enzima lakaze $\gamma_{lakaza}$ = 0,2 g $dm^{-3}$ u 0,2 mol $dm^{-3}$ fosfatnom puferu, pH 6,6. Suspenzija enzima lakaze ($V$ = 3 $cm^3$) dodana je u jednaki volumen diklormetana, heksana ili toulena te su reakcijske smijese miješane na magnetskoj miješalici pri brzini okretaja od 400 $min^{-1}$. U određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci iz svake od reakcijskih smjese te je mjerena aktivnost enzima lakaze.

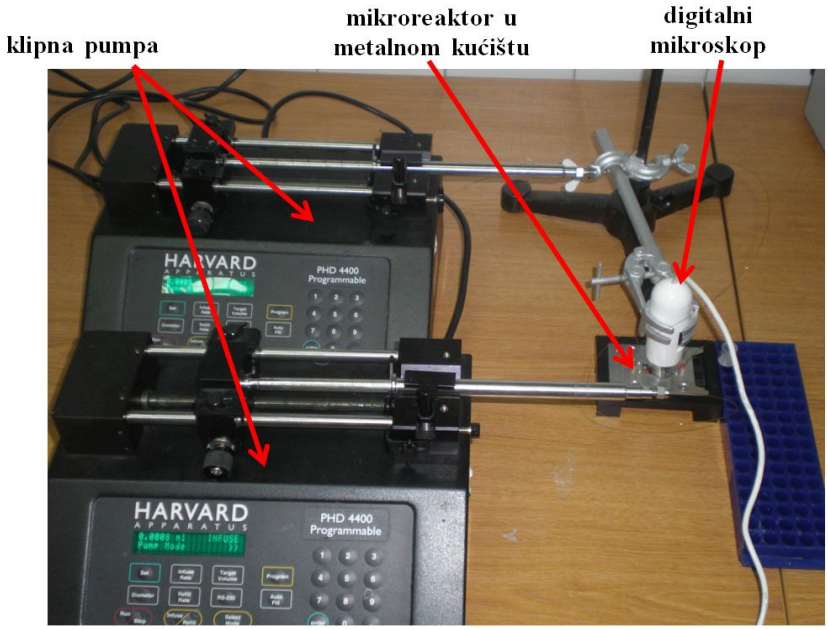
*3.2.2.2. Biotransformacija fenola u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru*

Biotransformacije fenola provedene su u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru bez kontinuirane aeracije. Korišten je stakleni kotlasti reaktor volumena $V$ = 15 $cm^3$ opremljen magnetskom miješalicom. Svi eksperimenti su provedeni pri konstantnoj temperaturi od $T$ = 25 °C (slika 6). Pripremljene su otopine fenola $c_{fenol}$ = 12 mmol $dm^{-3}$ u diklormetanu, heksanu i toulenu te suspenzija enzima lakaze $\gamma_{lakaza}$ = 0,2 g $dm^{-3}$ u 0,2 mol $dm^{-3}$ fosfatnom puferu, pH 6,6. Suspenzija enzima lakaze ($V$ = 3 $cm^3$) dodana je u jednaki volumen otopine fenola u odabranim organskih otapalima te su reakcijske smijese miješane na magnetskoj miješalici pri brzini okretaja od 400 $min^{-1}$. U određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci iz pojedine reakcijske smijese. Uzorci su sakupljani u kivete s otopinom natrijevog hidroksida koncentacije 1 mol $dm^{-3}$. Tako prikupljeni uzorci su homogenizirani na tresilici te razrijeđeni acetonitrilom, ponovno homogenizirani i profiltrirani kroz filter (Chromafil Xtra, PA-20/25, Macherey – Nagel, Njemačka). U na ovaj način pripremljenim uzorcima izmjerena je koncentracija fenola.

***3.2.2.3. Analiza profila strujanja u sustavu voda-organsko otapalo u mikroreaktoru***

Analiza profila strujanja provedena je u sustavima nastalim uvođenjem vode i organskog otapala (diklormetan, heksan i toulen) u stakleni mikroreaktor (Micronit Microfluidics B.V., Nizozemska). Upotrijebljen je mikrorekator s glatkim stjenkama opremljen s dva ulaza i dva izlaza „Y-oblika“. Dimenzije mikrokanala upotrijebljenog mikroreaktora bile su širina : visina : duljina = 250 μm : 50 μm : 330 mm, a ukupni volumen je bio $V$ = 4 $mm^3$. Kako bi se bolje razlikovale vodena i organska faza u vodenoj fazi je otopljen Coomassie Brilliant Blue G 250 čime se dobila otopina intenzivno plave boje.

Mikroreaktor je bio postavljen u metalno kućište kako bi se ulazi povezali s klipnim pumpama (PHD 4400 Syringe Pump Series, Harvard Apparatus, SAD) pomoću dovodnih cjevčica od silikata. Izlaz iz reaktora je također izveden pomoću silikatnih cijevčica čiji je spoj s mikroreaktorem izveden na isti način kao i ulaz. Pomoću digitalnog mikroskopa (Ednet Digital Microscope, Njemačka) promatrani su i fotografirani profili strujanja pri različitim ukupnim volumnim protocima te različitim omjerima protoka faza voda-organsko otapalo (1:1, 1:3, 3:1, 1:5 5:1, 1:7, 7:1) (slika 7).




**Slika 7**. Aparatura za provedbu pokusa u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru

### *3.2.2.4. Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru*

Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo (diklormetan, heksan i toulen) provedena je u mikroreaktoru prethodno opisane geometrije za omjer volumnih protoka voda-organsko otapalo 1:1, pri ukupnim protocima od $q_V$ = 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 i 400 $mm^3\ min^{-1}$. Pokusi su provedeni na način da je jedna jedna od faza koje su se uvodile bila suspenzija enzima lakaze $\gamma_{lakaza}$ = 0,2 g $dm^{-3}$ u 0,2 mol $dm^{-3}$ fosfatnom puferu, pH 6,6, dok je druga faza bila organsko otapalo (diklormetan, heksan ili toulen). Na izlazu iz reaktora uozci su sakupljani u plastične kivete držane na ledu. U sakupljenim uzorcima određivana je aktivnost enzima lakaze.

### *3.2.2.5. Biotransfromacija fenola u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru*

Provedena je biotransformacija fenola enzimom lakaza u sustavima voda-organsko otapalo (diklometan, heksan ili toulen) u mikrorekatoru prethodno opisane geometrije za omjer volumnih protoka voda-organsko otapalo 1:1, pri ukupnim protocima od $q_V$ = 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 i 400 $mm^3\ min^{-1}$. U mikrorekator su uvođene suspenzija enzima lakaze $\gamma_{lakaza}$ = 0,2 g $dm^{-3}$ u 0,2 mol $dm^{-3}$ fosfatnom puferu, pH 6,6 i otopine fenola u odabranim

organskim otapalima (diklormetanu, heksanu ili toulenu). Pokusi su provedeni s dvije različite ulazne koncentracije fenola $c_{u,fenol}$ = 3 i 6 mmol $dm^{-3}$. Uzorci su sakupljani u definiranim vremenskim intervalima u kivete s otopinom natrijevog hidroksida koncentacije 1 mol $dm^{-3}$. Ovako prikupljeni uzorci su homogenizirani na tresilici te razrijeđeni acetonitrilom, ponovno homogenizirani i profiltrirani kroz filter (Chromafil Xtra, PA-20/25, Macherey – Nagel, Njemačka). U tako pripremljenim uzorcima određena je koncentracija fenola.

### 3.2.3. Matematički model procesa biotransformacije fenola

#### *3.2.3.1. Matematički model procesa biotransformacije fenola u kotlastom reaktoru*

Biotransfromacija fenola u sustavu voda-organsko otapalo provedena u kotlastom reaktoru matematički je opisana postavljenjem bilance tvari za dinamičku promjenu koncentracije fenola tijekom vremena uz pretpostavku homogenog sustava (jednadžba 11). Matematički model procesa uzima u obzir pretpostavku da se kinetika reakcije može opisati Michaelis-Menteničinim izrazom (jednadžba 8):

$$\frac{dc_{\text{fenol}}}{dt} = -v_{\max} \cdot \frac{c_{\text{fenol}}}{K_m + c_{\text{fenol}}} \qquad [11]$$

Kinetički parametri Michaelis-Menteničine kinetike procijenjeni su na temelju dinamičke promjene koncentracije fenola u šaržnom reaktoru primjenom integralne metode (jednadžbe 12-17).

$$\frac{dc_{\text{fenol}}}{dt} = -v_{\max} \cdot \frac{c_{\text{fenol}}}{K_m + c_{\text{fenol}}} \qquad [12]$$

$$\frac{K_m + c_{\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}} \cdot dc_{\text{fenol}} = -v_{\max} \cdot dt \qquad [13]$$

$$K_m \cdot \frac{dc_{\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}} + dc_{\text{fenol}} = -v_{\max} \cdot dt \qquad [14]$$

$$K_m \cdot \int_{c_{0,\,fenol}}^{c_{\text{fenol}}} \frac{dc_{\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}} + \int_{c_{0,\text{fenol}}}^{c_{\text{fenol}}} dc_{\text{fenol}} = -v_{\max} \cdot \int_0^t dt \qquad [15]$$

$$K_m \cdot \ln\left(\frac{c_{0,\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}}\right) + \left(c_{0,\text{fenol}} - c_{\text{fenol}}\right) = v_{\max} \cdot t \qquad [16]$$

$$\frac{\left(c_{0,\text{fenol}} - c_{\text{fenol}}\right)}{t} = v_{\max} - K_m \cdot \frac{\ln\left(\frac{c_{0,\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}}\right)}{t} \qquad [17]$$

### *3.2.3.2. Matematički model procesa biotransformacije fenola u mikroreaktoru*

Biotransfromacija fenola u sustavu voda-organsko otapalo provedena u mikroreaktoru matematički je opisana postavljenjem bilance tvari za promjenu koncentracije fenola u idealnom cijevnom reaktoru u stacionarnom stanju uz pretpostavku homogenog sustava (jednadžba 18). Matematički model ovog procesa također uključuje pretpostavku da se kinetika reakcije može opisati Michaelis-Menteničinim izrazom (jednadžba 8):

$$\begin{aligned} \frac{dc_{\text{fenol}}}{dt} &= -u \cdot \frac{dc_{\text{fenol}}}{dx} - v_{\max} \cdot \frac{c_{\text{fenol}}}{K_m + c_{\text{fenol}}} = 0 \\ \frac{dc_{\text{fenol}}}{dx} &= -\frac{1}{u} \cdot v_{\max} \cdot \frac{c_{\text{fenol}}}{K_m + c_{\text{fenol}}} \end{aligned} \qquad [18]$$

Kinetički parametri Michaelis-Menteničine kinetike procijenjeni su na temelju promjene koncentracije fenola u mikroreaktoru pri različitim prividnim linearnim brzinama strujanja primjenom integralne metode (jednadžbe 19-24).

$$\frac{dc_{\text{fenol}}}{dx} = -\frac{1}{u} \cdot v_{\max} \cdot \frac{c_{\text{fenol}}}{K_m + c_{\text{fenol}}} \qquad [19]$$

$$\frac{K_m + c_{\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}} \cdot dc_{\text{fenol}} = -\frac{1}{u} \cdot v_{\max} \cdot dx \qquad [20]$$

$$K_m \cdot \frac{dc_{\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}} + dc_{\text{fenol}} = -\frac{1}{u} \cdot v_{\max} \cdot dx \qquad [21]$$

$$K_m \cdot \int_{c_{u,\text{fenol}}}^{c_{\text{fenol}}} \frac{dc_{\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}} + \int_{c_{u,\text{fenol}}}^{c_{\text{fenol}}} dc_{\text{fenol}} = -\frac{1}{u} \cdot v_{\max} \cdot \int_0^x dx \qquad [22]$$

$$K_m \cdot \ln\left(\frac{c_{u,\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}}\right) + \left(c_{u,\text{fenol}} - c_{\text{fenol}}\right) = \frac{1}{u} \cdot v_{\max} \cdot x \qquad [23]$$

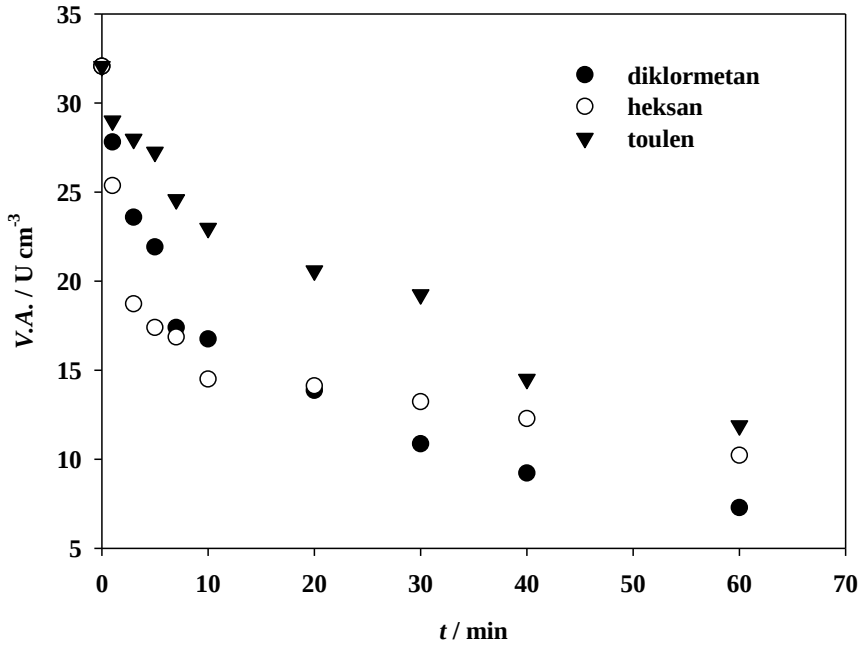
$$u \cdot \frac{\left(c_{0,\text{fenol}} - c_{\text{fenol}}\right)}{x} = v_{\max} - K_m \cdot \frac{u \cdot \ln\left(\frac{c_{0,\text{fenol}}}{c_{\text{fenol}}}\right)}{x} \qquad [24]$$

# 4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je biotransformacija fenola lakazom iz *Trametes versicolor* u tri sustava voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru te u mikroreaktoru. Provedena je analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo te su procijenjeni kinetički parametri modela za opis procesa biotransformacije za oba reaktorska sustava. Također provedena je analiza profila strujanja pri različitim volumnim protocima i omjerima uvođenja vode i organskog otapala u mikroreaktoru.

## 4.1. Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru

Provedeni su pokusi u kojima se pratila dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru volumena $V$ = 15 $cm^3$ pri konstantnoj temperaturi, $T$ = 25 °C. Suspenzija enzima lakaze ($V$ = 3 $cm^3$, $\gamma_{lakaza}$ = 0,2 g $dm^{-3}$ suspendirana u 0,2 mol $dm^{-3}$ fosfatnom puferu, pH 6,6) dodana je u jednaki volumen diklormetana, heksana ili toulena te su reakcijske smijese miješane na magnetskoj miješalici. U određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci iz pojedine reakcijske smijese te je mjerena aktivnost enzima lakaze. Dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u sva tri sustava voda-organsko otapalo prikazana je na slici 8.




**Slika 8.** Dinamička promjena aktivnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru

Početna aktivnost enzima lakaze u sva tri sustava voda organsko otapalo iznosila je *V.A.* = 32,06 U $cm^{-3}$. Pokusi su provođeni tijekom 60 min. Pad aktivnosti enzima lakaze uočen je već nakon prve minute provedbe pokusa u sva tri ispitivana sustava. Najveći pad aktivnosti enzima lakaze nakon prve minute provedbe pokusa određen je u sustavu voda-heksan, dok je nakon istog vremena provedbe pokusa najmanji pad aktivnosti enzima izmjeren u sustavu voda-toulen. Isti trend može se uočiti tijekom cijelog vremena provedbe pokusa; aktivnost enzima lakaze najsporije pada u sustavu voda-toulen. U slučaju sustava voda-diklormetan i sustava voda-heksan, prvih sedam minuta provedbe pokusa aktivnost enzima lakaze brže pada u sustavu voda-heksan, no nakon tog vremena promjena aktivnosti enzima lakaze u oba sustava je približno jednaka. Na kraju provedbe pokusa aktivnost enzima lakaze smanjila se u sustavu voda-diklormetan na 22,7 % početne vrijednosti ($V.A._{\text{voda-diklormetan}}$ = 7,28 U $cm^{-3}$), u sustavu voda-heksan na 31,9 % početne vrijednosti ($V.A._{\text{voda-heksan}}$ = 10,22 U $cm^{-3}$) te u sustavu voda-toluen na 37,1 % početne vrijednosti ($V.A._{\text{voda-toulen}}$ = 11,89 U $cm^{-3}$). Dobiveni rezultati upućuju na vremenski ograničenu mogućnost primjene enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u svrhu provedbe biotransformacije fenola što je vjerojatno posljedica negativnog utjecaja korištenih organskih otapala na enzim lakazu.

## 4.2. Biotransformacija fenola u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru

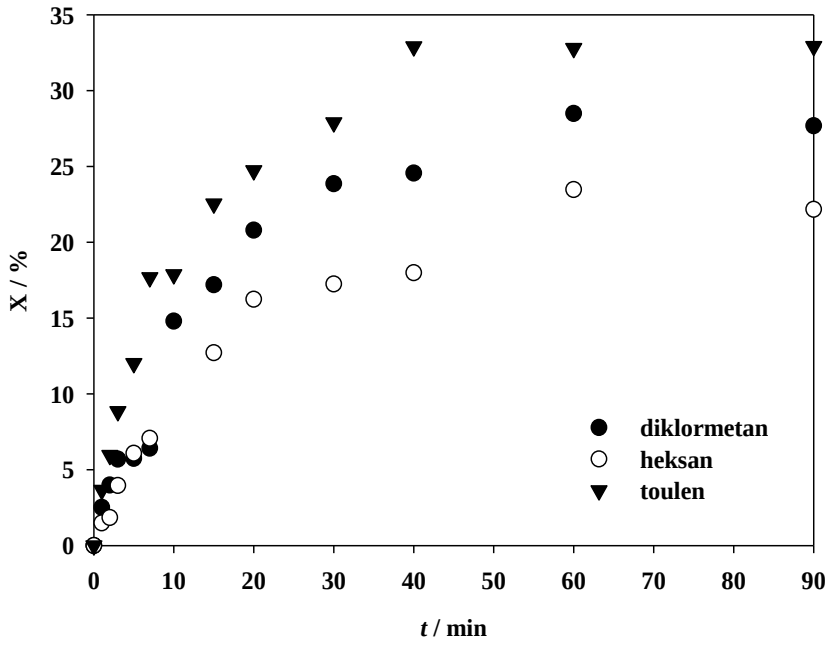
U kotlastom reaktoru volumena $V$ = 15 $cm^3$ pri konstantnoj temperaturi, $T$ = 25 °C provedeni su pokusi biotransformacije fenola katalizirani lakazom porijeklom iz *Trametes versicolor* u tri sustava voda-organsko otapalo (diklormetan, heksan i toulen). Početna koncentracija fenola iznosila je $c_{0,fenol}$ = 6 mmol $dm^{-3}$ dok je početna koncentracija enzima lakaze bila $\gamma_{lakaza}$ = 0,2 g $dm^{-3}$ (0,2 mol $dm^{-3}$ fosfatni pufer, pH 6,6). U prethodno definiranim vremenskim intervalima, uzimani su uzorci reakcijske smijese u kojima je određivana koncentracija fenola.

Na temelju dinamičke promjene koncentracije fenola tijekom provedbe pokusa za sva tri sustava voda-organsko otapalo procijenjene su vrijednosti kinetičkih parametra Michaelis-Menteničinog kinetičkog modela primjenom integralne metoda. Metoda se temelji na bilanci tvari za dinamičku promjenu koncentracije fenola u kotlastom reaktoru te integriranja na ovaj način postavljene bilance (jednadžbe 11-17). Bilanca tvari (jednadžba 11) jednostavno se integrira i prevodi u linearni oblik (jednadžba 17) pomoću kojeg su određene vrijednosti kinetičkih parametra Michaelis-Menteničine kinetike. Procijenjene vrijednosti parametra ($K_m$ i $v_{max}$) za sva tri sustava prikazane su u tablici 3. Iz rezultata je vidljivo da je maksimalna brzina reakcije, $v_{max}$ biotransformacije fenola enzimom lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* najveća u sustavu voda-toulen i iznosi $v_{max}$ = 0,330 U $mg^{-1}$, dok je najmanja u sustavu voda-heksan i iznosi $v_{max}$ = 0,135 U $mg^{-1}$. Ovo je i očekivano jer je enzim lakaza upravo u sustavu voda-toluen izgubio najmanje od svoje početne aktivnosti. Procijenjene vrijednosti konstanti zasićenja, $K_m$ su približno slične u sustavima voda-diklormetan i voda-heksan. Najmanja vrijednost konstante zasićenja je procijenjena u sustavu voda-toulen što upućuje na zaključak da enzim lakaza ima najveći afinitet prema fenolu kao supstratu upravo u ovom sustavu.

**Tablica 3**. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametra Michaelis-Menteničine kinetike u procesu biotransformacije fenola enzimom lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* u kotlastom reaktoru u sustavu voda-organsko otapalo primjenom integralne metode procjene parametra

| Organsko otapalo | $K_m$ (mmol dm$^{-3}$) | $v_{max}$ (U mg$^{-1}$) |
|---|---|---|
| diklormetan | 4,888 ± 0,891 | 0,225 ± 0,112 |
| heksan | 4,874 ± 1,001 | 0,135 ± 0,110 |
| toulen | 4,254 ± 1,100 | 0,330 ± 0,098 |

Rezultati dinamičke promjene konverzije fenola prikazani su na slici 9. Iz rezultata je vidljivo da konverzija fenola raste tijekom prvih 40 minuta pokusa u sva tri sustava voda-organsko otapalo. Nakon 40 minuta konverzija poprima približno konstantnu vrijednost u sva tri ispitivana sustava. Najbrži porast konverzije izračunat je za sustav voda-toulen. U prvih 10 minuta provedbe pokusa vrijednosti konverzije fenola u sustavu voda-diklormetan i voda-heksan su približno jednake. No nakon toga vremena pa do kraja provedbe pokusa, više vrijednosti konverzije fenola dobivene su u sustavu voda-diklormetan. Maksimalne konverzije postignute u pojedinim sustavima su: $X_{\text{voda-diklormetan}}$ = 28,49 %, $X_{\text{voda-heksan}}$ = 23,46 % i $X_{\text{voda-toulen}}$ = 32,79 %.




**Slika 9**. Dinamička promjena konverzije u sustavima voda-organsko otapalo u kotlastom reaktoru

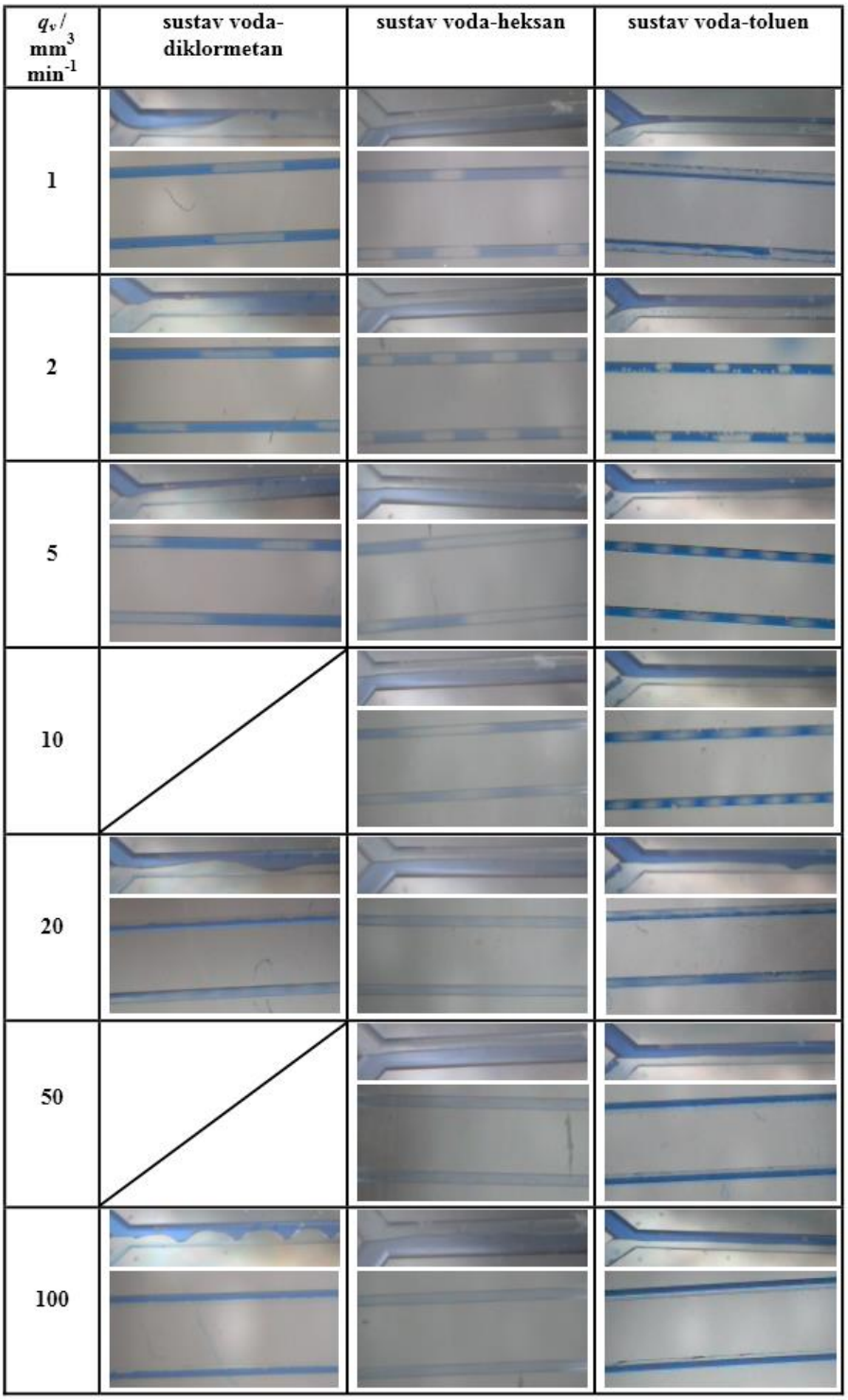
## 4.3. Analiza profila strujanja sustava voda-organsko otapalo u mikroreaktoru

Analiza profila strujanja u mikroreaktoru provedena je u tri sustava voda-organsko otapalo (diklormetan, heksan i toluen). U svim pokusima vodena faza je obojena plavo dok je organska faza bila bezbojna. Pokusi su provedeni pri različitim omjerima protoka obiju faza (1:1, 1:3, 3:1, 1:5 5:1, 1:7, 7:1) u rasponu ukupnih protoka od $q_V = 1 - 200$ mm$^3$ min$^{-1}$. Profili strujanja su fotografirani na ulazu u reaktor te na sredini mikroreaktora i prikazani su na slikama 10-16.

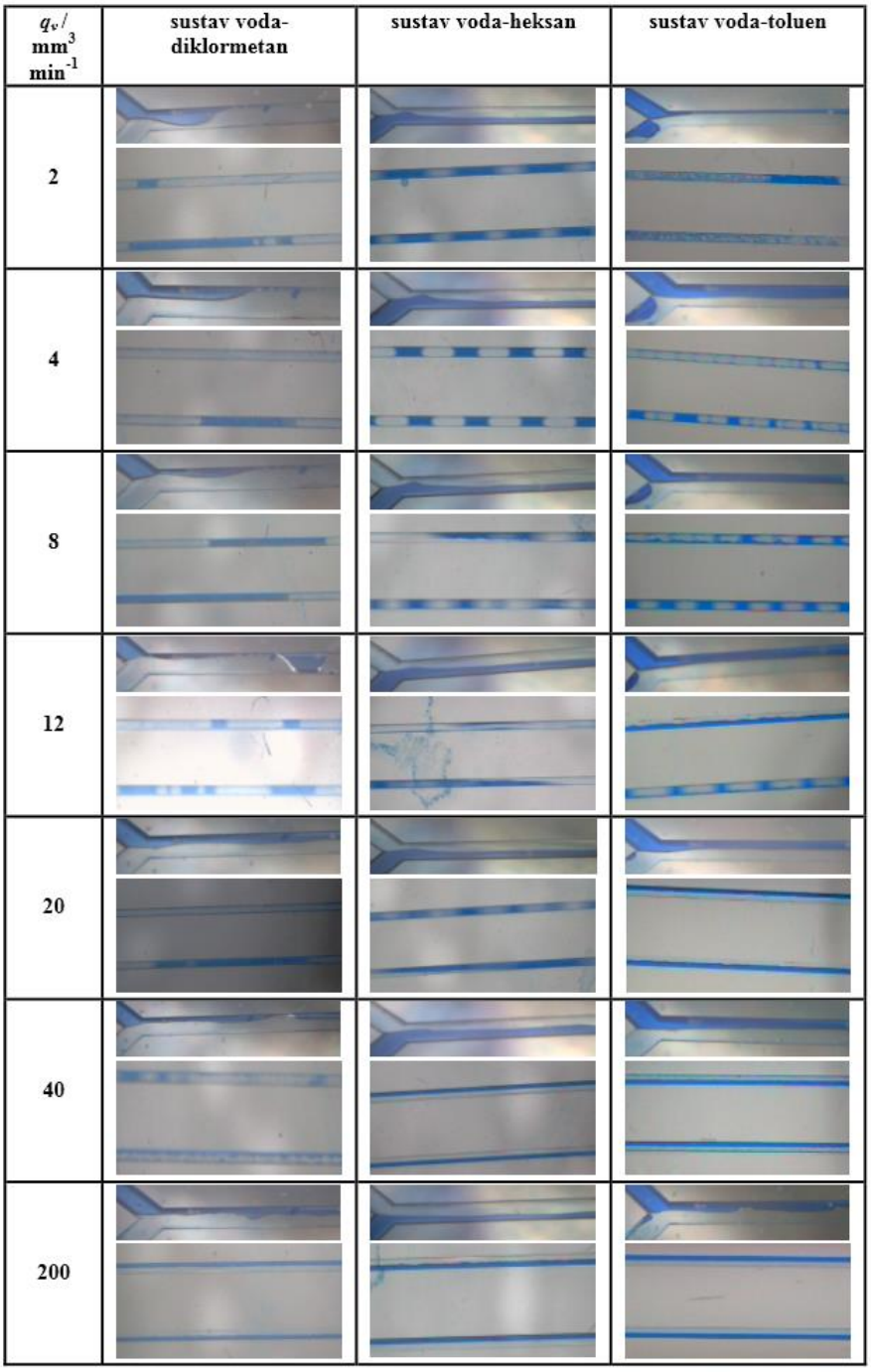
Analizom fotografija profila strujanja za sva tri sustava voda-organsko otapalo uočeno je da se ovisno o omjerima protjecanja dviju faza razvijaju segmentirano ili paralelno strujanje. Segmentirani profil strujanja uočen je kod malih ukupnih protoka bez obzira na omjere protoka faza.

Paralelni profil strujanja je uočen kod velikih ukupnih protoka, ali ne i za sve omjere protoka faza. Uočeno je da se paralelni profil strujanja razvija kada vodena faza struji brže od organske. Omjer protoka 1:7 za sve sustave voda-organsko otapalo rezultirao je paralelnim stabilnim strujanjem u mikroreaktoru.

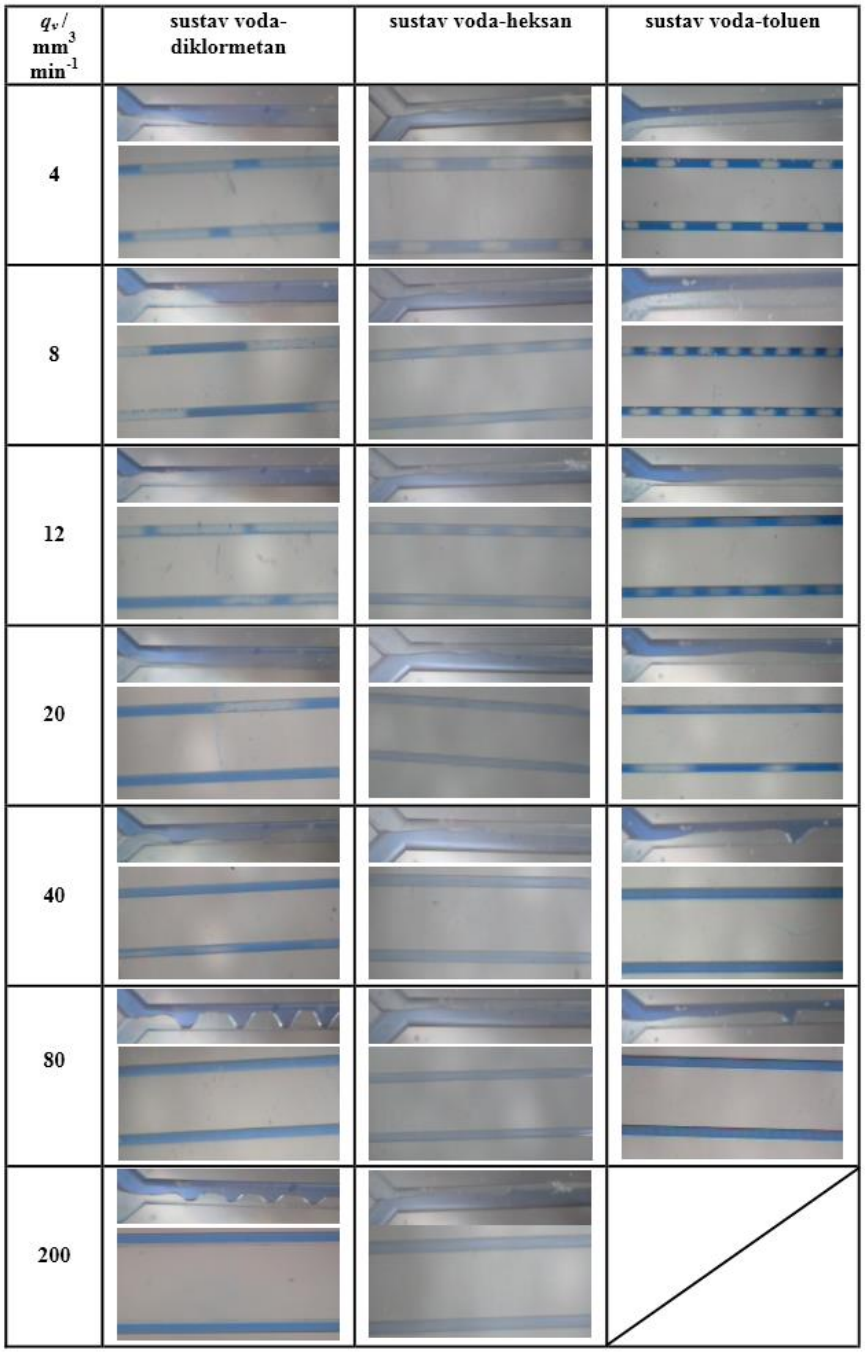
Pri velikim ukupnim protocima, stabilan profil strujanja se uspostavlja veoma brzo nakon uvođenja obiju faza u mikroreaktor. Kod malih ukupnih protoka i velikih omjera protoka faza teško se uspostavlja stabilan profil strujanja; pri ovim uvjetima provedbe procesa karakterističan je prijelazni profil strujanja. Uočeno je također da pri velikim ukupnim protocima segmente pojedine faze više nije moguće razlikovati pod mikroskopom jer dolazi do miješanja faza.



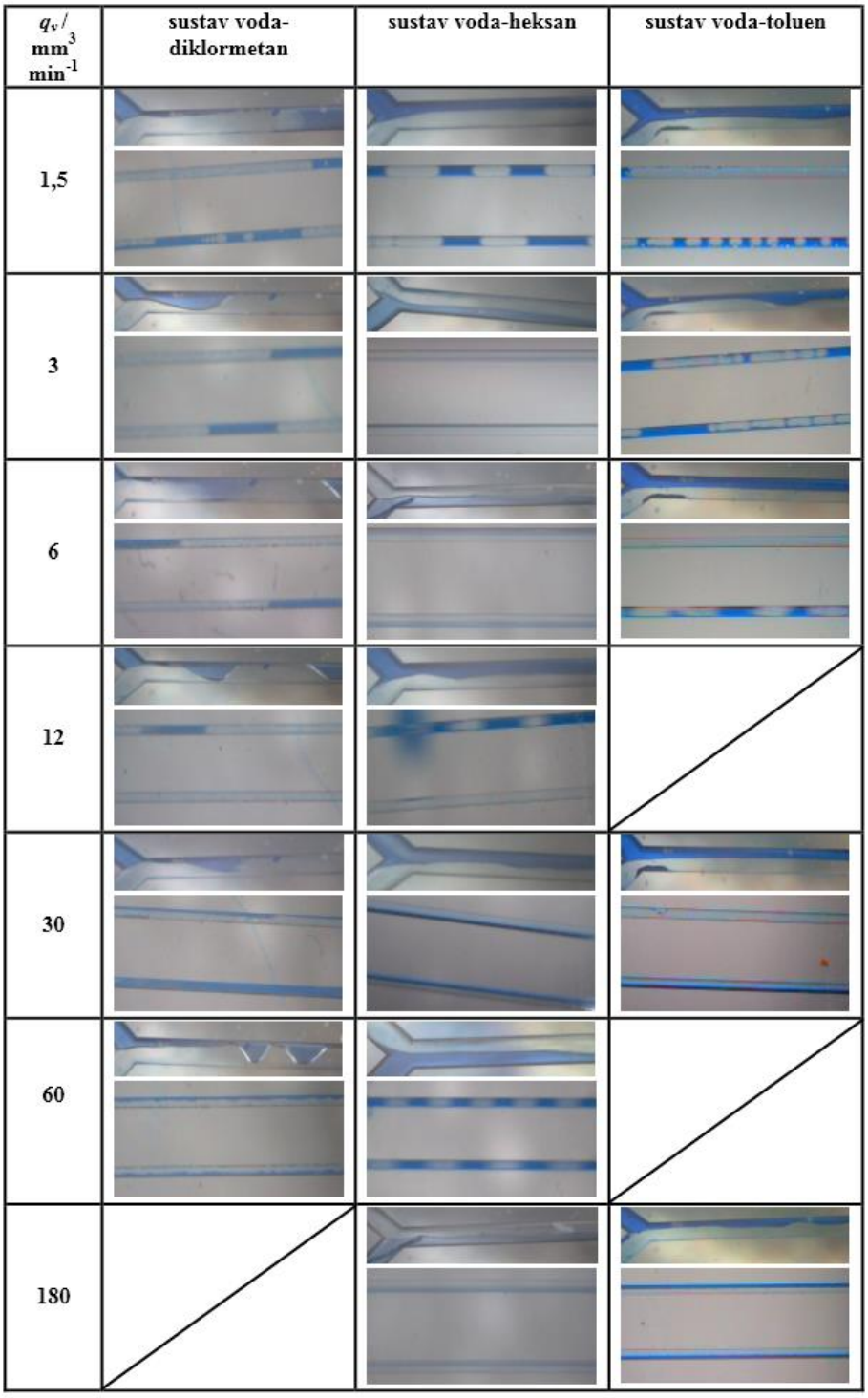

**Slika 10.** Fotografije profila strujanja sustava voda-organsko otapalo u mikroreaktoru za omjer protoka faza 1:1



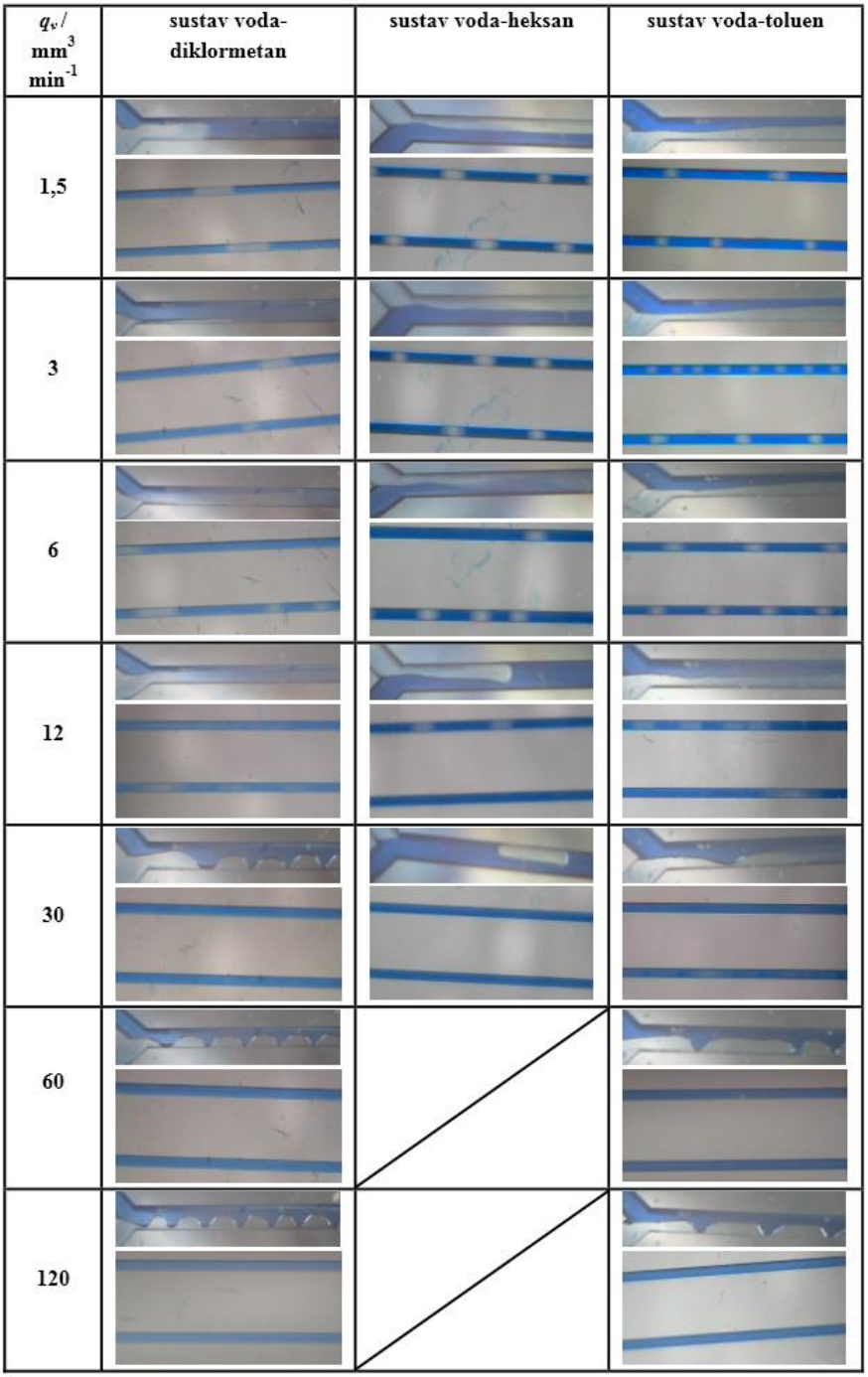

**Slika 11.** Fotografije profila strujanja sustava voda-organsko otapalo u mikroreaktoru za omjer protoka faza 1:3



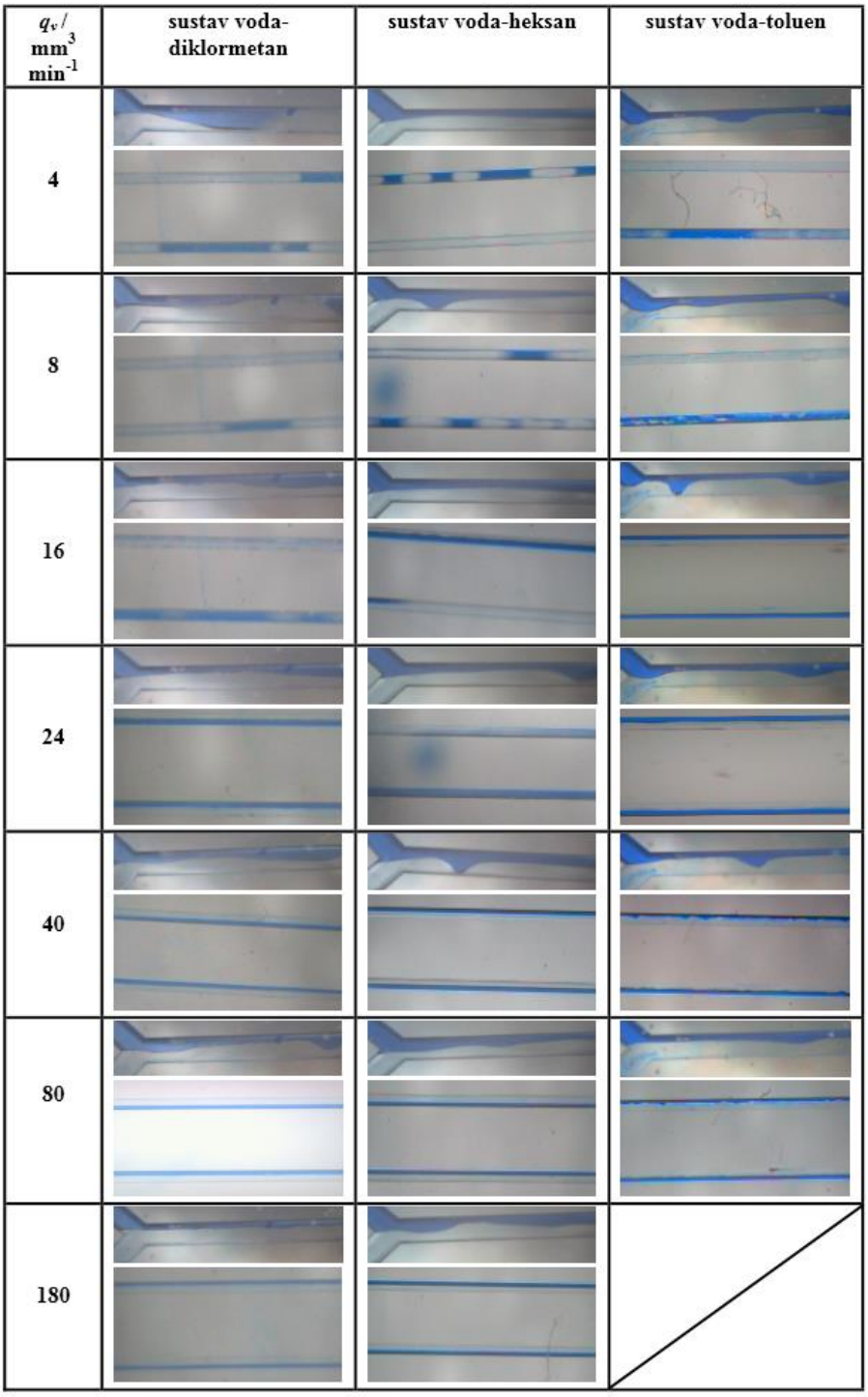

**Slika 12.** Fotografije profila strujanja sustava voda-organsko otapalo u mikroreaktoru za omjer protoka faza 3:1



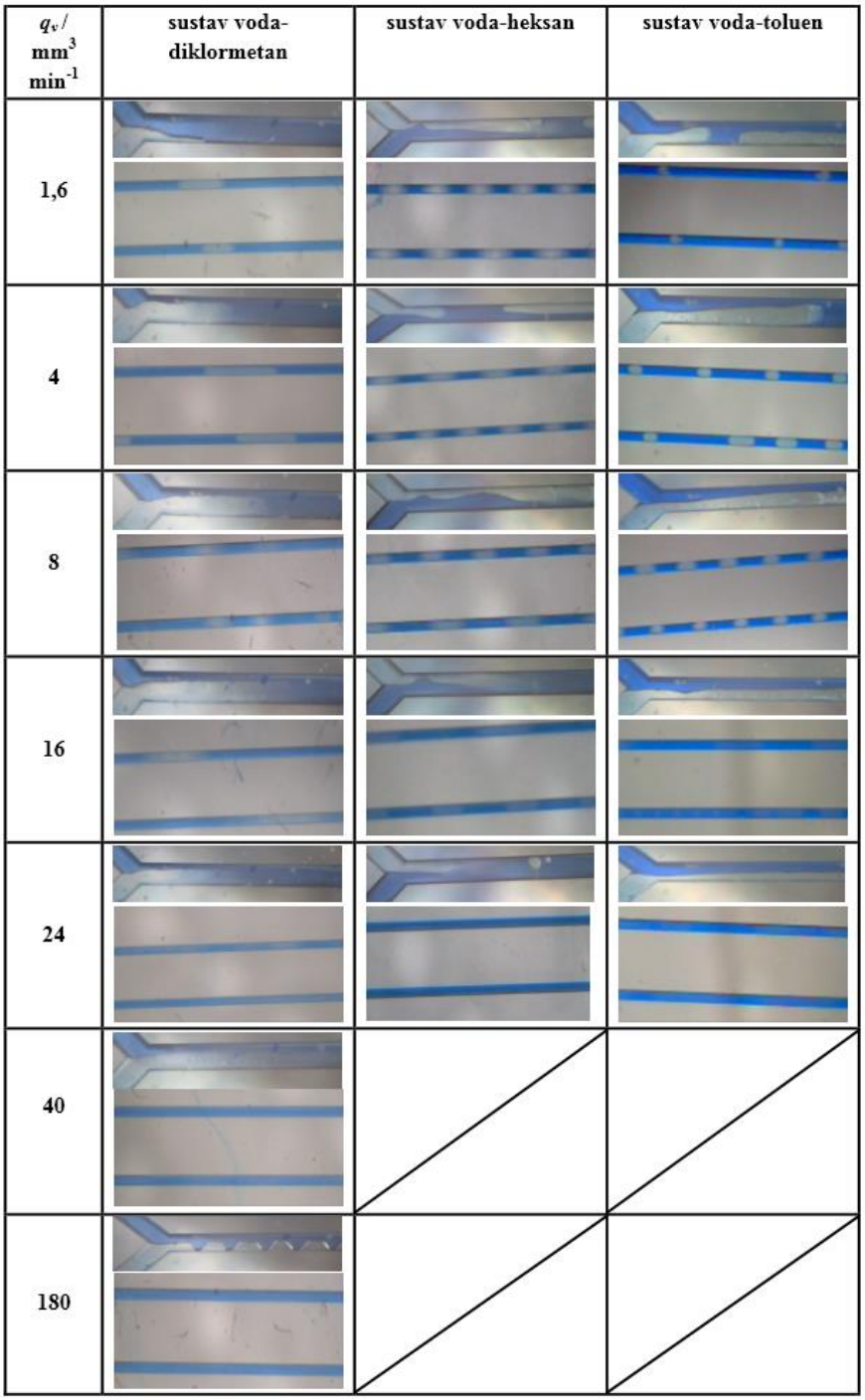

**Slika 13.** Fotografije profila strujanja sustava voda-organsko otapalo u mikroreaktoru za omjer protoka faza 1:5




**Slika 14.** Fotografije profila strujanja sustava voda-organsko otapalo u mikroreaktoru za omjer protoka faza 5:1



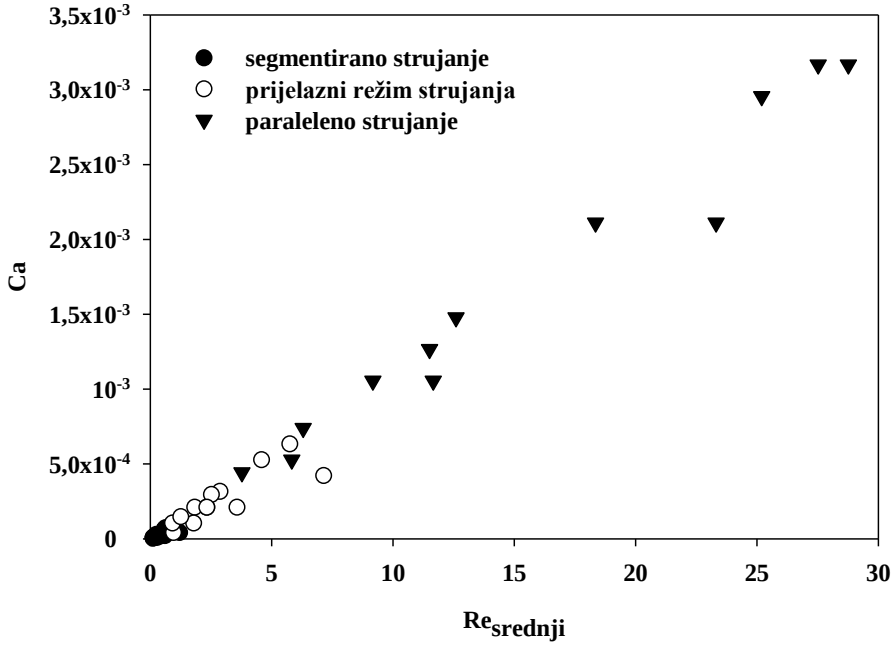

**Slika 15.** Fotografije profila strujanja sustava voda-organsko otapalo u mikroreaktoru za omjer protoka faza 1:7



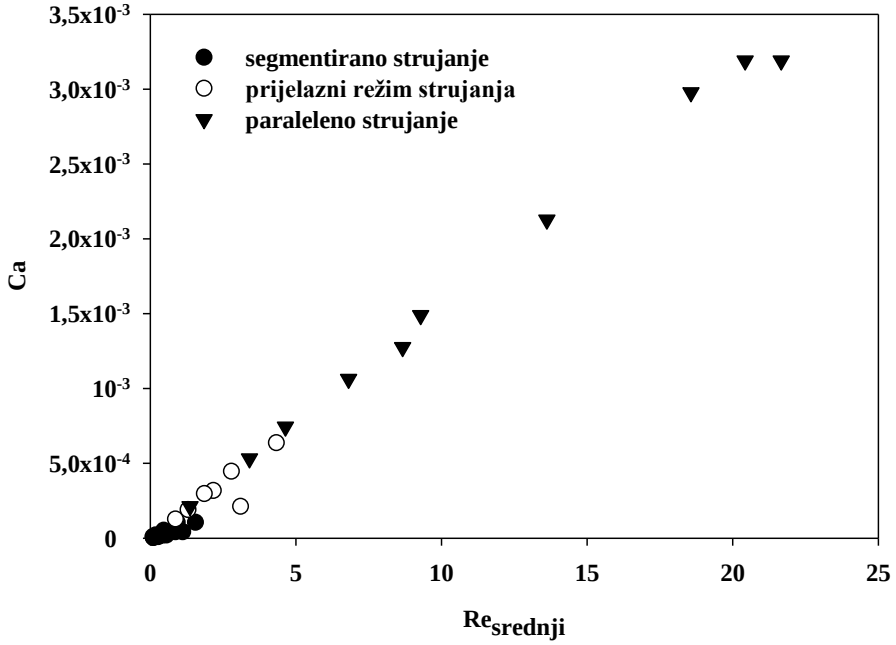

**Slika 16.** Fotografije profila strujanja sustava voda-organsko otapalo u mikroreaktoru za omjer protoka faza 7:1

Kako bi se dobio bolji uvid u mehanizme koji su dominantni pri određenom protoku u sustavu voda-organsko otapalo provedena je bezdimenzijska analiza. Izračunate su vrijednosti srednjeg Reynoldsovog broja i kapilarnog broja. Srednji Reynoldsov broj predstavlja srednju vrijednost između Reynoldsovog broja za vodenu i Reynoldsovog broja za organsku fazu. Po definiciji Reynoldsov broj predstavlja omjer inercijske sile i viskozne sile, a kapilarni broj

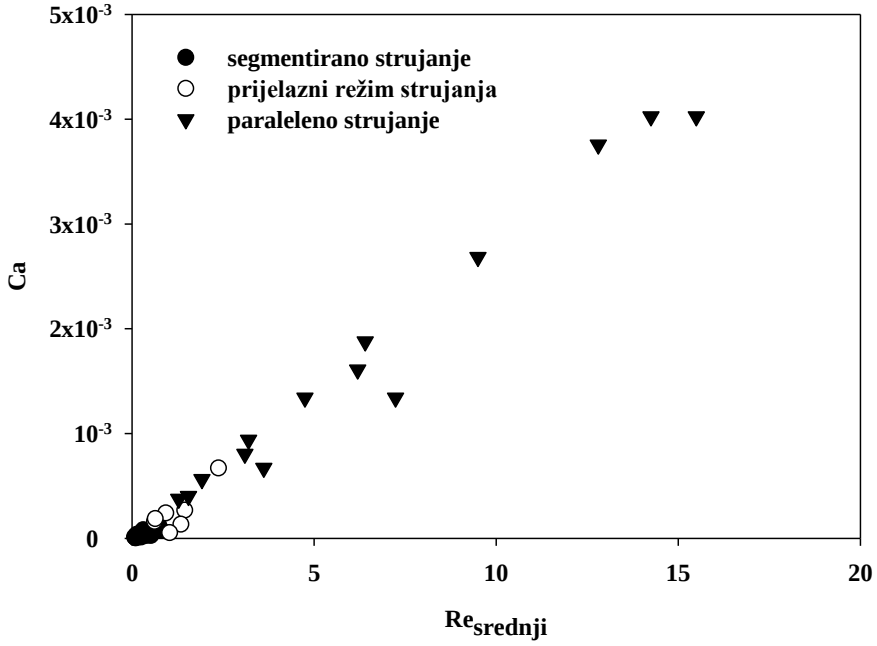
odnos viskoznosti i površinske napetosti. Pri svim analiziranim protocima kod sva tri sustava voda-organsko otapalo dobivene su vrijednosti Reynoldsovog broja manje od Re = 30 čime je potvrđeno da su svi pokusi provedeni u laminarnom režimu strujanja. Za mikroreaktore je granična vrijednost Reynoldsovog broja za laminarni profil strujanja Re =100. Na slikama 17-19 dan je prikaz ovisnosti promjene kapilarnog broja o srednjem Reynoldsovom broju. Uočeno je da je kod svih sustava za male vrijednosti Reynoldsovih brojeva do Re = 1,2 i male vrijednosti kapilarnog broja do Ca = $1{,}3 \cdot 10^{-4}$ dominantno segmentirano strujanje. Kod Reynoldsovih brojeva većih od Re = 1,3 i kapilarnih brojeva većih od Ca = $2{,}1 \cdot 10^{-4}$ razvija se paralelno strujanje.




**Slika 17.** Zavisnost kapilarnog broja o srednjem Reynoldsovom broju za strujanje sustava voda-diklormetan u mikroreaktoru



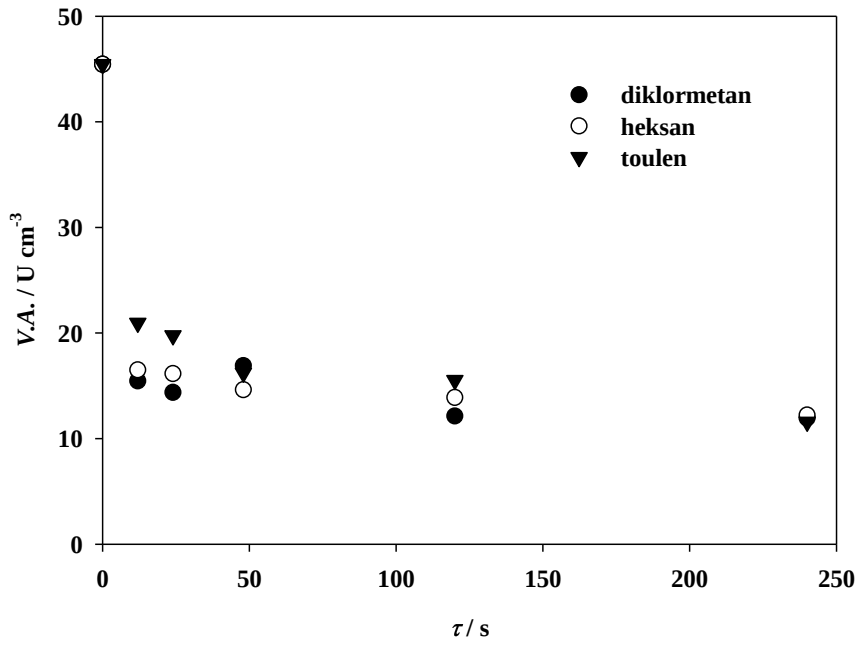

**Slika 18.** Zavisnost kapilarnog broja o srednjem Reynoldsovom broju za strujanje sustava voda-heksan u mikroreaktoru




**Slika 19.** Zavisnost kapilarnog broja o srednjem Reynoldsovom broju za strujanje sustava voda-toulen u mikroreaktoru

## 4.4. Analiza stabilnosti enzima lakaze u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru

Proveden je pokus u kojem se pratila ovisnost aktivnosti enzima lakaze o vremenu zadržavanja u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru. Pomoću jedne klipne pumpe u mikroreaktor je uvođena suspenzija enzima lakaze ($\gamma_{lakaza}$ = 0,2 g dm$^{-3}$ u 0,2 mol dm$^{-3}$ fosfatnom puferu, pH 6,6), a pomoću druge organska faza (diklormetan, heksan ili toluen). Pokusi su provedeni pri omjeru volumnih protoka voda-organsko otapalo 1:1, kod različitih ukupnih protoka od $q_V$ = 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 i 400 mm$^3$ min$^{-1}$. Na izlazu iz reaktora uzorci su sakupljani u plastične kivete držane na ledu te je u tim uzorcima određena aktivnost enzima lakaze. Rezultati ovisnosti aktivnosti enzima lakaze o vremenu zadržavanja za sva tri ispitivana sustava voda-organsko otapalo prikazani su na slici 20.




**Slika 20.** Promjena aktivnosti enzima lakaze pri različitim vremenima zadržavanja u sustavima voda-organsko otapalo u mikroreaktoru

Početna aktivnost enzima lakaze u sva tri sustava voda organsko otapalo iznosila je *V.A.* = 45,440 U cm$^{-3}$. Pokusi su provođeni u rasponu vremena zadržavanja $\tau$ = 4 min. Pad aktivnosti enzima lakaze uočen je već kod vremena zadržavanja od svega $\tau$ = 0,6 s u sva tri ispitivana sustava. Najveći pad je aktivnosti enzima lakaze za vremena zadržavanja veća od $\tau$ = 0,6 s opažen je u sustavima voda-diklormetan i voda-heksan, dok je nakon istog vremena zadržavanja značajno manji pad aktivnosti enzima lakaze izmjeren u sustavu voda-toluen.

Sličan trend može se uočiti i kod većih vremena zadržavanja; aktivnost enzima lakaze najsporije pada u sustavu voda-toluen. U slučaju usporedbe sustava voda-diklormetan i sustava voda-heksan do vremena zadržavanja $\tau$ = 4,8 s aktivnost enzima lakaze brže pada u sustavu voda-diklormetan no nakon ovog vremena zadržavanja promjena aktivnosti enzima u oba sustava je približno jednaka i sporije se smanjuje.

## 4.5. Biotransfromacija fenola u sustavima voda-organsko otapalo u mikrorekatoru

U mikroreaktoru su provedeni pokusi biotransformacije fenola enzimom lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* u tri sustava voda-organsko otapalo (diklormetan, heksan i toulen). Biotransformacija u mikroreaktoru je provedena pri dvije ulazne koncentracije fenola $c_{u,fenol}$ = 3 i 6 mmol dm$^{-3}$ dok je koncentracija enzima lakaze u oba pokusa bila $\gamma_{lakaza}$ = 0,2 g dm$^{-3}$ (0,2 mol dm$^{-3}$ fosfatni pufer, pH 6,6). Svaka se faza pomoću klipnih pumpa uvodila odvojeno u mikroreaktor. Svi pokusi su provedeni pri omjeru protoka faza 1:1. Pokusi su provedeni pri različitim vremenima zadržavanja, a u uzorcima je određena koncentracija fenola. Iz rezultata pokusa, odnosno iz ovisnosti koncentracija fenola na izlazu iz reaktora o vremenu zadržavanja, za sva tri sustava voda-organsko otapalo, procijenjene su vrijednosti parametra Michaelis-Menteničine kinetike primjenom integralne metode (jednadžbe 18-24). Procijenjene vrijednosti parametra ($v_{max}$ i $K_m$) za sva tri sustava prikazane su u tablici 4.

**Tablica 4**. Procijenjene vrijednosti parametra Michaelis-Menteničine kinetike procesa biotransfromacije fenola enzimom lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* u mikroreaktoru u sustavu voda-organsko otapalo primjenom integralne metode procjene parametra

| Organsko otapalo | $K_m$ (mmol dm$^{-3}$) | $v_{max}$ (U mg$^{-1}$) |
|---|---|---|
| diklormetan | 5,401 ± 1,001 | 23,18 ± 2,014 |
| heksan | 5,221 ± 0,978 | 14,04 ± 1,546 |
| toulen | 4,296 ± 1,112 | 35,01 ± 2,225 |

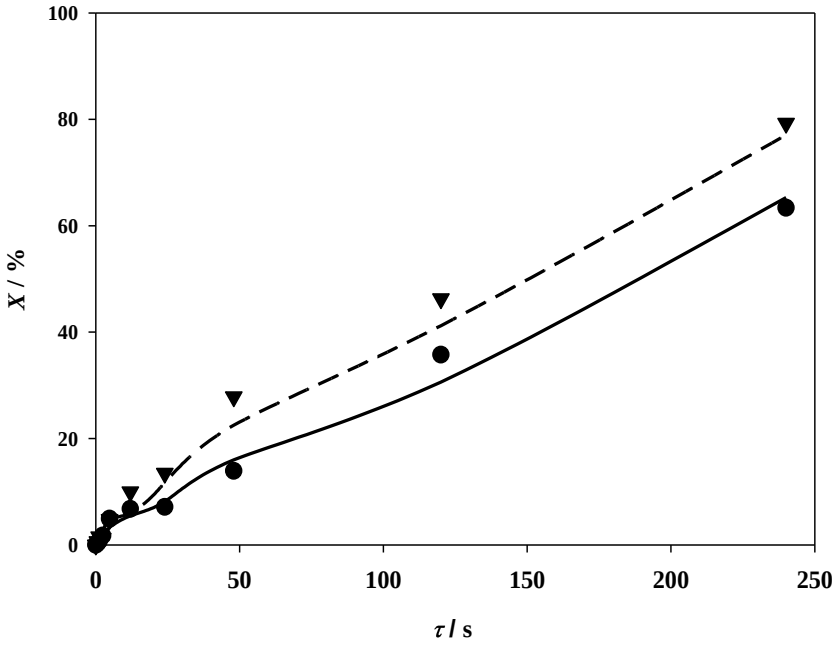
Iz procijenjenih vrijednosti je vidljivo da je maksimalna brzina reakcija biotransformacije fenola enzimom lakaza porijeklom iz *Trametes versicolor* najveća u sustavu voda-toulen i iznosi $v_{max}$ = 35,01 U mg$^{-1}$, dok je najmanja u sustavu voda-heksan i iznosi $v_{max}$ = 14,04 U mg$^{-1}$. Procijenjene vrijednosti maksimalnih brzina reakcije biotransformacije fenola enzimom lakaza u mikroreaktoru su približno 100 puta veće od onih procijenjenih u kotlastom reaktoru (tablica 3). Uočeno je također da su procijenjene vrijednosti konstanti zasićenja u mikroreaktoru slične onima procijenjenim u kotlastom reaktoru. Najmanja vrijednost konstante zasićenja je procijenjena u sustavu voda-toulen što upućuje na zaključak da enzim lakaza ima najveći afinitet prema fenolu kao supstratu upravo u sustavu voda-toulen.

Ovisnost konverzije fenola o vremenu zadržavanja u mikroreaktoru za sva tri sustava voda-organsko otapalo prikazana je na slikama 21-23. Iz rezultata je vidljivo da konverzija fenola raste povećanjem vremena zadržavanja kod sva tri ispitivana sustava. Uočeno je također da dolazi do „skoka“ u konverziji pri određenom vremenu zadržavanja. Ta promjena u trendu vidljiva je u području vremena zadržavanja $\tau$ = 12 – 48 s, odnosno u području ukupnih protoka $q$ = 20 – 5 mm$^3$ min$^{-1}$. Ovo se može objasniti promjenama u režimu strujanja analiziranih sustava pri navedenim vremenima zadržavanja.

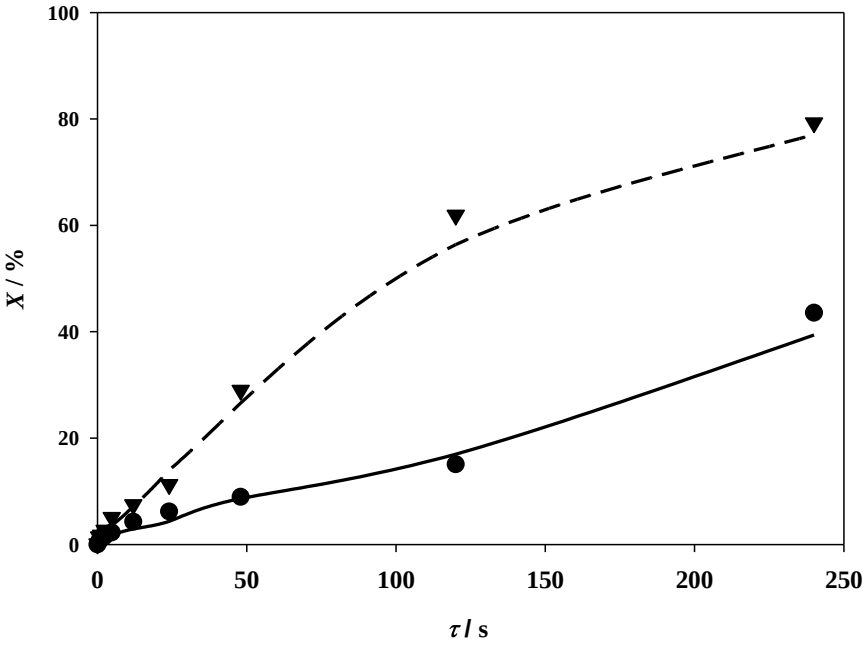
Prilikom analize profila strujanja u sustavu voda-toluen, kod ukupnog protoka 50 mm$^3$ min$^{-1}$ ($\tau$ = 4,8 s) uočen je stabilan paralelni tok, kod protoka 20 mm$^3$ min$^{-1}$ ($\tau$ = 12 s) uočeno je prijelazno strujanje, a kod protoka 5 mm$^3$ min$^{-1}$ ($\tau$ = 48 s) stabilno segmentirano strujanje. Sličan trend uočen je i kod sustava voda-diklormetan. U sustavu voda-heksan segmentirano strujanje se razvija pri kod većih vrijednosti vremena zadržavanja. Na temelju analize profila

strujanja i rezultata pokusa biotransformacije u mikroreaktoru može se zaključiti da je konverzija puno veća pri segmentiranom profilu strujanja.

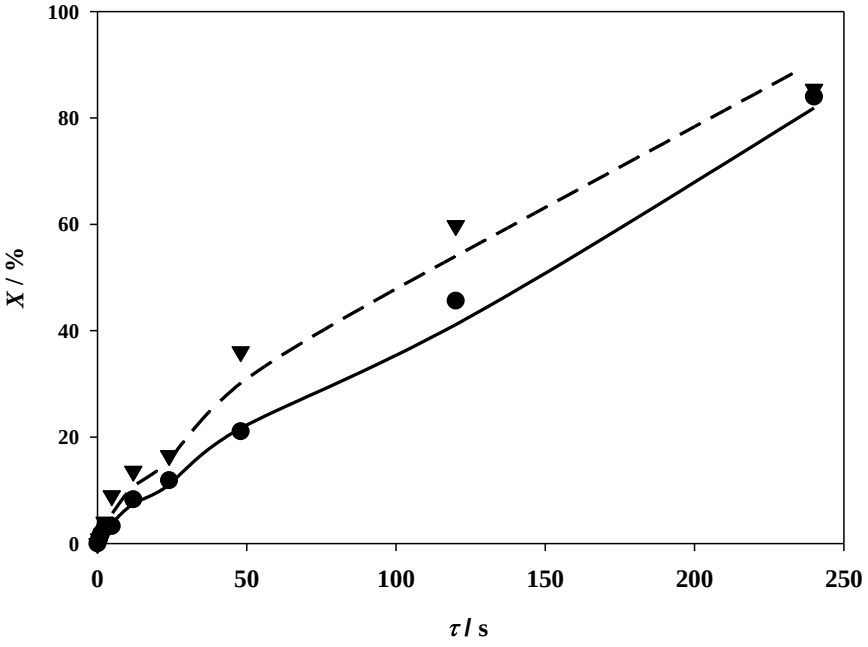
Kinetički parametri modela biotransformacije fenola procijenjeni su na temelju rezultata dobivenih u pokusima provedenih pri ulaznoj koncentraciji fenola $c_{u,fenol}$ = 6 mmol dm$^{-3}$, dok je ocjena vajanosti matematičkog modela procesa provedena na rezultatima pokusa dobivenim pri ulaznoj koncentraciji fenola $c_{u,fenol}$ = 3 mmol dm$^{-3}$. Pokazano je dobro slaganje rezultata simulacije matematičkog modela procesa s eksperimentalnim rezultatima, posebno za pokuse provedene pri malim vremenima zadržavanja i to za sva tri sustava voda - organsko otapalo (slike 21-23). Maksimalne konverzije fenola postignute su pri najvećim vremenima zadržavanja i iznosile su: $X_{voda\text{-}diklormetan}$ = 79,28 %, $X_{voda\text{-}heksan}$ = 77,05 % i $X_{voda\text{-}toulen}$ = 79,28 %.




**Slika 21.** Ovisnost konverzije fenola o vremenu zadržavanja u sustavu voda-diklormetan u mikroreaktoru ((●) $c_{u,fenol}$ = 6 mmol dm$^{-3}$, (▼) $c_{u,fenol}$ = 3 mmol dm$^{-3}$, (—) model, $\gamma_{u,lakaza}$ = 0,2 g dm$^{-3}$)




**Slika 22.** Ovisnost konverzije fenola o vremenu zadržavanja u sustavu voda-heksan u mikroreaktoru ((●) $c_{u,fenol}$ = 6 mmol dm$^{-3}$, (▼) $c_{u,fenol}$ = 3 mmol dm$^{-3}$, (—) model, $\gamma_{u,lakaza}$ = 0,2 g dm$^{-3}$)




**Slika 23.** Ovisnost konverzije fenola o vremenu zadržavanja u sustavu voda-toluen u mikroreaktoru ((●) $c_{u,fenol}$ = 6 mmol dm$^{-3}$, (▼) $c_{u,fenol}$ = 3 mmol dm$^{-3}$, (—) model, $\gamma_{u,lakaza}$ = 0,2 g dm$^{-3}$)

# 5. ZAKLJUČCI

Na temelju dobivenih rezultata izvedeni su slijedeći zaključci:

- U kotlastom reaktoru i u mikroreaktoru enzim lakaza je najstabilnija u sustavu voda-toulen, dok je najveći gubitak stabilnosti opažen u sustavu voda-heksan.
- Michaelis-Menteničina konstanta zasićenja procijenjena na temelju rezultata pokusa u oba tipa reaktora pokazuje da enzim lakaza najveći afinitet prema fenolu ima u sustavu voda-toluen.
- U pokusima biotransformacije fenola u kotlastom reaktoru postignute su maksimalne konverzije: $X_{\text{voda-diklormetan}} = 28{,}49\ \%$, $X_{\text{voda-heksan}} = 23{,}46\ \%$ i $X_{\text{voda-toulen}} = 32{,}79\ \%$.
- U mikroreaktoru je kod malih vrijednosti Reynoldsova broja do Re = 1,2 i kapilarnog broja do $Ca = 1{,}3 \cdot 10^{-4}$ dominantno segmentirano strujanje, dok se kod Reynoldsovih brojeva većih od Re = 1,3 i kapilarnih brojeva većih od $Ca = 2{,}1 \cdot 10^{-4}$ razvija paralelno strujanje.
- U pokusima biotransformacije fenola u mikroreaktoru postignute maksimalne konvezije postignute su pri vremenu zadržavanja $\tau = 240$ s: $X_{\text{voda-diklormetan}} = 79{,}28\ \%$, $X_{\text{voda-heksan}} = 77{,}05\ \%$ i $X_{\text{voda-toulen}} = 79{,}28\ \%$.

# 6. LITERATURA


1. Šalić A., Tušek A., Kurtanjek Ž., Zelić B., Mikroreaktori, Kem. Ind. **59** (2010) 227-248.

2. Yoshida. J., Nagaki, A., Iwasaki, T., Suga, S., Enhancement of Chemical Selectivity by Microreactors, Chem. Eng. Technol. **28** (2005) 259-265.

3. Ehrfeld, W., Hessel, V., Löwe, H., Microreactors: New technology for modern chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2000, str. 1-11.

4. Jonathan, P., Klavs, F.J., Integrated microreactors for reaction automation: New approaches to reaction development, Annu. Rev. Chem. **3** (2010) 19-42.

5. Jovanović, J., Rebrov, E.V., Nijhuis, T.A., Kreutzer, M.T., Hessel, V., Schouten, J.C., Liquid-liquid flow in a capillary microreactor: Hydrodynamic flow patterns and extraction performance, Ind. Eng. Chem. Res. **51** (2012) 1015-1026.

6. Dessimoz, A., Cavin, L., Renken, A., Kiwi-Minsker, L., Liquid–liquid two-phase flow patterns and mass transfer characteristics in rectangular glass microreactors, Chem. Eng. Sci. **63** (2008) 4035-4044.

7. Bolivar, J. M., Wiesbauer J., Nidetzky B., Biotransformations in microstructured reactors: More than flowing with the stream? Trends. Biotechnol. **29** (2011) 333-342.

8. Maruyama, T., Uchida J., Ohkawa T., Futami T., Katayama K., Nishizawa K., Sotowa K., Kubota F., Kamiya N., Goto M.,Enzymatic degradation of *p*-chlorophenol in a two-phase flow microchannel system, Lab. Chip. **3** (2003) 308–312.

9. Jurinjak Tušek, A., Tišma, M., Bregović, V., Ptičar, A., Kurtanjek, Ž., Zelić B., Enhancement of phenolic compounds oxidation using laccase from *Trametes versicolor* in a microreactor, Biotechnol. Bioproc. E. **18** (2013) 686-696.

10. Žnidaršič-Plazl, P., Plazl, I., Modelling and experimental studies on lipase-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a microreactor, Process. Biochem. **44** (2009) 1115-1121.

11. Kundu, S., Bhangale, A.S., Wallace, W.E., Flynn, K.M., Guttman, C.M., Gross, R.A., Beers, K.L. Continuous flow enzyme-catalyzed polymerization in a microreactor. J. Am. Chem. Soc. **133** (2011) 6006-6011.

12. Tadepalli, S., Qian, D., Lawal A., Comparison of performance of microreactor and semi-batch reactor for catalytic hydrogenation of *o*-nitroanisole, Catal. Today **125** (2007) 64-73.

13. Msdhavi, V., Lele, S.S., Lacase: Properties and applications, Bioresources **4** (2009) 1694-1717.

14. Kunamneni, A., Francisco Plou, F., Ballesteros, A., Alcalde, M., Laccases and their applications: A patent review, Recent Pat. Biotechnol. 2 (2008) 10-24.

15. Swarts, J.H., Verhagen, F., Field, J., Wijnberg, J., Trichlorinated phenols from hypholoma elongatum, Phytochem. **49** (1998) 203-206.

16. Bull, S., HPA Compendium of chemical hazards phenol, CRCE HQ, HPA (Version 4), 2007 https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/316681/Phenol_properties_incident_management_and_toxicology.pdf ( pristupljeno 10. srpanj 2015.)

17. Metzer, D. E., Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells, Elsevier Academic Press, San Diego, 2003, str. 455-460.

# 7. PRILOZI

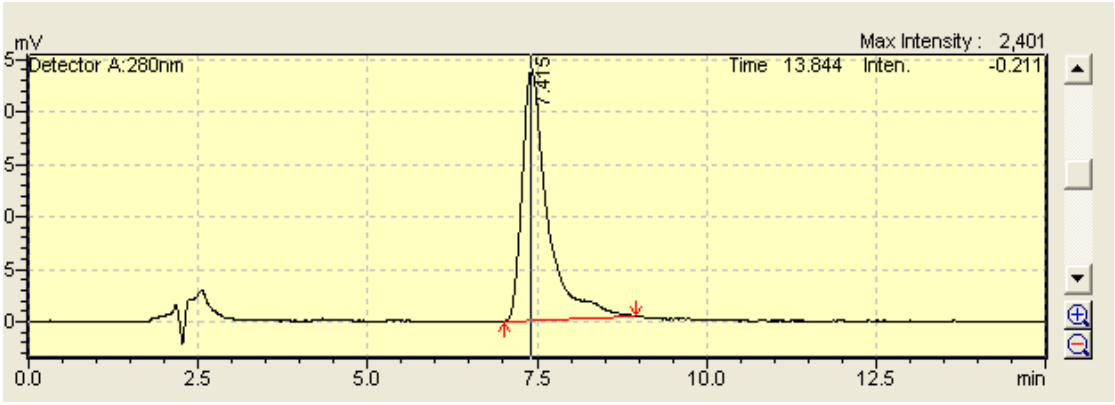
**Prilog 1.** Kromatogram za fenol

**Prilog 2.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije fenola u diklormetanu

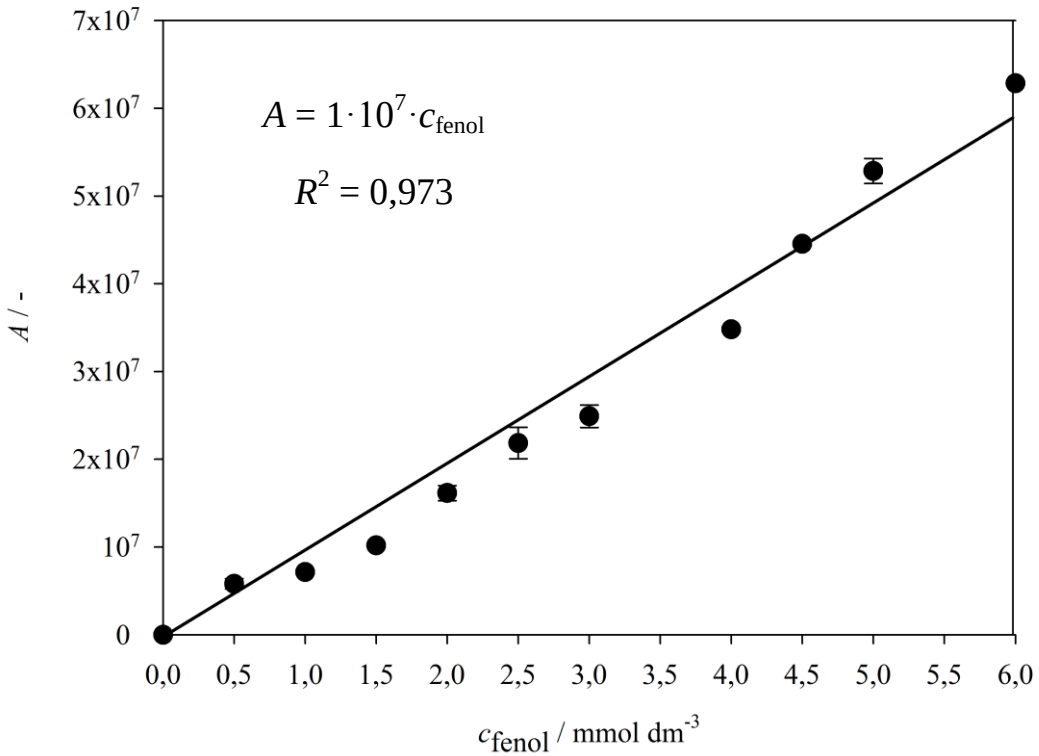
**Prilog 3.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije fenola u heksanu

**Prilog 4.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije fenola u toulenu

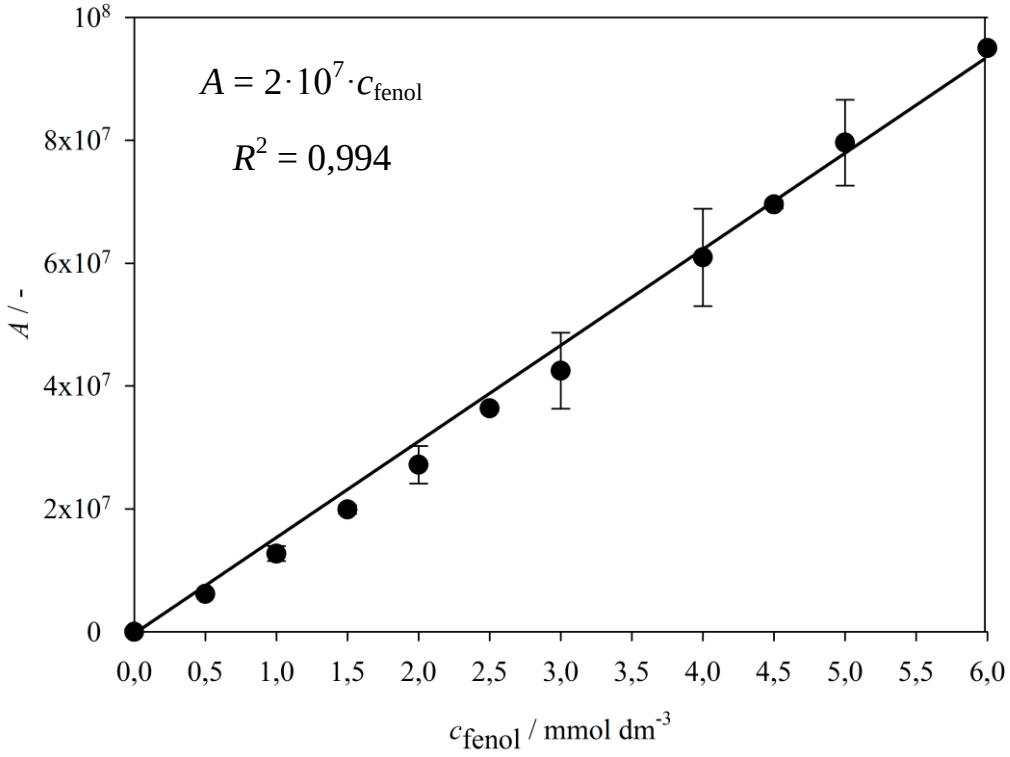
**Prilog 1.** Kromatogram za fenol



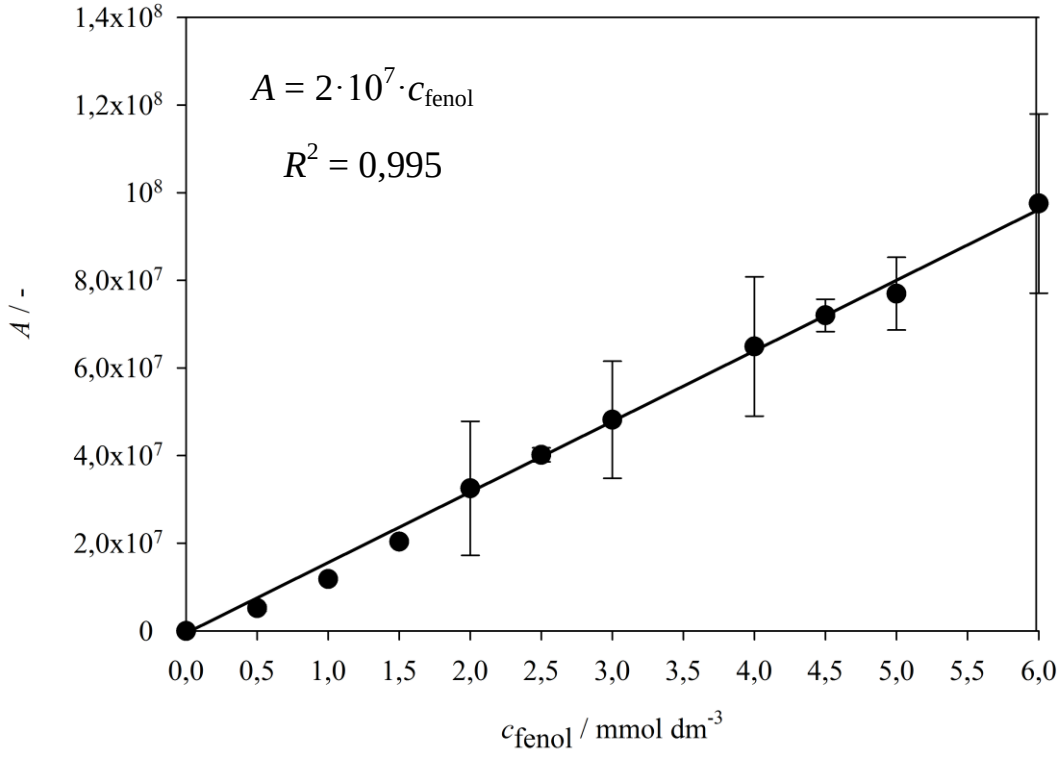

**Prilog 2.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije fenola u diklormetanu



**Prilog 3.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije fenola u heksanu




**Prilog 4.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije fenola u toulenu



# ŽIVOTOPIS

Tin Rahelić rođen je 14. prosinca 1993. godine u Zagrebu. Pohađao je Osnovnu školu August Šenoa u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole upisao se u Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, smjer prirodoslovna gimnazija. Tijekom srednjoškolskog obrazovanja sudjeluje na županijskim natijecanjima iz fizike. U kategoriji samostalnih radova na državnom natjecanju iz kemije u drugom razredu osvaja 5 mijesto, a u trećem s temom „Izrada i primjena mikroreaktora“ prvo mjesto. Akademske godine 2012./2013. upisuje preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.