

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

Marta Ostojić

**IMOBILIZACIJA *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens*
LIPAZA NA NOSAČE NA BAZI MEMBRANE JAJA**

DOKTORSKI RAD

Osijek, travanj, 2025.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Doktorski studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam
Smjer: Prehrambena tehnologija
Zavod za procesno inženjerstvo
Katedra za energiju, okoliš i održivi razvoj
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska
UDK: 577.15:637.412(043.3)
005.936.44:662.756(043.3)

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija
Znanstvena grana: Inženjerstvo
Tema rada: prihvaćena je na IV. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek održanoj 28. Ožujka 2024. godine.
Mentor: prof. dr. sc. Sandra Budžaki
Komentor: prof. dr. sc. Ivica Strelec

**Imobilizacija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* lipaza na nosače na bazi membrane jaja
Marta Ostojčić, 0113138301**

Sažetak: Lipaze su enzimi čija je primjena u odnosu na kemijske katalizatore vrlo poželjna posebno u imobiliziranom obliku. U današnje vrijeme postoje brojni nosači za imobilizaciju enzima na bazi otpada i/ili nusproizvoda poljoprivredno-prehrambene industrije, među kojima i membrane jaja. U okviru ovog doktorskog rada pripremljeni su nosači na bazi membrane jaja tretiranjem otpadne ljuske jaja s tri kiseline: 5 % klorovodičnom, 10 % octenom i 15 % *o*-fosforom kiselinom. Na pripremljene nosače su primjenom tri tehnike imobilizacije (adsorpcija, kovalentno direktno i indirektno vezanje) imobilizirane lipaze iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens*. Biokemijska i operativna svojstva imobiliziranih lipaza su pokazala pomak u pH i temperaturnom optimumu, bolju temperaturnu i skladišnu stabilnost u odnosu na slobodne lipaze te mogućnost korištenja u 10 uzastopnih ciklusa bez značajnog gubitka katalitičke aktivnosti. Na temelju dobivenih rezultata aktivnosti imobiliziranih lipaza, desorpcije te biokemijskih i operativnih svojstava odabrana je imobilizirana *Burkholderia cepacia* lipaza za provjeru funkcionalnosti u sintezi biodizela gdje je jedan sat sinteze bio dovoljan za sintezu 97 % metilnih estera masnih kiselina što je u skladu sa propisanim pravilnikom. Provedena tehno-ekonomska analiza pripreme nosača na bazi membrane jaja i imobilizacije lipaza na iste pokazala je da ovaj pristup predstavlja ekonomski isplativu i održivu alternativu u odnosu na komercijalne nosače, kao i ekološki prihvatljivo rješenje smanjenja otpada njegovom transformacijom u vrijedne materijale.

Ključne riječi: *Burkholderia cepacia* lipaza, *Pseudomonas fluorescens* lipaza, nosači na bazi membrane jaja, Imobilizacija

Rad sadrži: 188 stranica
54 slike
49 tablica
5 priloga
219 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu:

- | | | |
|----|-------------------------------------|---------------|
| 1. | prof. dr. sc. Drago Šubarić | predsjednik |
| 2. | izv. prof. dr. sc. Krunoslav Aladić | član |
| 3. | doc. dr. sc. Nikola Maravić | član |
| 4. | prof. dr. sc. Darko Velić | zamjena člana |

Datum obrane:

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Rektoratu Sveučilišta u Osijeku, Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu te u Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
 Faculty of Food Technology Osijek
 Doctoral Study Food Technology and Nutrition
 Department of Process Engineering
 Subdepartment Energy, Environment and Sustainable Development
 Franje Kuhača 18, HR-31000 Osijek, Croatia
 UDC: 577.15:637.412(043.3)
 005.936.44:662.756(043.3)

Scientific area: Biotechnical sciences
Scientific field: Food Technology
 Engineering
Thesis subject was approved by the Faculty Council of the Faculty of Food Technology at its session no. IV. held on 28 March 2024.
Mentor: Sandra Budžaki, PhD, prof.
Co-mentor: Ivica Strelec, PhD, prof.

Immobilization of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* lipases on eggshell membrane based carriers
 Marta Ostojčić, 0113138301

Summary: Lipases are enzymes whose use is highly desirable, especially in immobilized form. Nowadays, there are numerous carriers for enzyme the immobilization based on waste and/or by-products of the agro-food industry, including eggshell membranes. In this thesis, eggshell membrane based carriers were prepared by treating eggshells with three acids: 5% hydrochloric, 10% acetic and 15% *o*-phosphoric acid. Lipases from the bacteria *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas fluorescens* were immobilized on the prepared carriers using three immobilization techniques (adsorption, covalent direct binding and indirect binding). The biochemical and operational properties of the immobilized lipases showed a shift in pH and temperature optimum, better temperature and storage stability compared to free lipases and the reuse in 10 consecutive cycles without significant loss of catalytic activity. Based on the results obtained on immobilized lipase activity, desorption, biochemical and operational properties, immobilized lipase from *Burkholderia cepacia* was selected to test the functionality in biodiesel synthesis, where one hour of synthesis was sufficient for 97% fatty acid methyl esters, which is in accordance with the prescribed standard. The techno-economic analysis of the production of carriers based on eggshell membrane and the immobilization of lipases showed that this approach represents an economically viable and sustainable alternative to commercial carriers, as well as an environmentally friendly solution to reduce waste by converting them into valuable materials.

Key words: immobilization, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, eggshell membrane based carriers

Thesis contains: 188 pages
 54 figures
 49 tables
 5 supplements
 219 references

Original in: Croatian

Review (Evaluation) committee:

- | | | |
|----|--|--------------|
| 1. | <i>Drago Šubarić</i> , PhD, prof. | chair person |
| 2. | <i>Krunoslav Aladić</i> , PhD, associate prof. | member |
| 3. | <i>Nikola Maravić</i> , PhD, assistant prof. | member |
| 4. | <i>Darko Velić</i> , PhD, prof. | stand-in |

Defense date:

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek; Rector's office, University of Osijek; University Library in Zagreb and in University Library in Osijek

DOKTORSKI RAD JAVNO JE OBRANJEN DANA

Pred Povjerenstvom za obranu doktorskog rada:

- | | | | |
|----|----------------------------|-------------|-------------------|
| 1. | titula, Ime Prezime | predsjednik | _____
(potpis) |
| 2. | titula, Ime Prezime | član | _____
(potpis) |
| 3. | titula, Ime Prezime | član | _____
(potpis) |

ZAHVALJAM
ZA
OCJENU

Zahvaljujem se svojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Budžaki za sve savjete i neizmjernu strpljivost prilikom izrade mog doktorskog rada. Hvala Vam što ste mi pružili ovu priliku i pokazali mi da ja to mogu! Veliko hvala komentoru prof. dr. sc. Ivici Strelecu za sva usmjerevanja i pronalaskе rješenja čak i kada su se činili nemogućim.

Hvala svim mojim dragim prijateljima i kolegama, a posebno doc. dr. sc. Mariji Stjepanović jer je znala kada i kako pomoći.

Veliko, veliko hvala mojoj obitelji, braći i snajama i Danijelu, a ponajviše nećacima Davidu, Niki i Fabiu te Magdaleni i Moniki što su uvijek bili uz mene pružajući mi bezgraničnu ljubav i sreću i tako me vraćajući na pravi put kada postane teško.

Na kraju, najveća hvala mojoj najvećoj podršci, mojim divnim roditeljima Anici i Zlatku, koji su zaslužni za sve što sam do sada postigla. Hvala što me uvijek podržavate u svemu i vjerujete u mene. Hvala što ste tu i u sretnim i u teškim trenucima pružajući mi ogromnu, neiscrpnu ljubav i potporu. Bez Vas ovo ne bi bilo moguće, a ni ovoliko bitno za mene!

ZA OOCJENU

ImoLip
WASTE



Ovaj doktorski rad izrađen je na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku sredstvima Hrvatske zaklade za znanost u sklopu istraživačkog projekta

„Imobilizacija lipaza na funkcionalizirane nosače na bazi odabranih otpada iz poljoprivredno-prehrambene industrije“ (IP-2020-02-6878)

Pregled znanstvenih radova i poglavlja u knjigama objavljenih iz teme doktorske disertacije nalazi se u Prilogu 5.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	5
2.1. LIPAZE	6
2.2. IMOBILIZACIJA	15
2.2.1. IMOBILIZACIJA ADSORPCIJOM.....	16
2.2.2. IMOBILIZACIJA KOVALENTNIM VEZANJEM.....	17
2.3. NOSAČI ZA IMOBILIZACIJU	19
2.4. LJUSKA JAJA KAO OTPAD	20
2.5. MEMBRANA LJUSKE JAJA	24
2.6. TEHNO-EKONOMSKA ANALIZA	30
3. EKSPERIMENTALNI DIO	31
3.1. ZADATAK RADA	32
3.2. MATERIJALI	33
3.3. METODE	34
3.3.1. Određivanje kemijskog sastava ljuske jaja	34
3.3.2. Priprema nosača na bazi membrane jaja	36
3.3.3. Karakterizacija pripremljenih nosača na bazi membrane jaja.....	40
3.3.3.2. Određivanje parametara boje nosača na bazi membrane jaja.....	40
3.3.3.3. Infracrvena spektroskopija nosača na bazi membrane jaja	41
3.3.3.4. Određivanje granulometrijskog sastava nosača na bazi membrane jaja	41
3.3.3.5. Određivanje svojstava pora nosača na bazi membrane jaja	41
3.3.3.6. Određivanje mikrostrukturiranosti površine nosača na bazi membrane jaja pretražnom elektronskom mikroskopijom	42
3.3.3.7. Određivanje kapaciteta vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja	42
3.3.4. Imobilizacija <i>Burkholderia cepacia</i> i <i>Pseudomonas fluorescens</i> lipaza na nosače na bazi membrane jaja.....	42
3.3.4.1. Imobilizacija adsorpcijom	42
3.3.4.2. Imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem	44
3.3.4.3. Imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem	45
3.3.5. Liofilizacija imobiliziranih lipaza.....	48
3.3.6. Određivanje desorpcije imobiliziranih lipaza	48
3.3.7. Određivanje biokemijskih i operativnih svojstava slobodnih i imobiliziranih lipaza.....	49
3.3.7.1. Test aktivnosti lipaza	49
3.3.7.2. Određivanje optimalnog pH i temperature	49
3.3.7.3. Određivanje pH i temperaturne stabilnosti	49
3.3.7.4. Određivanje stabilnosti u organskim otapalima	50
3.3.7.5. Određivanje stabilnosti skladištenjem	50
3.3.7.6. Određivanje kinetičkih parametara	50
3.3.7.7. Određivanje supstratne specifičnosti.....	51

3.3.7.8. Određivanje višestrukosti uporabe.....	51
3.3.8. Prikaz selekcije imobiliziranih lipaza	51
3.3.9. Sinteza biodizela.....	52
3.3.10. Tehno-ekonomska analiza proizvodnje nosača na bazi membrane jaja i imobilizacije lipaza.....	53
3.3.11. Statistička obrada podataka.....	54
4. REZULTATI I RASPRAVA	55
4.1. KEMIJSKI SASTAV LJUSKE JAJA	56
4.2. PRIPREMLJENI NOSAČI NA BAZI MEMBRANE JAJA	57
4.2.1. Kemijski sastav nosača na bazi membrane jaja	59
4.2.2. Granulometrijski sastav nosača na bazi membrane jaja	63
4.2.3. Svojstva pora nosača na bazi membrane jaja.....	64
4.2.4. Mikrostrukturiranost nosača na bazi membrane jaja.....	66
4.2.5. Kapacitet vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja	67
4.3. IMOBILIZACIJA LIPAZA	67
4.3.1. Imobilizacija adsorpcijom	68
4.3.2. Imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem.....	71
4.3.3. Imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem.....	75
4.4. DESORPCIJA IMOBILIZIRANIH LIPAZA.....	80
4.4.1. Desorpcija lipaza imobiliziranih adsorpcijom	80
4.4.2. Desorpcija lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem	83
4.4.3. Desorpcija lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem	86
4.5. BIOKEMIJSKA I OPERATIVNA SVOJSTVA SLOBODNIH I IMOBILIZIRANIH LIPAZA.....	88
4.5.1. pH optimum	89
4.5.2. Temperaturni optimum	93
4.5.3. pH stabilnost.....	96
4.5.4. Temperaturna stabilnost	105
4.5.5. Stabilnost u organskim otapalima.....	113
4.5.6. Stabilnost skladištenjem.....	119
4.5.7. Kinetika.....	129
4.5.8. Supstratna specifičnost.....	131
4.5.9. Višestrukost uporabe.....	136
4.5.10. Statistička analiza za krajnji odabir lipaza.....	139
4.7. PROVJERA FUNKCIONALNOSTI ODABRANE IMOBILIZIRANE <i>BURKHOLDERIA CEPACIA</i> LIPAZE U SINTEZI BIODIZELA	144
4.8. TEHNO-EKONOMSKA ANALIZA.....	144
5. ZAKLJUČCI.....	152
6. LITERATURA.....	155
7. ŽIVOTOPIS PRISTUPNICE	181
8. PRILOZI.....	183

Popis oznaka, kratica i simbola

A	aktivnost lipaze [U]
$\sum A$	zbroj površina svih pikova metilnih estera masnih kiselina od C 4:0 do C 24:1
A_{Ei}	površina pika internog standarda metilnog estera masne kiseline C 19
ANOVA	analiza varijance (eng. <i>analysis of variance</i>)
BCL	<i>Burkholderia cepacia</i> lipaza
BET	Brunauer-Emmet-Teller analiza
BJH	Barrett-Joyner-Halenda metoda
BU	biljno ulje
DMU	djevičansko maslinovo ulje
EDTA-2Na	<i>di</i> -natrijeva sol etilendiaminotetraoctena kiselina
ESM	membrana jaja (eng. <i>eggshell membrane</i>)
ESM-N	nativna (netretirana) membrana jaja
ESMC	nosač na bazi membrane jaja (eng. <i>eggshell membrane carrier</i>)
ESMC-HCl	nosač na bazi membrane jaja dobiven otapanjem ljuske jaja 5 % klorovodičnom kiselinom
ESMC-HAc	nosač na bazi membrane jaja dobiven otapanjem ljuske jaja 10 % octenom kiselinom
ESMC-H ₃ PO ₄	nosač na bazi membrane jaja dobiven otapanjem ljuske jaja 15 % <i>o</i> -fosfornom kiselinom
FAME	metilni esteri masnih kiselina, biodizel (eng. <i>fatty acid methyl esters</i>)
FTIR-ATR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom-tehnika prigušene totalne refleksije (eng. <i>Fourier transform infrared spectroscopy -attenuated total reflectance</i>)
<i>h</i>	Hillov koeficijent
IADS	imobilizacija adsorpcijom

IDKV	imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem
IIDKV	imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem
K_m	Michaelisova konstanta [mmol/L]
KU	kokosovo ulje
LSD	Fisher-ov test najmanje značajne razlike (eng. <i>least significant difference</i>)
MUS	maslinovo ulje – standard
OU	otpadno ulje
p NPP	p -nitrofenil palmitat
PFL	<i>Pseudomonas fluorescens</i> lipaza
RU	repičino ulje
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija
SM	svinjska mast
s.t.	suha tvar [g/100 g]
SU	suncokretovo ulje
t	vrijeme (eng. <i>time</i>) [h]
V_{max}	maksimalna brzina enzimske reakcije [U/mL], [U/g]
W	masa uzorka biodizela [mg]
W_{Ei}	masa korištenog internog standarda metilnog estera masne kiseline C 19 [mg]

ZNA
OCJENU

1. UVOD

Lipaze su enzimi iz skupine hidrolaza čija je glavna metabolička uloga u živim stanicama hidroliza triacilglicerola do masnih kiselina i glicerola. To su svestrani biokatalizatori koji, osim navedenog, pri pogodnim reakcijskim uvjetima kataliziraju i reakcije esterifikacije, interesterifikacije, transesterifikacije, acidolize, alkoholize i aminolize (Budžaki i sur., 2022; Mulinari i sur., 2020; Sarmah i sur., 2018). Upravo zbog svoje svestranosti djelovanja naišle su na široku primjenu u prehrambenoj industriji, industriji kože i tekstila, ulja i masti, papira te u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji kao i obradi otpadnih voda bogatih lipidima (Andualema i Gessesse, 2012; Budžaki i sur., 2022). U navedenim industrijama lipaze se koriste kao slobodni (homogeni) ili kao imobilizirani (heterogeni) biokatalizatori.

Iako je primjena lipaza u odnosu na kemijske katalizatore u industrijskoj proizvodnji poželjnija zbog visoke specifičnosti obzirom na supstrat i tip reakcije koji se provodi, ekološku prihvatljivost i energetska nezahtjevnost što sve utječe na sniženje cijene proizvodnog procesa i konačnog proizvoda, visoka cijena lipaza kao i nemogućnost ponovne uporabe slobodnih lipaza predstavlja ključnu prepreku za širu uporabu u industrijskoj proizvodnji. Navedeno se može nadići primjenom imobiliziranih lipaza koje se po završenom proizvodnom procesu mogu lako izdvojiti iz reakcijske smjese te ponovno uporabiti u sljedećem proizvodnom ciklusu kao i u kontinuiranim procesima proizvodnje. Štoviše, imobilizacija može utjecati i na poboljšanje operativne stabilnosti lipaza, kao i mogućnost njihova korištenja u širokom rasponu vrijednosti pH i temperature (Franssen i sur., 2013). Za imobilizaciju enzima danas se koriste različite tehnike koje se obzirom na način vezanja i/ili ograničavanja pokretljivosti enzima ugrubo mogu svrstati u tri osnovne skupine: imobilizaciju adsorpcijom, imobilizaciju kovalentnim vezanjem te imobilizaciju zarobljavanjem enzima. Imobilizacija adsorpcijom je tehnika imobilizacije koja se temelji na uspostavljanju relativno slabih veza između nosača i enzima. Čvrsto povezivanje enzima s nosačem postiže se primjenom imobilizacije kovalentnim vezanjem: direktno na aktiviranu funkcionalnu skupinu nosača ili indirektno na aktiviranu fleksibilnu kemijsku strukturu (tzv. fleksibilna ruka) kovalentno vezanu na nosač. Međutim, u oba slučaja kovalentnog vezanja, nosač je prvo potrebno kemijski modificirati/aktivirati kako bi se potom na aktivirani nosač ili na nosač s aktiviranom fleksibilnom rukom kovalentno vezao enzim.

Najpoželjnija svojstva nosača za imobilizaciju enzima su otpornost na stejšnjivanje, mogućnost aktivacije, kemijska inertnost prema enzimu i reakcijskoj smjesi, biokompatibilnost, biorazgradivost, netoksičnost, raspoloživost i ponajviše niska cijena (Ismail i Baek, 2020; Jiang i sur., 2017; Zdarta i sur., 2018). Obzirom da većina komercijalno dostupnih nosača ima relativno visoku cijenu, postoji potreba za pronalaskom jeftinijih. Upravo ovdje moguću

primjenu pronalaze različiti široko dostupni otpadi i/ili nusproizvodi poljoprivredno-prehrambene industrije, pri čemu bi poljoprivredno-prehrambena industrija umjesto znatnog troška za zbrinjavanje otpada mogla njegovom prodajom čak ostvariti određenu dobit, a investicijskim ulaganjem u proizvodnju nosača za imobilizaciju enzima dugoročno ostvariti i znatno veći profit.

Među brojnim vrstama otpada nastalim u poljoprivredno-prehrambenoj industriji, prema dostupnoj znanstvenoj literaturi, istraživane su potencijalne sirovine za proizvodnju nosača poput kokosovih vlakana, otpadnih zrna žitarica, taloga kave, ljuske luka, rižine pljevice te otpadne ljuske i/ili membrana jaja (Budžaki i sur., 2022; Girelli i sur., 2020). Naime, trenutna prosječna proizvodnja kokošnjih jaja iznosi oko 87 milijuna tona godišnje (Statista, 2024) s tendencijom porasta. Ako se u obzir uzme da ljuska jaja iznosi 10 – 11 % ukupne mase jaja, jasno je da toliki postotak od spomenute količine predstavlja značajnu količinu otpada koju je potrebno odgovarajuće zbrinuti. Otpad od ljuske jaja sastoji se od kalcificiranog matriksa – ljuske, organskog omotača – membrane te prijanjavajućeg sloja bjelanjka (Strelec, Tomičić, i sur., 2023). Svaki od spomenuta tri strukturna dijela ljuske jaja može zasebno pronaći svoju primjenu kao sekundarna sirovina u proizvodnji visokovrijednih proizvoda uključujući i funkcionalne materijale koji se, između ostalog, nadalje mogu koristiti kao nosači za imobilizaciju enzima. Membrana ljuske jaja predstavlja bogat izvor proteina, kolagenih vlakana, hijaluronske kiseline i drugih vrijednih glikozaminoglikana te zbog toga sve više pronalazi primjenu u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji (Budžaki i sur., 2022; Strelac, Ostojčić, i sur., 2023). Prema dostupnoj literaturi, membrana otpadne ljuske jaja može poslužiti kao nosač za imobilizaciju različitih enzima i to većinom u svrhu proizvodnje biosenzora (Choi i sur., 2001; Choi i Yiu, 2004; Tembe i sur., 2008; Xiao i Choi, 2002; G. Zhang i sur., 2006; Y. Zhang i sur., 2007a).

U okviru ovog doktorskog rada provedeno je određivanje kemijskog sastava otpadne ljuske kokošnjih jaja te njezina obrada s tri odabrane kiseline: 5 % klorovodičnom, 10 % octenom i 15 % *o*-fosfornom kiselinom, a sve u svrhu dobivanja tri različita nosača za imobilizaciju lipaza. U svrhu utvrđivanja utjecaja primijenjenih kiselina na sastav i strukturu nosača na bazi membrane jaja proizvedenim nosačima određen je kemijski i granulometrijski sastav, poroznost te mikrostrukturiranost površine. Prije imobilizacije određena su ključna biokemijska i operativna svojstva slobodnih lipaza iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* namijenjenih za imobilizaciju, a imobilizacija na sva tri pripremljena nosača provedena je primjenom tri tehnike imobilizacije, adsorpcijom te kovalentnim direktnim i indirektnim vezanjem. Na temelju dobivenih rezultata aktivnosti imobiliziranih lipaza te

moгуće desorpcije (otpuštanje enzima sa nosača) odabrane su imobilizirane lipaze koje su potom podvrgnute biokemijskoj i operativnoj karakterizaciji. Na temelju usporedbe svojstava slobodnih i odabranih imobiliziranih lipaza, izdvojene su one najpoželjnijih svojstava za provjeru funkcionalnosti u postupku sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima. Završno, ekonomičnost/prihvatljivost proizvodnje imobiliziranih lipaza na nosače na bazi membrane jaja, najpoželjnijih svojstva, procijenjena je primjenom tehnološke analize.

ZNA
OCJENU

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIPAZE

Lipaze (triacilglicerol hidrolaze, E.C. 3.1.1.3) su enzimi iz skupine hidrolaza čija je glavna metabolička uloga u živim stanicama hidroliza tri-, di- i mono- acilglicerola do masnih kiselina i glicerola. To su svestrani biokatalizatori koji, osim navedenog, pri pogodnim reakcijskim uvjetima kataliziraju esterifikaciju, interesterifikaciju, transesterifikaciju, acidolizu, alkoholizu i aminolizu (Budžaki i sur., 2022; Casas-Godoy i sur., 2012; Chandra i sur., 2020; Mulinari i sur., 2020; Priji i sur., 2016; Sarmah i sur., 2018). U svim slučajevima, katalitička reakcija lipaza se provodi na granici dvofaznog sustava koji proizlazi iz prisutnosti organske hidrofobne faze i vode.

Godine 1848. Claude Bernard otkrio je da sekrecija gušterače, kasnije nazvana pankreasnom lipazom, može emulgirati i saponificirati masne tvari. Nekoliko godina kasnije, samim krajem devetnaestog stoljeća, prve bakterijske lipaze izolirao je nizozemski liječnik i profesor fiziologije Christiaan Eijkmann iz *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus pyocyaneus* i *Bacillus fluorescens*, trenutno poznate kao *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, odnosno *Pseudomonas fluorescens* (Casas-Godoy i sur., 2012). Danas je poznato da lipaze proizvode različiti organizmi, uključujući životinje, biljke i mikroorganizme. Budući da su lipaze ekstrahirane iz životinjske gušterače rijetko dovoljno čiste da bi se mogle koristiti u prehrambenoj industriji, većina proučavanih i industrijski korištenih lipaza dobiva se iz mikrobnih izvora. Mikrobne lipaze se također najviše koriste zbog svoje stabilnosti i visokih prinosa. Osim toga, ove lipaze se mogu lako genetski modificirati te su dostupne zbog brzog rasta mikroorganizama što dovodi i do visoke produktivnosti (Chioke i sur., 2018). Ekspresija lipaza u mikroorganizmima uglavnom je regulirana čimbenicima okoliša kao izvanstanični odgovor na medij koji je lišen hranjivih tvari. Kod većine mikroorganizama prisutnost lipida i masnih kiselina kao izvora ugljika potiče proizvodnju ovih izvanstaničnih enzima.

Molekularna težina lipaza, kao monomernog proteina, kreće se u rasponu od 19 do 60 kDa. Prve strukture lipaze dobivene su iz *Rhizomucor miehei* i humane lipaze gušterače dok je trenutno u bazama podataka dostupno nekoliko stotina sekvenci lipaze (Bora i sur., 2013; Casas-Godoy i sur., 2012; Svendsen, 2000). Kristalne strukture mnogih bakterijskih lipaza do danas su razjašnjene, a većina njih dijeli zajednički obrazac savijanja poznat kao α/β hidrolaza, zatim katalitičku trijadu kao i prisutnost disulfidnih mostova koji daju stabilnost i često su važni za katalitičku aktivnost (Casas-Godoy i sur., 2012; Priji i sur., 2016). Općenito, α/β hidrolaza se sastoji od α spirala ($\alpha A - \alpha F$) pakiranih s obje strane središnje beta ploče sastavljene od osam paralelnih niti ($\beta 1 - \beta 8$), osim druge niti koja je u antiparalelnom smjeru. Aktivno mjesto lipaza

sastoji se od tri katalitička ostatka (trijada), nukleofilnog ostatka, ostatka katalitičke kiseline i ostatka histidina. U lipazama, nukleofil je uvijek serin, dok je katalitička kiselina ili aspartat ili glutamat. Položaj nukleofilnog ostatka često je nakon $\beta 5$ lanca, aspartat/glutamat ostatak je nakon $\beta 7$ lanca, a histidinski ostatak nakon $\beta 8$ lanca (Priji i sur., 2016). Geometrija aktivnih mjesta lipaza uvelike varira i određuje biokemijska svojstva enzima. Radi se o dubokom hidrofobnom džepu u koji se točno uklapaju cijepajuće masne kiseline supstrata, a koji se razlikuje po obliku, veličini, dubini i fizikalno-kemijskim karakteristikama pripadajućih aminokiselina. Prema obliku veznih mjesta, lipaze se mogu podijeliti u tri kategorije (i) u obliku pukotine s veznim mjestom blizu površine proteina (*Rhizomucor* i *Rhizopus*), (ii) u obliku lijevka (lipaza gušterače, *Candida antarctica*, *Burkholderia sp.* i *Pseudomonas cepacia*) i (iii) u obliku tunela (*Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*) (Pleiss i sur., 1998). Lipaze pokazuju aktivnosti ovisne o pH i temperaturi te su općenito najaktivnije pri neutralnom pH 7 te između 30 i 60 °C (Gupta i sur., 2004). Međutim, visoke aktivnosti lipaze mogu pokazati u rasponu od pH 3 do čak pH 12 te u velikom temperaturnom rasponu između 5 i 70 °C (Chandra i sur., 2020; Gupta i sur., 2004; Kumar i sur., 2020; Priji i sur., 2016; Verma i sur., 2012). Poželjno svojstvo lipaza je i stabilnost u organskim otapalima, a iz dostupne literature može se zaključiti da su lipaze općenito stabilne u organskim otapalima poput acetona, etanola i metanola (Gupta i sur., 2004; Verma i sur., 2012).

Bez obzira na vrstu katalizirane reakcije, najopćenitiji opis katalitičkog djelovanja lipaza je „Ping Pong Bi Bi“ mehanizam koji se sastoji od dva glavna koraka: acilacije i hidrolize aciliranog enzimskog kompleksa (Paiva i sur., 2000). Katalitički mehanizam lipaza započinje acilacijom koja se sastoji od prijenosa protona između aspartata, histidina i serinskih ostataka lipaze, uzrokujući aktivaciju hidroksilne skupine katalitičkog serina. Kao posljedica toga, hidroksilni ostatak serina, s naknadno povećanom nukleofilnošću, napada karbonilnu skupinu supstrata što rezultira stvaranjem aciliranog enzimskog kompleksa i otpuštanjem alkoholnog dijela izvornog supstrata. Zatim se odvija korak deacilacije, odnosno hidrolize aciliranog enzimskog kompleksa gdje nukleofil napada enzim, otpuštajući produkt i regenerirajući enzim. Taj nukleofil može biti voda u slučaju hidrolize ili alkohol u slučaju alkoholize (Casas-Godoy i sur., 2012).

Aktivnost lipaza općenito ovisi o dostupnosti velike površine supstrata i zahtijeva blage uvjete. Danas su dostupne brojne metode za određivanje hidrolitičke aktivnosti lipaza, a koje se mogu podijeliti na titrimetrijske, spektroskopske, kromatografske, turbidimetrijske, konduktometrijske, imunokemijske te mikroskopske (Aravindan i sur., 2007). Prema općoj

kemijskoj jednadžbi hidrolize poznato je da se aktivnost lipaza može pratiti preko otpuštanja ili slobodnih masnih kiselina ili glicerola iz triacilglicerola ili estera masne kiseline. Danas je najrašireniji protokol za određivanje aktivnosti lipaza titrimetrijski test s maslinovim uljem kao supstratom zbog jednostavnosti, točnosti i ponovljivosti. Jedinična aktivnost lipaze [U] odnosi se na otpuštanje 1 μ mola slobodne masne kiseline iz emulgiranog maslinovog ulja po minuti pri odgovarajućoj temperaturi i pH vrijednosti.

Selektivnost lipaza je ključna karakteristika ovih enzima i povezana je s njihovom sposobnošću da prepoznaju i preferencijalno kataliziraju određene reakcije. Mogu se razlikovati tri tipa selektivnosti: supstratna selektivnost, regioselektivnost i enantioselektivnost. Supstratna selektivnost povezana je s preferencijama za određeni supstrat; tri-, di- ili mono- acilglicerole. Na primjer, pokazalo se da monoacilglicerol lipaza izolirana iz ljudskih eritrocita hidrolizira samo mono-oleoilglicerol, u usporedbi s odgovarajućim di- i tri- acilglicerolima (Casas-Godoy i sur., 2012). Ova se selektivnost također odnosi na sklonost lipaza prema masnim kiselinama kratkog, srednjeg ili dugog lanca te na stupanj nezasićenosti i potencijalne supstitucije supstrata. Preferencija lipaze za acilne skupine različitih veličina izravno je pod utjecajem oblika njezinog veznog mjesta i prirode aminokiselina koje čine ovo vezno mjesto. Osim toga, lipaze mogu pokazati kemoselektivnost koja je specifičnost lipaza prema određenoj kemijskoj skupini. Regioselektivnost se definira kao preferencija lipaza prema danoj esterskoj vezi u glicerolnoj okosnici triacilglicerola, tj. primarnoj ili sekundarnoj esterskoj vezi. Regioselektivnost može biti sn-1(3) ili sn-2 (Bora i sur., 2013; Casas-Godoy i sur., 2012). Većina mikrobnih lipaza hidrolizira sn-1(3) položaje triacilglicerola, a samo nekoliko njih može hidrolizirati sn-2 položaj. Lipaze sa sn-1(3) specifičnošću proizvode *Rhizopus arrizhus*, *Aspergillus niger*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar* i *Thermomyces lanuginosus* (Casas-Godoy i sur., 2012). Lipaze sa sn-2 specifičnošću su rjeđe, a uključuju one iz roda *Staphylococcus* i lipaze C iz *Geotrichum sp* FO401B (Casas-Godoy i sur., 2012). Nadalje, neke lipaze su nespecifične pa nasumično djeluju na triacilglicerole. Primjeri neregiospecifičnih lipaza su one iz *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Cutibacterium acnes*, *Clerodendrum viscosum* i *Candida antarctica*. Autori Park i Park (2022) ističu da je regioselektivnost lipaza često međusobno nedosljedna budući da je određena komunikacijom između strukture enzima i strukture supstrata, a i da, usprkos tome, drugi vanjski čimbenici kao što su temperatura, sadržaj vode, hidrofobnost organskog otapala, reakcijski medij i imobilizacija, mogu izazvati konformacijske promjene proteinske strukture praćene utjecajem na regioselektivnost. Tako lipaza iz *Pseudomonas fluorescens* pokazuje sn-

1(3) regiospecifičnost za triacilglicerole u mediju emulzije ulja u vodi, u usporedbi s pokazivanjem neregiospecifičnih svojstava u mediju aprotičnog organskog otapala s niskim sadržajem vode. Isto tako, *C. antarctica* lipaza u slobodnoj formi pokazuje sn-1(3) regiospecifičnost, dok njezin imobilizirani oblik nije regiospecifičan (Park i Park, 2022). Prema tome, promjene fizikalno-kemijskih uvjeta mogu uzrokovati konformacijske promjene lipaza te je potrebno unaprijed odrediti i osigurati regioselektivnost enzima pod željenim reakcijskim uvjetima. Enantioselektivnost se odnosi na preferiranje lipaza prema određenom enantiomeru kiralne molekule, u kemijskoj reakciji koja podrazumijeva smjesu racemata, odnosno mješavinu oba enantiomera. Dok druge hidrolaze kao što su proteaze, fosfolipaze, glikozidaze i nukleaze reagiraju isključivo sa samo jednim od enantiomera svojih supstrata, lipaze mogu djelovati u interakciji sa svim enantiomerima. Međutim, prema već spomenutim autorima, Park i Park (2022), lipaze mogu razlikovati enantiomerne položaje acilglicerola i tako se usmjeriti prema jednoj enantioselektivnoj reakciji. Iako enantiomeri imaju vrlo slična kemijska svojstva poput tališta, topljivosti i reaktivnosti, njihova biološka svojstva mogu biti vrlo različita. Tako dok određeni enantiomer pokazuje terapijsko djelovanje, drugi je neaktivan ili čak toksičan. Prema tome, enantioselektivnost je od velikog interesa u farmaceutskoj industriji gdje se lipaze intenzivno koriste.

Upravo zbog svoje svestranosti djelovanja, lipaze se koriste u različitim industrijama poput prehrambene, industrije kože i tekstila, ulja i masti, papira te u kozmetičkoj i već spomenutoj farmaceutskoj industriji kao i pri obradi otpadnih voda bogatih lipidima (Andualema i Gessesse, 2012; Budžaki i sur., 2022; Nimkande i Bafana, 2022). Iako lipaze čine oko 10 % svih industrijskih enzima koji se koriste u trenutnoj industrijskoj proizvodnji, očekuje se porast uporabe ovih enzima zbog njihove svestranosti (Budžaki i sur., 2022). U **Tablici 1** dan je pregled primjena lipaza u različitim industrijskim granama.

Tablica 1 Primjena lipaza u industriji (Chandra i sur., 2020; Choudhury i Bhunia, 2015; Guerrand, 2017; Hasan i sur., 2006; Verma i sur., 2012)

<i>INDUSTRIJA</i>	<i>REAKCIJA</i>	<i>PRIMJENA</i>
Prehrambena industrija	Hidroliza i modifikacija masti	Poboljšanje arome, okusa i kvalitete te produljenje roka trajanja
Kemijska industrija (deterdženti)	Hidroliza masti	Uklanjanje masnih mrlja s tkanina
Farmaceutska industrija	Hidroliza ekspoliesterskih alkohola	Proizvodnja raznih međuproizvoda koji se koriste u proizvodnji lijekova
Kozmetička industrija	Sinteza	Proizvodnja emulgatora i ovlaživača
Poljoprivredna industrija	Esterifikacija	Proizvodnja herbicida
Tekstilna industrija	Hidroliza	Proizvodnja tkanine s većom upijajućom moći za poboljšanu ravnomjernost u bojenju
Industrija papira	Sinteza	Izmjena sirovog škroba
Industrija kože	Hidroliza	Odmaščivanje kože
Eko-industrija	Hidroliza i transesterifikacija ulja i masnoća	Uklanjanje tvrdih mrlja i hidroliza ulja i masti
Industrija goriva	Transesterifikacija	Proizvodnja biodizela

U prehrambenoj industriji (**Tablica 2**), gdje se koristi široka paleta različitih enzima, lipaze se obično koriste u mesnim, pekarskim i mliječnim proizvodima i to ponajviše za razvoj i poboljšanje tvari aroma okusa te za produljenje roka trajanja proizvoda. Većina aktivnosti lipaza usmjerena je prema proizvodnji tvari aroma hrane koje uspješno zamjenjuju složenije prirodne aromatske spojeve.

Tablica 2 Primjena lipaza u prehrambenoj industriji (Aravindan i sur., 2007; Guy i Sahi, 2006; Mehta i sur., 2021; Rajendran i sur., 2009)

<i>INDUSTRIJA</i>	<i>PRIMJENA</i>
Mliječna industrija	Hidroliza mlijeka, masti, zrenje sira i modifikacija masti maslaca
Pekarska industrija	Poboljšanje okusa i produženje roka trajanja
Industrija pića	Poboljšanje arome
Preljevi za hranu	Poboljšanje kvalitete
Mesna industrija	Razvoj okusa
Proizvodnja kolača	Povećanje viskoznosti tijesta, smanjenje vremena prozračivanja tijesta; povećanje volumena kolača uz zadržavanje fine teksture mrvica; povećanje svježine i dugotrajnosti kolača
Industrija ulja	Modifikacija ulja

U mliječnoj industriji lipaze se prvenstveno koriste za hidrolizu mliječne masti. Nadalje, za modificiranje duljine lanca masnih kiselina s ciljem poboljšanja okusa raznih sireva kao i za ubrzavanje procesa zrenja sira i lipolizu maslaca, masti i vrhnja. Slobodne masne kiseline

nastale djelovanjem lipaza na mliječnu mast u mnogim mliječnim proizvodima, osobito mekim sirevima, doprinose razvoju specifičnih tvari aroma okusa. Enzimski modificirani sir proizvodi se postupkom inkubacije sira u prisutnosti enzima na povišenoj temperaturi s ciljem razvoja koncentrirane arome katalizirane lipazom za daljnju upotrebu kao sastojak u drugim proizvodima, poput umaka, juha i grickalica pri čemu je koncentracija masti i do 10 puta veća nego u normalnom siru. Lipaze iz *Penicillium roqueforti* široko se primjenjuju u poboljšanju okusa plavog sira, budući da mogu sintetizirati metil ketone koji su odgovorni za njegov karakterističan okus. Također su razvijeni katalitički enzimski procesi za reakcije interesterifikacije različitih jestivih ulja poput suncokretovog, kako bi se proizvele masti koje imaju sastav i svojstva kao kakao maslac (Guerrand, 2017). Takvi se proizvodi nazivaju ekvivalenti kakao maslaca ili zamjene za kakao maslac. Zahvaljujući svojoj strukturi, kakao maslac pokazuje jedinstvena svojstva u prehrambenim proizvodima (osjećaj u ustima, ponašanje pri topljenju, itd.) gdje se uvelike i koristi. Međutim, opskrba kakao maslacem je općenito neizvjesna uz kontinuiranu promjenu u cijeni. Upravo je iz tog razloga još 1976. godine Unilever patentirao postupak proizvodnje zamjene za kakao maslac pomoću imobilizirane *Rhizomucor miehei* lipaze reakcijom transesterifikacije (zamjene plamitinske kiseline stearinskom kiselinom) u željeni produkt, stearinsko-oleinsko-stearinski triacilglicerol (Aravindan i sur., 2007). Osim zamjene za kakao maslac, betapol odnosno zamjena za masnoću iz humanog mlijeka, bio je prvi komercijalni proizvod dobiven tretmanom tripalmitina s nezasićenim masnim kiselinama specifičnim za sn-1(3) lipaze. Za razliku od biljnih ulja i masti kravljeg mlijeka, u masti humanog mlijeka je palmitinska kiselina najzastupljenija zasićena masna kiselina uglavnom esterificirana na sn-2 poziciji triacilglicerola, dok su nezasićene masne kiseline na vanjskim pozicijama. Profil masnih kiselina masti humanog mlijeka ima presudan učinak na njegovu probavljivost i crijevnu apsorpciju u dojenčadi. Proizvodnju zamjene za masnoću u humanom mlijeku kataliziraju sn-1(3) lipaze u reakciji acidolize tripalmitina, masnoće palminog ulja, palminog stearina ili svinjske masti (bogate palmitinskom kiselinom u sn-2 poziciji) sa slobodnim masnim kiselinama iz različitih izvora (Guerrand, 2017).

U pekarstvu se lipaze primarno koriste za poboljšanje okusa pekarskih proizvoda oslobađanjem kratkolančanih masnih kiselina u reakcijama esterifikacije. Nadalje, furfural acetat se koristi kao sredstvo za poboljšanje okusa u hrani i pekarstvu te za produljenje roka valjanosti većine pekarskih proizvoda, a koji se sintetizira katalitičkim djelovanjem lipaze iz *Burkholderia cepacia*. Svi hidrolitički enzimi, uključujući i lipaze, pokazali su se učinkovitima u smanjenju

početne čvrstoće i povećanju specifičnog volumena kruha. Pored navedenog, modifikacija masti i ulja danas je jedno od najvažnijih područja u prehrambenoj industriji koja zahtijeva nove zelene tehnologije, a gdje lipaze također pronalaze važnu primjenu. Prilagođena biljna ulja s nutritivno važnim triacilglicerolima i promijenjenim fizikalno-kemijskim svojstvima imaju veliki potencijal na tržištu budućnosti. Kvalitetno lošija te time i jeftinija ulja također se mogu poboljšati djelovanjem lipaza za potrebe proizvodnje nutritivno važnih strukturiranih triacilglicerola poput spomenute zamjene za kakao maslac, niskokaloričnih triacilglicerola i ulja obogaćenih oleinskom kiselinom. Može se pretpostaviti da će modifikacije posredovane lipazama vjerojatno zauzeti istaknuto mjesto i u naftnoj industriji za krojenje strukturiranih lipida budući da su enzimske modifikacije specifične i mogu se provesti u umjerenim reakcijskim uvjetima. Obzirom da lipaze omogućuju modificiranje svojstava lipida mijenjanjem položaja lanaca masnih kiselina u glicerolu i zamjenom jednog ili više njih novima, relativno jeftin i manje poželjan lipid može se modificirati u mast veće nutritivne vrijednosti (Verma i sur., 2012). Upravo tako se proizvodi margarin bez trans- masnih kiselina iz triacilglicerola ili se triacilgliceroli modificiraju tako da sadrže masne kiseline srednjeg lanca (6 – 12 atoma ugljika) na položajima sn-1 i sn-3 te dugolančane masne kiseline na položaju sn-2 kako bi imale nižu kalorijsku vrijednost (21 – 29 kJ/g) od konvencionalnih masti i ulja (38 kJ/g) (Nunes i sur., 2011). Za potrebe prehrambene industrije lipaze se također koriste za uvođenje Ω -3 masnih kiselina kao funkcionalnih sastojaka u proizvodima poput keksa, kruha, sladoleda itd., ili za otpuštanje Ω -3 masnih kiselina hidrolizom odabranih ribljih ulja.

Lipaze se, također, koriste za sintezu monoacilglicerola kao sirovine za jestive filmove i lubrikante, biosufrakante za stabilizaciju emulzija u preljevima za salate, za proizvodnju bioaktivnih komponenti kao što su vitamini i sekundarni metaboliti koji imaju antioksidativna svojstva u različitim gelovima, kao i pri proizvodnji vina s povećanim udjelom alkohola i poboljšanim okusom (Moore i Akoh, 2017; Negi, 2019). U današnje doba, kada otpad predstavlja jedan od glavnih globalnih problema, zanimljivo je istaknuti i da se hidrolizom otpada od hrane pomoću lipaza može proizvoditi energija u obliku biometana (Meng i sur., 2015). Osim biometana lipaze se koriste i za proizvodnju biodizela.

Jedan od najprihvaćenijih te najviše korištenih procesa proizvodnje biodizela je kemijski katalizirana reakcija transesterifikacije triacilglicerola uz prisustvo metanola i natrijevog hidroksida kao katalizatora, tijekom koje nastaje biodizel, odnosno smjesa metilnih estera masnih kiselina (eng. *Fatty Acid Methyl Esters*; FAME) i glicerol kao nusprodukt. Iskorištenje kemijski katalizirane reakcije je vrlo visoko, međutim, nedostaci su velika potrošnja energije

obzirom da se kemijska reakcija odvija na temperaturama od oko 70 °C te potrošnja velikih količina vode za izdvajanje biodizela iz reakcijske smjese što iziskuje dodatne troškove za zbrinjavanje otpadne vode. S druge strane, kemijska reakcija transesterifikacije je ograničena na polazne sirovine visoke čistoće što podrazumijeva nizak udio slobodnih masnih kiselina (razina jestivih ulja) te nizak udio vode (ispod 2 %) ili u protivnom nastaju dodatni nusprodukti, sapuni (reakcija saponifikacije: slobodne masne kiseline i NaOH) koji otežavaju izdvajanje biodizela iz reakcijske smjese te iziskuju dodatne količine vode za pročišćavanje.

Rješenje se ogleda u uvođenju biokatalizatora, odnosno lipaza. Lipazama se mogu zamijeniti kemijski katalizatori čime se smanjuje energetska potrošnja proizvodnje biodizela jer lipaze djeluju na znatno nižim temperaturama (oko 40 °C). Obzirom da lipaze djeluju na granici faza te im je za optimalnu katalitičku aktivnost potrebna voda za hidrataciju znači da sirovina ne mora biti visokog stupnja čistoće kao što je to u slučaju kemijski katalizirane reakcije. Nadalje, slobodne masne kiseline prisutne u sirovini u slučaju transesterifikacije katalizirane lipazama ne ometaju nastanak konačnog produkta i potrošnju katalizatora u reakciji saponifikacije kao što je to slučaj kod kemijski katalizirane reakcije. Dakle, kao supstrat za lipaze u proizvodnji biodizela mogu se koristiti nejestiva ulja, otpadana ulja od prženja te ostala ulja nižeg stupnja čistoće od jestivih ulja koja sadrže odgovarajući udio slobodnih masnih kiselina i vode. U enzimskoj sintezi biodizela, mnogi čimbenici utječu na učinkovitost reakcije, kao što su koncentracija lipaza, temperatura, udio vode, udio slobodnih masnih kiselina, prisutnost otapala, alkohol te omjer ulje:alkohol. Svakako treba uzeti u obzir i mogućnost smanjenja aktivnosti lipaza u prisutnosti kratkolančanih alkohola, poput etanola i metanola koji su najčešće korišteni alkoholi u procesu proizvodnje biodizela zbog svoje dostupnosti i niske cijene. Kako bi se izbjegao negativan učinak alkohola na lipaze, moguće je nekoliko strategija, uključujući postupno dodavanje metanola u reakcijsku smjesu, upotrebu metil acetata ili etil acetata kao akceptora acila ili upotrebu organskih otapala (Cavalcante i sur., 2021). Postupno dodavanje metanola u reakcijsku smjesu jedna je od najčešćih i najraširenijih strategija. Kao varijanta postupnog dodavanja, kontinuirano dodavanje također može dovesti do značajnog poboljšanja konverzije triacilglicerola u biodizel (Ko i sur., 2012). Prema tome, aktivnost i stabilnost lipaza ovisi o prirodi upotrijebljenog alkohola budući da isti može promijeniti morfologiju enzima ili njegovo aktivno mjesto, vežući se u neposrednoj blizini aktivnih mjesta, utječući na proces molekularnog prepoznavanja kompleksa enzim – supstrat. Stoga je očito da se odabir odgovarajućeg alkohola za sintezu biodizela provodi sukladno prirodi i porijeklu lipaze, a u slučaju imobiliziranog biokatalizatora i o vrsti nosača i protokolu imobilizacije

(Cavalcante i sur., 2021). Zbog sve veće potražnje za energijom uz potrebu za smanjenjem ovisnosti o fosilnim gorivima, prijeko je potreban prijenos biokatalitičke proizvodnje biodizela iz laboratorijskog u industrijsko mjerilo. Upravo je ovdje teško zamisliti korištenje lipaza u slobodnom obliku, kako zbog potencijalne potrebne velike količine istih tako i zbog njihove visoke cijene. Dokazano je da su imobilizirane lipaze moćan alat u proizvodnji biodizela zbog njihove povećane stabilnosti u odnosu na slobodne lipaze te mogućnosti ponovne uporabe.

Prema dosad navedenim primjenama lipaza u industrijskoj proizvodnji, jasno je da se one mogu koristiti kao slobodni (homogeni) ili kao imobilizirani (heterogeni) biokatalizatori. Iako je primjena lipaza u odnosu na kemijske katalizatore u industrijskoj proizvodnji poželjnija zbog visoke specifičnosti obzirom na supstrat i tip reakcije koji se provodi, ekološku prihvatljivost i energetska nezahtjevnost što sve utječe na sniženje cijene proizvodnog procesa, visoka cijena lipaza kao i vrlo česta nemogućnost ponovne uporabe slobodnih lipaza predstavlja ključnu prepreku za širu uporabu u industrijskoj proizvodnji. Navedeno se može nadići primjenom imobiliziranih lipaza koje se po završenom proizvodnom procesu mogu lako izdvojiti iz reakcijske smjese te ponovno uporabiti u sljedećem proizvodnom ciklusu, ili se čak mogu koristiti u kontinuiranim procesima proizvodnje. Štoviše, imobilizacija može utjecati i na poboljšanu operativnu stabilnost lipaza, kao i mogućnost njihova korištenja u širokom rasponu vrijednosti pH i temperature (Franssen i sur., 2013; Mateo i sur., 2007). Upravo zbog svega navedenog, očekuje se sve veća upotreba imobiliziranih lipaza, posebice u kemijskoj industriji za brzorastuće područje sinteze *zelenog* biodizela, ali i u obradi/predtretmanu otpadnih voda iz prehrambene industrije s visokim udjelom masti. Imobilizirane lipaze otvaraju mogućnost razvoja novih proizvodnih tehnologija, npr. prijelazom sa šaržnih na kontinuirane procese. Uvođenjem kontinuiranih umjesto šaržnih procesa, veličina reaktora i investicijski troškovi se smanjuju, olakšavajući kontrolu procesa s malim varijacijama u kvaliteti proizvoda. U okviru koncepta kontinuiranih biokatalitičkih reaktora posebna se pozornost pridaje mikrostrukturiranim reaktorima, jer oni nude značajnu prednost intenziviranja prijenosa mase i topline (Budžaki i sur., 2022).

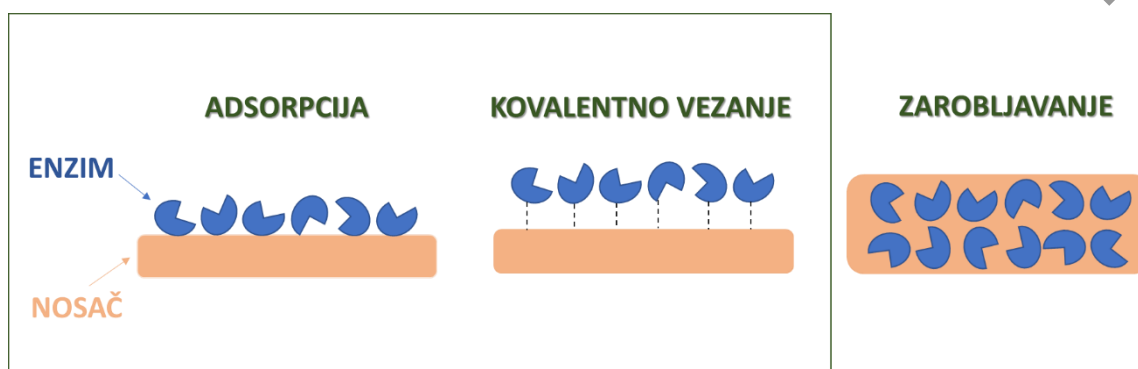
2.2. IMOBILIZACIJA

Prema Ahmadu i Sardaru (2015) imobilizirani enzim otkriven je 1916. godine kada se pokazalo se da se aktivnost invertaze ne mijenja u slučaju njezine adsorpcije na čvrstu matricu poput ugljena ili aluminijevog hidroksida. Upravo ova činjenica dovela je do razvoja trenutno poznatih tehnika imobilizacije enzima.

Imobilizacija enzima je proces kojim se njegova pokretljivost, u odnosu na prirodno okruženje, ograničava na najčešće čvrstu podlogu (nosač) koja je kemijski drugačija od supstrata (reaktanta) ili produkta, a kojim se istovremeno doprinosi njegovu koncentriranju na znatno manjoj površini (Mohidem i sur., 2023). Na takav način omogućena je brža provedba reakcije od interesa, i to iz razloga što na znatno manjoj površini postoji više izvršitelja (enzima) koji tu reakciju provode. Ujedno se vezanjem enzima na čvrstu podlogu javlja potencijal višestrukog korištenja, kao i mogućnost poboljšanja operativnih svojstava enzima i vođenja kontinuiranih procesa. Osim navedenih prednosti imobilizacije enzima, primarni nedostaci korištenja imobiliziranih enzima uključuju potencijalno smanjenje aktivnosti enzima tijekom procesa imobilizacije, curenje enzima (otpuštanje sa nosača), visoku cijenu nosača te njegovu potencijalnu razgradivost u reakcijskoj smjesi što uzrokuje sekundarno onečišćenje reakcijske smjese (Mohidem i sur., 2023). Stoga je potrebno i dalje ulagati u istraživanja s ciljem poboljšanja katalitičke aktivnosti imobiliziranih enzima, njihove stabilnosti, jednostavnog izdvajanja iz reakcijske smjese te mogućnosti ponovne uporabe u istom ili drugom proizvodnom procesu (Mohidem i sur., 2023). Odabir optimalnih uvjeta imobilizacije je najvažniji kriterij za dobivanje veće efikasnosti imobilizacije, odnosno većeg vezanja enzima za nosač. Neki od ključnih uvjeta su vrijeme imobilizacije, pH vrijednost i odgovarajući pufer, temperatura te odsutnost inhibitora (Mateo i sur., 2007). Prema tome, iako se sama imobilizacija može provesti u vrlo kratkom roku, od svega nekoliko minuta (Barbosa i sur., 2015), interakcija u više točaka između nekomplementarnih dijelova enzima i nosača je spor i vremenski ovisan proces koji zahtijeva ispravno poravnanje skupina smještenih u već imobiliziranom ili djelomično imobiliziranom enzimu te čvrstoj površini nosača. Nadalje, iako se u mnogim slučajevima imobilizacija može provesti pri neutralnoj pH vrijednosti, inkubacija pri višim, odnosno alkalnim pH vrijednostima, može poboljšati reaktivnost nukleofila proteina te je stoga pogodnija za postizanje visoke efikasnosti imobilizacije. Isto tako, iako se imobilizacija u dostupnoj literaturi može provoditi pri sobnoj temperaturi (Choi, 2005; D'Souza i sur., 2013; Girelli i Scuto, 2021; Singh i sur., 2016), umjereno visoka temperatura od 30 do 37 °C može

pogodovati vibraciji enzima i nosača i tako povećati mogućnosti dobivanja više veza između istih.

Za imobilizaciju enzima danas se koriste različite tehnike koje se obzirom na način vezanja i/ili ograničavanja pokretljivosti enzima generalno mogu svrstati u tri osnovne skupine (**Slika 1**): (i) imobilizaciju adsorpcijom, (ii) imobilizaciju kovalentnim vezanjem te (iii) imobilizaciju zarobljavanjem enzima.



Slika 1 Tehnike imobilizacije obzirom na način vezanja i/ili ograničavanja pokretljivosti enzima

U sklopu ovog doktorskog rada lipaze su imobilizirane s prve dvije tehnike, odnosno adsorpcijom te kovalentnim direktnim i indirektnim vezanjem. Tehnika zarobljavanjem enzima nije odabrana zbog same prirode nosača, budući da ona općenito podrazumijeva: (i) zarobljavanje enzima u polimernoj mreži koja dopušta supstratu i produktima da prođu do aktivnog mjesta enzima, ali zadržava enzim, (ii) zarobljavanje enzima u strukturama sličnim organelama, ili (iii) sidrenje enzima u fosfolipidnom sloju (Budžaki i sur., 2022).

2.2.1. IMOBILIZACIJA ADSORPCIJOM

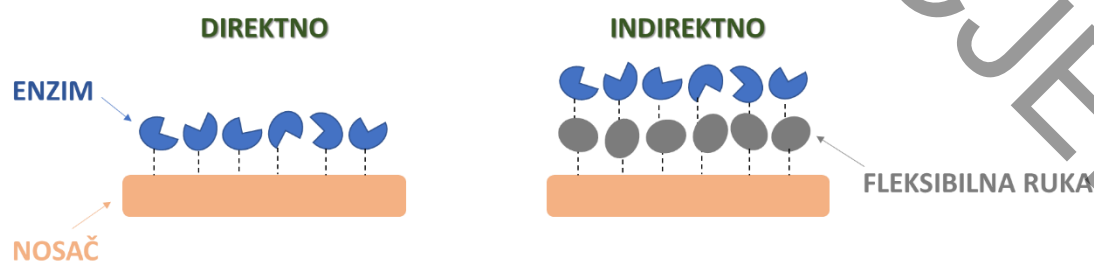
Imobilizacija adsorpcijom je tehnika imobilizacije koja se temelji na uspostavljanju relativno *slabih veza* između nosača i enzima. Pri tome slabe veze između nosača i enzima uključuju hidrofobne, Van der Waalsove i/ili vodikove veze između aminokiselinskih bočnih ogranaka enzima i komplementarnih skupina funkcionalnih nosača, ali isto tako i nešto jače, i svakako poželjnije veze ionskog (elektrostatskog) karaktera (Ahmad i Sardar, 2015; Mohidem i sur., 2023; Nguyen i Kim, 2017). Princip imobilizacije adsorpcijom uključuje pripremu enzima u puferu odgovarajućeg pH i ionske jakosti te dodavanje čvrstog nosača na određeni vremenski period pod odgovarajućim uvjetima koji održavaju aktivnost enzima. Po završetku imobilizacije, slabo vezani ili nevezani enzimi se uklanjaju s površine nosača ispiranjem

puferom. Prema tome, imobilizacija adsorpcijom je vrlo jednostavan i ekonomičan proces i općenito neinvazivan prema aktivnosti enzima jer ne uključuje funkcionalizaciju nosača (Nguyen i Kim, 2017). Upravo iz ovog razloga ne čudi činjenica da je većina komercijalno dostupnih imobiliziranih enzima upravo imobilizirana adsorpcijom. Međutim, ova tehnika ima i nedostataka, a to je prije svega povezanost enzima za nosač slabim fizičkim vezama te u slučaju promjene temperature, pH ili ionske jakosti pufera mogu rezultirati ispiranjem, odnosno otpuštanjem (curenjem enzima sa nosača) (Ahmad i Sardar, 2015). Ovaj se neželjeni učinak ispiranja u industrijskim uvjetima visokih koncentracija reagensa i proizvoda, kao i visoke ionske jakosti može čak i ubrzati. U navedenim uvjetima potrebno je povećanje snage interakcije između enzima i nosača bez smanjenja enzimske aktivnosti što se može postići povećanjem hidrofobnih ili elektrostatskih sila. Jače hidrofobne interakcije mogu se postići korištenjem hidrofobnih nosača ili hidrofobnih enzima, dok se jake elektrostatske interakcije mogu postići korištenjem visoko nabijenih nosača ili nabijenih proteina (Cavalcante i sur., 2021). Također, zbog moguće pojave adsorpcije enzima u više slojeva (eng. *multy layer adsorption*) i samim time ograničavanjem njegove aktivnosti, potrebno je optimizirati vrijeme i ostale uvjete procesa imobilizacije.

2.2.2. IMOBILIZACIJA KOVALENTNIM VEZANJEM

Čvrsto povezivanje enzima s nosačem postiže se primjenom imobilizacije kovalentnim vezanjem. Funkcionalne skupine prisutne u enzimima povezuju se s nosačem obzirom na to da one nisu odgovorne za katalitičku aktivnost. Reakciju vezanja enzima na nosač (imobilizacija) potrebno je izvesti u uvjetima koji ne uzrokuju gubitak enzimske aktivnosti na način da korišteni reagensi ne utječu na aktivno mjesto enzima (Ahmad i Sardar, 2015). Kovalentna veza najčešće nastaje kao rezultat reakcije između ϵ -amino skupina bočnih ogranaka lizina i aldehidnih, karboksilnih ili epoksidnih skupina nosača, ili između karboksilnih skupina bočnih ogranaka enzima i amino skupina nosača. Među čimbenicima koji utječu na aktivnost kovalentno vezanog enzima su veličina i oblik materijala nosača, priroda metode vezanja, sastav materijala nosača i specifični uvjeti tijekom vezanja (Cavalcante i sur., 2021). Također, smjer vezanja enzima je presudan za određivanje enzimske stabilnosti, budući da se veće vrijednosti aktivnosti enzima postižu kada aminokiseline aktivnog centra nisu uključene u vezanje na nosač (Cavalcante i sur., 2021). Budući da je fizičko vezanje enzima, adsorpcijom, na nosače preslabo za fiksiranje proteina na nosač, što nadalje rezultira manje stabilnim biokatalizatorom koji je osjetljiv na istjecanje u industrijskim procesima, kovalentnim vezanjem može se riješiti ovaj problem jer se stvara jača veza između enzima i nosača

dopuštajući tako više ciklusa ponovne uporabe imobiliziranog enzima. S druge strane, ovakva imobilizacija je nepovratna (ireverzibilna) i može rezultirati znatnim gubitkom aktivnosti enzima tijekom samog postupka imobilizacije. Kovalentna imobilizacija može se provoditi direktno ili indirektno (Slika 2).



Slika 2 Imobilizacija direktnim i indirektnim kovalentnim vezanjem

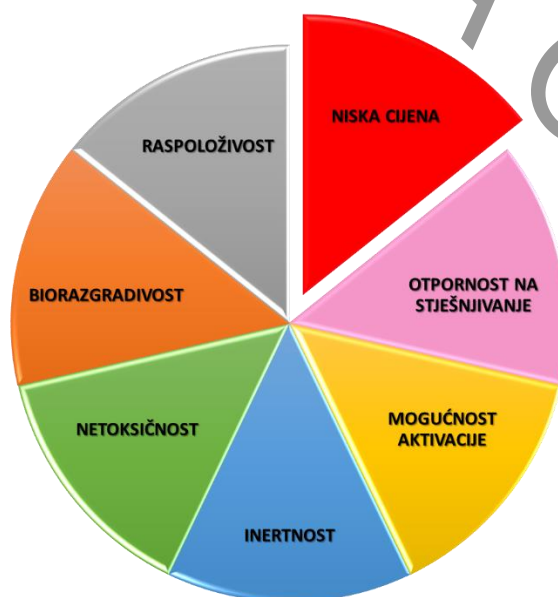
Direktna kovalentna imobilizacija enzima podrazumijeva kovalentno vezanje enzima direktno na aktiviranu funkcionalnu skupinu nosača, a indirektna kovalentno vezanje enzima na aktiviranu fleksibilnu kemijsku strukturu (tzv. fleksibilnu ruku; eng. *spacer*) vezanu na nosač. Umetanje fleksibilne ruke daje veći stupanj mobilnosti imobiliziranom enzimu tako da se njegova aktivnost može poboljšati u usporedbi s aktivnošću izravno vezanog enzima (Ahmad i Sardar, 2015). Međutim, u oba slučaja kovalentnog vezanja (direktno i/ili indirektno), nosač je prvo potrebno kemijski modificirati/aktivirati kako bi se potom na aktivirani nosač ili na nosač s aktiviranom fleksibilnom rukom kovalentno vezao enzim. Za aktivaciju nosača danas se koriste različiti spojevi uključujući trezil- i sulfonil- klorid, cijanogen-bromid, epiklorhidrin, glutaraldehid, *N*-hidroksi-sukcinilimid, natrijev perjodat, hidrazin, β -merkaptotanol i ditiotritol, dok se kao *fleksibilne ruke* nosača najčešće koriste glutaraldehid, heksametilendiamin, te ravnolančani ili razgranati polietilenimini različite molekulske mase.

Promotrite li se prednosti i nedostaci gore navedenih vrsta imobilizacije enzima obzirom na njihovu cijenu i zahtjevnost, može se reći da je imobilizacija adsorpcijom najjeftinija i najjednostavnija metoda imobilizacije, dok su imobilizacija kovalentnim vezanjem kao i imobilizacija zarobljavanjem enzima znatno složenije zbog dodatnih postupaka, a samim time i skuplje. S druge strane, sa stanovišta stabilnosti kao i višestruke iskoristivosti imobiliziranih enzima, enzimi imobilizirani adsorpcijom često se mogu prikazati poprilično nestabilnima u proizvodnim procesima budući da se imobilizirani enzimi mogu lako odvojiti od nosača što je rjeđa pojava u slučaju imobilizacije zarobljavanjem enzima, a iznimno rijetka u slučaju imobilizacije kovalentnim vezanjem (Mohidem i sur., 2023). Shodno tomu, i višestruka iskoristivost čvršće povezanih enzima je veća. Sve navedeno može se općenito primijeniti i na

imobilizaciju lipaza. Tako se imobilizacija lipaza adsorpcijom pokazuje manje učinkovito kada je u pitanju stupanj višestruke uporabe, a uvođenje *fleksibilne ruke* u slučaju indirektno kovalentne imobilizacije najčešće dovodi do povećane aktivnosti lipaza na nosaču u odnosu na direktno vezanu lipazu (Brígida i sur., 2008; Cespugli i sur., 2018; Corici i sur., 2016; Ittrat i sur., 2014).

2.3. NOSAČI ZA IMOBILIZACIJU

Materijali koji se najčešće koriste kao nosači za imobilizaciju enzima su keramika, spužvasto staklo, celuloza, pijesak, sintetizirani polimeri, drveni ugljen, metalni oksidi, nehrđajući čelik i polimerni gel, a mogu se podijeliti u tri kategorije kao anorganski, organski i organski sintetski nosači (Hettiarachchy i sur., 2018). Anorganski nosači uključuju hidroksiapatit, cirkonij, bentonit, titanijev oksid, aluminijski oksid, nikel ili niklov oksid, silikagel, aktivni ugljen, kaolinit, staklo i keramiku te su obično manje reaktivni od organskih, međutim njihova toplinska stabilnost kao i mehanička svojstva te otpornost na organske reagense i mikrobiološku kontaminaciju su vrlo važne prednosti. S druge strane, organski nosači poput celuloze, kitozana, hitina, dekstrana, karagenana, želatine, alginata i škroba su podložniji mikrobiološkoj kontaminaciji. Međutim, njihova niska cijena i dostupnost nadilaze navedene nedostatke. Organski sintetski polimeri koji se koriste kao nosači su polipropilen, poliamid, polivinil, poliakrilat, polistiren, najlon i kopolimeri iz kombinacija etilena i maleinskog anhidrida ili polipeptida, polialdehida i stirena. Organski sintetski nosači vrlo su prikladni za korištenje unutar širokog spektra enzimskih postupaka, budući da se mogu proizvesti sa željenim fizikalno-kemijskim svojstvima. Osim toga, nisu osjetljivi niti na mikrobiološku kontaminaciju. Dostupni su na tržištu s različitim svojstvima i u različitim oblicima, poput jednostavnih smola ili kao polimeri s nizom opcija kiselih i bazičnih funkcionalnih skupina ili čak kao prethodno aktivirani nosač.



Slika 3 Najpoželjnija svojstva nosača za imobilizaciju enzima

Prema literaturi, poželjna veličina čestica nosača za imobilizaciju enzima trebala bi biti u rasponu od 20 do 500 μm (Strelec i sur., 2024), a ostala najpoželjnija svojstva nosača za imobilizaciju enzima prikazana su **Slikom 3**. Ona uključuju otpornost na stješnjivanje, mogućnost aktivacije, kemijsku inertnost prema enzimu i okruženju u reakcijskoj smjesi, biorazgradivost, netoksičnost, raspoloživost i ponajviše nisku cijenu (Ismail i Baek, 2020; Jiang i sur., 2017; Zdarta i sur., 2018). Obzirom da većina komercijalno dostupnih nosača ima relativno visoku cijenu, postoji potreba za pronalaskom jeftinijih. Upravo ovdje moguću primjenu pronalaze različiti otpadi i/ili nusproizvodi poljoprivredno-prehrambene industrije. Prema dostupnoj literaturi, postoje brojni nosači na bazi otpada poput kokosovih vlakana, otpadnih zrna žitarica, taloga kave, ljuski luka, rižine pljevice, a isto tako i otpadne ljuske jaja ili membrane jaja (Budžaki i sur., 2022; Girelli i sur., 2020).

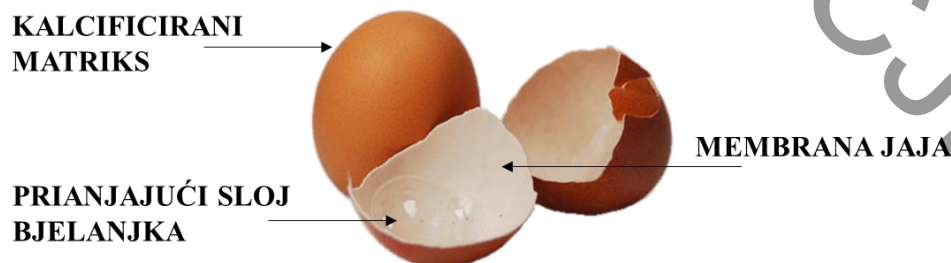
2.4. LJUSKA JAJA KAO OTPAD

Ljuska kokošnjih jaja ostatak je prvenstveno poljoprivredne proizvodnje, obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava i obrta, ali isto tako i restorana i domaćinstava. Godišnja proizvodnja kokošnjih jaja je u 2022. godini dosegla 65 milijuna tona godišnje (od toga u Europskoj uniji oko 11 milijuna tona, od čega oko 37 tisuća tona u Republici Hrvatskoj) i procjenjivalo se da će taj broj porasti na 90 milijuna tona do 2030. godine (Budžaki i sur., 2022; Strelac, Tomičić, i sur., 2023). Međutim, svega dvije godine kasnije, odnosno trenutačna prosječna proizvodnja kokošnjih jaja iznosi oko 87 milijuna tona godišnje (Statista, 2024) iz

čega je jasno vidljivo da ovaj broj raste brže od predviđenog. Ako se u obzir uzme da ljuska jaja iznosi 10 – 11 % ukupne mase jaja, jasno je da otpadna ljuska jaja predstavlja značajnu količinu otpada koju je potrebno odgovarajuće zbrinuti. Sukladno izvoru njena nastanka, nastalim količinama i zakonskoj regulativi, ljuska jaja klasificira se u dvije osnovne skupine: (i) komunalni otpad te (ii) nusproizvod životinjskog podrijetla kategorije 3, koji nije namijenjen prehrani ljudi. Pri tome se ljuska jaja koja je nastala kao kuhinjski otpad iz kućanstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata može svrstati u nekoliko podskupina komunalnog otpada, uključujući miješani komunalni otpad i biorazgradivi otpad iz kuhinja i kantina, dok ljuska jaja nastala u industriji, farmama koka nesilica, valionicama pilića te poljoprivrednim obiteljskim gospodarstvima predstavlja nusproizvod životinjskog podrijetla kategorije 3. Otpadna ljuska jaja se uglavnom koristi u gnojivima (26,6 %) i stočnoj hrani (21,1 %) kao dodatni izvor kalcija, te se odlaže na odlagališta u kategoriji komunalnog otpada (26,3 %) i na druge načine uključujući spaljivanje (15,8 %) (Kattimani i sur., 2022). Iz ovoga je jasno da glavnina ljuske jaja završava na odlagalištima otpada, sa i/ili bez nekog oblika obrade, pri čemu, osim što opterećuje okoliš, ujedno predstavlja i dodatni financijski izdatak za onoga koji ju stvara. Tako u slučaju domaćinstava, restorana, ugostiteljskih i maloprodajnih objekata čini udio u rashodu zbrinjavanja komunalnog otpada, a u slučaju industrijske proizvodnje, valionica te farmi koka nesilica u troškovima pravilnog skladištenja prije zbrinjavanja, troškovima odvoza i zbrinjavanja te troškovima dodatno propisanih naknada. Međutim, uzmu li se u obzir podaci o kemijskom sastavu ljuske jaja, postaje jasno da ona predstavlja nadasve vrijednu sirovinu za proizvodnju čitave palete različitih proizvoda, čemu u prilog govore brojna istraživanja i patentni o mogućnosti njezine uporabe (Aina i sur., 2022; M. M. Cordeiro i T. Hincke, 2011; Mignardi i sur., 2020; A. Ribeiro i sur., 2015; Vandeginste, 2021).

Ljuska jaja se strukturno gledajući može podijeliti u tri fizički različita dijela (sa udjelima na bazi suhe tvari): kalcificirani matriks (~ 92 %), na koji je s unutrašnje strane vezana membrana ljuske jaja (~ 3 %), a na koju je prilijepljen prijanjajući sloj bjelanjka zaostao nakon odvajanja bjelanjka i žumanjka od cjelovitog jajeta (~ 3 %) (**Slika 4**) (Strelec, Ostojčić, i sur., 2023). S druge strane, ljuska jaja koja nastaje nakon pripreme kuhanih jaja ili nakon izljudžanja pilića u valionicama sadrži samo dva strukturno različita dijela, odnosno kalcificirani matriks i membranu jaja. Svaki od spomenuta tri strukturna dijela ljuske jaja mogu pronaći svoju primjenu kao sekundarne sirovine u proizvodnji visokovrijednih proizvoda uključujući i

funkcionalne materijale koji se, između ostalog, nadalje mogu koristiti kao nosači za imobilizaciju enzima.



Slika 4 Struktura ljuske jaja

U kalcificiranom matriksu dominira kalcijev karbonat u obliku kristala kalcita pomiješanih s organskim materijalom ljuske jaja, dok ostatak čine proteini, kalcijev fosfat, magnezijev karbonat te ugljikohidrati, lipidi i elementi u tragovima (Faridi i Arabhosseini, 2018; Hincke i sur., 2012; Mignardi i sur., 2020; Mittal i sur., 2016; Tsai i sur., 2006; Waheed i sur., 2019). Pri tome treba naglasiti da se ugljikohidratna komponenta prvenstveno nalazi vezana za proteinska vlakna matriksa, a prema Nakano i sur. (2003) sadrži značajne količine uronske i sijalinske kiseline te kondroitin-sulfata. Membranu jaja čine ponajviše proteini, od čega kolagen i značajne količine glikozaminoglikana, odnosno glukozamin, kondroitin te hijaluronska kiselina (Mittal i sur., 2016). Iako u dostupnoj literaturi ne postoje konkretni podaci o kemijskom sastavu prianjajućeg sloja bjelanjka, njegov se kemijski sastav može procijeniti na osnovi podataka o kemijskom sastavu bjelanjka jaja. Bjelanjak sadrži preko 88 % vode, a ostatak su proteini te ugljikohidrati, lipidi i mineralne tvari (Abeyrathne i sur., 2014; Alleoni, 2006; Réhault-Godbert i sur., 2019).

Na temelju prethodno navedenih podataka o strukturi i kemijskom sastavu ljuske jaja, jasno je da ista predstavlja nadasve vrijedan izvor kalcija, visokovrijednih proteina te glikozaminoglikana, koji bi se primjenom odgovarajućih tehnoloških postupaka mogli izdvojiti iz ljuske jaja i slijedno plasirati na tržište kao proizvodi dodane vrijednosti. Pri tome transformacija ljuske jaja primjenom osnovnih tehnologija prerade može rezultirati proizvodima poput komposta, hrane za životinje ili digestata za bioplinska postrojenja, dok primjenom novih naprednih tehnologija to mogu biti proizvodi poput (finih) kemikalija, aditiva, dodataka prehrani, farmaceutskih, nutritivnih i veterinarsko-medicinskih proizvoda, enzima ili različitih funkcionalnih materijala. Međutim, za bilo koji oblik uporabe/iskorištenja ili

transformacije ljuske jaja u tržišno dostupne proizvode neophodno je pridržavati se Zakonske regulative (Uredba (EZ) Br. 1069/2009, 2011).

Uklanjanje bjelančevina iz ljuske jaja postiže se kuhanjem i/ili pranjem destiliranom vodom ili kuhanjem u 0,1 % otopini natrijevog dodecil sulfata. Čišćenje ljuske jaja i uklanjanje mikroorganizama postiže se korištenjem razrijeđenih kiselih otopina poput octene i klorovodične kiseline. Ovi se postupci najčešće koriste u pripremi ljuski jaja kao nosača za imobilizaciju enzima (Budžaki i sur., 2022). Međutim, dostupna literatura pruža oskudne podatke o učinku različitih metoda prethodne obrade ljuske jaja na strukturne promjene membrane jaja kao i na učinkovitost imobilizacije enzima. U publiciranim znanstvenim radovima mogu se naći podaci vezani za potencijal korištenja ljuske jaja kao nosača za imobilizaciju enzima poput ureaze, lipaze i tirozinaze primjenom adsorpcije, adsorpcije sekvencijalnim hvatanjem enzima u glutaraldehidnu matricu i adsorpcijom na polietileniminom obloženu ljusku nakon čega slijedi hvatanje enzima glutaraldehidom (Chattopadhyay i Sen, 2012; Norouzian i sur., 2007; Ribeiro i sur., 2018; Salleh i sur., 2016; Vemuri i sur., 1998; Venkaiah i Kumar, 1995). Međutim, uzimajući u obzir sastav, malo je vjerojatno da će se ljuska jaja naći u proizvodnji kao nosač za imobilizaciju enzima i to prvotno zbog svoje neinertnosti odnosno mogućeg otpuštanja kalcija te samim time sekundarnog onečišćenja reakcijske smjese. Osim toga, kalcificirani matriks ljuske jaja vrlo jeftin izvor prirodnog kalcija u obliku kalcijevog karbonata, iz kojeg se relativno jednostavnim postupcima mogu pripremiti anorganske i organske kalcijeve soli, koje se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji (kao aditivi i dodaci prehrani), kao i za proizvodnju gnojiva na bazi kalcija za poljoprivredne svrhe. S druge strane, moguće otpuštanje kalcija iz kalcificiranog matriksa u prisustvu pufera može dovesti do sekundarnog onečišćenja reakcijske smjese. Među brojnim metodama dobivanja kalcijevih soli iz ljuski jaja najpoznatiji su oni koji se temelje na otapanju kalcijevog karbonata iz kalcificiranog matriksa u razrijeđenim otopinama kiseline poput klorovodične, octene i fosforne kiseline (Budžaki i sur., 2022).

Obrada ljuske jaja s različitim kiselinama, osim soli, također rezultira izdvajanjem membrana jaja kao nusproizvoda. Membrana ljuske jaja nije samo izvor kolagena i hijaluronske kiseline za potrebe farmaceutske i kozmetičke industrije, već za razliku od kalcificiranog matriksa, ima veliki potencijal kao nosač za imobilizaciju enzima. To potvrđuju mnoge studije koje se temelje na imobilizaciji enzima poput lakaze, oksidaze, ureaze, tirozinaze, urikaze, katalaze, β -galaktozidaze, ali i lipaze, na membrani ljuske jaja kao čvrstom nosaču i to većinom za razvoj biosenzora (Abdulla i sur., 2017; Aini i sur., 2015; Choi i sur., 2001; Choi i Yiu, 2004; D'Souza

i sur., 2013; Girelli i Scuto, 2021; Işık i sur., 2021; Jiang i sur., 2017; Kessi i Arias, 2019; Li i sur., 2008; Pundir i sur., 2009; Tembe i sur., 2008; Wu i sur., 2004; G. Zhang i sur., 2006; Y. Zhang i sur., 2007b).

2.5. MEMBRANA LJUSKE JAJA

Struktura i kemijski sastav membrane jaja

Formiranje jajeta počinje u jajovodu ptica gdje u području bijele prevlake stanice tubularne žlijezde izlučuju prekursore membrane jaja koja okružuje rotirajući nezreli, nekalcificirani bjelanjak. Membrana se progresivno taloži kao isprepletana vlaknasta mreža i može se promatrati kao sklop tri različite podstrukture koje uključuju vanjsku, unutarnju i graničnu membranu. Svaka od njih ima sličnu strukturu, s jezgrom bogatom kolagenom, okruženom glikoproteinskim omotačem, međutim, položaj vlakana, orijentacija i veličina razlikuju se za svaki sloj membrane (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Ukupna debljina membrane je približno 100 μm (Yang i sur., 2019). Granična membrana predstavlja najdublju, vrlo tanku, gustu nevlaknastu strukturu koja okružuje bjelanjak jajeta, a sastoji se od vrlo tanke strukture debljine samo nekoliko mikrona i funkcionira kao barijera koja ograničava istjecanja bjelanjka i žumanjka (Chen i sur., 2019; Mensah i sur., 2021). Vlakna unutarnje membrane manjeg su promjera od onih vanjske membrane, s debljinom od oko 15 – 26 μm , s manjom širinom vlakana 0,1 – 3 μm i promjerom 1,5 – 2 μm (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Vanjska membrana nalazi se ispod kalcificiranog matriksa ljuske jaja, a debljine je od oko 50 – 70 μm , s vlaknima širine 1 – 7 μm i promjera 2,5 – 5 μm (Han i sur., 2023). Vlakna vanjske membrane prodiru kroz mamilarne kvržice ljuske, tvoreći strukturu sličnu pupoljku koja je djelomično kalcificirana. Vanjska membrana ima karakteristične strukture na svojoj vanjskoj površini nazvane mamilarni čvorovi. To su diskretne nakupine organske tvari koje funkcioniraju kao mjesta nukleacije kalcita. Ova mjesta imaju drugačiji sastav proteina od ostatka fibrozne membrane, sadrže visoku koncentraciju globularnih proteina i proteoglikana (Rodríguez-Navarro i sur., 2015). Budući da je vanjska membrana djelomično mineralizirana, ona predstavlja prijelaznu zonu u kojoj se organska vlakna spajaju i transformiraju u mineraliziranu strukturu ljuske jajeta.

Membrana ljuske jaja predstavlja bogat izvor proteina (60 – 90 %), te od toga kolagenih vlakana (10 – 15 %), a isto tako i proteoglikana (30 – 50 %) i drugih vrijednih glikozaminoglikana (25 %) uključujući hijaluronsku kiselinu, kondroitin sulfat, glukozamin te antimikrobne i antioksidativne proteine (Budžaki i sur., 2022; Kulshreshtha i sur., 2022; Strelec, Ostojčić, i sur., 2023). Međutim, također sadrži mineral kalcijev karbonat, sijaličnu kiselinu, uronsku

kiselinu i minimalnu količinu polisaharida (Nakano i sur., 2003). Osim toga, prisutne su i male količine minerala kao što su magnezij, silicij i cink (Kodali i sur., 2011; Mittal i sur., 2016). Vlaknasta proteinska struktura membrana stabilizirana je putem dezmozina, izodezmozina i disulfidnih poprečnih veza, što ju čini vrlo netopljivom (Ahmed i sur., 2017, 2019; Kodali i sur., 2011). Gotovo 500 proteina je identificirano u membrani, a koji se sastoje od strukturnih proteina poput kolagena, kao i globularnih proteina poput ovokaliksina, lizozima, lizil oksidaze, itd. (Ahmed i sur., 2017). Glavni strukturni protein je membranski protein ljuske jaja bogat cisteinom, ali također sadrži 10 % kolagena (tip I, V i X) (Kodali i sur., 2011; Strelec, Ostojčić, i sur., 2023; Strelec, Tomičić, i sur., 2023). Vanjska i unutarnja membrana sadrže kolagene I i X, ali samo unutarnja membrana posjeduje kolagen tipa V, dok je prema procjenama, ukupni omjer između kolagena I i V 100:1 (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Osim svega navedenog, membrane posjeduju molekule slične onima u koštanom matriksu, kolagen tipa I u jezgri vlakana i keratan sulfat u mamilarnim izbočinama (Baláž i sur., 2015; Rao i sur., 2015). Ove molekule su važne za procese nukleacije minerala ljuske i posjeduju potencijal za razvoj materijala u inženjerstvu koštanog tkiva (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Membrane također sadrže značajne količine ugljikohidrata, uključujući hijaluronsku kiselinu, koja igra važnu ulogu u hidrataciji tkiva i staničnih mehanizama kao što su rast, diferencijacija i transport te se primjenjuje različite zdravstvene i medicinske svrhe. Unatoč tome što su membrane jaja bogate važnim bioaktivnim spojevima, često se smatraju otpadnim ostacima te se nedovoljno koriste u druge svrhe.

Odvajanje membrane od otpadne ljske jaja

Najčešće korištene metode za odvajanje membrane od ljske jaja prikazane su **Tablicom 3**.

Tablica 3 Metode odvajanja membrana od ljske jaja uz pripadajuće prednosti i nedostatke (A. Torres-Mansilla i sur., 2023)

<i>METODA</i>	<i>PREDNOST</i>	<i>NEDOSTATAK</i>
Ručno skidanje	Nema kemijskog utjecaja; cijena	Vrijeme; veličina dobivenih membrana
Kemijsko otapanje	Veličina dobivenih membrana	Moguća promjena organske strukture; nedostatak utvrđenog protokola; onečišćenje okoliša nastalim vodenim otpadom
Odvajanje pomoću mikrovalova	Korištenje konvencionalne mikrovalne pećnice	Moguća promjena bioloških i fizikalno-kemijskih svojstava ESM-a zbog toplinskog stresa/grijanja
Brzo isparavanje	Jednostavna oprema; mala potrošnja energije; dobra stopa odvajanja	Nepoznati učinak u strukturu membrana
Mehaničko odvajanje	Prikladno za industrijsku upotrebu.	Onečišćenje zraka uzrokovano prašinom; predmet zaštite intelektualnog vlasništva (patenti)
Enzimsko odvajanje	Alternativna metoda	Složeni reakcijski uvjeti; visoka cijena enzima

Koncept odvajanja membrane od ljske jaja potiče na sustavno istraživanje i razvoj metoda budući da je sposobnost uspješnog odvajanja membrane od ljske jaja ključni postupak za njihovu širu upotrebu kao biomaterijala. Metode koje su korištene u okviru različitih istraživačkih radova u laboratorijskim uvjetima, a koje su Kattmani i suradnici naglasili u svom preglednom radu (Kattmani i sur., 2022) su ručno odvajanje, obrada mikrovalovima, obrada kiselinama, flotacija otopljenim zrakom, korištenje proteolitičkih enzima uz mljevenje te mehaničko miješanje. U okviru spomenutog preglednog rada, autori su zaključili da su sva istraživanja vezana za metode odvajanja membrana od ljske jaja provedena na komercijano nedostupnoj opremi te zbog toga postoji potreba za razvojem kako metoda tako i tehnologije odvajanja membrana od ljske jaja, a koje bi se mogle učinkovito koristiti u industrijskom mjerilu.

Spomenute metode su najčešće korištene u okviru laboratorijskih istraživanja i mogu se podijeliti na fizikalne, kemijske i enzimske. Ukratko, fizikalne metode odvajanja membrane jaja od ljske jaja daju najniži prinos uz najnižu cijenu u odnosu na ostale metode. Kemijska metoda je učinkovitija u odnosu na fizikalne metode ali i relativno velike nedostatke u pogledu denaturacije membranskih proteina i zbrinjavanja otpadne tekućine. Enzimski metoda ima najveću učinkovitost u odvajanju membrane jaja od ljske jaja uz značajno manju denaturaciju

proteina membrane jaja u odnosu na kemijsku metodu pri čemu je najveći nedostatak enzimske metode visoka cijena koštanja (Han i sur., 2023).

Enzimska obrada se uglavnom koristi za dobivanje hijaluronske kiseline iz izoliranih membrana dok se kod ručnog odvajanja membrana može dobiti uglavnom nativna membrana s odgovarajućom količinom zaostalog kalcijevog karbonata. Kemijska metoda odvajanja membrana od ljuske jaja rezultira čistim membranama, bez zaostatka kalcijevog karbonata, što se obično postiže kiselinama i to octenom, klorovodičnom, sumpornom ili etilendiamintetraoctenom kiselinom (Kattimani i sur., 2022). Međutim, kemijska obrada ljuske jaja kiselinama utječe na proteinske veze kao i na strukturu i kemijske svojstva membrana (A. C. Torres-Mansilla i Delgado-Mejía, 2017) no u literaturi nisu pronađeni podaci koji se odnose na spomenuto. Osim toga, u literaturi ne postoje niti podaci o koncentraciji kiseline, vremenu i temperaturi potrebnoj za kiselinsku obradu određene količine ljuske jaja.

Metode korištene u industrijskim mjerilima su odvajanje membrana potpomognuto mikrovalovima, brzim isparavanjem ili flotacija otopljenim zrakom. Odvajanje potpomognuto mikrovalovima sastoji se od slabljenja fizičkih veza između membrana i ljuske jaja. Budući da membrane sadrže više vode nego ljuska te se dvije komponente različito zagrijavaju što rezultira apsorpiranjem veće količine energije iz elektromagnetskih valova te širenjem i konačnim odvajanjem od ljuske. U postupku brzog isparavanja koristi se šaržni reaktor koji iskorištava učinak promjena tlaka zasićene tekućine za odvajanje membrane sa postotkom odvajanja od ~ 69 % (Chi i sur., 2022). Na kraju, flotacija otopljenim zrakom odvaja membranu od ljuske jaja uslijed različite topljivosti u vodi uz dodatno uvođenje zraka u otopinu. Nedostatak ove metode je što se otpadna ljuska jaja mora u potpunosti zdrobiti prije postupka odvajanja što iziskuje dodatno vrijeme i energiju (Han i sur., 2023).

Prema literaturi, razvijeno je i patentirano nekoliko uređaja za optimizaciju odvajanja membrana u industrijskom mjerilu koji lome ili usitnjavaju ljusku jaja uz daljnju najčešću primjenu kavitacije, Venturijevog učinka ili metode mehaničke separacije za konačno izdvajanje membrana (A. Torres-Mansilla i sur., 2023). Važno je naglasiti da je idealan proces koji učinkovito izvlači velike dijelove membrane uz minimalne izmjene još uvijek predmet intenzivnog istraživanja.

Neovisno o primijenjenoj metodi, postoje određena ograničenja na koja treba obratiti pozornost prije odabira same metode za odvajanje membrana od ljuske jaja. Jedno od takvih ograničenja je već spomenuta moguća modifikacija samih membrana kod obrade kiselinama. Osim toga, značajan nedostatak postojećih metoda odvajanja su visoke razine kontaminacije membrana

kalcijem iz snažno prijanjavuće kalkificiranog matriksa što zahtijeva dodatni postupak uklanjanja kalcija kiselinama te rezultira velikim količinama otpadne vode (Chi i sur., 2019). Osim kalcija, na membranama može zaostati ponešto bjelanjka ili čak i žumanjka gdje je potrebno višekratno ispiranje vodom što uzrokuje generiranje velikih količina otpadnih voda s visokom vrijednosti za biokemijsku potrošnju kisika (Snyder, 2016). Do nakupljanja kemijskog i vodenog otpada dolazi i uslijed tretiranja otpadne ljuske jaja kiselinama ili primjenom metode flotacije što dodatno opterećuje okoliš i zahtijeva dodatne troškove za njihovo zbrinjavanje. Trenutačno većina metoda odvajanja koristi mljevenu ljusku kao početni ulazni materijal što povećava rizik od kontaminacije membrana površinskim patogenima ljuske jaja uključujući *Salmonellu*, *Listeriu monocytogenes*, *Campylobacter*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* te mezofilne aerobne bakterije (Kulshreshtha i sur., 2022). Stoga takve tehnike odvajanja zahtijevaju dodatne korake obrade kako bi se u konačnici osigurale mikrobiološki sigurne membrane jaja za daljnu primjenu.

Primjena membrana jaja

Globalno tržište jaja iznosilo je 213 milijardi USD 2020. godine, a očekuje se da će dosegnuti 297 milijardi USD do 2025 (Kulshreshtha i sur., 2022). Štoviše, različiti proizvodi od jaja kao što su tekuća jaja, bjelanjak, žumanjak, ljuska jaja i membrana jaja imaju visoku tržišnu vrijednost i dostupni su za prodaju u različitim oblicima uključujući čvrste, koncentrirane, kristalizirane, smrznute, tekuće i duboko smrznute proizvode (Kulshreshtha i sur., 2022). Od toga, membrane jaja predstavljaju novi proizvod na tržištu pri čemu izazivaju sve veći interes u nutraceutskoj i kozmetičkoj industriji. Veličina globalnog tržišta membrana i njihovih derivata u 2020. godini procijenjena je na ~ 105 milijuna USD te se predviđa da će rasti po ukupnoj godišnjoj stopi rasta od 10,1 % i doseći vrijednost ~ 169 milijuna USD do 2025. (Kulshreshtha i sur., 2022). Usporedba tržišne vrijednosti različitih proizvoda od jaja pokazuje da membrane imaju najveću tržišnu vrijednost (200–800 \$/kg) u usporedbi s ljuskom jaja (0,09–0,3 \$/kg) i jajima te tekućim jajima, bjelanjkom ili žumanjkom (1,48 –11,02 \$/kg) (Kulshreshtha i sur., 2022). Napredak u svijesti potrošača o dobrobitima korištenja membrana u preventivnoj zdravstvenoj zaštiti i osobnoj njezi, kao i povećanje prodaje temeljene na primjeni u različitim industrijskim granama, rezultiralo je brzim porastom globalnog tržišta. Štoviše, očekuje se da će potrošači prepoznati i preferirati sastojke iz membrana kao prirodne u odnosu na sintetičke alternative.

Budući da su membrane jaja izvor prirodnog kolagena, glukozamina, kondroitina i hijaluronske kiseline, njihova primjena je prvenstveno okrenuta prema kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Ove bioaktivne tvari, same ili u kombinaciji, široko su dostupne kao oralni dodaci prehrani za liječenje bolova u zglobovima uzrokovanih osteoartritisom budući da se kombinacija membrana i hidrolizata goveđeg kolagena pokazala blagotvornom na simptome boli i funkciju zglobova kod pacijenata s dijagnosticiranim osteoartritisom koljena (Bernardo i Azarcon, 2012). Osim djelovanja na kosti, klinička ispitivanja pokazala su da oralna konzumacija hidroliziranih membrana poboljšava izgled kože lica, proizvodnju kolagena i usporava proces starenja kože (Kulshreshtha i sur., 2022), zatim poboljšava rast i gustoću kose uz smanjeno lomljenje kose (Kalman i Hewlings, 2020), smanjuje bore i poboljšava zadržavanje vlage i hidrataciju kože (Jensen i sur., 2016) te omogućava normalnu i zdravu funkciju vezivnih tkiva (Kiers i Bult, 2021). Osim navedenih kozmetičkih primjena, dosadašnja istraživanja su pokazala i neke medicinske pozitivne učinke korištenja membrana jaja poput smanjenja crijevnih upala kod laboratorijskih miševa (Jia i sur., 2017), izlučivanje protuupalnih citokina u sisavaca te liječenje hipertenzije i gastrointestinalnih poremećaja kao i razvoj obloga za rane na bazi membrane jaja (M. M. Cordeiro i T. Hincke, 2011).

Znanstvena istraživanja u području funkcionalnih bio-materijala, čijoj skupini pripadaju i membrane jaja (Baláž i sur., 2015), okrenuta su u tri smjera (i) korištenje membrana kao bio-podloška za sintezu različitih nanočestica; (ii) potencijal sorbensa raznih vrsta, uključujući ione teških metala i organskih boja i (iii) primjenu membrana kao biosenzora.

Osim navedenog, predstavlja potencijal kao bio-nosača za imobilizaciju enzima. Prema dostupnoj literaturi, membrana otpadne ljuske jaja može poslužiti kao nosač za imobilizaciju različitih enzima poput lakaze (Girelli i Scuto, 2021), oksidaze (Pundir i sur., 2009; G. Zhang i sur., 2006), glukoza oksidaze (Aini i sur., 2015; Choi i sur., 2001; Li i sur., 2008; Wu i sur., 2004), ureaze (D'Souza i sur., 2013), tirozinaze (Tembe i sur., 2008), urikaze (Y. Zhang i sur., 2007b), katalaze (Choi i Yiu, 2004), β -galactozidaze (Kessi i Arias, 2019) i lipaze (Abdulla i sur., 2017; Işık i sur., 2021; Jiang i sur., 2017) i to većinom u svrhu proizvodnje biosenzora. Ono što se u navedenim radovima može primijetiti je to da je membrana jaja rezultat fizičkog odvajanja od kalcificiranog matriksa ljuske jaja. Tek je u nekolicini spomenutih radova membrana jaja dobivena tretiranjem kalcificiranog matriksa ljuske jaja različitim kiselinama što uzrokuje promjene u kemijskom sastavu membrane jaja u odnosu na sirovu (netretiranu) membranu jaja. Međutim, osim u objavljenim radovima koji su proizašli iz preliminarnih istraživanja ovoga doktorskog rada (Strelec, Ostožić, i sur., 2023; Strelac, Tomičić, i sur., 2023) u literaturi nema podataka o učincima kiselina na sastav i strukturu membrana jaja, a obzirom da promjene u kemijskom sastavu nosača mogu značajno utjecati na učinkovitost

imobilizacije, istraživanja u pogledu sastava i strukture kiselinama tretiranih membrana jaja omogućuju odabir najprikladnijeg postupka pripreme nosača na bazi membrane jaja željenih svojstava.

2.6. TEHNO-EKONOMSKA ANALIZA

Tehno-ekonomska analiza predstavlja sustavan pristup ocjeni tehničke izvedivosti i ekonomske isplativosti određenog procesa, proizvoda ili tehnologije. Ova analiza uključuje detaljnu procjenu tehničkih aspekata, poput izbora materijala, optimizacije proizvodnih parametara, energetske zahtjeva te pouzdanosti i učinkovitosti sustava. Istovremeno, ekonomski dio analize obuhvaća izračun troškova ulaganja, operativnih troškova, troškova održavanja, očekivanih prihoda te vremenskog okvira povrata na ulaganje. Kroz primjenu različitih analitičkih metoda, poput analize troškova i koristi (eng. *Cost-Benefit Analysis*), analize osjetljivosti te diskontiranja novčanih tokova (eng. *Discounted Cash Flow*), moguće je dobiti realnu procjenu održivosti i konkurentnosti predloženog rješenja. Tehno-ekonomska analiza od ključne je važnosti u industrijskom sektoru, istraživačkim projektima s naglaskom na inovacije, jer omogućava donošenje informiranih odluka, smanjenje financijskih rizika i učinkovito planiranje resursa. Osim toga, njena primjena pomaže u identifikaciji potencijalnih prepreka i optimizaciji procesa prije nego što dođe do implementacije, čime se povećava vjerojatnost uspjeha i dugoročne održivosti projekta.

U kontekstu cirkularne ekonomije i održivog upravljanja otpadom, tehno-ekonomska analiza omogućuje procjenu učinkovitosti procesa pretvorbe otpada u vrijedne proizvode, pri čemu se analiziraju operativni troškovi, investicijski izdaci, ekonomska isplativost i ekološki utjecaj.

ZA OCJENU

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Zadatak rada

Zadaci ovog doktorskog rada bili su:

1. Pripremiti nosače na bazi membrane jaja tretiranjem kalcificiranog matriksa otpadne ljuske jaja različitim kiselinama.
2. Imobilizirati, na pripremljene nosače na bazi membrane jaja, komercijalno dostupne lipaze iz bakterija *Burkholderia cepacia* (BCL) i *Pseudomonas fluorescens* (PFL) primjenom imobilizacijskih tehnika adsorpcije te direktnog i indirektnog kovalentnog vezanja.
3. Odabrati najbolje imobilizirane lipaze na temelju biokemijskih i operativnih svojstava u odnosu na slobodne lipaze.
4. Provjeriti funkcionalnost imobiliziranoj *Burkholderia cepacia* lipazi u postupku sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima.
5. Izraditi procjenu ekonomičnosti/prihvatljivosti proizvodnje odabranih imobiliziranih lipaza na nosače na bazi membrane jaja primjenom tehno-ekonomske analize.

Gore navedeni zadaci ovog doktorskog rada proizašli su iz postavljenih hipoteza:

1. Otapanjem kalcificiranog matriksa otpadne ljuske jaja 5 % kloridnom, 10 % octenom i 15 % *o*-fosfornom kiselinom moguće je dobiti funkcionalni materijal na bazi membrane jaja koji svojim svojstvima udovoljava uporabi kao nosača za imobilizaciju enzima.
2. Lipaze imobilizirane na pripremljene nosače na bazi membrane jaja pokazuju poboljšana biokemijska i operativna svojstva u odnosu na slobodne lipaze.
3. Lipaze imobilizirane na pripremljene nosače na bazi membrane jaja mogu se uspješno koristiti u postupku sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima.
4. Tehno-ekonomska analiza pokazuje da odabrane imobilizirane lipaze na nosače na bazi membrane jaja imaju velik potencijal za primjenu u industrijskoj proizvodnji.

3.2. Materijali

Otpadna ljuska kokošnjih jaja zaostala nakon prerade jaja u tvrtki ELCON prehrambeni proizvodi d.o.o. (Zlatar Bistrica, Republika Hrvatska) korištena je kao sirovina za pripremu nosača na bazi membrane jaja. Nosači na bazi membrane jaja pripremljeni su tretiranjem otpadne ljuske jaja korištenjem 5 % (w/v) klorovodične, 10 % (w/v) octene i 15 % (w/v) *o*-fosforne kiseline pripremljene od klorovodične kiseline (37 % w/v) proizvođača Carlo Erba (Emmendingen, Njemačka), ledene octene kiseline (99 – 100 %) proizvođača LabExpert (Ljubljana, Slovenija) i *o*-fosforna kiselina (85 %) proizvođača Fisher Chemical (Šangaj, Kina). Dobivene membrane isprane su acetonom proizvođača LabExpert (Ljubljana, Slovenija). *Burkholderia cepacia* (BCL) (Sigma-Aldrich broj proizvoda: 534641, Saint Louis, MO, SAD) i *Pseudomonas fluorescens* (PFL) (Sigma-Aldrich broj proizvoda: 534730, Saint Louis, MO, SAD) Amano lipaze PS korištene su za imobilizaciju na pripremljenim nosačima na bazi membrane jaja. Aktivnost lipaza je određena s maslinovim uljem kao supstratom proizvođača Sigma-Aldrich Chemicals (Saint Louis, MO, SAD). Ulja/mast korišteni za provjeru supstratne specifičnosti bili su maslinovo ulje (Trenton, Hrvatska), suncokretovo ulje (Zvijezda, Hrvatska), biljno ulje (Omegol Hrvatska), repičino ulje (S-BUDGET, Austrija), kokosovo ulje (Encian, Hrvatska), svinjska mast (pik VRBOVEC) kupljeni u lokalnom supermarketu, dok je otpadno jestivo ulje prikupljeno u obližnjem lokalnom restoranu (Osijek, Hrvatska). Sve druge kemikalije korištene u ovom istraživanju bile su *pro analysis* čistoće.

3.3. Metode

3.3.1. Određivanje kemijskog sastava ljuske jaja

Udio suhe tvari u otpadnoj ljusci jaja određen je standardnom metodom sušenja do konstantne mase. U prethodno osušene i izvagane aluminijske posudice dodano je oko 2,5 g ljuske jaja te je sušenje do konstantne mase provedeno tijekom 24 sata pri 100 °C (Wrolstad i sur., 2004) u sušioniku Memmert UF 55 (Memmert, Njemačka). Udio suhe tvari određen je prema jednadžbi (1):

$$\text{Udio suhe tvari} = \left(100 - \frac{a - b}{c}\right) \cdot 100 [\%] \quad (1)$$

gdje je:

a - masa posudice s uzorkom prije sušenja [g],

b - masa posudice s uzorkom poslije sušenja [g],

c - masa uzorka [g].

Sve ostale metode određivanja kemijskog sastava ljuske jaja provedene su na osušanim te uzorcima samljeveni na IKA WERKE M20 (IKA, Njemačka) mlinu na veličinu čestica manju od 0,5 mm. Nakon mljevenja uzorci su dosušeni u trajanju od jednog sata.

Udio pepela u ljusci jaja određen je standardnom metodom spaljivanja prema Al-Awwalu i Aliju (2015) pri 650 °C. U prethodno pripremljene i izvagane lončice za žarenje izvagano je oko 0,2 g ljuske jaja te su uzorci potom karbonizirani na električnom grijaču do nestanka bijelog dima. Nakon toga, karbonizirani uzorci su postavljeni na žarenje u mufolnu peć Iskraterm tip 1 (Iskraterm, Slovenija) u trajanju od jednog sata. Udio pepela određen je prema jednadžbi (2):

$$\text{Udio pepela} = \frac{m(\text{pepeo})}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 [\%] \quad (2)$$

Udio ukupnih proteina (tzv. sirovih bjelančevina) određen je metodom po Kjeldahlu (AOAC, 2002). Masi od 0,2 g uzoraka samljevane ljuske jaja u epruveti za spaljivanje dodano je 0,1 g modre galice kao katalizatora, 10 g natrijevog sulfata kao agensa za povišenje vrelišta i 15 mL koncentrirane sumporne kiseline te su uzorci postavljeni u blok za spaljivanje Behrotest K12

(Behr Labor-Technik, Njemačka) pri 420 °C tijekom jednog sata. Spaljenim uzorcima u epruvetama, ohlađenim na sobnu temperaturu, dodano je 75 mL destilirane vode te su epruvete postavljene u aparat za destilaciju Vapodest 1 (Gerhard, Njemačka). Prije destilacije uzorcima u epruvetama dodano je 50 mL 35 % vodene otopine natrijevog hidroksida, a destilat je prikupljan u Erlenmeyerove tikvice koje su sadržavale 25 mL 0,01 M kloridne kiseline i nekoliko kapi Tashiro indikatora. Prikupljeni volumen destilata u Erlenmeyerovoj tikvici iznosio je oko 100 mL. Otopine su titrirane sa 0,01 M natrijevim hidroksidom do promjene boje iz ružičaste u zelenu. Na temelju volumena 0,01 M natrijevog hidroksida utrošenog za neutralizaciju određena je količina dušika u uzorku. Udio ukupnih (sirovih) proteina u ljusci jaja izražen je u %-tku množenjem količine dobivenog dušika sa faktorom 6,25 prema jednadžbi (3):

$$\text{Udio proteina} = \frac{(a - b) \cdot f \cdot 0,14}{c \cdot 10} \cdot 6,25 [\%] \quad (3)$$

gdje je:

a - volumen utrošenog 0,01 M natrijevog hidroksida za titriranje slijepe probe [mL],

b - volumen utrošenog 0,01 M natrijevog hidroksida za titriranje glavne probe [mL],

c - masa uzorka [g],

f – iznosi 1.

Udio ukupnih lipida određen je metodom prema Folchu i sur. (1957). Uzorka otpadne ljuske jaja mase 1 g pomiješan je s 20 mL smjese otapala za ekstrakciju, kloroform:metanol (2:1, v/v), te je smjesa podvrgnuta miješanju tijekom 20 minuta pri 400 okretaja/min na tresilici IKA KS 260 Basic (IKA, Njemačka), a nakon toga separaciji krute od tekuće faze pomoću centrifuge Hermle Z 327 (Hermle, Njemačka) kroz 20 minuta pri 2000 okretaja/min. Nakon separacije dobiveni supernatant je profiltriran kroz nabrani filter papir, a filtratu je dodano 4 mL 0,9 % otopine natrijevog klorida u svrhu razdvajanja slojeva, nakon čega je gornji sloj izdvojen, a donji kvantitativno prenesen u prethodno osušene i izvagane tikvice za uparavanje. Proces uparavanja proveden je na rotacijskom uparivaču Vacuum Controller V-800 (Büchi, Švicarska) pri 60 °C i 150 okretaja/min, nakon čega je suhi ostatak sušen do konstante mase pri 105 °C. Udio ukupnih lipida je određen prema jednadžbi (4):

$$Udio\ ukupnih\ lipida = \frac{m_1 - m_2}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 [\%] \quad (4)$$

gdje je:

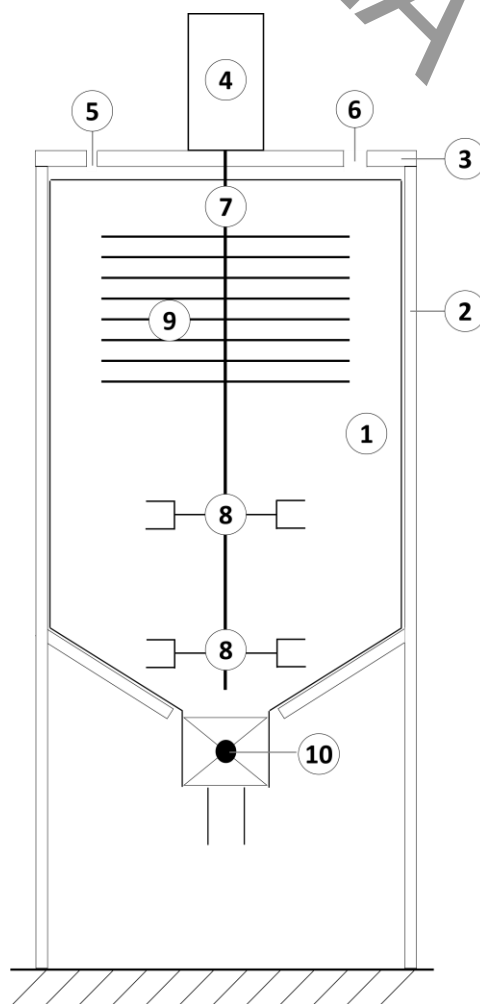
m_1 - masa tikvice s uzorkom nakon sušenja [g],

m_2 - masa prazne tikvice [g].

Udio kalcija u ljusci jaja određen je kompleksometrijskom titracijom pomoću *di*-natrijeve soli etilendiaminotetraoctene kiseline kao titranta i kalkon-karboksilne kiseline kao indikatora. Uzorak otpadne ljuske jaja mase 0,5 g otopljen je u 20 mL 2 M klorovodične kiseline gdje je nakon potpunog otapanja ljuske pH vrijednost otopine podešena na vrijednost pH 7 postepenim dodavanjem 2 M otopine natrijevog hidroksida. Uzorak je potom kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 100 mL. Alikvotu od 10 mL ovako pripremljenog uzorka dodano je 40 mL destilirane vode i 4 mL 8 M otopine natrijevog hidroksida. Smjesa je ostavljena 5 minuta na sobnoj temperaturi, u svrhu taloženja magnezijevog hidroksida, i potom titrirana sa 25 mM *di*-natrijevom soli etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA-2Na) do promjene boje iz ljubičaste u plavu, uz 250 μ L 0,1 % vodene otopine kalkon-karboksilne kiseline kao indikatora.

3.3.2. Priprema nosača na bazi membrane jaja

Nosači na bazi membrane jaja pripremljeni su obradom otpadne ljuske jaja otopinama kiselina i to 5 % klorovodičnom, 10 % octenom ili 15 % *o*-fosfornom kiselinom prema shemi prikazanoj na **Slici 6** u konusnom šaržnom reaktoru volumena 15 L (**Slika 5**): 1 – šaržni reaktor od polietilen tereftalata 15 L ($\phi=240$ mm; $h=380$ mm); 2 – stožasti držač šaržnog reaktora; 3 – poli(metil metakrilat) gornji držač miješalice; 4 – mješalica promjenjive brzine s mogućnošću kontrarotacije; 5 – otvor za uzorkovanje; 6 – otvor za doziranje kiseline; 7 – rotirajuća osovina od nehrđajućeg čelika otpornog na kiseline; 8 – dvostruki impulsni elementi za miješanje od nehrđajućeg čelika otpornog na kiseline ($\phi=110$ mm); 9 – češljasti element za miješanje od nehrđajućeg čelika otpornog na kiseline (razbijači pjene; $\phi = 170$ mm, $h = 100$ mm, 8 žica); i 10 – polivinil klorid neplastificirani (PVC-U) kuglasti ventil tip 546 Pro.

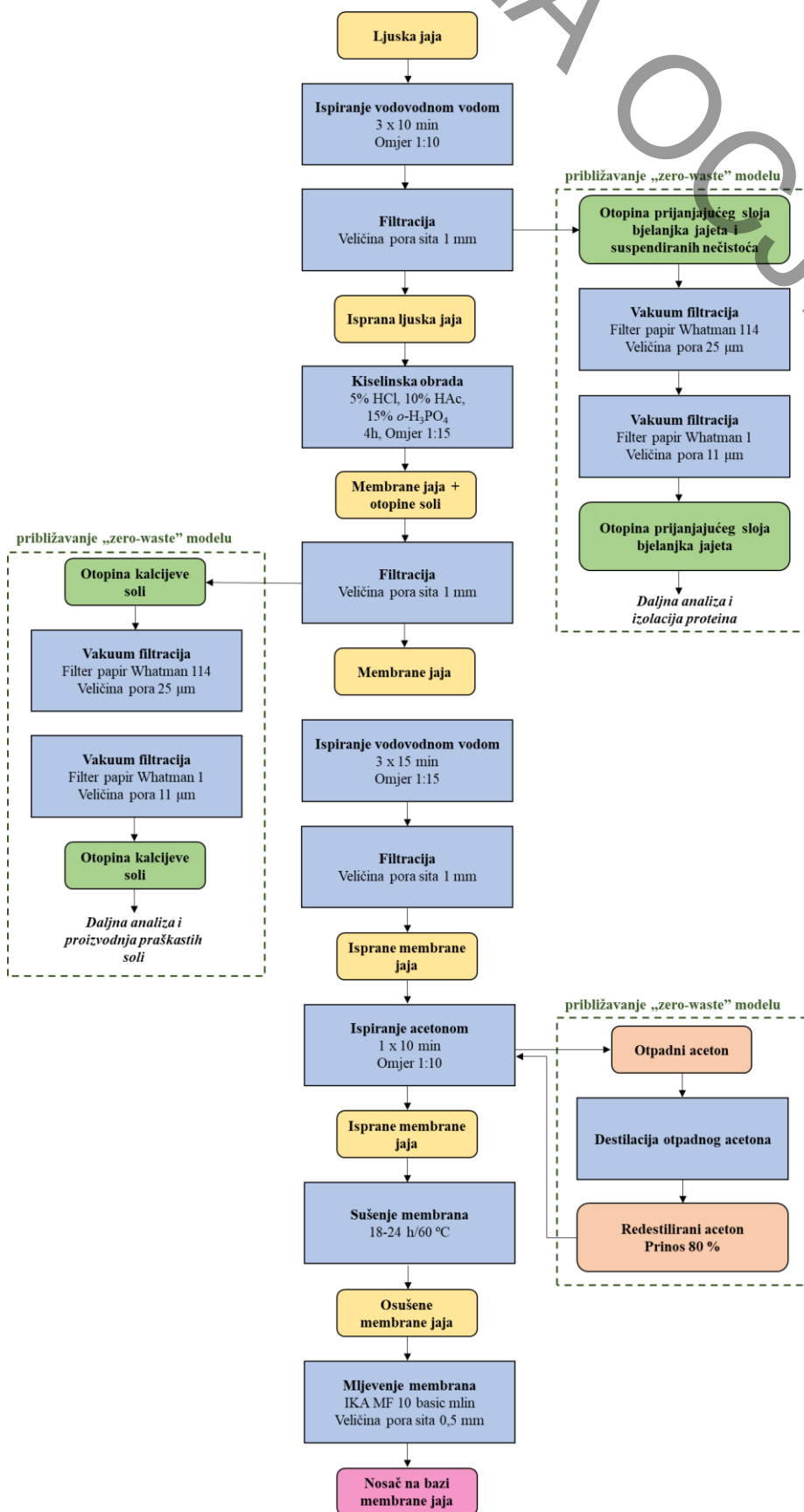


Slika 5 Shematski prikaz konstruiranog konusnog šaržnog reaktora od 15 L za pripremu nosača na bazi membrane jaja

Masa ljuske jaja od 650 g isprana je tri puta sa po 6,5 L vodovodne vode uz konstantno miješanje pri 350 okretaja/min u trajanju od 10 minuta uz izmjenu vode nakon svakog ispiranja. Ispranoj ljusci jaja je zatim dodano 10 L odgovarajuće kiseline, pri čemu je proces dodavanja kiseline proveden u manjim obrocima uz varijabilni broj obrtaja miješačkog tijela, a sve u svrhu smanjenja nastanka pjene uzrokovanog stvaranjem mjehurića ugljikovog dioksida prilikom reakcije otapanja kalcijevog karbonata. Proces dodavanja kiseline i regulacije broja obrtaja miješačkog tijela provedeni su kako slijedi. Na samom početku procesa dodana je jedna litra kiseline uz miješanje od 350 okretaja/min, nakon čega je svakih 5 do 10 minuta, ovisno o razini nastale pjene, dodavano po 0,5 – 1 L kiseline. Prije dodatka kiseline miješanje otopine je prekinuto, a po dodatku miješanje je nastavljeno pri 150 okretaja/min, uz povremenu promjenu smjera vrtnje miješala te se broj okretaja postepeno povećavao do 350 okretaja/min. Proces dobivanja membrana je smatran gotovim ukoliko je sva pjena nestala te nisu bili vidljivi komadići kalcificiranog matriksa u otopini što to je postignuto nakon maksimalno četiri sata,

ovisno o primijenjenoj kiselini. Membrane jaja su, nakon potpunog otapanja kalcificiranog matriksa, odvojene filtracijom na rešetkastom situ veličina pora od 1 mm, isprane 3×15 min destiliranom vodom u omjeru 1:15, zatim isprane acetonom u trajanju od 15 min i omjeru 1:10 te sušene 18 – 24 h pri 60 °C nakon čega je određen prinos dobivenih membrana. Osušene membrane su samljevene na veličinu čestica do 0,5 mm na mlinu IKA MF 10 basic (IKA, Njemačka). S obzirom na korištenje tri različite kiseline (5 % klorovodična (HCl), 10 % octena (HAc) i 15 % *o*-fosforna (H_3PO_4)) dobivena su tri različita nosača – ESMC (eng. *Eggshell membrane carrier*): ESMC-HCl, ESMC-HAc i ESMC- H_3PO_4 . Osim navedena tri nosača, dio membrana (ESM-N) odvojen je od isprane ljuske jaja fizičkim putem pomoću pincete (tzv. netretirane ili nativne membrane jaja) u svrhu kasnije usporedbe sa pripremljenim nosačima.

Kao što je prikazano na **Slici 6**, u sklopu postupka pripreme nosača na bazi membrane jaja, pojavile su se tri *otpadne* struje i to otopina prijanjajućeg sloja bjelanjka jaja, otopina kalcijeve soli i otpadni aceton. Sva tri sporedna produkta mogu se dalje iskoristiti za proizvodnju proteina bjelanjka jaja, proizvodnju kalcijevih soli te redestilaciju i vraćanje u proces acetona čak do 80 %. Sve to doprinosi približavanju *zero-waste* modelu u procesu potpunog iskorištavanja otpadne ljuske jaja. Međutim, osim postupka pripreme nosača na bazi membrane jaja, ostali postupci nisu bili dio istraživanja ove doktorske disertacije.



Slika 6 Shematski prikaz pripreme nosača na bazi membrane jaja

3.3.3. Karakterizacija pripremljenih nosača na bazi membrane jaja

Pripremljeni nosači na bazi membrane jaja analizirani su na kemijski sastav uz dodatnu analizu infracrvenog spektra s ciljem procjene utjecaja kiselina na promjenu sastava membrana. Nosači su međusobno uspoređeni i prema fizičkom izgledu, odnosno boji. Prihvatljivost pripremljenih nosača na bazi membrane jaja za uporabu kao nosača za imobilizaciju lipaza uključivala je određivanje veličine čestica granulometrijskom analizom, specifične površine Brunauer-Emmet-Teller (BET) analizom te mikrostrukturiranosti površine elektronskom pretražnom mikroskopijom (SEM) kao i određivanje kapaciteta vezanja vode i ulja u svrhu procjene minimalnog volumena otopine lipaza potrebnog u postupku imobilizacije.

3.3.3.1. Određivanje kemijskog sastava nosača na bazi membrane jaja

Pripremljeni nosači na bazi membrane jaja analizirani su na kemijski sastav istim postupcima kao i otpadna ljuska jaja, a koji su detaljno opisani u podpoglavlju 3.3.1.

Udio suhe tvari određen je standardnom metodom sušenja do konstantne mase te je određen prema jednadžbi (1).

Sve ostale metode određivanja kemijskog sastava membrana jaja provedene su na uzorcima osušenim do konstantne mase (24 h pri 100 °C) te samljevenim na IKA MF 10 basic (IKA, Njemačka) mlinu na veličinu čestica manju od 0,5 mm. Nakon mljevenja uzorci su dosušeni u trajanju od 1 h.

Udio pepela određen je standardnom metodom spaljivanja po Al-Awwal i Aliju (2015) pri 650 °C koristeći jednadžbu (2).

Udio ukupnih proteina (tzv. sirovih bjelančevina) određen je metodom po Kjeldahlu (AOAC, 2002) koristeći jednadžbu (3).

Udio ukupnih lipida određen je metodom po Folchu i sur. (1957) koristeći jednadžbu (4).

Udio kalcija u nosačima na bazi membrane jaja određen je kompleksometrijskom titracijom pomoću *di*-natrijeve soli etilendiaminotetraoctene kiseline kao titranta i kalcion-karboksilne kiseline kao indikatora.

3.3.3.2. Određivanje parametara boje nosača na bazi membrane jaja

Kromametar A CR-400 (Konica Minolta, Japan) je korišten za određivanje parametara boje pripremljenih nosača na bazi membrane jaja. Ovaj tip kromametra mjeri svjetlost pomoću silikonskih fotoćelija koja se reflektira s površine predmeta. U radu je korišten Lab sustav koji

daje rezultate približne onima ljudskoga oka. Mjereni su sljedeći parametri: L^* , a^* i b^* pri čemu parametar L^* određuje svjetlinu, odnosno ako je $L^* = 0$ uzorak je taman, a ako je $L^* = 100$ uzorak je svijetao. Parametar a^* pokazuje crvenu ili zelenu boju, odnosno ako je a^* pozitivan uzorak je crvene boje, a ako je negativan uzorak je zelene boje dok parametar b^* u pozitivnoj vrijednosti predstavlja žutu boju, a u negativnoj vrijednosti plavu boju.

3.3.3.3. Infracrvena spektroskopija nosača na bazi membrane jaja

Infracrveni spektar nosača na bazi membrane jaja snimljen je primjenom infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom te tehnike prigušene totalne refleksije (FTIR-ATR) na spektrometru Cary 600 (Agilent Technologies, SAD) opremljenim sa softverom MicroLab Expert (Agilent Technologies, SAD). Uzorci su snimljeni u području od 4000 do 600 cm^{-1} .

3.3.3.4. Određivanje granulometrijskog sastava nosača na bazi membrane jaja

Granulometrijski sastav nosača na bazi membrane jaja određen je pomoću uređaja Mastersizer 2000 (Malvern Panalytical, UK) metodom laserske difrakcije svjetlosti opremljenog optičkim instrumentom, jedinicom za raspršivanje krutih uzoraka (Scirocco 2000, Malvern Panalytical, UK) i računalom s odgovarajućim programskim paketom. Prilikom određivanja uzorak prolazi kroz fokusirani snop svjetlosti i raspršuje svjetlost pod karakterističnim prostornim kutovima. Dobiveni rezultati prikazani su kao dva ovisna parametra: (i) srednji promjer ponderiran volumenom i (ii) vrijednost raspona.

3.3.3.5. Određivanje svojstava pora nosača na bazi membrane jaja

Specifična površina pripremljenih nosača na bazi membrane jaja određena je primjenom Brunauer-Emmet-Teller (BET) analize prema Prekajskom i sur. (2014), određivanjem izotermi adsorpcije – desorpcije dušika na temperaturi od $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomoću Autosorb IQ (Quantachrome Instruments, SAD), površinskog analizatora sorpcije plina. Uzorci su pripremljeni otplinjavanjem na temperaturi od $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ pod vakuumom kroz 10 sati kako bi se uklonila sva vlaga i nečistoće iz pora. Iz podataka izoterme adsorpcije dušika, BET metodom, određene su specifične površine dobivenih mezoporoznih materijala. Pomoću Barrett-Joyner-Halenda (BJH) metode ispitivanja, izračunane su veličine pora. Iz količine adsorbiranog dušika pri relativnom tlaku (p/p^0) od 0,99 dan je ukupni volumen pora.

3.3.3.6. Određivanje mikrostrukturiranosti površine nosača na bazi membrane jaja pretražnom elektronskom mikroskopijom

Određivanje mikrostrukturiranosti površine nosača na bazi membrane jaja u svrhu dodatnog razjašnjenja poroznosti provedeno je snimanjem pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM) na uređaju Hitachi TM 3030 (Hitachi, Japan).

3.3.3.7. Određivanje kapaciteta vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja

Kapacitet vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja određen je prema modificiranoj metodi koju su u svom radu opisali Ballesteros i sur. (2014). Nosač mase 0,5 g pomiješan je s 5 mL destilirane vode i/ili standarda maslinovog ulja. Smjese su miješane na vibrirajućoj miješalici IKA vortex 4 basis (IKA, Njemačka) jednu minutu i zatim centrifugirane na Hermle Z 327 (Hermle, Njemačka) centrifugi pri 5000 okretaja/min sveukupno 30 minuta nakon čega je određen volumen supernatanta. Kapacitet vezanja vode izražen je u mililitrima vode po 1 gramu nosača, dok je kapacitet vezanja ulja izražen kao mililitri ulja po 1 gramu nosača.

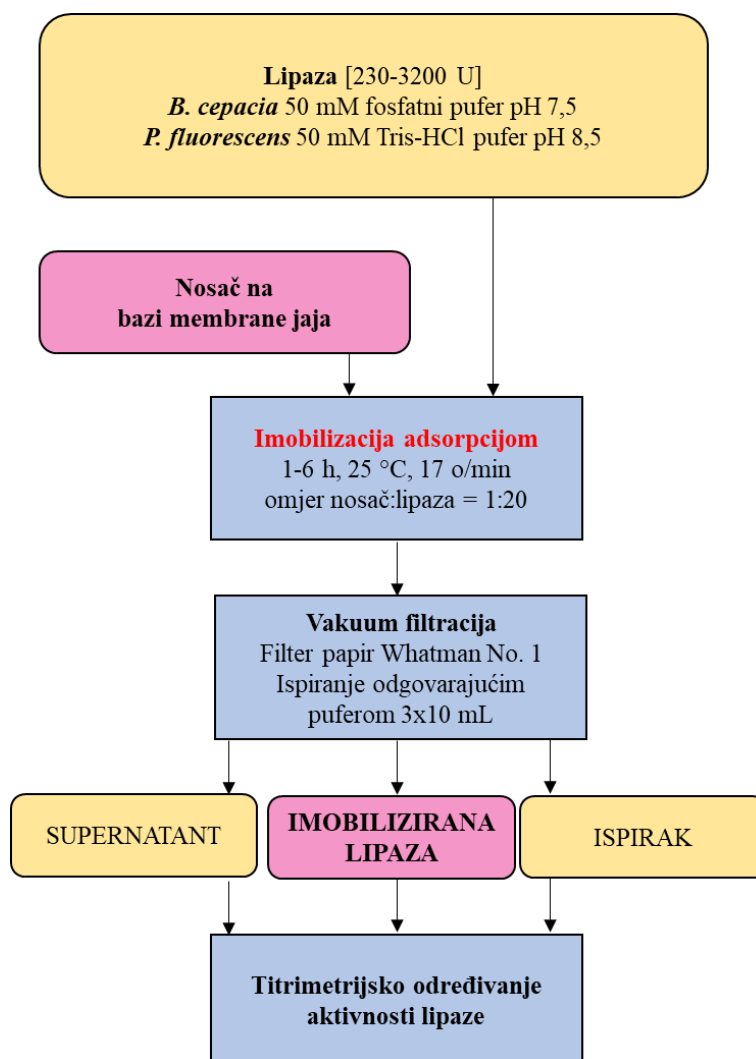
3.3.4. Imobilizacija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* lipaza na nosače na bazi membrane jaja

Imobilizacija lipaza na pripremljene nosače na bazi membrane jaja provedena je s tri različite metode, adsorpcijom te kovalentnim direktnim i kovalentnim indirektnim vezanjem. Postupak imobilizacije optimiziran je s obzirom na aktivnost lipaza u otopini za imobilizaciju i vrijeme imobilizacije. U postupku optimiranja rasponi aktivnosti lipaza u otopini za imobilizaciju kretali su se od 230 do 3200 U u rasponu vremena do maksimalno šest sati. Prećenje postupka imobilizacije, bez obzira na primijenjenu metodu, provedeno je određivanjem aktivnosti imobilizirane lipaze standardnim titrimetrijskim testom uz maslinovo ulje kao supstrat (Mustranta i sur., 1993).

3.3.4.1. Imobilizacija adsorpcijom

Imobilizacija lipaza adsorpcijom na pripremljene nosače na bazi membrane jaja provedena je kombinacijom metoda Chattopadhyay i Sen (2012) te Salleh i sur. (2016) u trajanju od 1 do 6 sati uz konstantnu rotaciju na multi-rotatoru Multi RS-60 (bioSan, Latvija) postavljenom na 17 okretaja/min pri sobnoj temperaturi uz različite početne aktivnosti lipaza u rasponu od 230 do 3200 U prema protokolu prikazanom na **Slici 7**. Otopine za imobilizaciju BCL u 50 mM

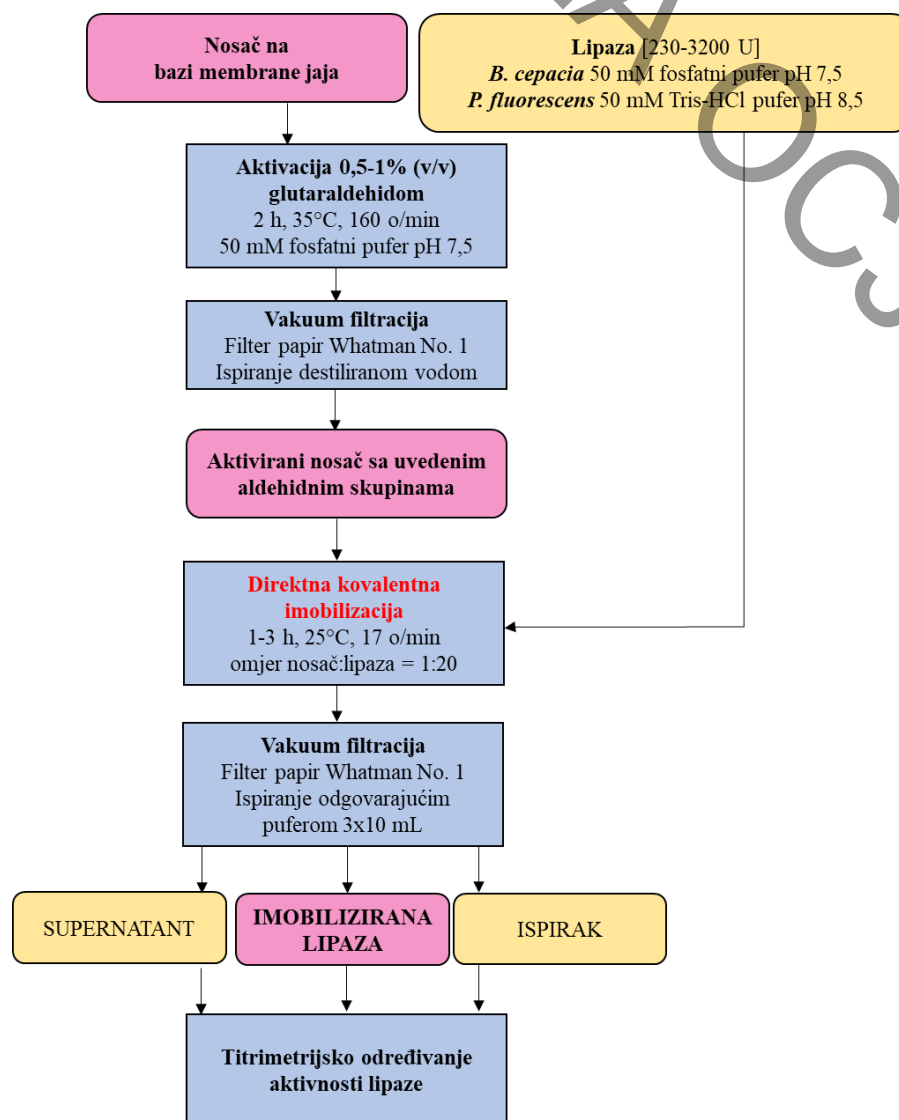
fosfatnom puferu pH 7,5 sadržavale su ukupnu aktivnost lipaze od 230, 430, 820, 1190 i 1430 U, dok su otopine PFL u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8,5 sadržavale ukupnu aktivnost lipaze od 320, 640, 1200, 1950, 2770 i 3200 U. Omjer mase nosača i volumena otopine lipaze bio je 1:20 te je stoga na 0,5 g nosača na bazi membrane jaja dodano 10 mL otopine lipaze određene aktivnosti. Nakon svakog sata imobilizacije, provedena je filtracija vakuumskom pumpom preko Whatman (No. 1) filter papira, a imobilizirana lipaza je isprana tri puta s 10 mL odgovarajućeg pufera. Aktivnost imobilizirane lipaze određena je prema Mustranti i sur. (1993) i prikazana kao [U/g] vlažnog nosača.



Slika 7 Protokol imobilizacije lipaza adsorpcijom na nosače na bazi membrane jaja

3.3.4.2. Imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem

U slučaju direktne kovalentne imobilizacije pripremljeni nosači su prije imobilizacije lipaza aktivirani glutaraldehidom koncentracije 0,5 i 1 % u trajanju od 2 sata prema metodi (Singh i sur., 2016) u svrhu utvrđivanja optimalne koncentracije glutaraldehida. Nakon toga je uslijedilo kovalentno vezanje lipaza u trajanju od 1 do 3 sata uz konstantnu rotaciju na multi-rotatoru Multi RS-60 (bioSan, Latvija) postavljenom na 17 okretaja/min pri sobnoj temperaturi uz različite početne aktivnosti lipaza u rasponu od 230 do 3200 U prema protokolu prikazanom na **Slici 8**. Otopine BCL u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,5 sadržavale su ukupnu aktivnost lipaze od 230, 430, 820, 1190 i 1430 U, dok su otopine PFL u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8,5 sadržavale ukupnu aktivnost lipaze od 320, 640, 1200, 1950, 2770 i 3200 U. Omjer mase nosača i volumena otopine lipaze bio je 1:20, te je stoga na 0,5 g nosača na bazi membrane jaja dodano 10 mL otopine lipaze odgovarajuće aktivnosti. Nakon svakog sata imobilizacije, provedena je filtracija vakuumskom pumpom preko Whatman (No. 1) filter papira, a imobilizirana lipaza je isprana tri puta s 10 mL odgovarajućeg pufera. Aktivnost imobilizirane lipaze određena je prema Mustranti i sur. (1993) i prikazana kao [U/g] vlažnog nosača.

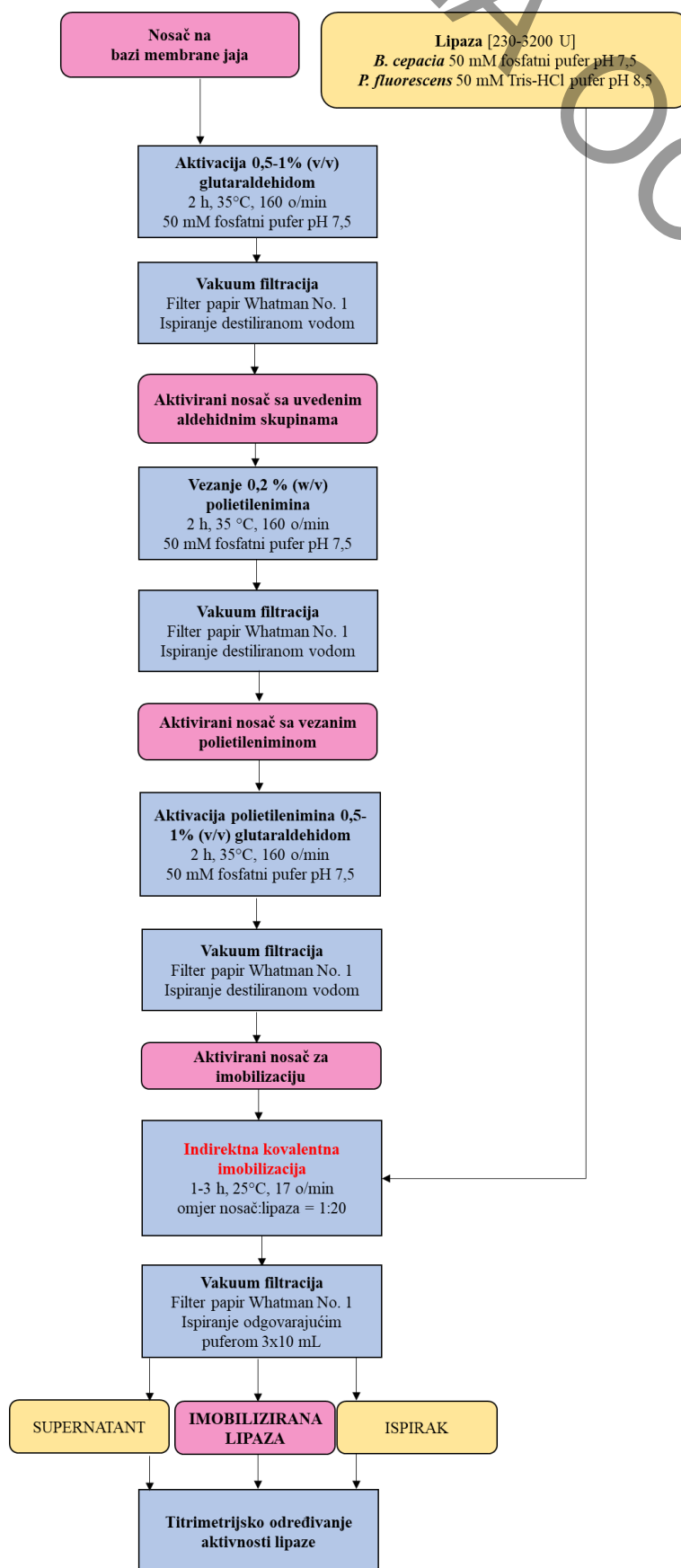


Slika 8 Protokol imobilizacije lipaza direktnim kovalentnim vezanjem na nosače na bazi membrane jaja

3.3.4.3. Imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem

Aktivacija nosača u slučaju indirektno kovalentne imobilizacije provedena je glutaraldehidom koncentracije 0,5 i 1 % u trajanju od 2 sata prema metodi Singh i sur. (2016) u svrhu utvrđivanja optimalne koncentracije glutaraldehida. Nakon toga je uslijedilo vezanje *fleksibilne ruke* polietilenimina koncentracije 0,2 % u trajanju od 2 sata prema metodi Cui i sur. (2013) te aktivacija polietilenimina glutaraldehidom koncentracije 0,5 % u trajanju od 2 sata. Imobilizacija lipaza na ovako aktivirane nosače provedena je u trajanju od 1 do 3 sata uz konstantnu rotaciju na multi-rotatoru Multi RS-60 (bioSan, Latvija) postavljenom na 17 okretaja/min pri sobnoj temperaturi uz različite početne aktivnosti lipaza u rasponu od 230 do 3200 U prema protokolu prikazanom na **Slici 9**. Otopine BCL u 50 mM fosfatnom puferu pH 7,5 sadržavale su ukupnu aktivnost lipaze od 230, 430, 820, 1190 i 1430 U, dok su otopine

PFL u 50 mM Tris–HCl puferu pH 8,5 sadržavale ukupnu aktivnost lipaze od 320, 640, 1200, 1950, 2770 i 3200 U. Omjer mase nosača i volumena otopine lipaza bio je 1:20, te je stoga na 0,5 g nosača na bazi membrane jaja dodano 10 mL otopine lipaze odgovarajuće aktivnosti. Nakon svakog sata imobilizacije, provedena je filtracija vakuumskom pumpom preko Whatman (No. 1) filter papira, a imobilizirana lipaza je isprana tri puta s 10 mL odgovarajućeg pufera. Aktivnost imobilizirane lipaze određena je prema Mustranti i sur. (1993) i prikazana kao [U/g] vlažnog nosača.



Slika 9 Protokol imobilizacije lipaza indirektnim kovalentnim vezanjem na nosače na bazi membrane jaja

Nakon provedenih imobilizacija, s obzirom na korištene dvije lipaze sa pet do šest početnih aktivnosti za imobilizaciju, tri tehnike imobilizacije i 1 – 6 h trajanja imobilizacije pripremljeno je 312 imobiliziranih lipaza koje su bile podvrgnute trima stupnjevima odabira, a koji su detaljnije objašnjeni u podpoglavlju **3.3.8.** i prikazan na **Slici 10.**

U ovom dijelu istraživanja, nakon završenih imobilizacija proveden je prvi stupanj odabira imobiliziranih lipaza gdje je od svakog tipa imobilizacije izdvojeno po dvije imobilizirane lipaze (2 BCL i 2 PFL) na svakom nosaču s najvećom aktivnosti u optimalnom vremenu imobilizacije. Prema tome broj predodabranih lipaza iznosio je ukupno 36 imobiliziranih lipaza (**Tablica 10**) koje su nadalje testirane na mogućnost desorpcije.

3.3.5. Liofilizacija imobiliziranih lipaza

Nakon odabira gore prikazanih 36 lipaza, bilo je potrebno imobilizirati veću količinu svake od njih kako bi se mogla provesti daljnja ispitivanja i biokemijska karakterizacija. Imobilizirane lipaze su potom podvrgnute procesu liofilizacije, kako bi se osigurala njihova stabilnost te ih se pripremi za daljnje analize. Liofilizacija je provedena na liofilizatoru ALPHA 2–4 LSC PLUS (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Njemačka) u trajanju od 24 sata. Ovaj postupak je ključan za očuvanje aktivnosti enzima tijekom dugotrajnog skladištenja i omogućavanje preciznog izvođenja svih potrebnih testova u budućim istraživanjima.

3.3.6. Određivanje desorpcije imobiliziranih lipaza

Imobilizirana lipaza (25 mg) suspendirana je u 1,5 mL fosfatnog pufera (50 mM, pH 7,5) za BCL ili Tris–HCl pufera (50 mM, pH 8,5) za PFL koji je sadržavao 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 ili 1 M natrijevog klorida, tijekom jednog sata uz stalnu rotaciju na multi-rotatoru Multi RS-60 (bioSan, Latvija) postavljenom na 17 okretaja/min na sobnoj temperaturi. Određena je aktivnost imobiliziranih lipaza te lipaza u supernatantu koji je dobiven centrifugiranjem uzoraka u trajanju od 5 minuta na centrifugi HERMLE Z 327 K (Hermale, Njemačka) na 10 000 g. Rezultati u supernatantu su izraženi kao aktivnost [U] dok su za imobiliziranu lipazu prikazani kao relativne aktivnosti gdje 100 % relativne aktivnosti označava uzorke u puferu bez dodatka soli (0 M NaCl).

Sukladno dobivenim rezultatima, proveden je drugi stupanj odabira imobiliziranih lipaza obzirom na početnu aktivnost lipaza, nosač i tehniku imobilizacije te je od 36 imobiliziranih lipaza, nakon prvog stupnja odabira, na temelju rezultata desorpcije odabrano ukupno 18 imobiliziranih lipaza (9 BCL i 9 PFL) kojima su nadalje određena biokemijska i operativna svojstva.

3.3.7. Određivanje biokemijskih i operativnih svojstava slobodnih i imobiliziranih lipaza

Biokemijska i operativna svojstva slobodnih i imobiliziranih lipaza određena su prije i nakon imobilizacije, a uključivala su određivanje pH i temperaturnog optimuma, pH i temperaturne stabilnosti, stabilnosti u organskim otapalima, stabilnosti skladištenjem, kinetičkih parametara i supstratne specifičnosti.

3.3.7.1. Test aktivnosti lipaza

Aktivnost lipaza određena je standardnim titrimetrijskim testom s maslinovim uljem kao supstratom prema Mustranti i sur. (1993) uz odgovarajuće modifikacije. Supstrat je pripremljen emulgiranjem 30 mL maslinovog ulja sa 70 mL reagensa za emulgiranje, prethodno zagrijanog na 50 °C, u trajanju od 1 min pomoću homogenizatora Homogenizer OV5 (VELP SCIENTIFICA, SAD). Reagens za emulgiranje (1 L) pripremljen je od natrijeva klorida (17,9 g), kalijeva dihidrogenfosfata (0,41 g), glicerola (540 mL), arapske gume (50 g) i destilirane vode. Reakcijska smjesa sadržavala je 5 mL emulzije supstrata, 4 mL 0,2 M natrijevog fostatnog pufera (pH 8) i 1 mL (1 mg/mL) otopine enzima (u slučaju slobodnih lipaza) ili 5 mL emulzije, 5 mL 0,2 M natrijevog fosfatnog pufera (pH 8) te imobilizirane lipaze mase 100 mg (vlažna masa) i/ili 25 mg liofilizirane imobilizirane lipaze. Reakcijska smjesa, u oba slučaja, inkubirana je 20 minuta pri 50 °C uz stalno miješanje na vodenoj kupelji Memmert WNE14 (Memmert, Njemačka). Reakcija je zaustavljena dodatkom 10 mL smjese acetona i etanola omjera 1:1, v/v. Oslobođene masne kiseline titrirane su s 0,05 M otopinom natrijevog hidroksida uz 250 µL fenolftaleina kao indikatora.

3.3.7.2. Određivanje optimalnog pH i temperature

Optimalni pH lipaza određen je u rasponu vrijednosti od 6 do 10 primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze. Korištena su tri različita puferka sustava: natrijev fosfatni pufer (pH 6, 7 i 8), Tris–HCl pufer (pH 8 i 9) i glicin–NaOH pufer (pH 9 i 10). Nakon određivanja optimalnog pH određen je i temperaturni optimum, uz optimalne pH vrijednosti, u rasponu od 30 do 70 °C. Rezultati su prikazani kao relativne aktivnosti gdje 100 % označava aktivnost pri optimalnom pH, odnosno temperaturi.

3.3.7.3. Određivanje pH i temperaturne stabilnosti

Nakon određivanja pH i temperaturnog optimuma, ispitana je pH i toplinska stabilnost lipaza pomoću termobloka LLG uniBLOCKTHERM (LLG, Njemačka) uz stalno miješanje na

250 okretaja/min. pH stabilnost praćena je tijekom šest sati na optimalnoj temperaturi otapanjem lipaza u tri različita pufera sustava (1 mg/mL za slobodnu lipazu i 25 mg u 1,5 mL za liofiliziranu imobiliziranu lipazu): 100 mM natrijev fosfatni pufer pH 6, 7 i 8, i 100 mM Tris-HCl pufer pH 9. Temperaturna stabilnost ispitivana je tijekom šest sati pri optimalnom pH (u optimalnom puferu) i pri različitim temperaturama (40, 50, 60 i 70 °C). Uzorci su testirani svakih sat vremena (nakon centrifugiranja), primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze, na rezidualnu aktivnost [%] imobilizirane lipaze gdje je aktivnost netretiranog i nezagrijanog uzorka određena kao 100 %, a aktivnost u supernatantu je izražena kao [U].

3.3.7.4. Određivanje stabilnosti u organskim otapalima

Stabilnost u organskim otapalima ispitivana je tijekom tri sata pri optimalnoj temperaturi, korištenjem termobloka LLG uniBLOCKTHERM (LLG, Njemačka) uz stalno miješanje na 250 okretaja/min, dodavanjem lipaza u 30 %-tnu otopinu metanola ili etanola (1 mg/mL za slobodnu lipazu i 25 mg u 1,5 mL za liofiliziranu imobiliziranu lipazu). Uzorci su testirani svakih sat vremena (nakon centrifugiranja), primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze, na rezidualnu aktivnost [%] imobilizirane lipaze gdje je aktivnost netretiranog i nezagrijanog uzorka određena kao 100 %, a aktivnost u supernatantu je izražena kao [U].

3.3.7.5. Određivanje stabilnosti skladištenjem

Stabilnost skladištenjem slobodne i imobilizirane lipaze ispitana je tijekom sedam dana u hladnjaku (4 °C) i na sobnoj temperaturi (25 °C). Dok su imobilizirane lipaze pohranjene u čvrstom, liofiliziranom obliku, slobodne su otopljene (1 mg/mL) u odgovarajućim puferima: 100 mM natrijev fosfatni pufer pH 6, 7 i 8 i 100 mM Tris-HCl pufer pH 9. Uzorci su testirani svaki dan, primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze, na rezidualnu aktivnost [%] pri čemu je aktivnost na dan početka skladištenja određena kao 100 %.

3.3.7.6. Određivanje kinetičkih parametara

Kinetički parametri K_m i V_{max} te $K_{0,5}$ i h za hidrolizu maslinovog ulja slobodnom i imobiliziranom lipazom određeni su ispitivanjem aktivnosti lipaze s rastućim koncentracijama supstrata standarda maslinovog ulja u rasponu 19,8 – 159,99 mmol/L primjenom standardnog titrimetrijskog testa za aktivnost lipaze. Aktivnost lipaze pri koncentraciji maslinovog ulja od 159,99 mmol/L određena je kao 100 %. Preferirani kinetički model i kinetički parametri su određeni nelinearnom regresijskom analizom u programu GraphPad Prism (9.0.2), koristeći se usporedbom dva kinetička modela, Michaelis–Menten kinetike i alosterije.

3.3.7.7. Određivanje supstratne specifičnosti

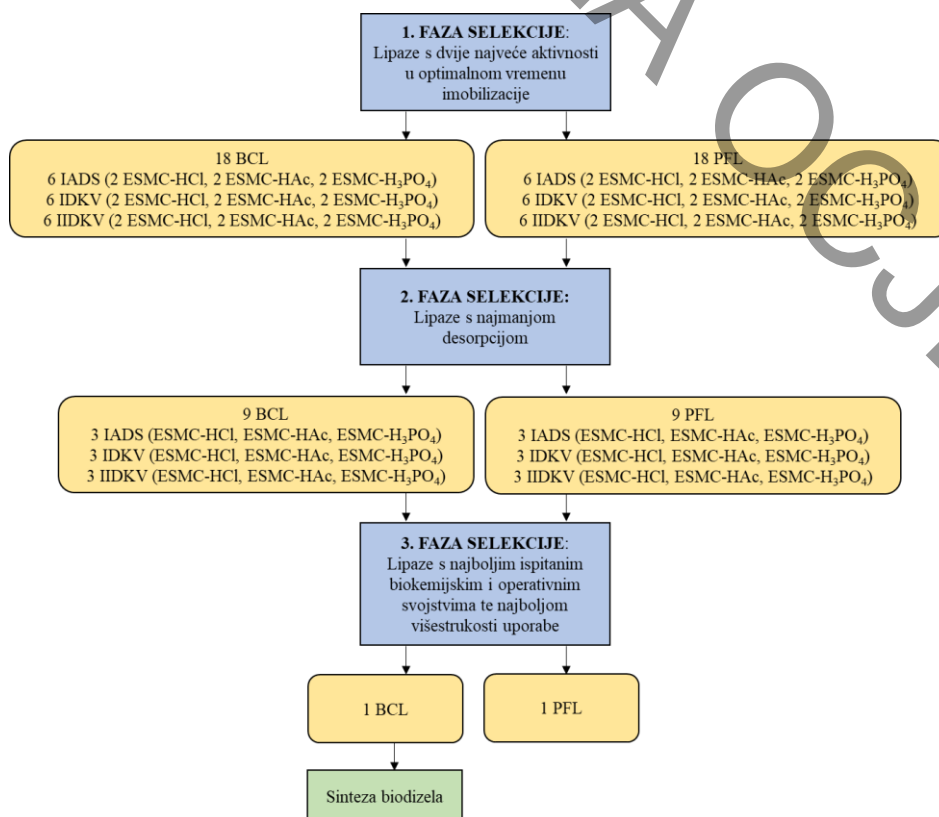
Supstratna specifičnost slobodnih i imobiliziranih lipaza prema odabranim različitim uljima i svinjskoj masti određena je standardnim titrimetrijskim testom pri optimalnom pH i temperaturi. Ispitana ulja uključivala su standard maslinovog ulja te komercijalno dostupna ulja: djevičansko maslinovo, suncokretovo, biljno, repičino i kokosovo, zatim otpadno jestivo ulje i svježu svinjsku mast. Aktivnost lipaze u standardu maslinovog ulja određena je kao 100 %.

3.3.7.8. Određivanje višestrukosti uporabe

Mogućnost višestrukosti uporabe određena je prema Palaciosu i sur. (2014) praćenjem hidrolitičke aktivnosti imobiliziranih lipaza uz *p*-nitrofenil palmitat (*p*NPP) kao supstrat tijekom deset ciklusa. Reakcijska smjesa sastojala se od 3,5 mL 50 mM Tris-HCl pufera pH 8 koji je sadržavao 1 g/L arapske gume i 0,4 mL 15 mM *p*NPP-a otopljenog u 2-propanolu. Smjesa je prethodno zagrijana na 40 °C, a zatim je dodano 25 mg imobilizirane lipaze. Nakon 5 min inkubacije na 40 °C reakcija je zaustavljena dodatkom 1,5 mL Marmurove otopine (kloroform:izoamil alkohol = 24:1). Uzorak je centrifugiran na 10 000 okretaja/min tijekom 5 minuta na 4 °C nakon čega je apsorbancija gornjeg sloja mjerena na 410 nm.

3.3.8. Prikaz selekcije imobiliziranih lipaza

Nakon imobilizacije provedene su tri razine selekcije za daljnju karakterizaciju imobiliziranih lipaza, a koje su prikazane na **Slici 10** u svrhu lakšeg razumijevanja postupka probira. Prvi odabir uključivao je lipaze s dvije najveće aktivnosti pripremljene u optimalnom vremenu imobilizacije. U skladu s tim, a s obzirom na dvije lipaze, dvije početne aktivnosti, tri nosača i tri tehnike imobilizacije odabrano je 36 imobiliziranih lipaza: 18 BCL i 18 PFL s dvije najbolje aktivnosti na svakom nosaču; ESMC-HCl, ESMC-HAc, ESMC-H₃PO₄, i to 6 BCL i 6 PFL imobiliziranih adsorpcijom, 6 BCL i 6 PFL imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem te 6 BCL i 6 PFL imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. Selektiranih 36 lipaza testirano je na svojstva desorpcije (otpuštanje enzima sa nosača). Nakon toga, sukladno rezultatima desorpcije ukupno je odabrano 18 imobiliziranih lipaza (9 BCL i 9 PFL) kojima su nadalje određena ključna biokemijska i operativna svojstva. U trećem, završnom, stupnju probira krajnji broj odabranih lipaza, sukladno rezultatima biokemijskih i operativnih svojstava, je 1 BCL i 1 PFL. U sklopu ovog doktorskog rada za potrebe provjere funkcionalnosti imobiliziranih lipaza u sinteza biodiezla (transesterifikacija) odabrana je regionspecifična lipaza (BCL).



Slika 10 Prikaz selekcije imobiliziranih lipaza

3.3.9. Sinteza biodizela

Provjera funkcionalnosti imobiliziranih lipaza na nosače na bazi membrane jaja najpoželjnijih karakteristika proveden je regionespecifičnom lipazom (BCL) na primjeru sinteze biodizela reakcijom transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja uz prisustvo metanola. Sinteza je provedena prema modificiranim uvjetima navedenim u radu Ostojčić i sur. (2021) sukladno rezultatima kapaciteta vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja. Stoga se reakcijska smjesa sastojala od 17,1155 g ulja, 2,1275 g metanola, 3,0185 g 0,2 M Tris-HCl pufera pH 9,0 te 0,25 g imobilizirane lipaze. Reakcija je provedena u trajanju od jednog sata, pri 40 °C uz stalno miješanje pri 500 okretaja/min. Nakon sinteze uzorci su profiltrirani (PTFE filter za špricu, veličina pora: 0,45 μm , *i.d.* = 25 mm) te centrifugirani na 10 000 g tijekom 5 min. Uspješnost provedene sinteze procijenjena je na temelju udjela nastalih metilnih estera masnih kiselina propisanih standardom EN HRN 14214 (EN HRN 14214, 2019).

Metilni esteri masnih kiselina određeni su plinskom kromatografijom standardnom metodom sukladno normi HRN EN 14103 uz određene prilagodbe s obzirom na konfiguraciju uređaja. Za određivanje korišten je Shimadzu GC – 2010 Plus plinski kromatograf s plameno – ionizacijskim detektorom uz SH–Rtx–Wax kapilarnu kolonu (duljina 30 m, promjer 0,25 mm i 0,25 μm debljina stacionarne faze) uz dušik kao plin nositelj (protok 1,33 ml/min).

Injektiranje uzoraka je provedeno na 250 °C uz omjer podjele 1:50 i volumen od 1 µL uz početnu temperaturu od 120 °C tijekom 5 minuta, temperaturni gradijent od 5 °C /min do 220 °C tijekom 20 minuta i temperaturu plameno-ionizacijskog detektora od 300 °C.

Identifikacija metilnih estera masnih kiselina u uzorcima provedena je usporedbom retencijskih vremena s onima dobivenim certificiranim referentnim materijalom (Supelco F.A.M.E. Mix, C4-C24) analiziranim pod istim uvjetima, a kvantifikacija je provedena metodom interne kalibracije korištenjem internog standarda nonadekanse masne kiseline C 19 (Sigma Aldrich).

Priprema uzorka sastojala se od odvage točne količine uzorka biodizela (100 mg) u odmjernu tikvicu od 10 ml uz dodatak internog standarda metilnog estera masne kiseline C 19 (100 mg) te je tikvica nadopunjena do oznake heptanom (Honeywell Research Chemicals). Sadržaj metilnih estera određen je prema niže navedenoj jednadžbi (5):

$$C = \frac{\sum A - A_{Ei}}{A_{Ei}} \cdot x \frac{W_{Ei}}{W} \times 100 \quad (5)$$

gdje je:

$\sum A$ – zbroj površina svih pikova metilnih estera masnih kiselina od C 4:0 do C 24:1,

A_{Ei} – površina pika internog standarda metilnog estera masne kiseline C 19,

W_{Ei} – masa korištenog internog standarda metilnog estera masne kiseline C 19 [mg],

W – masa uzorka biodizela [mg].

Ukupni sadržaj metilnih estera masnih kiselina (C) izražen je kao maseni postotak [% , m/m].

3.3.10. Tehno-ekonomska analiza proizvodnje nosača na bazi membrane jaja i imobilizacije lipaza

Tehno-ekonomska analiza obrade otpadne ljuske jaja za pripremu nosača na bazi membrane jaja za imobilizaciju lipaza provedena je na laboratorijskom mjerilu. Proces je analiziran prema shemi prikazanoj na **Slici 6**, počevši od same proizvodnje nosača bez uključivanja sporednih procesnih struja, kako bi se dobio uvid u osnovne troškove i efikasnost. Nakon toga, analizirane su sve procesne struje, poput dobivanja proteina bjelanjka jajeta, kalcijevih soli i redestilacije acetona. U daljnjem koraku, provedena je analiza troškova imobilizacije lipaza, koja je uključivala samo krajnje odabrane lipaze. Za svaku od ovih lipaza, razmotreni su troškovi kemikalija, vode, potrošnog materijala i energije.

3.3.11. Statistička obrada podataka

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti \pm standardne devijacije izračunane korištenjem Microsoft® Excel® 2016 MSO. Rezultati su obrađeni korištenjem računalnog programa Statistica 13.1 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD) pomoću metode analize varijance (ANOVA) za procjenu utjecaja svih određenih biokemijskih i operativnih svojstava, i Fisher-ovog LSD testa (test najmanje značajne razlike, $p < 0,05$) za procjenu statistički značajnih razlika između pojedinih imobiliziranih lipaza.

ZNA
OCJENU

4. REZULTATI I RASPRAVA

Priprema nosača za imobilizaciju lipaza predviđenih ovim doktorskim radom uključivala je korištenje otpadne ljuske kokošnjih jaja (**Slika 11**) kao početne sirovine. Ljuska jaja iz proizvodnje tekućih, smrznutih i dehidriranih proizvoda od kokošnjih jaja dobavljena je od tvrtke Elcon prehrambeni proizvodi d.o.o. iz Zlatar Bistrice (Hrvatska), skladištena zamrzavanjem na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ te je nadalje korištena sukladno dinamici eksperimentalnog dijela doktorskog rada.



Slika 11 Otpadna ljuska kokošnjih jaja

4.1. Kemijski sastav ljuske jaja

Kemijski sastav ljuske jaja određen je standardnim kemijskim metodama, a rezultati su prikazani u **Tablici 4**.

Tablica 4 Kemijski sastav ljuske jaja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

<i>PARAMETAR</i>	<i>VRIJEDNOST</i>
Suha tvar [g/100 g]	$85,00 \pm 2,31$
Pepeo [g/100 g s.t.]	$52,81 \pm 0,50$
Ukupni proteini [g/100 g s.t.]	$5,35 \pm 0,14$
Ukupni lipidi [g/100 g s.t.]	$0,59 \pm 0,04$
Kalcijev karbonat [g/100 g s.t.]	$90,79 \pm 1,20$

Prvo je određen udio suhe tvari otpadne ljuske jaja nakon čega su svi rezultati daljnjih analiza izraženi na suhu tvar. Iz **Tablice 4** vidljivo je da je udio suhe tvari u otpadnoj ljusci jaja $85,00 \pm 2,31$ g/100 g, dok se u dostupnoj literaturi za udio suhe tvari ljuske jaja vrijednosti kreću u rasponu od 70 pa sve do 98 % (Waheed i sur., 2019; Walton i sur., 1973) gdje taj udio ponajviše ovisi o manipulaciji ljuskom jaja prije određivanja. Iz rezultata (**Tablica 4**) je jasno vidljivo da u kemijskom sastavu dominira kalcijev karbonat i to s udjelom od $90,79 \pm 1,20$ g/100 g s.t. Ovaj podatak je očekivan budući da se udio kalcijeva karbonata u ljusci jaja prema literaturi kreće u rasponu od preko 90 pa sve do 98 % (Al-Awwal i Ali, 2015; Bashir

i Manusamy, 2015; Nys i Gautron, 2007; Waheed i sur., 2019; Walton i sur., 1973). Ukupni proteini čine $5,35 \pm 0,14$ g/100 g s.t. Ovi podatci su djelomično u skladu sa rezultatima koje navode S. Ray i sur. (2017) te Waheed i sur. (2019) gdje se u oba slučaja spominje udio proteina od oko 5 % dok je kod autora Waltona i sur. (1973) ovaj udio nešto viši i iznosi 7,56 %. S druge strane, Al-Awwal i Ali (2015) su u svom radu objavili puno niži udio proteina od 1,35 %. Razlike u rezultatima mogu se ponajviše objasniti već spomenutom manipulacijom ljuskom jaja prije analiza, odnosno ispiru li se ili ne prijanjajući (proteinski) sloj bjelanjka. Vrijednost udjela ukupnih lipida iznosi $0,59 \pm 0,04$ g/100 g s.t što je nešto više od podataka pronađenih u literaturi 0,24 % (Walton i sur., 1973) odnosno 0,35 % (Ray i sur., 2017). Analizom otpadne ljuske jaja određen je i udio pepela koji iznosi $52,81 \pm 0,50$ g/100 g s.t čime je ta vrijednost nešto viša u odnosu na literaturnu vrijednost koja iznosi $43,50 \pm 0,032$ % autora Al-Awwal i Alija (2015) prema čijim je uvjetima analiza i odrađena. Međutim, drugi autori navode za količinu pepela vrijednosti veće od 90 % gdje se kao razlog odstupanja može pretpostaviti temperatura žarenja (S. Ray i sur., 2017; Waheed i sur., 2019; Walton i sur., 1973). Naime, temperatura žarenja značajno utječe na rezultat određivanja udjela pepela u uzorcima jer može utjecati na stabilnost i kemijski sastav preostalog ostatka nakon izgaranja organske tvari. Ako je temperatura žarenja preniska (< 500 °C), može doći do nepotpunog sagorijevanja organske tvari, što može rezultirati precijenjenim udjelom pepela jer će u ostatku biti prisutni organski ostaci ili neizgoreni ugljik.

4.2. Pripremljeni nosači na bazi membrane jaja

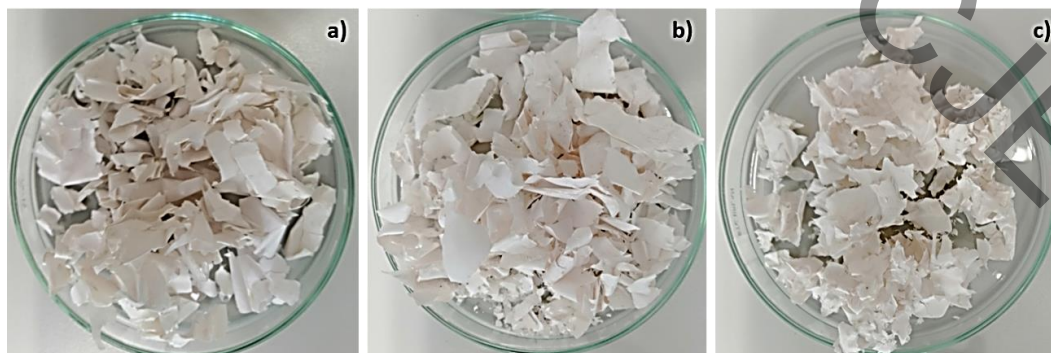
Ukupno je pripremljeno po 500 g svakog od tri nosača na bazi membrane jaja, ESM-HCl, ESM-HAc i ESM-H₃PO₄, prema postupku opisanom u eksperimentalnom dijelu rada (podpoglavlje 3.3.2., Slika 6). Dio pripremljenih nosača analiziran je odmah, a dio je vakuumiran i čuvan na +4 °C za potrebe postupka imobilizacije lipaza. Prinosi proizvedenih nosača prikazani su **Tablicom 5**.

Tablica 5 Prinosi nosača na bazi membrane jaja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

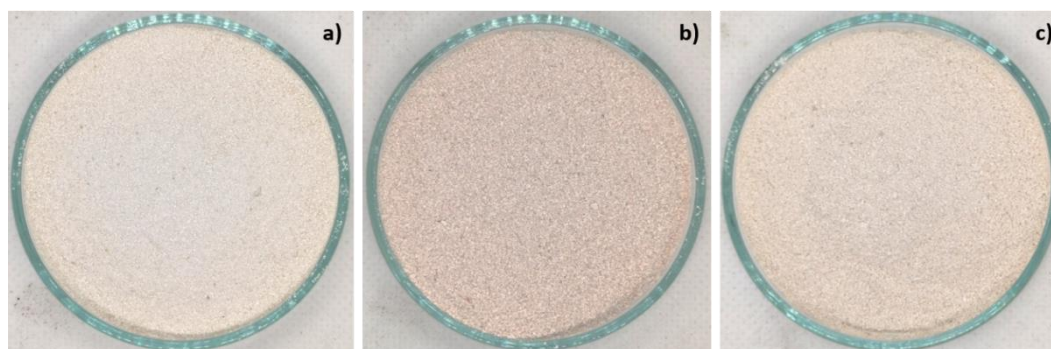
NOSAČ	ESMC-HCl	ESMC-HAc	ESMC-H ₃ PO ₄
Prinos [g/100 g]	$2,31 \pm 0,26$	$2,09 \pm 0,46$	$2,08 \pm 0,36$

Obrada isprane ljuske jaja različitim kiselinama rezultirala je s minimalnih $2,08 \pm 0,36$ g (ESMC-HCl) do maksimalnih $2,31 \pm 0,26$ g (ESMC-H₃PO₄) nosača na bazi membrane jaja po

100 g otpadne ljuske jaja. U dostupnoj znanstvenoj literaturi nisu pronađeni podaci o prinosu nosača na bazi membrane jaja proizvedenih obradom otpadne ljuske jaja kiselinama.



Slika 12 Proizvedene membrane jaja pripremljene obradom ljuske jaja a) 5 % kloridnom kiselinom, b) 10 % octenom kiselinom i c) 15 % *o*-fosfornom kiselinom



Slika 13 Proizvedeni nosači na bazi membrane jaja pripremljeni obradom ljuske jaja a) 5 % kloridnom kiselinom (ESMC-HCl), b) 10 % octenom kiselinom (ESMC-HAc) i c) 15 % *o*-fosfornom kiselinom (ESMC-H₃PO₄)

Na **Slikama 12 i 13** prikazane su fotografije dobivenih membrana jaja (**Slika 12**) kao i nosači pripremljeni na bazi membrane jaja (**Slika 13**). Dok se vizualno na fotografijama membrana jaja ne mogu uočiti razlike u boji, one su jasnije vidljive kod pripremljenih nosača. Odnosno, nosači pripremljeni octenom i *o*-fosfornom kiselinom čine se više ružičastima (**Slika 13b i 13c**), dok su oni pripremljeni klorovodičnom kiselinom imali žutu do svjetlo zelenu nijansu (**Slika 13a**). Žutu boju membrana jaja u svom radu navode i Wangrungrøj i sur. (2018), iako su membrane dobili odvajanjem od ljuske jaja klasifikatorom koji razdvaja membranu od ljuske, nakon ispiranja ljuske jaja vodom te sušenja. Baláž (2014) u svome preglednom radu navodi da se žuta boja membrana mijenja u ružičastu uranjanjem istih u kiselinu niske koncentracije. Prema tome, sirove/netretirane membrane su prirodno žute boje kao i pripremljeni nosači sa

klorovodičnom kiselinom (najniža primijenjena koncentracija kiseline) te ružičaste nijanse u slučaju primjene druge dvije kiseline (veće koncentracije) što potvrđuju navode iz literature. Razlike u boji pripremljenih nosača na bazi membrane jaja dodatno su potvrđene mjerenjem u CIELab sustavu, a rezultati su prikazani **Tablicom 6**. CIELAB, ili CIE $L^*a^*b^*$, sustav boja predstavlja kvantitativni odnos boja na tri osi: L^* vrijednost označava svjetlinu, a a^* i b^* su koordinate kromatičnosti (Ly i sur., 2020). Na dijagramu prostora boja, L^* je predstavljen na okomitoj osi s vrijednostima od 0 (crno – tamno) do 100 (bijelo – svijetlo). Vrijednost a^* označava crveno – zelenu komponentu boje, gdje ρa^* (pozitivno) i ρa^* (negativno) označavaju crvene odnosno zelene vrijednosti. Žuta i plava komponenta predstavljene su na b^* osi kao ρb^* (pozitivna) odnosno ρb^* (negativna) vrijednost. Shodno tome, iz rezultata se može zaključiti da sva tri nosača na bazi membrane jaja posjeduju vrlo svjetlu boju budući im je L vrijednost u rasponu od $85,93 \pm 0,03$ do $89,65 \pm 0,02$ s trendom porasta prema vrijednosti 100 (bijelo – svijetlo). Prema parametru a^* , nosači pripremljeni octenom ($2,20 \pm 0,01$) i *o*-fosfornom kiselinom ($0,55 \pm 0,02$), označavaju crvenu komponentu budući su u pozitivnim vrijednostima, dok kod nosača pripremljenog klorovodičnom kiselinom ($-0,98 \pm 0,01$) negativna vrijednost označava zelenu komponentu, čime je potvrđeno ono što je i vizualno uočeno i prethodno opisano. U slučaju b^* parametra, svi nosači sadrže žute komponente zbog pozitivnih vrijednosti ($7,85 \pm 0,01$ do $8,48 \pm 0,03$).

Tablica 6 Parametri boje nosača na bazi membrane jaja u CIELab sustavu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

PARAMETAR BOJE	ESMC-HCl	ESMC-HAc	ESMC-H ₃ PO ₄
L	$89,65 \pm 0,02$	$85,93 \pm 0,03$	$88,80 \pm 0,05$
a	$-0,98 \pm 0,01$	$2,20 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,02$
b	$7,85 \pm 0,01$	$8,19 \pm 0,02$	$8,48 \pm 0,03$

4.2.1. Kemijski sastav nosača na bazi membrane jaja

Pripremljeni nosači na bazi membrane jaja (**Slika 13**) analizirani su na kemijski sastav standardnim kemijskim metodama (**Tablica 7**) i infracrvenom spektroskopijom (**Slika 14**) te uspoređeni sa membranama jaja koje nisu kiselinski obrađivane, odnosno sirovim/netretiranim membranama (ESM-N) već su pincetom odvojene od vodom isprane ljuske jaja. Osim što su se vidno razlikovali po boji (**Slika 12**, **Slika 13**, **Tablica 6**) pripremljeni nosači na bazi membrane jaja su se razlikovali i u kemijskom sastavu (**Tablica 7**) te intenzitetu apsorpcijskih vrpci (**Slika 14**).

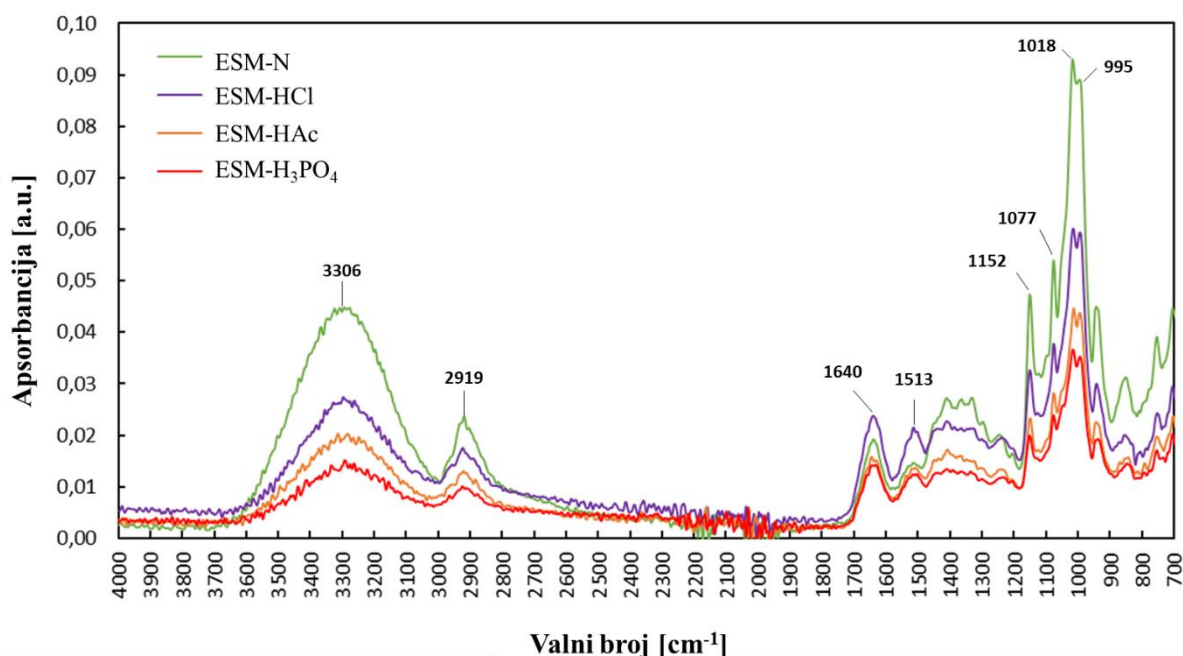
Tablica 7 Kemijski sastav nosača na bazi membrane jaja. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

PARAMETAR	ESM-N	ESMC-HCl	ESMC-HAc	ESMC-H ₃ PO ₄
Suha tvar [g/100 g]	91,45 \pm 0,36	92,17 \pm 0,39	90,85 \pm 0,12	94,45 \pm 0,10
Pepeo [g/100 g s.t.]	4,51 \pm 0,39	1,26 \pm 0,23	2,25 \pm 0,22	5,73 \pm 0,39
Ukupni proteini [g/100 g s.t.]	84,26 \pm 0,77	97,03 \pm 1,57	96,48 \pm 1,75	93,36 \pm 1,69
Ukupni lipidi [g/100 g s.t.]	0,57 \pm 0,06	0,56 \pm 0,11	0,42 \pm 0,11	0,26 \pm 0,09
Kalcijev karbonat [g/100 g s.t.]	42,15 \pm 1,08	15,19 \pm 1,83	28,13 \pm 0,77	22,07 \pm 1,24

Analiza kemijskog sastava nosača na bazi membrane jaja provedena je na sve tri vrste pripremljenih nosača, a budući da su A. C. Torres-Mansilla i Delgado-Mejía (2017) u svom istraživanju ukazali da bi izlaganje ljuske jaja 5 %-tnoj klorovodičnoj kiselini moglo dovesti do fizikalno–kemijskih promjena membrana provedena je analiza kemijskog sastava sirovih/netretiranih membrana jaja. Kao i kod otpadne ljuske jaja, i ovdje je prvo provedena analiza suhe tvari pripremljenih nosača nakon čega su svi rezultati daljnjih analiza izraženi na suhu tvar. Udio suhe tvari u pripremljenim nosačima iznosio je 91,45 \pm 0,36 g/100 g za membrane jaja bez obrade, 92,17 \pm 0,39 g/100 g za ESMC-HCl, 90,85 \pm 0,12 g/100 g ESMC-HAc te 94,45 \pm 0,10 g/100 g za ESMC-H₃PO₄ iz čega je vidljivo da ne postoji velika razlika u udjelu suhe tvari među nosačima na bazi membrane jaja dobivenih djelovanjem različitih kiselina na otpadnu ljusku jaja kao ni u odnosu na sirovu/netretiranu membranu jaja. Rezultati su u skladu s literaturnim podacima o udjelu vode u osušenim membranama koji iznosi 10 % pa sukladno tome udio suhe tvari 90 % (Vlad, 2009). Nadalje, prema dostupnoj literaturi autora Nakano i sur. (2003) te Pundir i sur. (2009), membrane jaja sadrže vrlo visok udio proteina te male količine ugljikohidrata i lipida što je ovim rezultatima (**Tablica 7**) i potvrđeno. Naime, ESMC-HCl sadrže 97,03 \pm ,57 g/100 g s.t. proteina, ESMC-HAc 96,48 \pm 1,75 g/100 g s.t. proteina dok ESMC-H₃PO₄ sadrže nešto niži udio proteina od 93,36 \pm 1,69 g/100 g s.t. što ukazuje na činjenicu da se obradom ljuske jaja 15 % o-fosfornom kiselinom iz membrana jaja gubi dio proteina. S druge strane, neobrađena membrana jaja sadrži proteine s udjelom od 84,26 \pm 0,77 g/100 g s.t. gdje se ovaj prividno manji udio u odnosu na obrađene membrane kiselinama može objasniti činjenicom da sirove membrane, zbog svog načina odvajanja sa ljuske jaja, sa sobom povlače dio kalcijeva karbonata kao i nekih drugih komponenti koje nisu određivane, a koje se djelovanjem kiselina uklanjaju. Isto tako, veća količina proteina pronađena u kiselinama tretiranim membranama vjerojatno je uzrokovana ekstrakcijom i/ili djelomičnom hidrolizom neproteinske organske tvari. Dok se ovi podatci slažu s navodom Baláza i sur. (2015) da se udio proteina u sirovim membranama kreće u

rasponu od 80 do 85 %, ostali podaci o udjelu ukupnih proteina u kiselinski proizvedenim membranama viši su od vrijednosti navedenih u dostupnoj literaturi gdje se navodi da se udio proteina u membrana kreće u rasponu od 60 do 69,2 % (King`ori, 2011; Mittal i sur., 2016). S druge strane, Tsai i sur. (2006) navode da se vlakna membrana jaja sastoje od 95 % proteina. Udio ukupnih lipida u sirovim/neobrađenim membranama jaja iznosi $0,57 \pm 0,06$ g/100 g s.t. te je viši u odnosu na ukupni udio lipida određen kod membrana koje su tretirane kiselinama, ESMC-HCl $0,56 \pm 0,11$ g/100 g s.t, ESMC-HAc $0,42 \pm 0,11$ g/100 g s.t, te ESMC-H₃PO₄ $0,26 \pm 0,09$ g/100 g s.t što je i najmanje zabilježena vrijednost. Analizom sadržaja pepela utvrđena je najveća razlika između rezultata za pojedini tip membrana. Dok neobrađene membrane sadržavaju $4,51 \pm 0,39$ g/100 g s.t pepela, ESMC-HCl te ESMC-HAc sadrže nešto niži udio pepela ($1,26 \pm 0,23$ g/100 g s.t i $2,25 \pm 0,22$ g/100 g s.t.) Nasuprot tome, kod ESMC-H₃PO₄ je zabilježen viši udio pepela, $5,73 \pm 0,39$ g/100 g s.t, u odnosu na ostale membrane jaja. Svi navedeni podatci su puno niži od udjela pepela koji su pronađeni u literaturi, 27,2 % kojeg navodi King`ori (2011) te viši od 0,31 % što navode Nakano i sur. (2003).

Kako bi se dodatno razjasnile uočene razlike u sadržaju proteina između netretiranih membrana i pripremljenih nosača na bazi membrane jaja, te kako bi se odredila neproteinska organska tvar koja je vjerojatno ekstrahirana tijekom obrade kiselinama, korištena je FTIR-ATR analiza, a infracrveni spektri su prikazani na **Slici 14**.

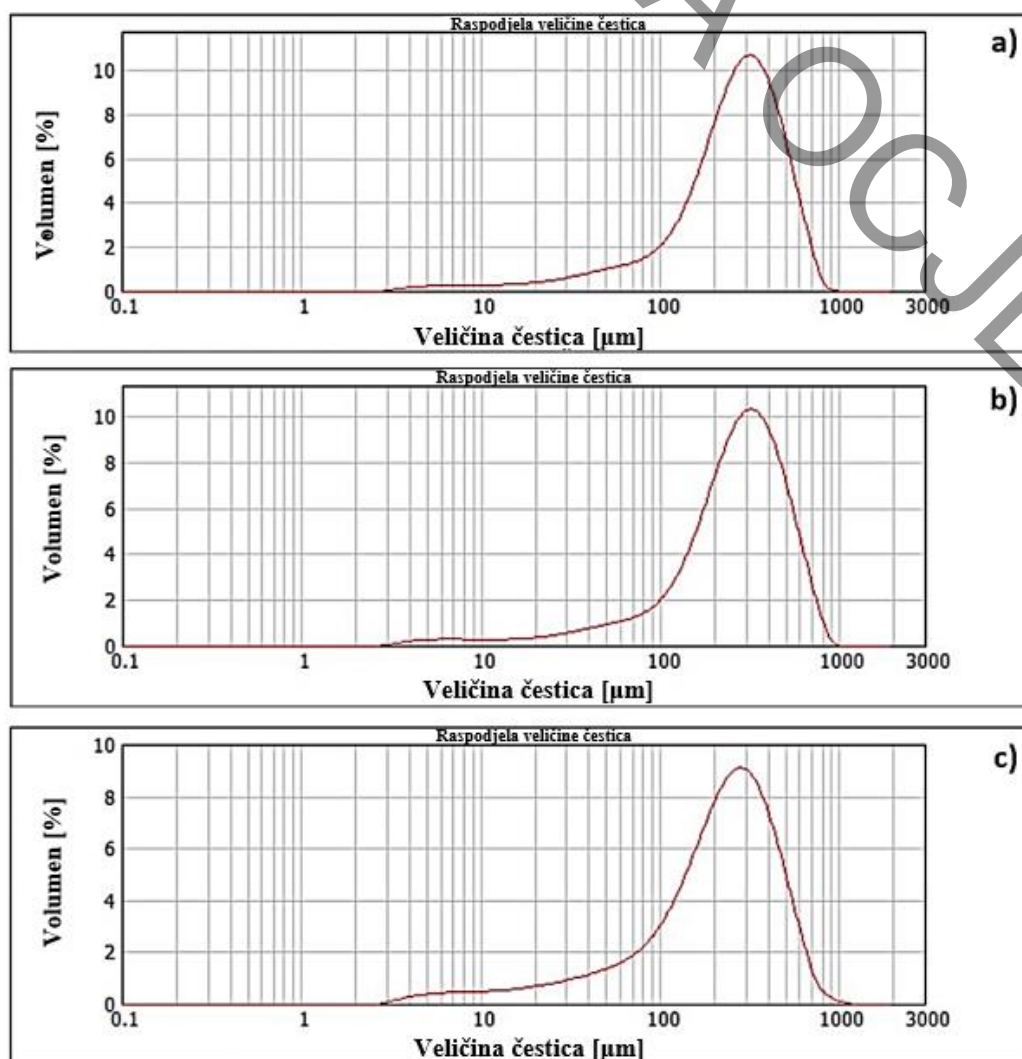


Slika 14 Infracrvena spektroskopija (FTIR-ATR) nosača na bazi membrane jaja

Svi nosači na bazi membrane jaja, kao i netretirana membrana, pokazuju identičan položaj apsorpcijskih traka koje se mogu pripisati konstitutivnim proteinima, polisaharidima, glikozaminoglikanima i lipidima (Strelec, Ostojčić, i sur., 2023). Traka sa središtem na 3306 cm^{-1} može se pripisati N–H i O–H vibracijama istezanja u proteinima i polisaharidima, traka na 2911 cm^{-1} C–H vibracijama rastezanja u lipidima, a trake na 1640 cm^{-1} ne samo C=O i C–N vibracijama istezanja amidnih veza prisutnih u proteinima, uključujući kolagenska vlakna, već i amidnim vezama prisutnim u glikozaminoglikanima koji sadrže *N*-acetilglukozamin i *N*-acetil-galaktozamin uključujući hijaluronsku kiselinu. Međutim, vrpca sa središtem na 1513 cm^{-1} mogla bi se pripisati isključivo N–H deformaciji i C–N vibraciji istezanja amidnih veza prisutnih u proteinima. Traka sa središtem na 1152 cm^{-1} mogla bi se pripisati C–O vibracijama istezanja u proteinima i ugljikohidratima, dok bi se trake prisutne u području od 1077 do 995 cm^{-1} mogle pripisati C–O vibracijama istezanja u polisaharidima. Većina opaženih traka bila je intenzivnija u FTIR-ATR spektrima netretiranih membrana od onih s kiselinama pripremljenim nosačima na bazi membrane jaja i to za sve detektirane vršne vrijednosti apsorpcije ako se promatraju ESMC-HAc i ESMC-H₃PO₄, dok je kod traka otkrivenih na 1640 i 1513 cm^{-1} najveći intenzitet pokazao ESMC-HCl. Sve ukazuje na to da su polisaharidi vjerojatno glavna neproteinska organska tvar koja je ekstrahirana iz membrana jaja tijekom obrade otpadne ljuske jaja klorovodičnom kiselinom. Uočene razlike u količini lipida između sirovih membrana i ESMC-HAc te ESMC-H₃PO₄ (**Tablica 7**) dokazane su smanjenim vršnim intenzitetom s valnim brojem od 2919 cm^{-1} koja se može pripisati C-H vibraciji istezanja endogenih lipida (Strelec, Tomičić, i sur., 2023). Iznenadujuće, mnogo veće količine ukupnih proteina otkrivene su u svim ESMC u usporedbi s netretiranim membranama (**Tablica 7**) što je očito suprotno od uočenih intenziteta vrhova koji se mogu pripisati proteinima, osim kada se radi o ESMC-HCl gdje su ti vrhovi doista najintenzivniji (1640 i 1513 cm^{-1}). Dakle, uočene razlike u procijenjenom ukupnom sadržaju proteina određenom Kjeldahl metodom (**Tablica 7**) i FTIR-ATR spektrima ispitivanih ESM-ova (**Slika 14**) mogu se objasniti nesavršenošću obje korištene metode, a ponajviše jer Kjeldahl metoda za određivanje ukupnog sadržaja proteina otkriva ne samo količinu proteina već i sve spojeve koji sadrže aminokiseline, uključujući glikozaminoglikane, ali i polisaharide. Na temelju gore navedenih rezultata, čini se vrlo mogućim da su konstitutivni oligo- i poli- saharidi, kao i neki od konstitutivnih glikozaminoglikana sirovih membrana, ekstrahirani tijekom tretiranja ljuske jaja kiselinama, što dovodi do uočenog povećanja količine ukupnih proteina i smanjenog intenziteta vrhova u FTIR-ATR spektrima za ESMC-HAc i ESMC-H₃PO₄.

4.2.2. Granulometrijski sastav nosača na bazi membrane jaja

Priprema nosača na bazi membrane jaja za imobilizaciju lipaza podrazumijeva odgovarajuću veličinu čestica nosača u skladu sa željenim rasponom. **Slika 15** prikazuje dijagrame raspodjele veličine čestica gdje se može vidjeti jasna monomodalna raspodjela veličine čestica s najvećim udjelom volumena čestica u rasponu srednjeg promjera volumena 200 – 300 μm za ESMC-HCl (**Slika 15a**) i za ESMC-HAc (**Slika 15b**), dok se kod ESMC-H₃PO₄ (**Slika 15c**) maksimum krivulje raspodjele nalazi se između 100 – 200 μm . Srednji promjeri čestica ($D(4,3)$) iznose 288,013 μm za ESMC-HCl, 297,524 μm za ESMC-HAc te 249,357 μm za ESMC-H₃PO₄. U svim uzorcima se može uočiti uža distribucija veličine čestica sa Span vrijednostima od 1,613 do 1,906. Specifična površina čestica ima najveću vrijednost u uzorku ESMC-H₃PO₄ te iznosi 0,0573 m^2/g , a najmanju vrijednost u uzorku ESMC-HCl gdje iznosi 0,0403 m^2/g . Dobiveni rezultati raspodjele čestica (100 – 300 μm) potvrđuju prikladnost dobivenih nosača za imobilizaciju lipaza budući da, prema literaturi, poželjna veličina čestica nosača za imobilizaciju enzima je u rasponu od 20 do 500 μm (Strelec i sur., 2024).



Slika 15 Granulometrijski sastav nosača na bazi membrane jaja, a) ESMC-HCl; b) ESMC-HAc; c) ESMC-H₃PO₄

4.2.3. Svojstva pora nosača na bazi membrane jaja

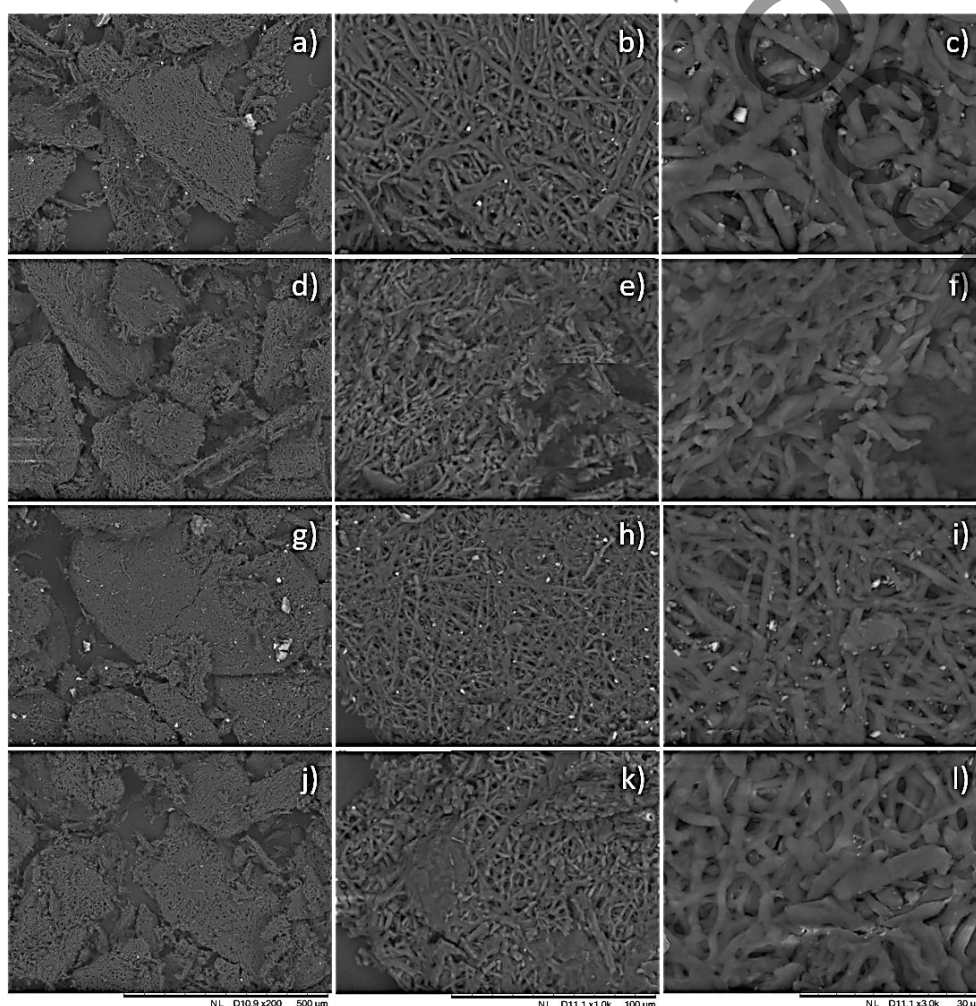
Iz podataka izoterme adsorpcije dušika, koristeći Brunauer–Emmett–Teller (BET) metodu, određene su specifične površine dobivenih mezoporoznih materijala. Koristeći Barrett-Joyner-Halenda (BJH) metodu ispitivanja, određene su veličine pora i njihov volumen pomoću podataka izoterme adsorpcije dušika. Prema dobivenim podacima o veličini pora membrana jaja (**Tablica 8**), može se zaključiti da se radi o mezoporoznim materijalima (2 – 50 nm). Podaci u **Tablici 8** pokazuju svojstva pora nosača na bazi membrane jaja, odnosno BET specifičnu površinu te volumen i veličinu pora. BET specifična površina za netretirane membrane iznosi 10,234 m²/g, dok je za nosače bila i do tri puta niža, odnosno u rasponu od 2,987 do 3,906 m²/g. Ovi rezultati su u rasponu BET specifičnih površina za membrane jaja pronađenih u literaturi, a koje iznose od 1,294 do 11,56 m²/g (Bessashia i sur., 2020; H.-J. Choi, 2017; J. Li i sur., 2017;

Tsai i sur., 2006). Osim najveće specifične površine, netretirane membrane su pokazale i najveći volumen pora od 0,02017 cm³/g, dok su volumeni pora nosača bili nešto niži i gotovo za sve nosače iznosili oko 0,006 ili 0,007 cm³/g potvrđujući rezultate iz literature koje navode Bessashia i sur. (2020), H.-J. Choi (2017) te Tsai i sur. (2006). Veličine pora svih tretiranih uzoraka kreću se između 3 i 4 nm što se također slaže s literaturom (Tsai i sur., 2006) te potvrđuje mezoporoznost materijala.

Tablica 8 Svojstva pora nosača na bazi membrane jaja

<i>PARAMETAR</i>	<i>ESM-N</i>	<i>ESMC-HCl</i>	<i>ESMC-HAc</i>	<i>ESMC-H₃PO₄</i>
BET specifična površina [m ² g ⁻¹]	10,234	3,906	2,987	3,774
Volumen pora [cm ³ g ⁻¹]	0,02017	0,00625	0,007406	0,006808
Veličina pora [nm]	3,357	3,851	3,4376	3,8045

4.2.4. Mikrostrukturiranost nosača na bazi membrane jaja



Slika 16 Elektronmikroskopska snimka (SEM) nosača na bazi membrane jaja pri različitim uvećanjima.

a), b), c) ESM-N; d), e), f) ESMC-HCl; g), h), i) ESMC-HAc; j), k), l) ESMC-H₃PO₄

Slikom 16 prikazana je elektronmikroskopska snimka (SEM) nosača na bazi membrane jaja pri različitim uvećanjima. Vidljivo je da su proizvedeni nosači na bazi membrane jaja trodimenzionalna mreža unakrsno povezanih proteina. Jasno se može vidjeti izuzetno porozna struktura materijala koji je izgrađen od vlaknastog matriksa, odnosno mreže isprepletenih vlakana upravo kako navode i Nys i Gautron (2007), S. Park i sur. (2016) te Kulshreshtha i sur. (2022). Kod netretiranih membrana jaja vlakna su vretenaste strukture sa očuvanom teksturom površine i jasnim rubovima (**Slika 16 a - c**), dok se u uzorku ESMC-HAc ne uočavaju promjene u strukturi (**Slika 16 g - i**) s obzirom na netretirane membrane jaja (**Slika 16 a - c**). U uzorcima ESMC-HCl (**Slika 16 d - f**) se primjećuje narušena struktura i manja poroznost materijala koja je nastala djelovanjem kiseline s prisutnom vlaknastom strukturom nedefiniranih rubova i

oblika dok je veličina čestica nepromijenjena. Također, u uzorku ESMC-H₃PO₄ (Slika 16 j - 1) je lokalno djelomično narušena vlaknasta porozna struktura materijala praćena smanjenjem ukupne poroznosti materijala, ali bez promjene veličine samih čestica. Osim toga, prisutnost malih bijelih nakupina ugrađenih u pore kao i na površini membrana ukazuje na prisutnost čestica kalcijevog karbonata, koje su očito skinute s ljuske jaja tijekom ručnog odvajanja membrana ili zaostale uslijed nepotpunog djelovanja kiseline.

4.2.5. Kapacitet vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja

Prije same imobilizacije lipaza bilo je prijeko potrebno definirati minimalni volumen otopine lipaza koji treba dodati na 1 g suhog nosača. Taj podatak određen je iz kapaciteta vezanja vode pripremljenih nosača, budući da voda s najvećim udjelom čini sastav pufera u kojemu se lipaza priprema neposredno prije imobilizacije. Ovisno o korištenoj metodi pripreme membrana, objavljeno je da iste pokazuju različite kapacitete adsorpcije vode iz fosfatnog pufera (Mensah i sur., 2021). Osim određivanja kapaciteta vezanja vode, pripremljeni nosači su ispitani i na kapacitet vezanja ulja zbog određivanja aktivnosti lipaza gdje se za potrebe testa djevičansko maslinovo ulje koristi kao supstrat. Vrijednosti kapaciteta zadržavanja vode i ulja pripremljenih nosača na bazi membrane jaja prikazani su u **Tablici 9**. Iz rezultata je vidljivo da svi nosači na bazi membrane jaja pokazuju velik kapacitet vezanja vode u rasponu od $4,09 \pm 0,24$ do $5,53 \pm 0,09$ mL vode po 1 g suhog nosača i nešto niži kapacitet vezanja ulja u rasponu od $3,04 \pm 0,25$ do $3,42 \pm 0,02$ mL maslinovog ulja po 1 g suhog nosača. Ovi rezultati ukazuju na visoku sposobnost apsorpcije vode kiselinama tretiranih membrana jaja. Dok točni podaci o kapacitetu vezanja vode i ulja za membrane jaja u trenutno dostupnoj literaturi ne postoje, rad autora Mensah i sur. (2021) o kapacitetu adsorpcije vode iz pufera u iznosu od 230 – 335 % potvrđuje rezultate utvrđene ovim istraživanjem.

Tablica 9 Kapacitet vezanja vode i ulja nosača na bazi membrane jaja

PARAMETAR	ESMC-HCl	ESMC-HAc	ESMC-H ₃ PO ₄
KVV [mL/g]	$5,53 \pm 0,09$	$4,58 \pm 0,09$	$4,09 \pm 0,24$
KVU [mL/g]	$3,01 \pm 0,25$	$3,42 \pm 0,02$	$3,17 \pm 0,05$

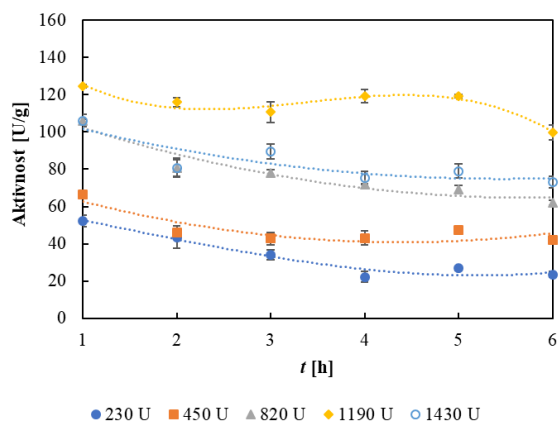
4.3. Imobilizacija lipaza

Iako se membrana ljuske jaja dugo smatrala otpadom, nova su istraživanja pokazala da ona ima jedinstvene kvalitete koje su privukle zanimanje brojnih istraživača. Membrana ljuske jaja, uglavnom u sirovom obliku, korištena je u studijama imobilizacije zbog svoje pristupačne

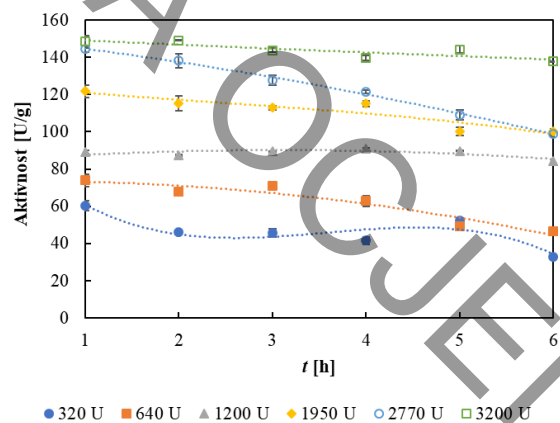
cijene, propusnosti i velike površine. Osim mnoštva potencijalnih primjena u raznim područjima industrije uključujući medicinsku, farmaceutsku, kozmetičku, električnu i prehrambenu industriju, dobro opisanu u pregledima Han i sur. (2023), Kulshreshtha i sur. (2022), Mensah i sur. (2021), S. Park i sur. (2016) te Shi i sur. (2021), membrane jaja se izdvajaju kao obećavajuća platforma za razvoj biosenzora za glukozu (Aini i sur., 2015; M. M. F. Choi i sur., 2001; Singh i sur., 2016; Wu i sur., 2004), vodikov peroksid (M. M. F. Choi i Yiu, 2004), aspartam (Xiao i Choi, 2002), homocistein (G. Zhang i sur., 2006a), dopamin (Joshi i sur., 2010), oksalata u mokraći (Pundir i sur., 2009) i detekcije uree (D'Souza i sur., 2013). Međutim, većina gore navedenih istraživačkih skupina koristila je netretirane, odnosno sirove membrane za imobilizaciju enzima, pri čemu su membrane namijenjene za razvoj biosenzora pripravljene ispiranjem ljuske jaja destiliranom vodom, odvajanjem membrana od kalcificiranog matriksa pincetom i imobilizacijom enzima na komadićima membrana veličine od 1×1 do 4×2 cm. To se značajno razlikuje od istraživanja obuhvaćenog ovim radom, gdje su membrane jaja, odnosno nosači na bazi membrane jaja pripremljeni obradom ljuske jaja sa tri različite kiseline te samljeveni do veličine čestica manjih od $500 \mu\text{m}$. Na tako pripravljene nosače provedene su imobilizacije lipaza iz bakterija *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* primjenom tri tehnike, adsorpcijom te direktnim i indirektnim kovalentnim vezanjem.

4.3.1. Imobilizacija adsorpcijom

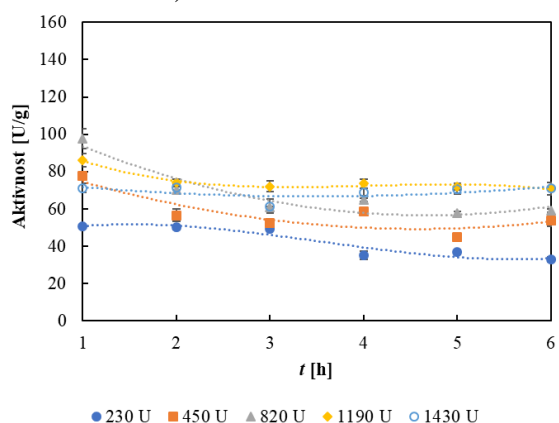
Prva, od tri primijenjene tehnike imobilizacije obuhvaćene ovim radom, je imobilizacija adsorpcijom, ujedno i jedna od najčešće korištenih tehnika imobilizacije. *Burkholderia cepacia* lipaza (BCL) i *Pseudomonas fluorescens* lipaza (PFL), s različitim početnim aktivnostima u rasponu od 230 do 3200 U, imobilizirane su adsorpcijom na pripravljene nosače na bazi membrane jaja. Kako bi se odredila početna aktivnost lipaze za imobilizaciju i vrijeme trajanja imobilizacije provedena su istraživanja u svrhu optimizacije procesa imobilizacije adsorpcijom. Analiza utjecaja aktivnosti lipaze i vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije adsorpcijom, izražena kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g], prikazana je na **Slici 17**, za svaku lipazu i svaki ESMC posebno.



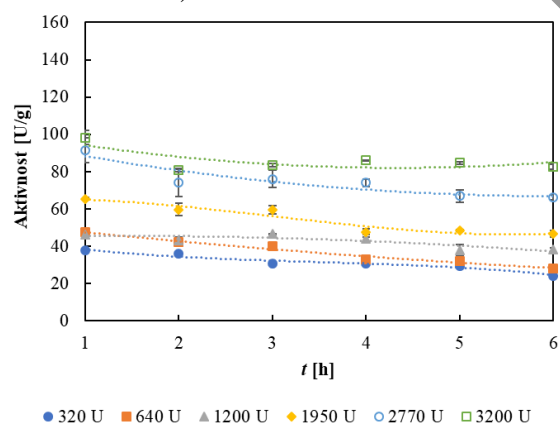
a) ESMC-HCl-BCL



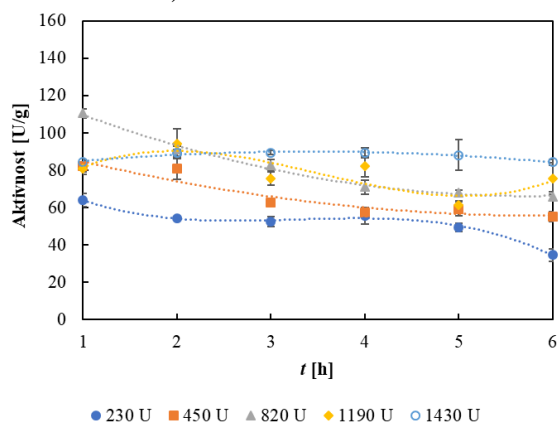
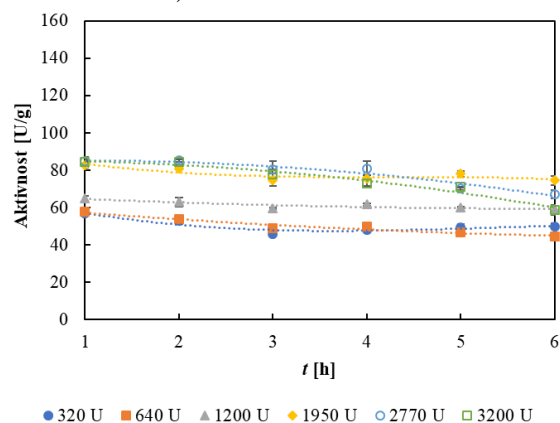
d) ESMC-HCl-PFL



b) ESMC-HAc-BCL



e) ESMC-HAc-PFL

c) ESMC-H₃PO₄-BCLf) ESMC-H₃PO₄-PFL

Slika 17 Utjecaj početne aktivnosti lipaze i vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije adsorpcijom izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g].

a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H₃PO₄-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e) ESMC-HAc-PFL, f) ESMC-H₃PO₄-PFL.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Na **Slici 17** se može vidjeti da je optimalno vrijeme za imobilizaciju adsorpcijom, za BCL (**Slika 17 a – c**) kao i za PFL (**Slika 17 d – f**) na svim ESMC, jedan sat i da su najveće aktivnosti imobilizirane lipaze postignute kod primijenjenih visokih početnih aktivnosti lipaza za imobilizaciju, točnije 820 i 1190 U za BCL, odnosno 2770 i 3200 U za PFL. Nadalje, može se uočiti da primjenom vremena imobilizacije duljeg od jednog sata, aktivnosti svih imobiliziranih lipaza opadaju. U svom radu, Salleh i sur. (2016) imobilizirali su nekoliko lipaza na ljusci jaja i kao optimalno vrijeme imobilizacije naveli dva sata, pri čemu također duže vrijeme imobilizacije dovodi do smanjenja aktivnosti. Ovaj fenomen su razjasnili Strelec i sur. (2024) korištenjem koncepta "višeslojne adsorpcije", što može rezultirati prostornom interferencijom obližnjih imobiliziranih enzima i time ometati aktivnost. Ova dva faktora – vrijeme i aktivnost – bili su ključni za prvi stupanj odabira imobiliziranih lipaza. Gledajući svaku lipazu i svaki ESMC zasebno, prema **Slici 17 a – c**, najveća aktivnost lipaze za BCL na ESMC-HCl postignuta je pri 1190 U i iznosi $124,50 \pm 0,90$ U/g, dok je u slučaju druga dva ESMC-a postignuta na 820 U i iznosi $97,65 \pm 5,46$ U/g odnosno $110,44 \pm 2,37$ U za ESMC-HAc i ESMC-H₃PO₄. S druge strane, prema **Slici 17 d – f**, najveća aktivnost PFL na ESMC-HCl i ESMC-HAc postignuta je pri 3200 U i iznosila je $148,38 \pm 3,48$ U/g odnosno $98,26 \pm 3,65$ U/g. Za ESMC-H₃PO₄, najveća aktivnost za PFL postignuta je pri 2770 U i iznosi $84,94 \pm 0,73$ U/g. Prema svemu navedenom može se zaključiti da obje lipaze nakon imobilizacije pokazuju najveću aktivnost na ESMC-HCl nosaču. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci o imobilizaciji adsorpcijom lipaza i/ili drugih enzima na nosače na bazi membrane jaja pripremljene obradom ljuske jaja kiselinama, međutim postoje podaci o imobilizaciji adsorpcijom na sirovim membranama jaja. Jiang i sur. (2017) su u svojem radu na sirove i oksidirane membrane jaja imobilizirali BCL i to u koncentracijama 30 U/mL tijekom 0,5 h i 150 U/mL tijekom 8 h te su zabilježili vezanje enzima od 5,01 mg proteina/g nosača pri čemu duži tretman oksidacijom smanjuje mogućnost vezanja enzima. Imobilizirane lipaze ispitane su na hidrolitičku i transesterifikacijsku aktivnost. Najveća hidrolitička aktivnost lipaze imobilizirane na sirove membrane bila je oko 12 mmol/min/g, a postignuta je imobilizacijom lipaze početne koncentracije 150 U/mL u trajanju od 8 h, dok je kod lipaze imobilizirane na oksidirane membrane za istu aktivnost bilo dovoljno 2 h imobilizacije pri istoj početnoj koncentraciji te je utvrđeno da se tijekom produljenog vremena imobilizacije aktivnost smanjuje. Važno je za napomenuti da je hidrolitička aktivnost lipaza, prema Jiang i sur. (2017), veća nekoliko tisuća puta nego što je to aktivnost imobiliziranih lipaza u okviru ovoga rada, a što se može pripisati korištenju drugog testa kao i supstrata za određivanje aktivnosti lipaza. Girelli i Scuto (2021) su u svome radu na sirove membrane jaja imobilizirali lakazu adsorpcijom

na dva načina te objavili rezultate imobilizacijske aktivnosti od 700 U/kg metodom uranjanja nosača u otopinu enzima te oko 7760 U/kg metodom ispuštanja enzima na površinu nosača. Eksperimentalni rezultati u okviru ovoga rada kao i oni iz dostupne literature (Girelli i Scuto, 2021; Jiang i sur., 2017) nadasve pokazuju da su nosači na bazi membrane jaja pogodni za imobilizaciju (adsorpcijom) različitih enzima pa tako i lipaza.

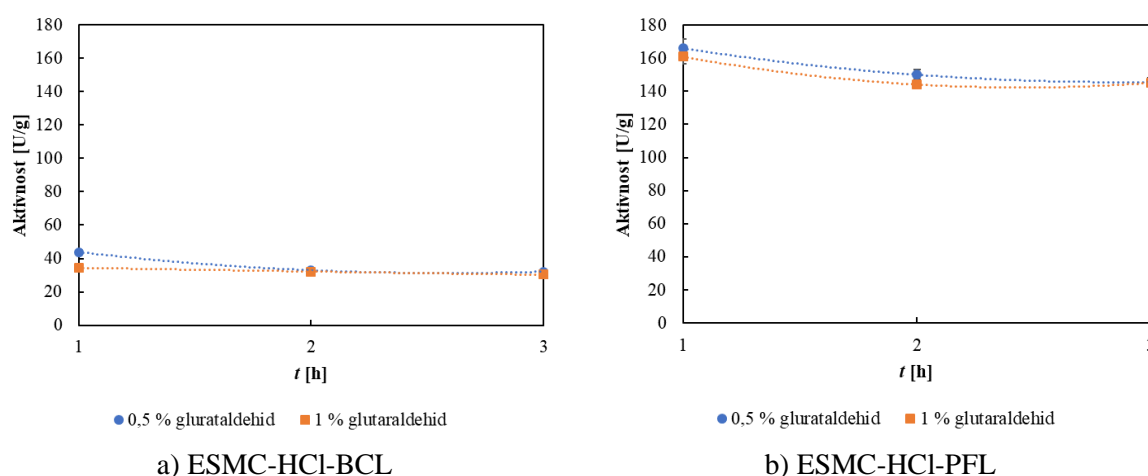
U okviru ovoga rada, za daljnju karakterizaciju lipaza imobiliziranih adsorpcijom odabrane su po dvije imobilizirane lipaze najbolje početne aktivnosti (nakon 1 sata imobilizacije) na svakom pojedinačnom ESMC. Za BCL, odabrano je šest lipaza, po dvije najbolje aktivnosti na svakom nosaču, kako slijedi: ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HCl-BCL-1190U; ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-1190U; ESMC-H₃PO₄-820U, ESMC-H₃PO₄-1190U. Prema istom principu odabrano je 6 PFL imobiliziranih lipaza: ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HCl-PFL-3200U; ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-3200U; ESMC-H₃PO₄-PFL-2770U, ESMC-H₃PO₄-PFL-3200U. Dvanaest lipaza imobiliziranih adsorpcijom odabranih na ovaj način predstavljaju prvu fazu odabira.

4.3.2. Imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem

Nakon imobilizacije adsorpcijom, druga primijenjena tehnika imobilizacije lipaza na nosače na bazi membrane jaja je imobilizacija kovalentnim vezanjem direktnim putem, odnosno izravno na glutaralhidom aktivirani nosač. Tijekom aktivacije nosača glutaralhidom jedna aldehidna skupina glutaraldehida reagira s kemijski induciranom slobodnom amino skupinom komponenti membrane jaja, a druge aldehidne skupine glutaraldehida ostaju slobodne (Pundir i sur., 2009). Nakon aktivacije nosača na bazi membrane jaja, kovalentno vezanje enzima na iste odvija se kroz reakciju između sekundarne aldehidne skupine (ostavljena slobodna) i amino skupine proteina (Girelli i sur., 2020). Prvo su provedena istraživanja optimizacije procesa kako aktivacije tako i imobilizacije kako bi se odredila koncentracija glutaraldehida za aktivaciju nosača, a kasnije i početna aktivnost lipaze za imobilizaciju te vrijeme imobilizacije. BCL i PFL, s različitim početnim aktivnostima u rasponu od 230 do 3200 U, imobilizirane su direktnim kovalentnim vezanjem na ESMC aktivirane glutaralhidom.

Uzimajući u obzir slično ponašanjem svih ESMC prilikom imobilizacije adsorpcijom (optimalno vrijeme imobilizacije, najveća aktivnost imobiliziranih lipaza na ESMC-HCl nosaču) optimizacija aktivacije nosača za potrebe direktne kovalentne imobilizacije lipaza odrađena je samo na ESMC-HCl nosaču primjenom dvije koncentracije glutaraldehida (0,5 i 1 %) u trajanju od 2 h. Rezultati su primijenjeni na sve nosače. Na tako aktivirane ESMC-

HCl, BCL početne aktivnosti 1190 U te PFL početne aktivnosti 2770 U su imobilizirane u vremenu od 1 do 3 sata kako bi se odredilo optimalno vrijeme imobilizacije. Navedene početne aktivnosti lipaza su odabrane na temelju najboljih aktivnosti koje su se pokazale u optimizaciji imobilizacije adsorpcijom, a vremenski period od prva tri sata s mogućnošću povećanja vremena imobilizacije ukoliko bi se pokazalo da je isto potrebno. Rezultati utjecaja koncentracije glutaraldehida i vremena imobilizacije za ESMC-HCl nosače prikazani su na **Slici 18**.



Slika 18 Utjecaj koncentracije glutaraldehida i vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g].

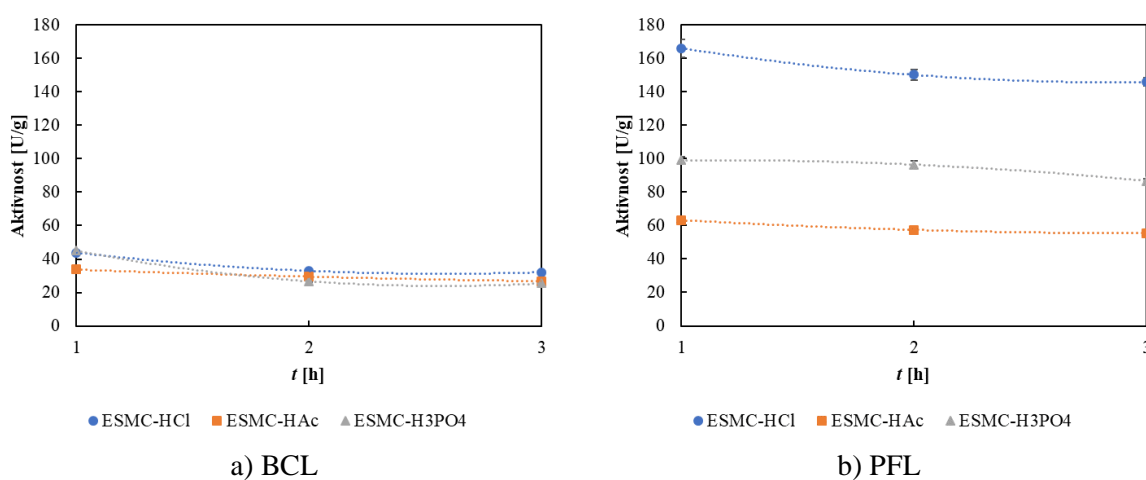
a) ESMC-HCl-BCL; b) ESMC-HCl-PFL.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Iz **Slike 18** vidljivo je da su za obje lipaze neznatno veće aktivnosti imobiliziranih lipaza postignute na ESMC-HCl nosačima aktiviranim 0,5 % glutaraldehydom u usporedbi sa 1 %-tnom koncentracijom te da je optimalno vrijeme imobilizacije 1 h. Osim toga, vidljivo je da se kod PFL postižu i do 4x veće aktivnosti u usporedbi sa BCL. Tako se u prvom, optimalnom satu, imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem, kod BCL postižu aktivnosti od maksimalnih $43,92 \pm 0,29$ U/g, dok je kod PFL aktivnost u istom satu čak $166,05 \pm 5,37$ U/g. Dobiveni rezultat za BCL je gotovo duplo niži od onog objavljenog od strane Abdulla i sur. (2017) koji su pokazali aktivnost od 80 U/g BCL imobiliziranog na membranu prethodno aktiviranu glutaraldehydom. Ako se ovi rezultati usporede sa onima dobivenim adsorpcijom (**Slika 17**), vidljivo je da je direktna kovalentna imobilizacija za BCL ($43,92 \pm 0,29$ U/g) manje učinkovita budući da se adsorpcijom dobivaju i do 3x veće vrijednosti aktivnosti imobiliziranih

lipaza u prvom satu ($124,50 \pm 0,90$ U/g). S druge strane, kod PFL imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem ($166,05 \pm 5,37$ U/g) je čak nešto učinkovitija od imobilizacije adsorpcijom gdje vrijednost imobilizirane lipaze na istom nosaču (ESMC-HCl) u prvom satu iznosi $144,48 \pm 1,58$ U/g.

S obzirom na dobivene rezultate za ESMC-HCl i za druga dva nosača (ESMC-HAc i ESMC-H₃PO₄) provedena je aktivacija s 0,5 %-tnim glutaraldehydom s ciljem određivanja optimalnog vremena trajanja imobilizacije pri korištenju istih početnih aktivnosti lipaza (1190 U BCL i 2770 U PFL) kao i kod ESMC-HCl. Rezultati utjecaja vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem prikazani su na **Slici 19**.



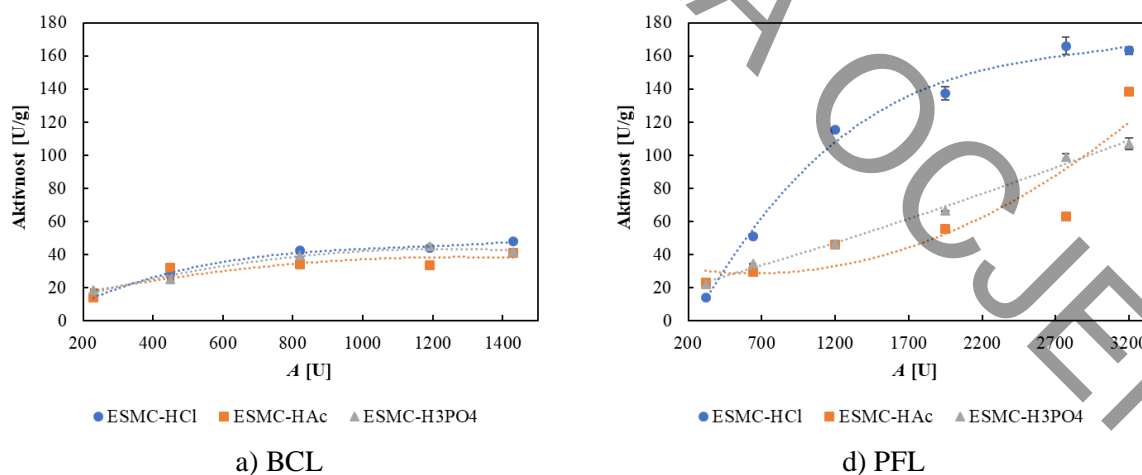
Slika 19 Utjecaj vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g].

a) BCL; b) PFL.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prema dobivenim rezultatima prikazanim na **Slici 19** za ESMC-HAc i ESMC-H₃PO₄ potvrđeno je optimalno vrijeme imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem u trajanju od jednog sata te da se veće aktivnosti imobiliziranih lipaza postižu kod PFL. Kao i kod imobilizacije adsorpcijom, najbolji rezultati za obje lipaze postignuti su na ESMC-HCl nosaču.

Nakon što su određeni optimalna koncentracija glutaraldehyda te optimalno vrijeme imobilizacije, pristupilo se provjeri utjecaja svih početnih aktivnosti lipaza (aktivnosti lipaza prije imobilizacije) na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem. Zaključno, svi nosači na bazi membrana jaja su aktivirani 0,5 %-tnim glutaraldehydom u trajanju od 2 h nakon čega su BCL početnih aktivnosti 230 – 1430 U te PFL početnih aktivnosti 230 – 3200 U imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem u trajanju od 1 h, a rezultati su prikazani na **Slici 20**.



Slika 20 Utjecaj početne aktivnosti lipaze na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g].
a) BCL; b) PFL.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Analiza utjecaja početne aktivnosti lipaze na uspjeh imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem, pokazala je da se povećanjem početne aktivnosti, za obje lipaze, uspjeh imobilizacije povećava. Međutim, rezultati također pokazuju da se direktnom kovalentnom imobilizacijom lipaza na aktivirane nosače ne ostvaruju značajno visoke aktivnosti lipaza vezanih po gramu nosača. Najbolje vrijeme imobilizacije za obje tehnike (1 sat) od 1,5x (PFL) do čak 3x (BCL) su aktivnosti imobiliziranih lipaza direktno kovalentno vezanih manje u odnosu na aktivnosti lipaza imobiliziranih adsorpcijom (**Slika 17**). Navedeno potvrđuje navode da kovalentno vezanje može rezultirati znatnim gubitkom aktivnosti enzima tijekom imobilizacije (Brena i sur., 2013; Franssen i sur., 2013). Isto navode i autori Tembe i sur. (2008) koji su na membrane jaja imobilizirali tirozinazu adsorpcijom, direktnim kovalentnim vezanjem te umrežavanjem. Od svih, adsorbirani enzim pokazao je maksimalnu aktivnost nakon koje je uslijedilo direktno kovalentno vezanje dok je enzim imobiliziran umrežavanjem pokazao zanemarivo malu aktivnost.

Kao što je već rečeno, najbolje aktivnosti su se, kao i kod imobilizacije adsorpcijom, kod obje lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem postigle na ESMC-HCl nosaču.

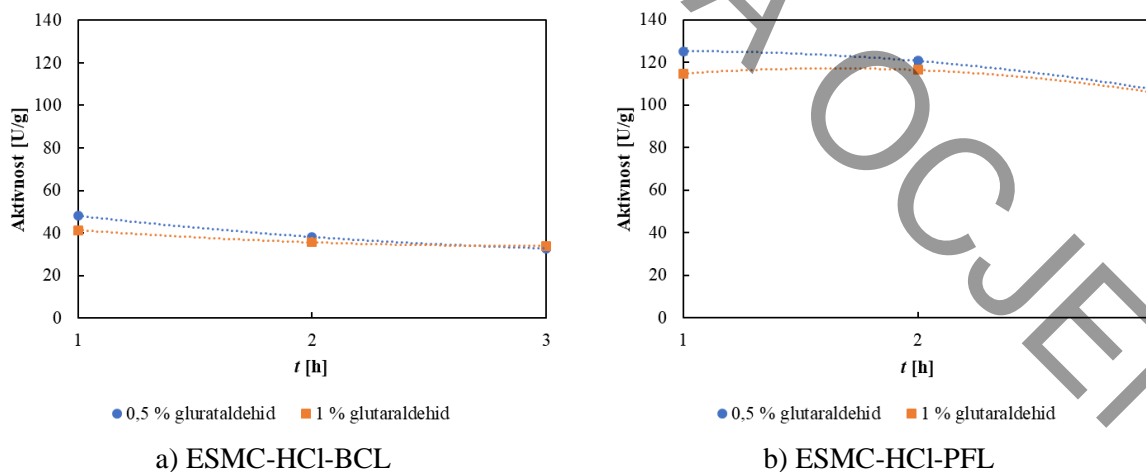
Za daljnju karakterizaciju lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem odabrane su po dvije najbolje početne aktivnosti za svaku lipazu na svakom pojedinom ESMC uz optimalno vrijeme imobilizacije u trajanju od 1 sata. Kod PFL su to bile aktivnosti 2770 U i 3200 U, kao i kod adsorpcije. Kod BCL su odabrane također aktivnosti koje su odgovarale onima odabranim

kod adsorpcije (820 U, 1190 U i 1430 U) budući da nije bilo velikih razlika u rezultatima postignutim s najvećim primijenjenim početnim aktivnostima. Za BCL odabrano je šest lipaza, kako slijedi: ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HCl-BCL-1190U; ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-1190U; ESMC-H₃PO₄-820U, ESMC-H₃PO₄-1190U. Prema istom principu odabrano je šest imobiliziranih PFL: ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HCl-PFL-3200U; ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-3200U; ESMC-H₃PO₄-PFL-2770U, ESMC-H₃PO₄-PFL-3200U. U prvoj fazi odabira imobiliziranih lipaza direktnim kovalentnim vezanjem odabrano je ukupno 12.

4.3.3. Imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem

Nakon provedenih imobilizacija adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem posljednja primijenjena tehnika je imobilizacija indirektnim kovalentnim vezanjem. Ova tehnika podrazumijeva vezanje lipaza na aktivirani nosač na koji je vezana fleksibilna ruka polietilenimina koja je također neposredno prije imobilizacije aktivirana glutaraldehydom. Prvo su, kao i kod direktnog kovalentnog vezanja, provedena istraživanja optimizacije procesa u svrhu određivanja koncentracije glutaraldehyda za aktivaciju nosača, početne aktivnosti lipaza za imobilizaciju te vremena trajanja imobilizacije. Koncentracija i vrijeme vezanja fleksibilne ruke polietilenimina kao i njegova aktivacija glutaraldehydom provedeni su sukladno uvjetima navedenim u literaturi (Cui i sur., 2013; Singh i sur., 2016). BCL i PFL, s različitim početnim aktivnostima u rasponu od 230 do 3200 U, imobilizirane su indirektnim kovalentnim vezanjem na pripremljene aktivirane nosače sa vezanim aktiviranim polietileniminom.

Kao kod direktnog kovalentnog vezanja, optimizacija aktivacije nosača provedena je samo na ESMC-HCl nosaču primjenom dvije koncentracije glutaraldehyda (0,5 i 1 %), u trajanju od 2 h. Na tako aktivirane ESMC-HCl, vezan je 0,2 %-tni polietilenimin u trajanju od 2 h koji je također trebalo aktivirati glutaraldehydom gdje je prema rezultatima direktne kovalentne imobilizacije odabrana koncentracija 0,5 % glutaraldehyda. Nakon toga, BCL početne aktivnosti 1190 U te PFL početne aktivnosti 2770 U su imobilizirane u trajanju 1 do 3 sata kako bi se ispitalo optimalno vrijeme imobilizacije. Navedene početne aktivnosti lipaza su odabrane na temelju aktivnosti koje su se pokazale najbolje u optimizaciji imobilizacije adsorpcijom. Tijekom prva tri sata praćena je uspoješnost imobilizacije s mogućnošću produljenja vremena ukoliko bi se pokazalo da je isto potrebno. Rezultati utjecaja koncentracije glutaraldehyda i vremena imobilizacije za ESMC-HCl nosače prikazani su na **Slici 21**.



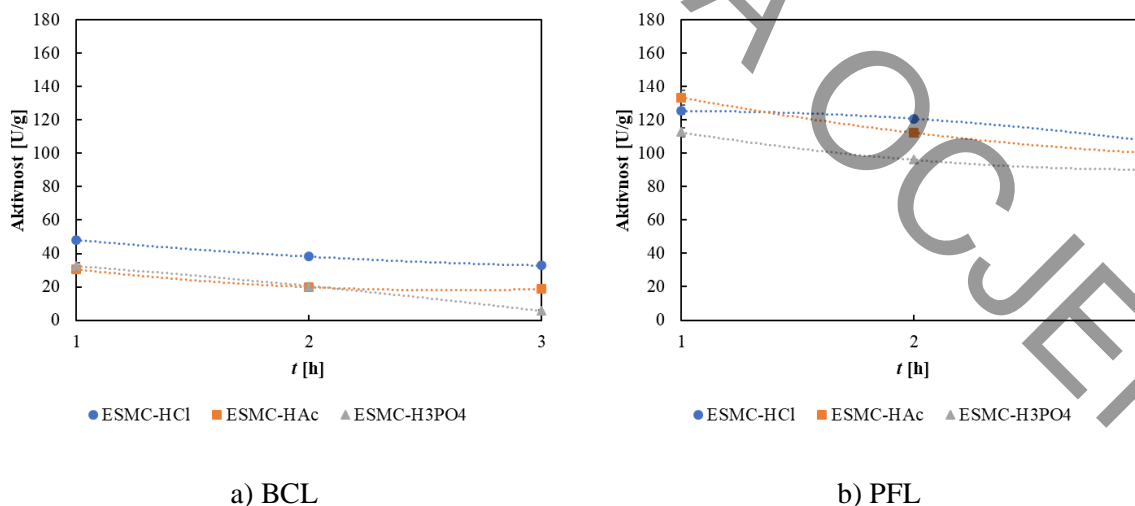
Slika 21 Utjecaj koncentracije glutaraldehida i vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g].

a) ESMC-HCl-BCL; b) ESMC-HCl-PFL.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Iz **Slike 21** vidljivo je da se za obje lipaze veće aktivnosti imobiliziranih lipaza postižu na ESMC-HCl nosačima aktiviranim 0,5 % glutaraldehidom u uz optimalno vrijeme imobilizacije u trajanju od 1 sata. Osim toga, vidljivo je da se kod PFL postižu i do 2,5x veće aktivnosti u usporedni sa BCL. Tako se u prvom optimalnom satu imobilizacije direktnim kovalentnim vezanjem kod BCL postižu aktivnosti od maksimalnih $48,08 \pm 0,54$ U/g dok je kod PFL aktivnost u istom satu čak $125,27 \pm 1,57$ U/g. Ako se ovi rezultati usporede sa onima dobivenim adsorpcijom (**Slika 17**) i direktnim kovalentnim vezanjem (**Slika 20**) vidljivo je da je indirektna kovalentna imobilizacija za BCL gotovo jednako efikasna kao i direktna kovalentna imobilizacija, međutim i do 3x manje efikasna od imobilizacije adsorpcijom. S druge strane, kod PFL imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem je samo nešto manje efikasna od imobilizacija adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem.

S obzirom na dobivene rezultate, za druga dva nosača (ESMC-HAc i ESMC-H₃PO₄) odabran je 0,5 %-tni glutaraldehid za aktivaciju nosača uz primjenu istih početnih aktivnosti lipaza (1190 U BCL i 2770 U PFL) s ciljem određivanja optimalnog vremena imobilizacije, a rezultati su prikazani na **Slici 22**.



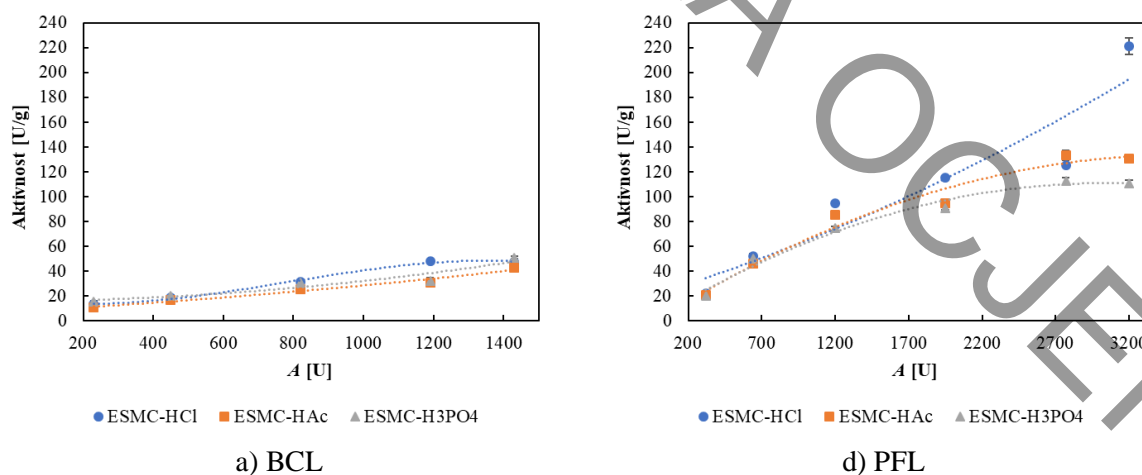
Slika 22 Utjecaj vremena imobilizacije na uspjeh imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g].

a) BCL; b) PFL.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prema dobivenim rezultatima prikazanim na **Slici 22**, i za druga dva nosača je potvrđeno da je jedan sat optimalan za imobilizaciju indirektnim kovalentnim vezanjem te da se veće aktivnosti imobiliziranih lipaza postižu kod PFL u odnosu na BCL. Kao i kod imobilizacije adsorpcijom tako i direktnim kovalentnim vezanjem, najbolji rezultati za BCL su postignuti na ESMC-HCl nosaču, dok je ovaj puta za PFL najveća aktivnost postignuta na ESMC-HAc nosaču, no samo za 8 jedinica veća nego na ESMC-HCl nosaču.

Nadalje, nakon određene optimalne koncentracije glutaraldehida za aktivaciju nosača te optimalnog vremena imobilizacije, provjeren je utjecaj svih početnih aktivnosti lipaza na uspjeh imobilizacije uz optimalno vrijeme imobilizacije. Dakle, svi nosači su aktivirani 0,5 %-tnim glutaraldehydom u trajanju od 2 h nakon čega je vezan 0,2 %-tni polietilenimin u trajanju od 2 h te aktiviran 0,5 %-tnim glutaraldehydom u trajanju od 2 h. BCL početnih aktivnosti 230 – 1430 U te PFL početnih aktivnosti 230 – 3200 U imobilizirane su indirektnim kovalentnim vezanjem u trajanju od 1 h, a rezultati su prikazani na **Slici 23**.



Slika 23 Utjecaj početne aktivnosti lipaze na uspjeh imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem izražen kao aktivnost imobilizirane lipaze po mokrom nosaču [U/g].

a) BCL; b) PFL.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Analiza utjecaja početne aktivnosti lipaze na uspjeh imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem, pokazala je da se povećanjem početne aktivnosti za obje lipaze i uspjeh imobilizacije povećava. Međutim, rezultati su pokazali da se indirektnom kovalentnom imobilizacijom BCL na nosače na bazi membrane jaja ne ostvaruju značajno visoke aktivnosti lipaza vezanih po gramu nosača te su manje u odnosu na aktivnosti lipaza imobiliziranih adsorpcijom (**Slika 17**) i gotovo jednake aktivnostima lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem (**Slika 20**). Ovi rezultati ne potvrđuju navode autora Ahmad i Sardar (Ahmad i Sardar, 2015) kako umetanje fleksibilne ruke daje veći stupanj mobilnosti imobiliziranom enzimu što poboljšava njegovu aktivnost u usporedbi s aktivnošću izravno vezanog enzima kod direktnog kovalentnog vezanja. Treba istaknuti da u slučaju PFL primjenom najveće početne aktivnosti lipaze za imobilizaciju od 3200 U, nakon 1 h imobilizacije se na ESMC-HCl postiže aktivnost od $221,16 \pm 6,46$ U/g što je i najveća postignuta aktivnost imobilizirane lipaze u okviru ovoga rada. Kao što je već rečeno, najbolje aktivnosti kovalentnim indirektnim vezanjem, kao i kod ostalih primijenjenih tehnika imobilizacije za obje lipaze postignute su na ESMC-HCl nosaču. Međutim, dok su vrijednosti aktivnosti za ostale nosače kod BCL bile približno jednake, kod PFL su za ESMC-HAc bile gotovo duplo niže u odnosu na ESMC-HCl, a za ESMC-H₃PO₄ još niže.

Za daljnju karakterizaciju lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem odabrane su dvije najbolje početne aktivnosti za svaku lipazu na svakom pojedinačnom ESMC uz optimalno vrijeme imobilizacije u trajanju od 1 sata. Za BCL odabrano je 6 imobiliziranih lipaza, dvije

najbolje aktivnosti na svakom nosaču, kako slijedi: ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HCl-BCL-1190U; ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-1190U; ESMC-H₃PO₄-820U, ESMC-H₃PO₄-1190U. Prema istom principu odabrano je 6 imobiliziranih PFL: ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HCl-PFL-3200U; ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-3200U; ESMC-H₃PO₄-PFL-2770U, ESMC-H₃PO₄-PFL-3200U. Dvanaest lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem odabranih na ovaj način predstavljaju prvu fazu odabira.

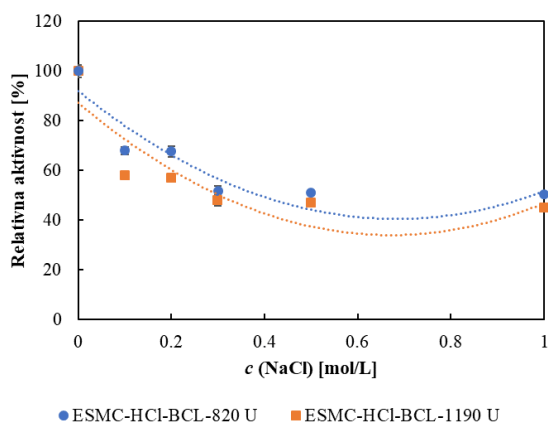
Sumarno, nakon provedenih imobilizacija, uz korištenje dviju lipaza s pet do šest početnih aktivnost, tri nosača, tri tehnike imobilizacije i vrijeme trajanja imobilizacije od 1 do 6 sati, te uz provedene optimizacije, dobiveno je 312 imobiliziranih lipaza. Od toga, prema gore opisanom protokolu, odabrano je 36 koje su nadalje testirane na mogućnost desorpcije (**Tablica 10**).

Tablica 10 Popis imobiliziranih lipaza odabranih za desorpciju

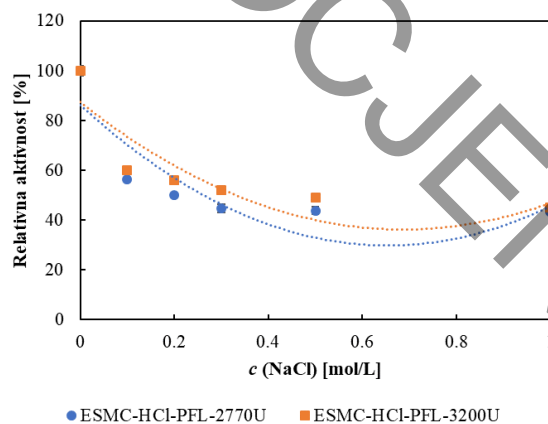
ADSORPCIJA	KOVALENTNO VEZANJE	
	DIREKTNO	INDIREKTNO
ESMC-HCl-BCL-820U	ESMC-HCl-BCL-820U	ESMC-HCl-BCL-820U
ESMC-HCl-BCL-1190U	ESMC-HCl-BCL-1190U	ESMC-HCl-BCL-1190U
ESMC-HAc-BCL-820U	ESMC-HAc-BCL-820U	ESMC-HAc-BCL-820U
ESMC-HAc-BCL-1190U	ESMC-HAc-BCL-1190U	ESMC-HAc-BCL-1190U
ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL-820U	ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL-820U	ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL-820U
ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL-1190U	ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL-1190U	ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL-1190U
ESMC-HCl-PFL-2770U	ESMC-HCl-PFL-2770U	ESMC-HCl-PFL-2770U
ESMC-HCl-PFL-3200U	ESMC-HCl-PFL-3200U	ESMC-HCl-PFL-3200U
ESMC-HAc-PFL-2770U	ESMC-HAc-PFL-2770U	ESMC-HAc-PFL-2770U
ESMC-HAc-PFL-3200U	ESMC-HAc-PFL-3200U	ESMC-HAc-PFL-3200U
ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL-2770U	ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL-2770U	ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL-2770U
ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL-3200U	ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL-3200U	ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL-3200U

4.4. Desorpcija imobiliziranih lipaza

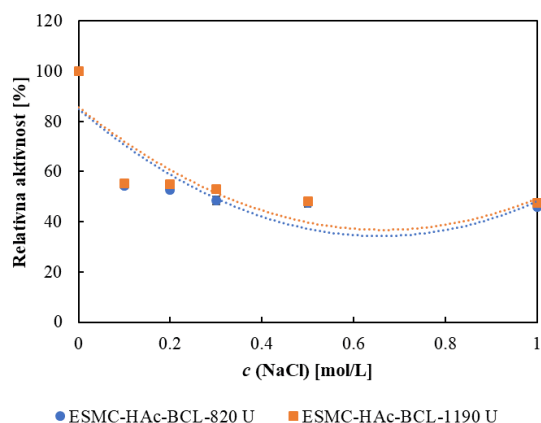
4.4.1. Desorpcija lipaza imobiliziranih adsorpcijom



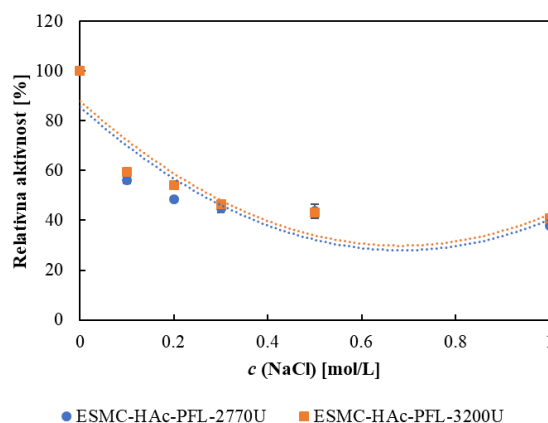
a) ESMC-HCl-BCL



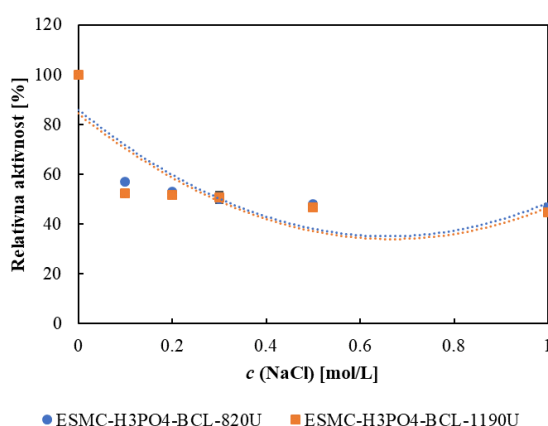
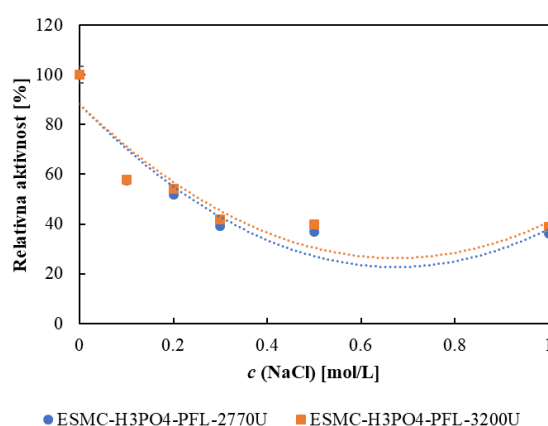
d) ESMC-HCl-PFL



b) ESMC-HAc-BCL



e) ESMC-HAc-PFL

c) ESMC-H₃PO₄-BCLf) ESMC-H₃PO₄-PFL

Slika 24 Desorpcija lipaza imobiliziranih adsorpcijom.

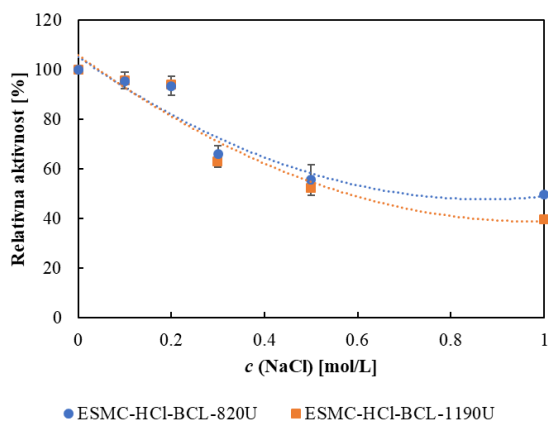
a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H₃PO₄-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e) ESMC-HAc-PFL, f) ESMC-H₃PO₄-PFL.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.

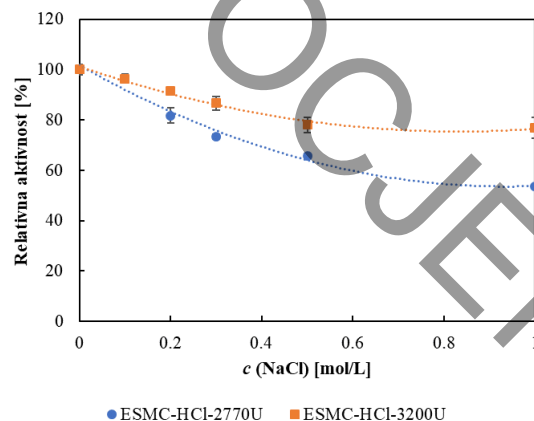
Iako je adsorpcija jedna od najpoželjnijih tehnika imobilizacije zbog svoje jednostavnosti, slabe veze koje se javljaju između enzima i nosača mogu dovesti do curenja enzima. Upravo ovo je razlog za ispitivanje desorpcije gdje se imobilizirani enzim podvrgne utjecaju pufera sa visokim koncentracijama soli, a gdje se eventualno curenje očituje mjerenjem njegove aktivnosti u supernatantu te praćenjem aktivnosti lipaze zaostale na nosaču. Rezultati desorpcije lipaza imobiliziranih desorpcijom (**Slika 24** i **Prilog 1**) pokazuju da se lipaze najjače oslobađaju s nosača kada se koristi čisti pufer, tj. bez dodatka NaCl-a, ali u vrlo maloj količini do maksimalno 7 U. Osim toga, aktivnost lipaze u supernatantu opada s povećanjem koncentracije soli u puferu. Dva su moguća razloga za to. Jedan je da NaCl ima pozitivan učinak na adsorpciju lipaza i sprječava njihovu desorpciju jer visoka ionska jakost može inducirati jaču interakciju između imobiliziranog enzima i nosača, što potvrđuju Nikolić i sur. (2009) i Zaak i sur. (2017). Međutim, gubitak aktivnosti imobilizirane lipaze s povećanjem koncentracije soli je iznenađujući te BCL ostaju na tek 50 % ili čak i nižoj početnoj aktivnosti primjenom 1 M NaCl, dok je kod PFL taj gubitak još izraženiji (36 % početne aktivnosti). Drugi mogući razlog je taj što NaCl negativno utječe na aktivnost BCL i PFL, što bi objasnilo niske vrijednosti aktivnosti u supernatantu, ali i niske vrijednosti aktivnosti imobiliziranih lipaza. Međutim, postoje radovi u dostupnoj literaturi koje podržavaju teoriju da NaCl ima negativan učinak na aktivnost lipaze u smislu snižavanja aktivnosti (Quilles Junior i sur., 2016), kao i oni koji ju osporavaju (Chauhan i Garlapati, 2013; Y. W. Zhang i sur., 2015). Razumijevanje ovog utjecaja je komplicirano činjenicom da se, u određenim slučajevima, priroda učinka pufera na stabilnost enzima oslanja i na inaktivacijski pH i na metodu koja se koristi za imobilizaciju enzima, gdje je priroda soli također važna. Na primjer, lipaza iz *T. lanuginosus* imobilizirana na oktil agarozu stabilizirana je visokim koncentracijama NaCl, ali je destabilizirana natrijevim fosfatom (Braham i sur., 2021). Zapravo, neki kationi mogu stabilizirati lipaze imobilizirane na nekim nosačima, ali ne i kada su imobilizirani na drugim nosačima, tako da ovaj učinak nije opći za sve lipaze kada se koriste različite tehnike imobilizacije, ali i različiti nosači. Općenito se može reći da u ovom istraživanju povećanje koncentracije soli u puferu smanjuje aktivnost i imobilizirane lipaze (**Slika 24**) i oslobođene lipaze u supernatantu (**Prilog 1**) te da se lipaze imobilizirane na ESMC-HCl čine najotpornijim na djelovanje soli jer upravo one zadržavaju nešto veću aktivnost u usporedbi s ostalima. Budući da je pri najvišoj koncentraciji soli od 1 M NaCl, za obje imobilizirane lipaze (BCL i PFL) na svim ESMC, niža početna aktivnost imobilizirane lipaze (820 U za BCL i 2770 U za PFL) imala veću ili jednaku relativnu aktivnost u usporedbi s višom početnom aktivnošću (1190 U za BCL i 3200 U za PFL), za daljnja istraživanja odabrane su niže koncentracije. Drugi razlog za ovaj izbor je ekonomičnost, jer

niže koncentracije zahtijevaju manju količinu lipaze koja se koristi za imobilizaciju. Stoga su sljedeće lipaze odabrane za daljnja istraživanja (**Tablica 11**): ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-H₃PO₄-BCL-820U i ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-H₃PO₄-PFL-2770U.

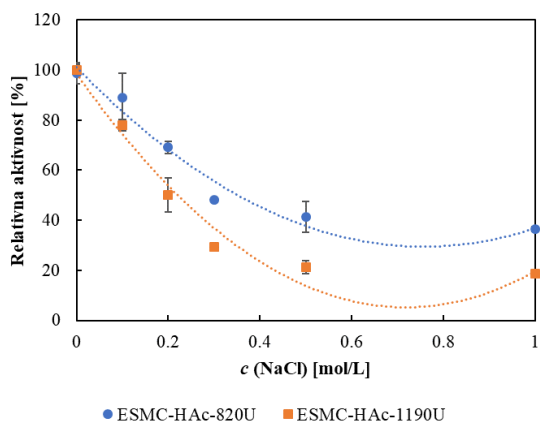
4.4.2. Desorpcija lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem



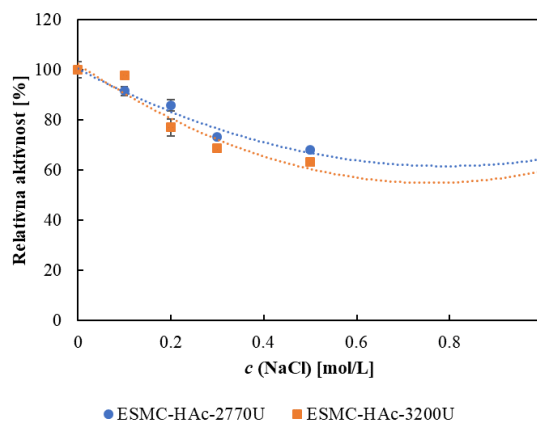
a) ESMC-HCl-BCL



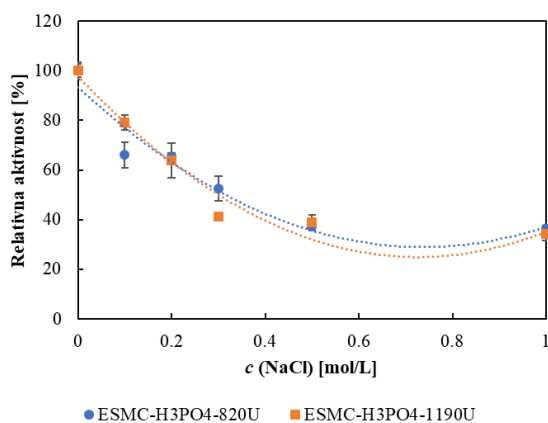
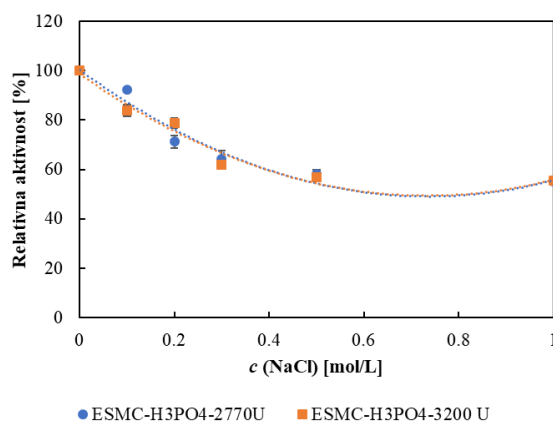
d) ESMC-HCl-PFL



b) ESMC-HAc-BCL



e) ESMC-HAc-PFL

c) ESMC-H₃PO₄-BCLf) ESMC-H₃PO₄-PFL

Slika 25 Desorpcija lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem.

a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H₃PO₄-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e) ESMC-HAc-PFL, f) ESMC-H₃PO₄-PFL.

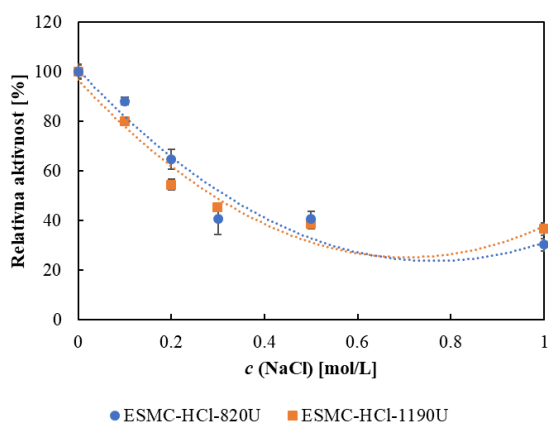
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Budući da se kovalentno vezanje ističe kao ona tehnika imobilizacije gdje se stvaraju jače veze između nosača i imobiliziranog enzima u odnosu na imobilizaciju adsorpcijom, upravo se iz tog razloga vjeruje da bi i desorpcija imobiliziranog enzima kod ove tehnike trebala biti isključena ili vrlo slaba. Rezultati desorpcije lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem pokazali su da nema curenja enzima s nosača budući da su aktivnosti istoga u supernatantu bile jednake nuli te iz tog razloga ti rezultati nisu niti prikazani. Budući da je dokazano da nema curenja enzima s nosača, supernatanti kod lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem nisu dalje ispitivani u određivanjima pH, temperaturne i stabilnosti u organskim otapalima, kao što je to bio slučaj kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom. Aktivnosti imobiliziranih lipaza zaostalih na nosaču su, kao i kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, također pokazale padajući trend s povećanjem koncentracije soli u puferu te je time potvrđeno da iste imaju negativan utjecaj na aktivnost lipaza (**Slika 25**). Za razliku od lipaza imobiliziranih adsorpcijom, ovdje se pokazalo da soli imaju veći negativni utjecaj za BCL budući da su aktivnosti pale na 36 do 49 % početnih vrijednosti te kod ESMC-HAc čak i na 18 %. Međutim, kod PFL je ovaj utjecaj bio puno manje izražen budući da su sve PFL zadržale preko 53 pa sve do 76 % početne aktivnosti. Ovi rezultati nisu bili u skladu sa navodom Tembe i sur. (2008) kod kojih su se lipaze imobilizirane na membrane aktivirane glutaraldehidom pokazale stabilnijima u usporedbi s adsorbiranim enzimima.

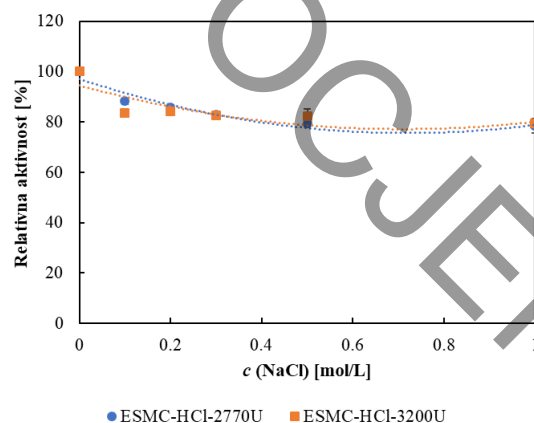
Ovdje je, kao i kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, NaCl imao najmanji utjecaj na lipaze imobilizirane na ESMC-HCl nosače. Nakon provedene desorpcije pristupilo se odabiru imobiliziranih lipaza za daljnju karakterizaciju (po jedna početna aktivnost na svakom nosaču) no nisu se mogle uzeti u obzir samo zadržane relativne aktivnosti kao u prvom stupnju odabira. Naime, kao i kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, pri najvišoj koncentraciji soli (1 M NaCl) za imobilizirane BCL na svim nosačima, niža početna aktivnost imobilizirane lipaze (820 U) imala je veću relativnu aktivnost u usporedbi s višom (1190 U) što ide u prilog ekonomičnosti procesa. Međutim, kada su se usporedile aktivnosti liofiliziranih lipaza u odnosu na obje početne aktivnosti prije imobilizacije, pokazalo se da imobilizirane lipaze viših početnih aktivnosti (1190 U) imaju značajno veće aktivnosti (čak do dva puta) od lipaza nižih početnih aktivnosti (820 U). Sukladno tome za BCL na svim nosačima odabrane su one imobilizirane lipaze koje u bile viših početnih aktivnosti u polaznoj otopini za imobilizaciju (1190 U). S druge strane, PFL su pri najvišoj koncentraciji soli od 1 M NaCl, pokazale nešto drukčije rezultate te je tako za ESMC-HCl i ESMC-H₃PO₄ bila pogodnija viša (3200 U), a kod ESMC-HAc niža početna aktivnost (2770 U). Kako kod ovih lipaza razlika u aktivnosti liofiliziranih lipaza obje

početne aktivnosti nije prelazila 18 %, a ekonomičnost je išla u prilog nižim početnim aktivnostima, za daljnju karakteritaciju odabrane su, na svim nosačima, PFL nižih početnih aktivnosti (2770 U). Stoga su sljedeće lipaze odabrane za daljnja istraživanja (**Tablica 11**): ESMC-HCl-BCL-1190U, ESMC-HAc-BCL-1190U, ESMC-H₃PO₄-BCL-1190U i ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-H₃PO₄-PFL-2770U.

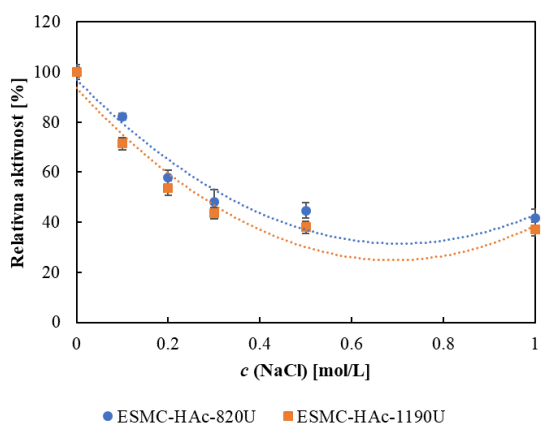
4.4.3. Desorpcija lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem



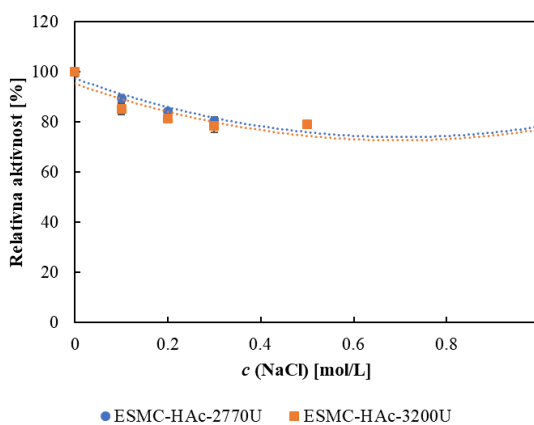
a) ESMC-HCl-BCL



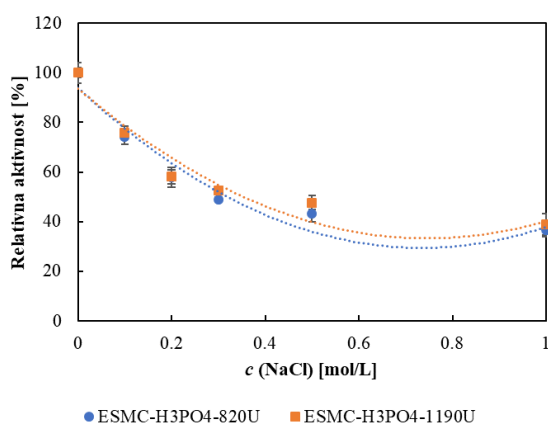
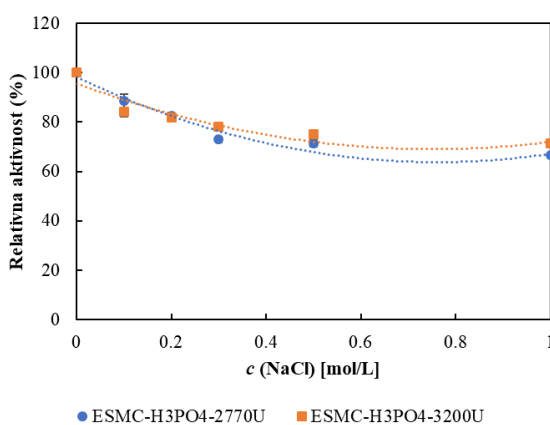
d) ESMC-HCl-PFL



b) ESMC-HAc-BCL



e) ESMC-HAc-PFL

c) ESMC-H₃PO₄-BCLf) ESMC-H₃PO₄-PFL

Slika 26 Desorpcija lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem.

a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H₃PO₄-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e) ESMC-HAc-PFL, f) ESMC-H₃PO₄-PFL.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Kako su rezultati desorpcije kod lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem pokazale da nema curenja enzima s nosača, isto se očekivalo te je i dokazano i kod imobilizacije indirektnim kovalentnim vezanjem budući da su aktivnosti lipaza u supernatantu bile jednake nuli te iz tog razloga nisu niti prikazane. Budući da je ovdje, kao i kod lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem, dokazano da nema curenja enzima s nosača, supernatanti ni u ovom slučaju nisu dalje ispitivani. Sada već očekivano, kao i kod prve dvije tehnike imobilizacije, potvrđen je negativan utjecaj soli na aktivnost imobiliziranih lipaza (**Slika 26**). Ovdje su se BCL pokazale nešto otpornijima na utjecaj soli u usporedbi sa lipazama imobiliziranim direktnim kovalentnim vezanjem, ali nešto manje otpornim s obzirom na lipaze imobilizirane adsorpcijom, budući da su zadržale početnu aktivnost do 41 %. Međutim, kod PFL je ovaj utjecaj bio puno manje izražen u odnosu na obje prethodne tehnike jer su sve PFL zadržale preko 66 pa sve do 79 % početne aktivnosti. Kao i kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, i ovdje je NaCl imao najmanji utjecaj na PFL imobilizirane na ESMC-HCl, dok se kod BCL ovaj puta nešto boljim pokazao ESMC-HAc nosač, međutim tek za neznatnih 5 % u usporedbi sa ESMC-HCl. Budući da su pri najvišoj koncentraciji soli od 1 M NaCl, za obje lipaze, za ESMC-HCl i ESMC-H₃PO₄ bila pogodnija viša (1190 U za BCL i 3200 U za PFL), a kod ESMC-HAc niža početna aktivnost (820 U za BCL i 2770 U za PFL) te da razlike u aktivnosti liofiliziranih lipaza nisu prelazile 29 %, a ekonomičnost je išla u prilog nižim početnim aktivnostima, za daljnju karakteritaciju odabrane su, na svim nosačima, obje lipaze nižih početnih aktivnosti u otopini pripremljenoj za imobilizaciju (820 U za BCL i 2770 U za PFL). Stoga su sljedeće lipaze odabrane za daljnja istraživanja (**Tablica 11**): ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HAc-BCL-820U, ESMC-H₃PO₄-BCL-820U i ESMC-HCl-PFL-2770U, ESMC-HAc-PFL-2770U, ESMC-H₃PO₄-PFL-2770U.

Uzimajući u obzir rezultate desorpcije sukladno objašnjenju kriterija za probir odabrane imobilizirane lipaze sumirane su u **Tablici 11** te su nadalje podvrgnute biokemijskoj i operativnoj karakterizaciji.

Tablica 11 Popis imobiliziranih lipaza odabranih za biokemijsku i operativnu karakterizaciju

ADSORPCIJA	DIREKTNO KOVALENTNO VEZANJE	INDIREKTNO KOVALENTNO VEZANJE
ESMC-HCl-BCL-820U	ESMC-HCl-BCL-1190U	ESMC-HCl-BCL-820U
ESMC-HAc-BCL-820U	ESMC-HAc-BCL-1190U	ESMC-HAc-BCL-820U
ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL-820U	ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL-1190U	ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL-820U
ESMC-HCl-PFL-2770U	ESMC-HCl-PFL-2770U	ESMC-HCl-PFL-2770U
ESMC-HAc-PFL-2770U	ESMC-HAc-PFL-2770U	ESMC-HAc-PFL-2770U
ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL-2770U	ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL-2770U	ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL-2770U

4.5. Biokemijska i operativna svojstva slobodnih i imobiliziranih lipaza

Biokemijska i operativna svojstva lipaza podrijetlom iz *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* određena su standardnim titrimetrijskim testom uz maslinovo ulje kao supstrat, fenolftalein kao indikator, te natrijev hidroksid kao titrant. Ukratko, po dodatku enzima emulziji maslinovog ulja u 200 mM fosfatnom puferu koji je sadržavao arapsku gumu kao emulgator, enzimska reakcija je provedena 20 minuta, nakon čega je prekinuta dodatkom 10 mL smjese etanol:acetone (1:1), da bi potom količina oslobođenih masnih kiselina bila određena titracijom sa 50 mM NaOH uz 250 µL fenolftaleina kao indikatora. Od biokemijskih i operativnih svojstava određeni su optimalni pH i temperatura, pH i temperaturna stabilnost kao i stabilnost u organskim otapalima (metanol i etanol) te stabilnost skladištenjem, kinetički parametri i supstratna specifičnost prema komercijalno dostupnim uljima, svinjskoj masti te otpadnom jestivom ulju. Navedena biokemijska i operativna svojstva su određena za slobodne i imobilizirane lipaze.

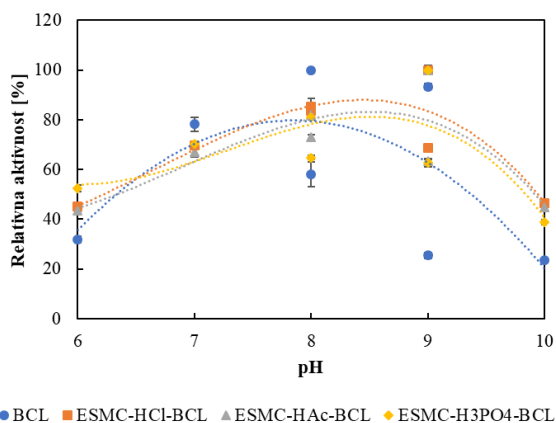
Koliko je poznato, u dostupnoj literaturi nema podataka o karakterizaciji BCL i PFL imobiliziranih na nosače na bazi membrane jaja pripremljenih tretiranjem otpadne ljuske jaja različitim kiselinama. U tri znanstvene publikacije prikazani su rezultati istraživanja imobiliziranih lipaza na membrane jaja, i to: (i) gdje je BCL imobilizirana na membrane jaja prethodno aktivirane glutaraldehydom (Abdulla i sur., 2017); (ii) gdje je BCL imobilizirana na sirove i oksidirane membrane jaja adsorpcijom i dvije druge metode imobilizacije, ali bez karakterizacije imobiliziranih lipaza (Jiang i sur., 2017) te (iii) gdje je lipaza iz *A. haemolyticus* imobilizirana na membrane jaja dobivene korištenjem 0,5 M HCl uz glutaraldehyd kao sredstvo za aktiviranje ili umrežavanje prilikom imobilizacije (Işık i sur., 2021). Stoga su sve karakteristike imobiliziranih lipaza na membrane jaja u okviru ovoga rada uspoređene s karakteristikama imobiliziranih lipaza na drugim nosačima i/ili imobiliziranim na membrane jaja drugim tehnikama imobilizacije u odnosu na tehnike imobilizacije provedene u ovom radu.

4.5.1. pH optimum

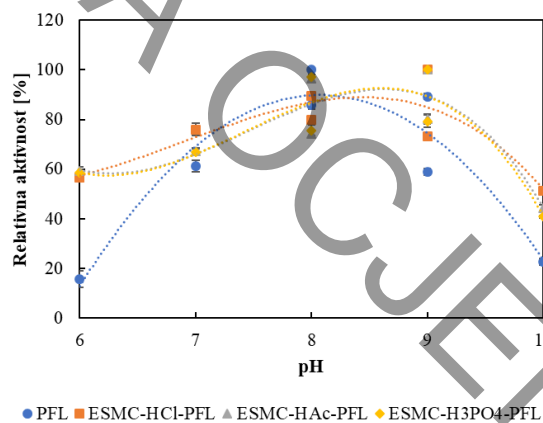
Među najvažnija svojstva enzima, pa tako i lipaza, ubrajaju se pH i temperaturni optimum. Aktivnost enzima ovisi o oba parametra, a pri njihovim optimalnim vrijednostima je brzina katalizirane reakcije maksimalna.

Slobodnim i imobiliziranim lipazama pH optimum određen je titrimetrijskim testom gdje su učinci pH na hidrolizu maslinovog ulja pomoću BCL i PFL ispitani u pH rasponu od 6 do 10. Navedeni raspon pH vrijednosti pokriven je trima različitim puferima uz preklapne točke na pH 8 i 9. Prema tome za određivanje pH optimuma odabrana su tri pufera kako slijedi: natrijev fosfatni pufer (pH 6, 7 i 8), Tris-HCl pufer (pH 8 i 9) i glicin-NaOH pufer (pH 9 i 10). Natrijev ili kalijev fosfatni pufer su najčešće korišteni puferi, kako u imobilizaciji enzima na različite nosače pa i na membrane jaja, tako i u određivanju aktivnosti (slobodnih i imobiliziranih) enzima (Aini i sur., 2015; D'Souza i sur., 2013; Girelli i Scuto, 2021; Jiang i sur., 2017; B. Li i sur., 2008b; Pundir i sur., 2009; Salleh i sur., 2016; Tembe i sur., 2008; Wu i sur., 2004). Za imobilizaciju enzima na membrane jaja najčešće je korišten fosfatni pufer pH 7 (Aini i sur., 2015; M. M. F. Choi i sur., 2001; M. M. F. Choi i Yiu, 2004; D'Souza i sur., 2013; Jiang i sur., 2017; Kessi i Arias, 2019; Pundir i sur., 2009; Wu i sur., 2004), a rjeđe pH 7,4 (B. Li i sur., 2008b) i pH 8 (Y. Zhang i sur., 2007). S druge strane, za ispitivanje aktivnosti i biokemijsku karakterizaciju imobiliziranih enzima, prema dostupnim literaturnim referencama, pH korištenih pufera kretao se u rasponu od 3 do 11 pri čemu očito nije paženo na mogući raspon pH vrijednosti fosfatnog pufera koji se nalazi rasponu od 5,8 do 8 (M. M. F. Choi i sur., 2001; M. M. F. Choi i Yiu, 2004; Girelli i Scuto, 2021; Tembe i sur., 2008; Wu i sur., 2004; G. Zhang i sur., 2006b). Osim fosfatnog, Tris-HCl pufer je jedan od češće korištenih pufera u biokemijskim i medicinskim istraživanjima, a predstavlja otopinu *tris*(hidroksimetil)aminometana određene koncentracije čiji se pH, u rasponu 7 do 9, na željenu vrijednost podešava dodatkom kloridne kiseline (Mohan, 2003). Završno, za najalkalnije vrijednosti pH odabran je glicin–NaOH pufer.

Imobilizirane lipaze (BCL i PFL) pokazale su drugačiji pH optimum u odnosu na slobodne lipaze (**Slike 27-29**).



a) BCL

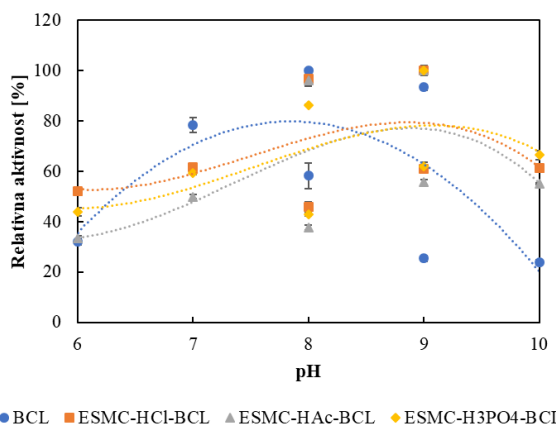


b) PFL

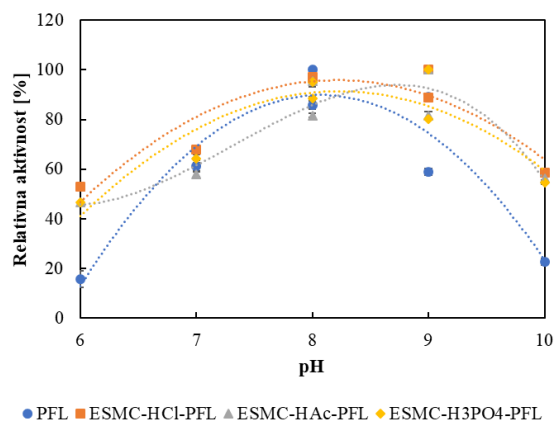
Slika 27 pH optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom.

a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



a) BCL

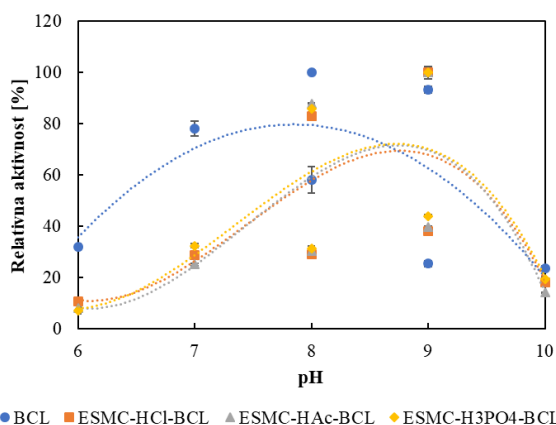


b) PFL

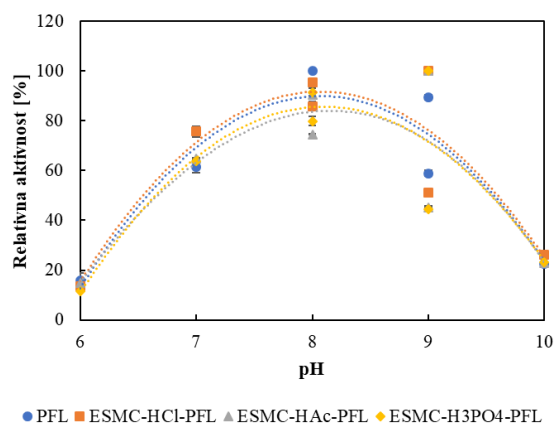
Slika 28 pH optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem.

a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



a) BCL



b) PFL

Slika 29 pH optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem.

a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prema **Slikama 27 – 29**, maksimum relativne aktivnosti (100 %) uočen je pri pH 8 za slobodne lipaze, a pri pH 9 za sve imobilizirane lipaze. Najviše vrijednosti za aktivnost svih ispitanih lipaza dobivene su za pH vrijednosti u rasponu od 7 do 9, a najniže aktivnosti u najkiselije ispitanoj pH sredini (pH 6) i najalkalnije ispitanoj pH sredini (pH 10), gdje je uočeno smanjenje aktivnosti. Iz ovih rezultata dobiva se krivulja u obliku zvona koju slijedi većina enzima. Dva različita učinka odgovorna su za ovo ponašanje: (i) stanje protonacije funkcionalnih skupina aminokiselina i kofaktora uključenih u katalitičku reakciju i (ii) izvorna, trodimenzionalna proteinska struktura enzima. Vrijednost pH optimuma mnogih enzima je unutar fiziološkog raspona, odnosno oko 7,5. Dok je enzim stabilan unutar raspona svog pH optimuma, ekstremnije pH vrijednosti u oba smjera napadaju njegovu terciarnu strukturu na ireverzibilan način. Ovaj proces je ovisan o vremenu i efektivnom pH, odnosno što više odstupa od optimalnog pH to je inaktivacija brža (Bisswanger, 2014).

U pH rasponu od 7 do 9 slobodne lipaze (BCL i PFL) zadržavaju od $61,37 \pm 2,35$ do $93,32 \pm 1,19$ % relativne aktivnosti što ukazuje na njihovu visoku aktivnost u navedenom pH rasponu.

Prema Filho i sur. (2019) imobilizirane lipaze pokazuju visoku aktivnost u širokom rasponu pH vrijednosti, što se ovim istraživanjem pokazalo točnim. Međutim, za isti pH raspon (pH 7–9) kao kod slobodnih lipaza, ako se zanemari pH optimum na 9 u Tris-HCl puferu, imobilizirane lipaze pokazuju nešto niže aktivnosti. Ovo se pogotovo odnosi za BCL koja, ovisno o primijenjenoj tehnici imobilizacije, zadržava $25,12 \pm 0,43$ do $96,56 \pm 2,72$ % aktivnosti, s tim da su pri tome najveće aktivnosti zabilježene kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom pri pH 8 u Tris-HCl puferu, a najniže kod onih imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem pri pH 7 u fosfatnom puferu. Što se tiče imobilizirane PFL, ona se čini nešto otpornijom na promjenu pH vrijednosti gdje u istom rasponu (pH 7–9) zadržava između $44,50 \pm 0,68$ i $97,22 \pm 2,23$ %, a također se najboljima pokazuju lipaze imobilizirane adsorpcijom, te najmanje optornima lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem.

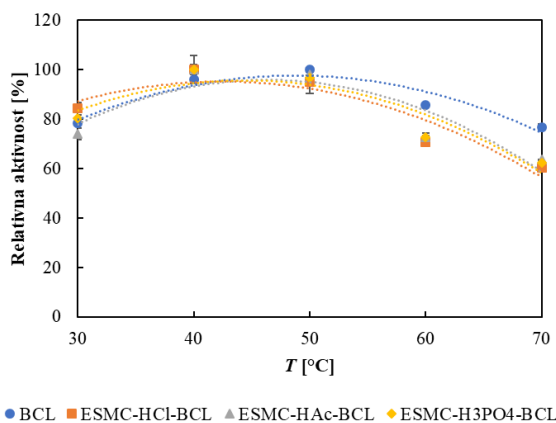
Işik i sur. (2021) su naveli da je aktivnost lipaze imobilizirane na membrane jaja bila veća pri gotovo svim ispitivanim pH vrijednostima u usporedbi sa slobodnim enzimom, što je ovdje potvrđeno za sve imobilizirane lipaze uz iznimku BCL imobiliziranu s obje kovalentne tehnike imobilizacije. Najviše je iznenadila činjenica da se optimalni pH razlikovao u jednoj pH jedinici između slobodnih i imobiliziranih lipaza. Gledajući slobodne lipaze, i BCL i PFL pokazuju najveću aktivnost pri pH 8 u natrijevom fosfatnom puferu, dok je za imobilizirane lipaze najveća aktivnost postignuta pri pH 9 u Tris-HCl puferu. Pomak u optimalnoj pH vrijednosti za

imobilizirane lipaze, prema Cao i sur. (2016) može biti posljedica jačih interakcija između lipaze i nosača, uključujući vodikove veze kao i elektrostatske interakcije. Osim toga, glavni razlog za promjenu optimalnog pH također može biti posljedica promjene koncentracije H⁺ iona u enzimskom mikrokruženju kao gubitak nekih –NH₂ skupina zbog kovalentnog spajanja (Pundir i sur., 2009). Elektrostatski naboji koji se mijenjaju nakon imobilizacije mogu pomaknuti optimalni pH imobiliziranog enzima u blago alkalno područje (Mokhtar i sur., 2020). Štoviše, u alkalnim sredinama, imobilizirana lipaza, prema Mokhtar i sur. (2020), ima veću aktivnost od slobodne lipaze, što je i dokazano ovim istraživanjem. Što se tiče pomaka u optimalnom pH za imobilizirane lipaze, on se može, ali i ne mora dogoditi. Tako Ali i sur. (2016) i Mortazavi i Aghaei (2020) kao i u sklopu ovog istraživanja, pokazuju pomak optimalnog pH imobiliziranih lipaza u odnosu na slobodne lipaze prema alkalnom području, Pundir i sur. (2009) i Ferreira i sur. (2018) prema kiselom, dok El-Ghonemy i sur. (2021) nisu zabilježili pomak optimalnog pH kod imobiliziranih lipaza u odnosu na slobodne lipaze. Dobiveni rezultati za pH optimum slobodnih lipaza (pH 8) su u skladu sa preliminarnim rezultatima ovog doktorskog rada objavljenim u radu Ostojčić i sur. (2021), kao i s radovima Padilha i sur. (2012) i Sachan i sur. (2018), ali se razlikuju od onih koje su objavili Dalal i sur. (2008), Liu i sur. (2006) i Sharma i sur. (2009) (pH 9) te Kojima i Shimizu (2003) (pH 8,5). Prema literaturi, imobilizirane BCL i PFL su pokazale najveću aktivnost u pH rasponu od 6 do 7,5 (Dias i sur., 2018; Ghadi i sur., 2015; K. Li i sur., 2017; Martins i sur., 2017; Rios i sur., 2019; Xu i sur., 2018) što je niže u odnosu na ovdje prikazane rezultate, međutim razlike u rezultatima mogu biti uzrokovane korištenim testom za određivanje aktivnosti, kao i imobilizacijskim tehnikama i prirodi nosača za imobilizaciju. Abdulla i sur. (2017) su imobilizirali BCL na rižinu ljusku i membrane jaja gdje su oba nosača prije imobilizacije aktivirani glutaraldehydom te su pokazali različiti optimalni pH s obzirom na nosač. Imobilizirana BCL na rižinu ljusku imala je najveću aktivnost pri pH 8, a na membrane jaja pri pH 7. Štoviše, isti autori su pokazali da s povećanjem pH obje imobilizirane lipaze pokazuju smanjenje aktivnosti u odnosu na slobodnu lipazu pri čemu se razlog tome može pripisati gubitku H⁺ iona iz skupina bočnih lanaca nosača te činjenici da pH optimum imobiliziranih lipaza ponajviše ovisi o svojstvima nosača i primijenjenoj imobilizacijskoj tehnici, što je ovim istraživanjem potvrđeno.

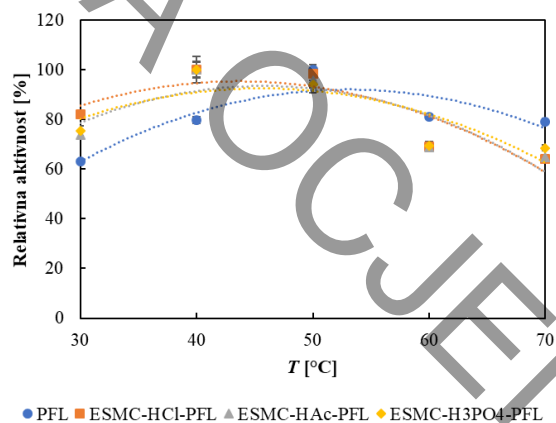
4.5.2. Temperaturni optimum

Temperaturna ovisnost enzimske aktivnosti pokazuje određene sličnosti s trendom ovisnosti većine enzima o pH slijedeći krivulju u obliku zvona. Raste s porastom temperature nakon čega dostiže svoju maksimalnu vrijednost te u podljednoj fazi opada. Ovakav trend ovisnosti aktivnosti enzima o temperaturi često se opisuje pojmom *temperaturni optimum*, iako postojanje optimalne temperature za maksimalnu enzimsku aktivnost ne mora nužno postojati (Bisswanger, 2014). Opisana funkcionalna ovisnost enzimske aktivnosti o temperaturi je posljedica dva suprotna procesa: (i) brzina kemijskih reakcija, uključujući i enzimske, povećava se s temperaturom, što je u skladu s empirijskim pravilom koje predviđa dvostruko do trostruko ubrzanje reakcije na svakih 10 °C porasta temperature te (ii) tercijska struktura enzima termolabilna je i podložna denaturaciji pri povišenim temperaturama, što dovodi do gubitka funkcionalnosti. Denaturacija djeluje suprotno ubrzanju reakcije i uzrokuje pad enzimske aktivnosti na višim temperaturama. Ovaj proces u suprotnosti je s procesom ubrzanju brzine reakcije i odgovoran je za njezin pad na visokim temperaturama. Brzina denaturacije proteina ovisi o kombinaciji intenziteta temperature i vremena izlaganja; što je temperatura viša, to je denaturacija brža. Stoga se ne može odrediti fiksna temperatura za maksimalnu aktivnost enzima; ona prije ovisi o prethodnoj obradi enzima. Ako se enzim odmah testira na umjerenoj temperaturi denaturacije, njegova će aktivnost biti znatno veća nego ako se zadrži na istoj temperaturi dulje vrijeme prije početka analize. Takvi uvjeti mogu lako nastati ako je potrebno određeno vrijeme za pripremu i pokretanje analize, dok je enzim već prisutan u termostatiranoj reakcijskoj smjesi. Tijekom tog vremena denaturacija već počinje, a budući da vrijeme pripreme nije uvijek jednako, gubitak aktivnosti enzima također će varirati (Bisswanger, 2014).

Pri optimalnoj pH vrijednosti određenoj za slobodne i imobilizirane lipaze određen je temperaturni optimum također titrimetrijskim testom uz korištenje maslinovog ulja kao supstrata, a rezultati su prikazani **Slikama 30 - 32**.

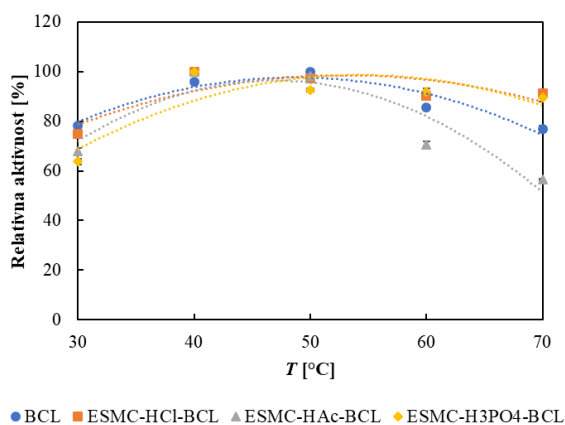


a) BCL

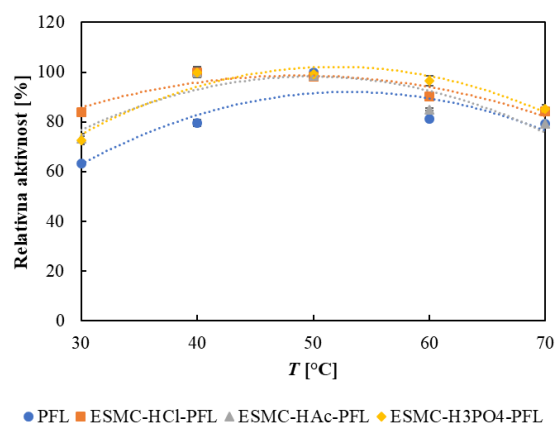


b) PFL

Slika 30 Temperaturni optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom.
 a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza.
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

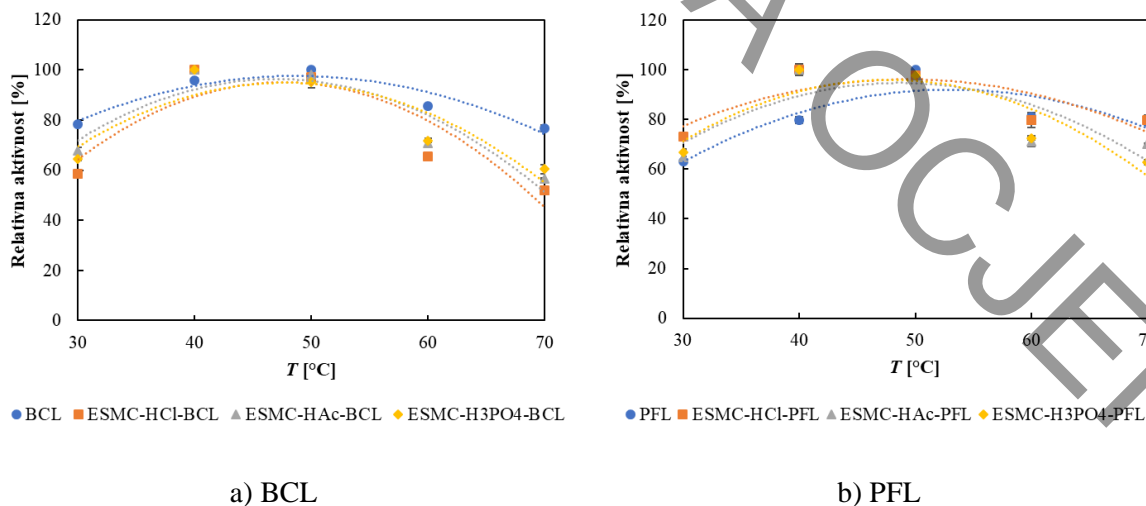


a) BCL



b) PFL

Slika 31 Temperaturni optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem.
 a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza.
 Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



Slika 32 Temperaturni optimum slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem.

a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Sukladno prikazanim rezultatima na **Slikama 30 – 32**, kao i kod optimalnog pH, zabilježen je pomak u temperaturnom optimumu kod imobiliziranih lipaza u odnosu na slobodne lipaze prema nižim temperaturama. Slobodne BCL i PFL pokazale su maksimalnu enzimsku aktivnost u reakciji hidrolize maslinovog ulja pri 50 °C, dok su sve imobilizirane lipaze pokazale najveću aktivnost pri 40 °C. Iako je ovdje došlo do snižavanja temperaturnog optimuma u slučaju imobiliziranih lipaza, prema Işık i sur. (2021) nosači za imobilizaciju poput membrana jaja sadrže velike količine –OH skupina u svojoj strukturi i stoga imaju sposobnost povišenja temperaturnog optimuma imobiliziranog enzima u odnosu na slobodni enzim budući da štite njegovu strukturu u uvjetima povišene temperature. Objavljeni znanstvenoistraživački radovi također potvrđuju promjenu temperaturnog optimuma imobiliziranih lipaza u odnosu na slobodne (Chattopadhyay i Sen, 2012; Pundir i sur., 2009). Pomak u temperaturnom optimumu prema nižim temperaturama svakako je poželjan iz energetskih razloga, budući da se reakcije od interesa mogu izvesti na nižim temperaturama. Značajan pomak u optimalnoj reakcijskoj temperaturi naveli su Mokhtar i sur. (2020) gdje je slobodna lipaza imala najveću aktivnost pri 37 °C, a imobilizirana pri 50 °C. Prema istim autorima, viša temperatura ima manji utjecaj na aktivnost imobilizirane lipaze. To, međutim, nije bio slučaj u okviru ovoga rada, budući da su slobodne lipaze u većini slučajeva pokazale veću relativnu aktivnost na visokim temperaturama (>50 °C), u odnosu na imobilizirane lipaze. Općenito se može zaključiti da i BCL i PFL pokazuju visoke aktivnosti u širokom temperaturnom rasponu. U rasponu od 30 do 70 °C

slobodne lipaze zadržavaju od $63,08 \pm 0,59$ do $95,91 \pm 0,98$ % početne aktivnosti, a imobilizirane čak i nešto više do $98,60 \pm 1,91$ % za BCL te do $99,09 \pm 1,02$ % za PFL

Pri najnižoj ispitanoj temperaturi (30 °C) lipaze imobilizirane adsorpcijom pokazuju najveće aktivnosti, dok pri najvišoj ispitanoj temperature (70 °C) najvišu aktivnost zadržavaju lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem. Iz navedenog proizlazi da imobilizacija pozitivno utječe na očuvanje lipaza od gubitka aktivnosti pri višim temperaturama, i to ponajprije imobilizacija direktnim kovalentnim vezanjem. Dobiveni podaci o temperaturnom optimumu slobodnih lipaza razlikuju se od onih koje su objavili Padilha i sur. (2012) (37 °C), Dalal i sur. (2008) (40 °C), Kojima i Shimizu (2003) (45 °C), Kulkarni i Gadre (2002) i Liu i sur. (2006) (55 °C), Wang i sur. (2009) (60 °C) i J. Yang i sur. (2007) (70 °C), ali su u skladu s onima koje su objavili Sachan i sur. (2018), Sánchez i sur. (2018) te Sharma i sur. (2009). BCL i PFL imobilizirane na različitim nosačima, koristeći različite tehnike, pokazuju najveću aktivnost u temperaturnom rasponu od 40 do 70 °C (Abdulla i sur., 2017; Corrêa i sur., 2022; Ghadi i sur., 2015; Martins i sur., 2017) u što se uklapaju i rezultati dobiveni u okviru ovog doktorskog rada, a upravo prema Filho i sur. (2019) imobilizirane lipaze pokazuju visoke aktivnosti u širokom temperaturnom rasponu. Pundir i sur. (2009) su u svojem radu za imobiliziranu lipazu na membranu jaja aktiviranu glutaraldehidom zabilježili promjenu optimalne temperature imobiliziranih lipaza (40 °C) u odnosu na slobodne lipaze (35 °C). Rezultati ovog istraživanja su u skladu i s rezultatima istraživanja autora Abdulla i sur. (2017) koji su za BCL imobiliziranu na rižinu ljusku i membranu jaja, neovisno o nosaču, kao optimalnu temperaturu zabilježili 40 °C dok aktivnost imobilizirane lipaze opada s daljnjim povećanjem temperature zbog deaktivacije enzima, kao i zbog dezintegracije materijala nosača.

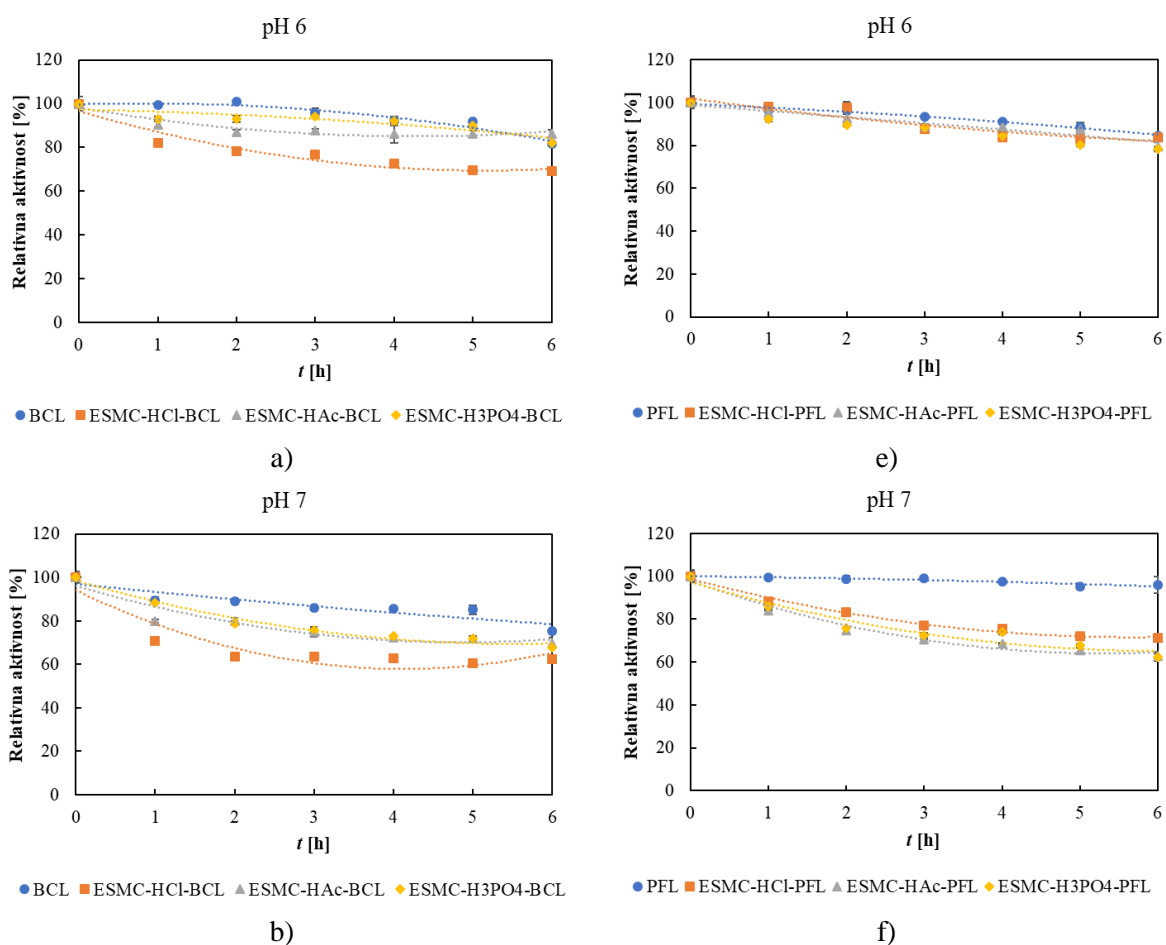
4.5.3. pH stabilnost

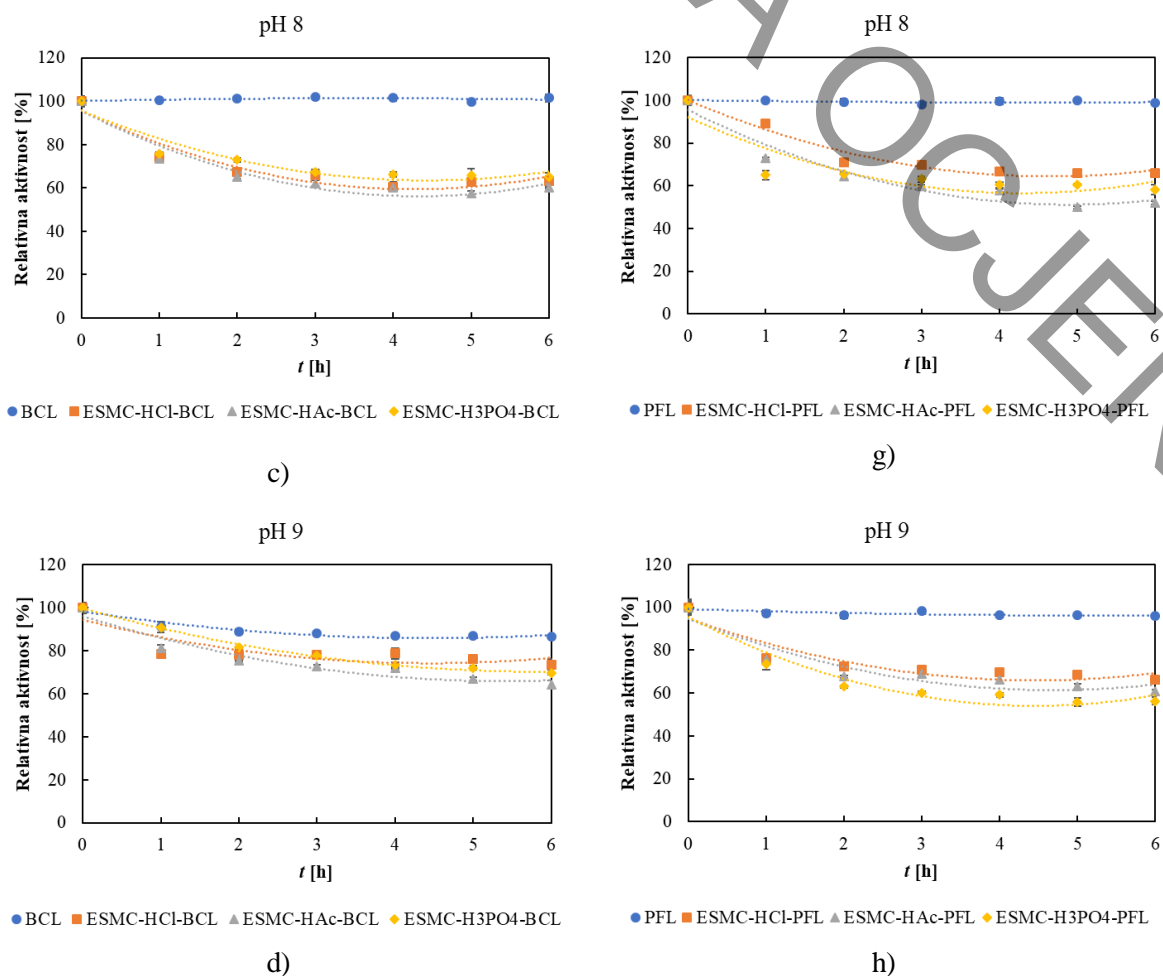
Primjena enzima u industriji moguća je samo ako su enzimi stabilni u širokom temperaturnom i pH rasponu, kao i u prisutnosti soli, lužina i površinski aktivnih tvari. Ovo je bitno budući da se industrijska primjena enzima odvija na visokim temperaturama (npr. pranje ~ 60 – 70 °C, želatinizacija škroba ~ 100 °C, oblikovanje tekstila ~ 80 – 90 °C), pri visokim koncentracijama soli (u prehrambenoj industriji), u alkalnim uvjetima i u prisutnosti površinski aktivnih tvari (u deterdžentima i u nekoliko reakcijskih sustava biotransformacije).

Upravo iz navedenih razloga provedena su ispitivanja stabilnosti slobodnih i imobiliziranih lipaza na nosače na bazi membrana jaja kroz određeno vrijeme pri različitim pH vrijednostima, temperaturama te u prisutnosti najčešće korištenih otapala gdje bi prema Filho i sur. (2019)

imobilizacija trebala imati pozitivan učinak na lipaze koje bi u imobiliziranom obliku imale poboljšanu stabilnost uz visoke aktivnosti u širokom pH i temperaturnom rasponu.

pH stabilnost je praćena pri četiri pH vrijednosti (natrijev fosfatni pufer pH 6, 7 i 8 i Tris-HCl pufer pH 9) na optimalnoj temperaturi (50 °C za slobodne i 40 °C za imobilizirane lipaze) tijekom šest sati. Eksperimenti su provedeni u termobloku (LLG uniBLOCKTHERM, Meckenheim, Njemačka) uz stalno miješanje od 250 okretaja/min. Navedeni puferi su odabrani jer udovoljavaju optimalno dobivenom pH, ali isto tako i najčešće korištenim pH vrijednostima u reakcijama od interesa. **Slikama 33 – 35** su prikazani rezultati pH stabilnosti slobodnih i imobiliziranih lipaza.

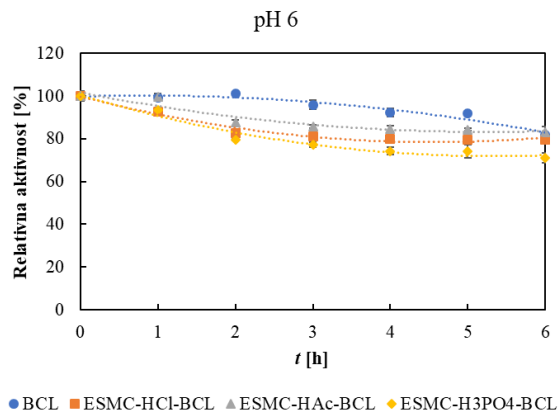




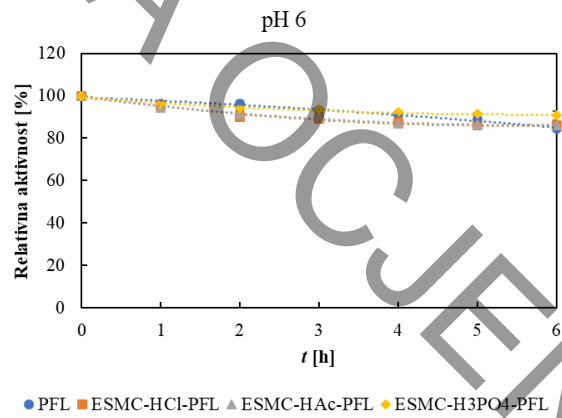
Slika 33 pH stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom.

- a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9.

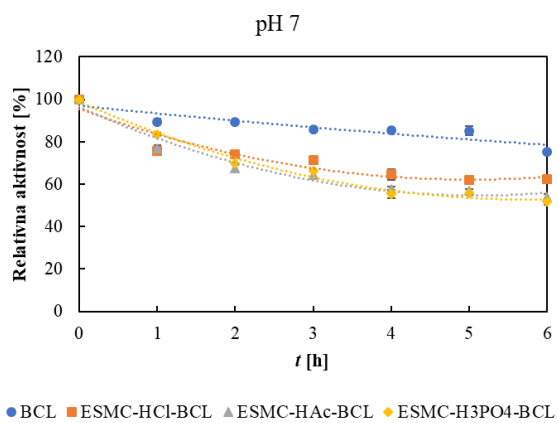
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



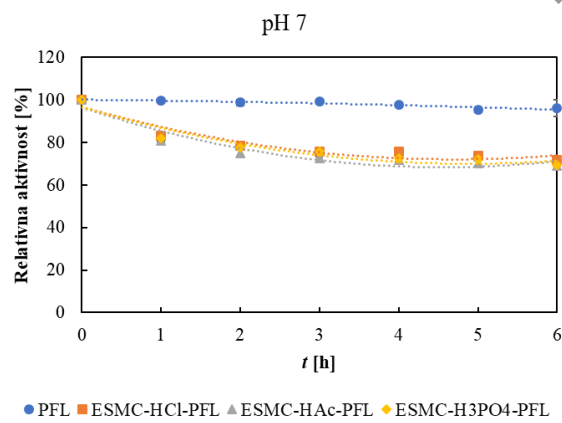
a)



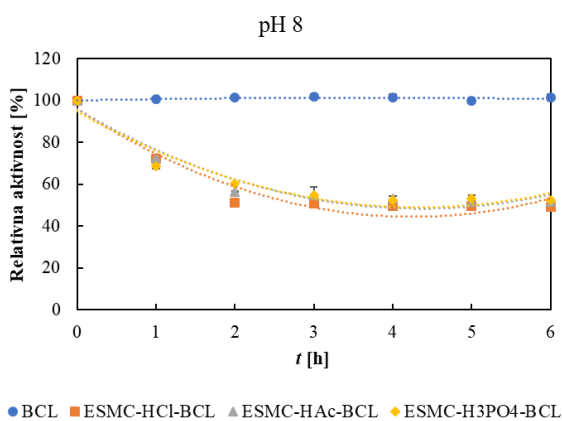
e)



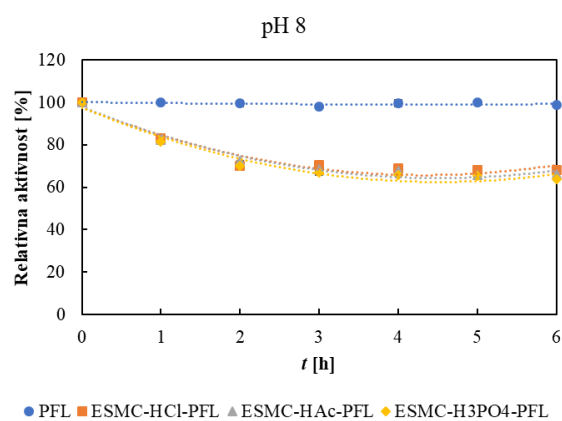
b)



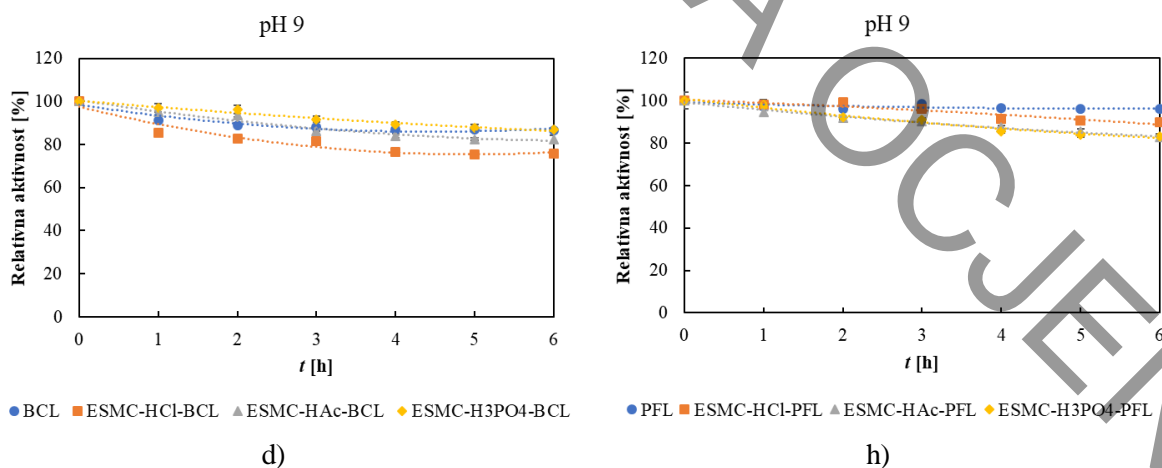
f)



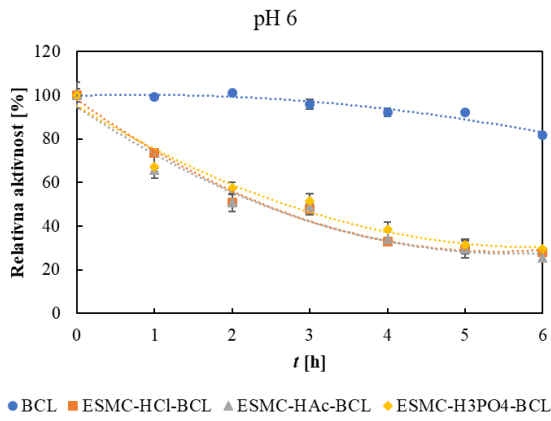
c)



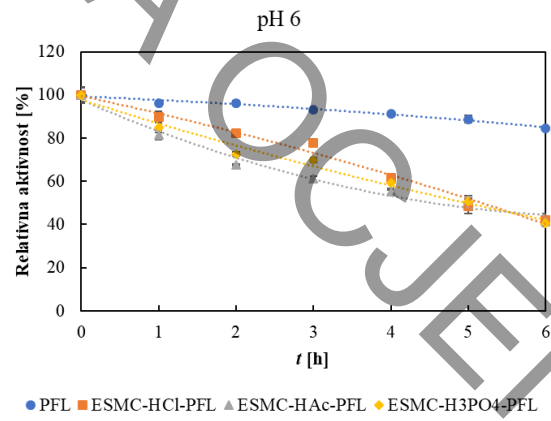
g)



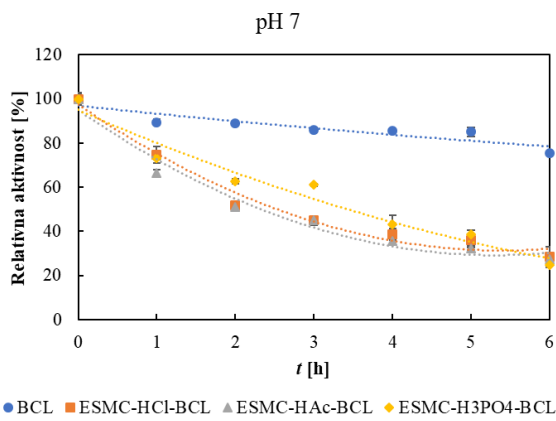
Slika 34 pH stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



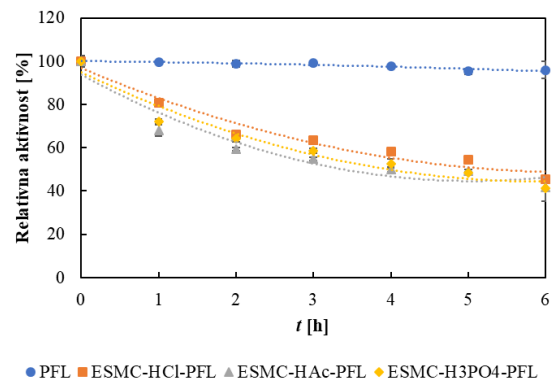
a)



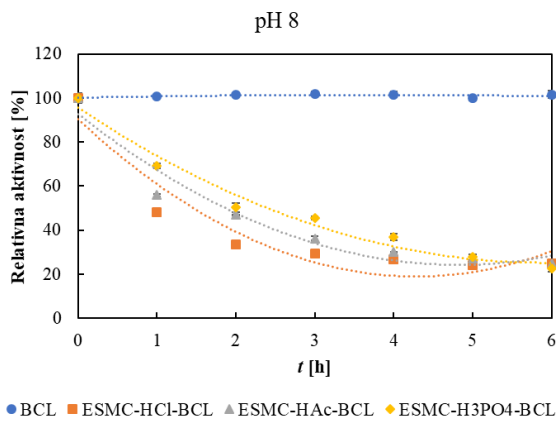
e)



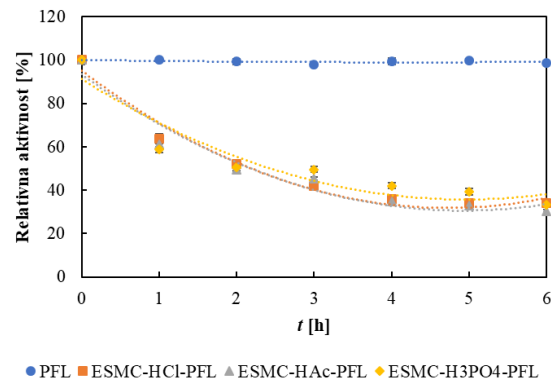
b)



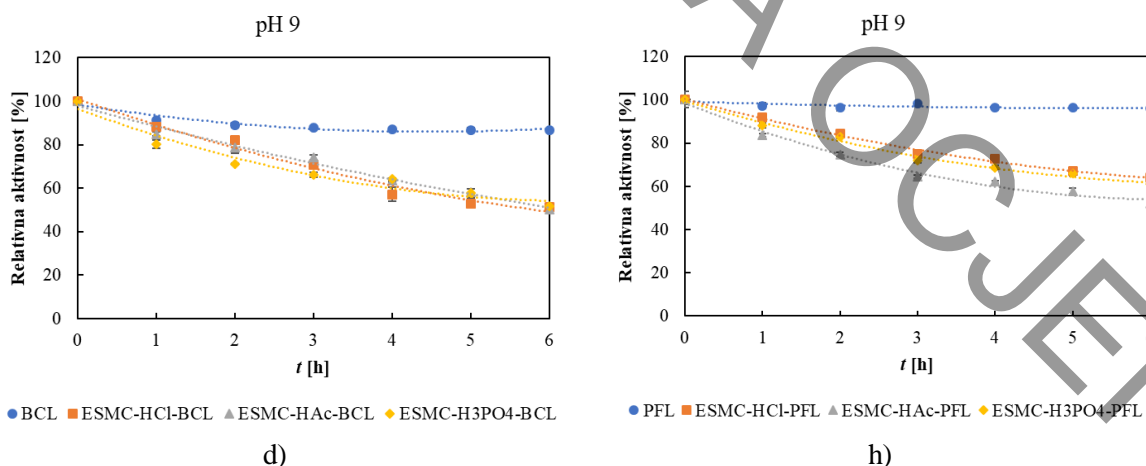
f)



c)



g)



Slika 35 pH stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 6, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 7, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 8, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na pH 9.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prema prikazanim rezultatima, slobodne lipaze su se pokazale stabilnijima od imobiliziranih pri gotovo svim pH vrijednostima, uz iznimku pH 6 kod adsorpcije i pH 9 kod direktnog kovalentnog vezanja za BCL te pH 6 kod direktnog kovalentnog vezanja za PFL, gdje su vrijednosti relativne aktivnosti slobodnih lipaza bile gotovo jednake ili tek nešto niže od imobiliziranih. Lipaze imobilizirane adsorpcijom su se pokazale relativno otpornima na utjecaj pH jer su imobilizirane BCL i PFL zadržale preko $60,19 \pm 0,59$ % odnosno $51,96 \pm 0,90$ % aktivnosti u razdoblju od šest sati pri pH 8 pa sve do visokih $86,27 \pm 1,96$ % odnosno $83,81 \pm 0,58$ % pri pH 6, ovisno o korištenom nosaču (**Slika 33**, **Tablica 12**). Ono što se kod ovih imobiliziranih lipaza može primijetiti je to da, bez obzira na lipazu (BCL ili PFL) i nosač, sve su najbolju pH stabilnost pokazale na najnižoj pH vrijednosti (pH 6), a zatim na pH 7 ili pri optimalnoj pH vrijednosti (pH 9). Lipaze imobilizirane adsorpcijom su se najnestabilnijima pokazale pri pH vrijednosti 8, što je ujedno određeno kao optimalni pH za slobodne lipaze pri kojoj su obje slobodne lipaze kroz 6 sati zadržale preko 98 % aktivnosti. To je bilo poprilično iznenađujuće jer se očekivalo, sukladno literaturnim navodima u radovima autora Kharrat i sur. (2011) te Mokhtar i sur. (2020), da će imobilizirane lipaze imati veću stabilnost u odnosu na slobodne lipaze. Uzimajući u obzir aktivnosti lipaza u supernatantu u slučaju imobilizacije adsorpcijom (**Prilog 2**), najniže aktivnosti lipaza zabilježene su pri vrijednostima pH 6 i iznose do maksimalnih 4 U tijekom svih šest sati. Najveće vrijednosti aktivnosti lipaza u supernatantu zabilježene su pri najvišem pH (pH 9) i iznose do 19 U, pri čemu se može zaključiti da se pri optimalnom pH imobiliziranih lipaza zapravo najviše lipaze odvaja s nosača i ispušta u

reakcijsku smjesu (supernatant). Prema tome, budući da su se sve lipaze imobilizirane adsorpcijom pokazale najstabilnijima pri pH 6, kao i da na istom pH pokazuju najmanje aktivnosti u supernatantu, za očekivati je da bi za reakcije od interesa bilo poželjno koristiti ovaj pH.

Kako bi se uočile moguće statistički značajne razlike između pH stabilnosti pojedinih imobiliziranih lipaza proveden je post-hoc Fisher-ov LSD test za šesti sat pH stabilnosti, a rezultati su prikazani **Tablicama 12 – 14**.

Tablica 12 Fisher-ov LSD test za pH stabilnost za lipaze imobilizirane adsorpcijom

<i>pH</i> <i>stabilnost</i> <i>(6h)</i>	<i>ESMC-</i> <i>HCl-BCL</i>	<i>ESMC-</i> <i>HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-</i> <i>BCL</i>	<i>ESMC-</i> <i>HCl-PFL</i>	<i>ESMC-</i> <i>HAc-PFL</i>	<i>ESMC-</i> <i>H₃PO₄-PFL</i>
pH 6 [%]	69,10±1,23 ^a	86,27±1,96 ^b	82,18±0,43 ^c	83,81±0,58 ^A	79,45±2,05 ^B	78,28±1,23 ^B
pH 7 [%]	62,48±0,85 ^a	69,72±2,65 ^b	67,94±0,82 ^b	71,22±0,22 ^A	62,83±1,01 ^B	62,53±2,14 ^B
pH 8 [%]	63,14±2,45 ^{a,b}	60,19±0,59 ^a	65,21±1,90 ^b	66,03±0,55 ^A	50,94±0,90 ^B	58,18±2,19 ^C
pH 9 [%]	73,64±2,40 ^a	64,23±1,87 ^b	69,51±0,69 ^c	66,28±0,88 ^A	60,20±0,78 ^B	56,30±1,82 ^C

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Tablica 13 Fisher-ov LSD test za pH stabilnost za lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem

<i>pH</i> <i>stabilnost</i> <i>(6h)</i>	<i>ESMC-</i> <i>HCl-BCL</i>	<i>ESMC-</i> <i>HAc-BCL</i>	<i>ESMC-</i> <i>H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-</i> <i>HCl-PFL</i>	<i>ESMC-</i> <i>HAc-PFL</i>	<i>ESMC-</i> <i>H₃PO₄-PFL</i>
pH 6 [%]	76,90±0,85 ^a	83,06±2,74 ^a	70,92±2,23 ^b	86,01±2,03 ^A	86,25±1,35 ^A	90,67±2,10 ^B
pH 7 [%]	62,49±1,28 ^a	53,72±1,49 ^b	51,79±1,63 ^b	71,78±0,54 ^A	68,90±0,32 ^B	69,26±0,55 ^B
pH 8 [%]	49,15±0,29 ^a	51,64±0,42 ^b	52,26±0,94 ^b	68,16±0,78 ^A	66,13±1,29 ^B	63,70±0,00 ^C
pH 9 [%]	75,90±1,36 ^a	82,42±1,96 ^b	86,77±1,06 ^c	89,68±0,47 ^A	82,68±1,43 ^B	83,08±0,00 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Tablica 14 Fisher-ov LSD test za pH stabilnost za lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem

<i>pH</i> <i>stabilnost</i> <i>(6h)</i>	<i>ESMC-</i> <i>HCl-BCL</i>	<i>ESMC-</i> <i>HAc-BCL</i>	<i>ESMC-</i> <i>H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-</i> <i>HCl-PFL</i>	<i>ESMC-</i> <i>HAc-PFL</i>	<i>ESMC-</i> <i>H₃PO₄-PFL</i>
pH 6 [%]	28,18±1,94 ^{a,b}	25,48±1,55 ^a	29,42±0,53 ^b	42,16±2,98 ^A	41,33±0,65 ^A	40,61±1,22 ^A
pH 7 [%]	28,42±4,65 ^a	27,25±0,26 ^a	24,88±0,85 ^a	45,41±0,52 ^A	41,83±1,61 ^A	41,17±5,75 ^A
pH 8 [%]	24,69±0,41 ^a	24,63±1,42 ^a	22,57±1,68 ^a	33,85±0,37 ^A	30,35±0,63 ^B	33,35±0,16 ^A
pH 9 [%]	51,15±1,61 ^a	50,21±1,18 ^a	51,57±1,76 ^a	63,88±0,54 ^A	52,17±1,13 ^B	60,99±1,11 ^C

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Prema rezultatima prikazanim u **Tablicama 12 – 14**, uočena je statistički značajna razlika u pH stabilnosti među imobiliziranim lipazama na pripremljene nosač na bazi membrane jaja. Kod svih testiranih pH vrijednosti adsorpcijom imobilizirane PFL pokazuju najveću stabilnost kada su imobilizirane na ESMC-HCl. S druge strane, za BCL su rezultati nešto drugačiji, gdje je pri

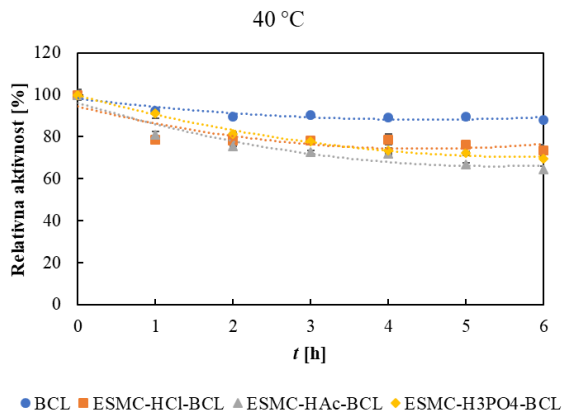
pH 6 i 7 najveću stabilnost pokazala lipaza imobilizirana na ESMC-HAc, dok je pri pH 8 najveću stabilnost pokazala lipaza imobilizirana na ESMC-H₃PO₄, a pri pH 9 na ESMC-HCl. Lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem, također se pokazuju nestabilnijima na gotovo svim pH vrijednostima u odnosu na slobodne lipaze izuzev pri pH 9 za BCL te pri pH 6 samo za PFL gdje su vrijednosti relativnih aktivnosti slobodnih lipaza bile gotovo jednake ili tek nešto niže od imobiliziranih (**Slika 34**). Kada se rezultati usporede sa onima kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, mogu se uočiti nešto niže vrijednosti na svim pH vrijednostima, ali također najbolja stabilnost pri najnižem pH. U slučaju lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem (**Tablica 13**), PFL je također pokazala najbolju stabilnosti kada je imobilizirana na ESM-HCl uz statistički značajnu razliku s obzirom na druga dva nosača. Kod BCL su se za pH 6 dobili podjednaki rezultate bez statistički značajne razlike na nosačima ESMC-HCl i ESMC-HAc. S druge strane, pri pH 7 se BCL pokazala najstabilnijom kada je imobilizirana na ESMC-HCl, a pri pH 8 i 9 na ESMC-H₃PO₄, uz statistički značajne razlike s obzirom na druge nosače. Lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem (**Tablica 14**) su se pri svim pH vrijednostima za obje lipaze pokazale najstabilnijima kada su imobilizirane na ESMC-HCl, ali bez statistički značajne razlike s obzirom na druga dva nosača. Međutim, kod lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem, mogu se uočiti najmanje od svih postignutih stabilnosti. Naime, BCL imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem, u fosfatnom puferu (pH 6, 7 i 8) nakon šest sati ostaju na svega $22,57 \pm 1,68$ do $29,42 \pm 0,53$ % početne aktivnosti, dok je kod PFL stabilnost nešto bolja te za iste pH vrijednosti iznosi od $30,35 \pm 0,63$ do $45,41 \pm 0,52$ %. Ono što se još može primijetiti, i što je različito od druga dva tipa imobiliziranih lipaza, je da su ove lipaze najstabilnije pri svojem optimalnom pH 9, gdje relativne aktivnosti nakon šest sati za BCL iznose $50,21 \pm 1,18$ do $51,57 \pm 1,76$ %, a za PFL $52,17 \pm 1,13$ do $63,88 \pm 0,54$ %, ovisno o korištenom nosaču. Prema Aravindan i sur. (2007) lipaze su vrlo stabilne u širokom pH rasponu. pH stabilnost slobodne BCL je ispitana u radu Dalal i sur. (2008) gdje je pokazano da je lipaza bila potpuno stabilna najmanje 12 sati na 25 °C pri pH 9 i 10 dok pri pH 8 gubi do 50 % aktivnosti pri istoj temperaturi i vremenu trajanja skladištenja (25 °C; 12 sati). Stoga je lipaza koju proizvodi *B. cepacia* (A.T.C.C. 25609) nazvana alkalnom lipazom uz napomenu da samo nekoliko sojeva *B. cepacia* proizvodi alkalne lipaze dok drugi sojevi proizvode lipaze s pH optimumom u rasponu vrijednosti pH od 6,5 do 7. Girelli i Scuto (2021) su imobilizirali lakazu na membrane jaja te u svrhu ispitivanja pH stabilnosti imobilizirane lakaze uronili u pufere na pH 3, 4, 5 i 7 na 25 °C tijekom jednog sata. Pokazalo se da imobilizirana lakaza ima najveću stabilnost pri pH 5 što odgovara najčešćoj pH vrijednosti u industrijskoj primjeni toga enzima (Hu i sur., 2007). Osim

toga, lakaza pokazuje su veću stabilnost u pH rasponu 5 – 7 nego u kiselom mediju pri pH 3, uz općenito veću pH stabilnost slobodnog u odnosu na imobilizirani enzim kao što je to bio slučaj u ovom radu.

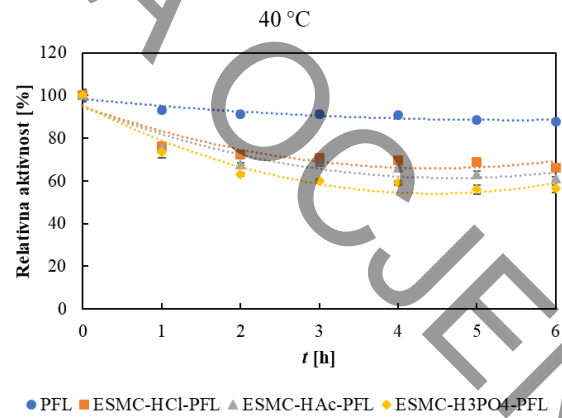
4.5.4. Temperaturna stabilnost

Temperaturna stabilnost jedna je od najpoželjnijih karakteristika u potrazi za novim lipazama (Hamdan i sur., 2021). Termofilni mikroorganizmi za sintetiziranje funkcionalnih enzimskih biokatalizatora sa sposobnošću podnošenja visokih temperatura i sposobnosti održavanja svog prirodnog stanja u ekstremnim uvjetima otvaraju nove mogućnosti za njihovu biotehnološku primjenu. Termostabilne lipaze jedni su od najpoželjnijih enzima koji se koriste u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te se aktivno istražuju kao potencijalni biokatalizatori u proizvodnji biodizela i drugim biotehnološkim procesima (Hamdan i sur., 2021). Budući da je rad bioprocasa na povišenim temperaturama koristan zbog veće brzine difuzije, niže viskoznosti supstrata, povećane topivosti reaktanta, pomaka u termodinamičkoj ravnoteži u slučaju endotermnih reakcija i smanjenog rizika od mikrobne kontaminacije, imobilizacija lipaza na krutom nosaču pomaže povećati njihovu termostabilnost i proširiti njihov biotehnološki potencijal (Kharrat i sur., 2011). Ove prednosti daleko nadmašuju troškove infrastrukture i obrade koji nastaju zbog strogih zahtjeva za materijalima, teže post-reakcijske inaktivacije i ograničenja u slučaju labilnih supstrata ili proizvoda (Iyer i Ananthanarayan, 2008). U mnogim od ovih slučajeva, enzimi se koriste unatoč svojoj relativnoj nestabilnosti stoga uvijek postoji potreba za enzimima aktivnim u ekstremnim uvjetima pH i temperature.

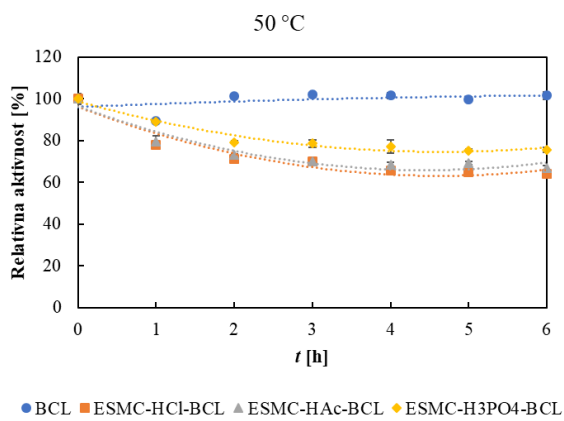
Budući da su ispitane lipaze pokazale relativnu stabilnost pri različitim pH vrijednostima, ali se njihova primjena uglavnom odvija pri optimalnom pH, bilo je potrebno ispitati i njihovu temperaturnu stabilnost u tim uvjetima. Temperaturna stabilnost slobodnih i imobiliziranih lipaza je praćena upotrebom optimalnog pufera (100 mM natrijevog fosfatnog pufera pH 8 za slobodne lipaze, 100 mM Tris-HCl pufera pH 9 za imobilizirane lipaze) na četiri različite temperature (40, 50, 60 i 70 °C) tijekom šest sati korištenjem termobloka (LLG uniBLOCKTHERM, Meckenheim, Njemačka) uz stalno miješanje od 250 okretaja/min. **Slikama 36 - 38** su prikazani rezultati temperaturne stabilnosti slobodnih i imobiliziranih lipaza.



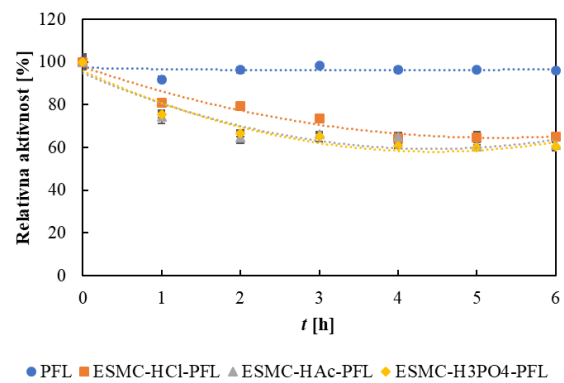
a)



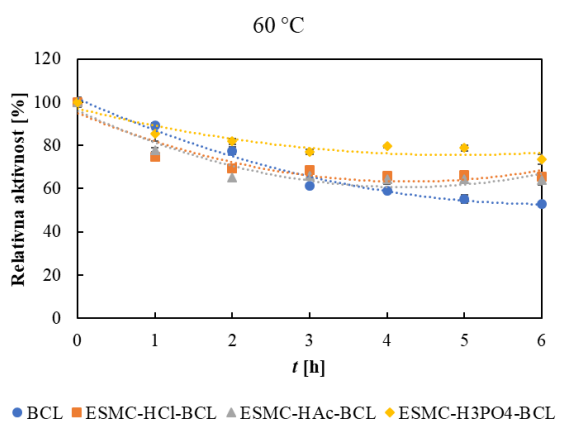
e)



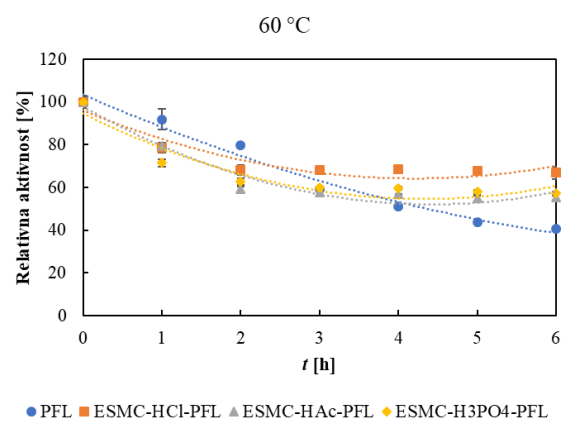
b)



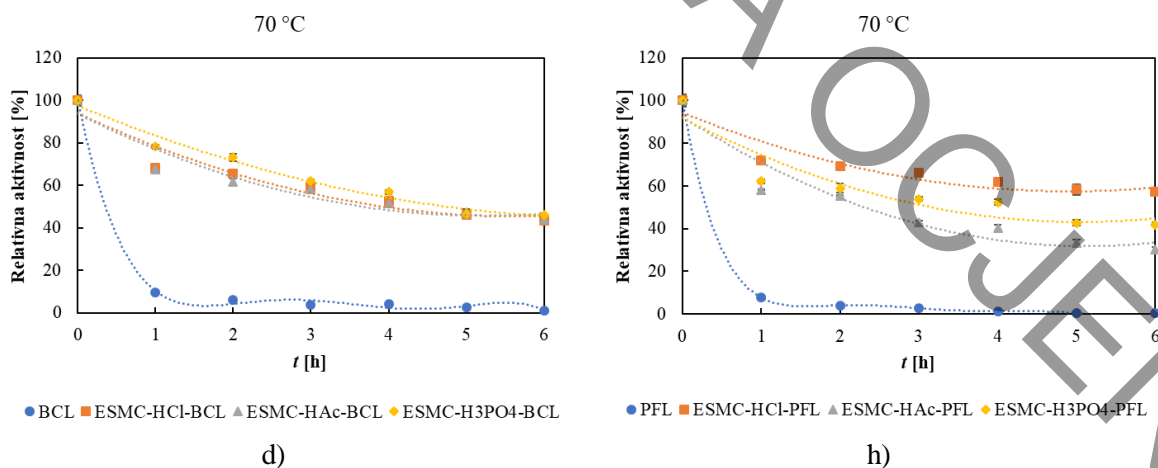
f)



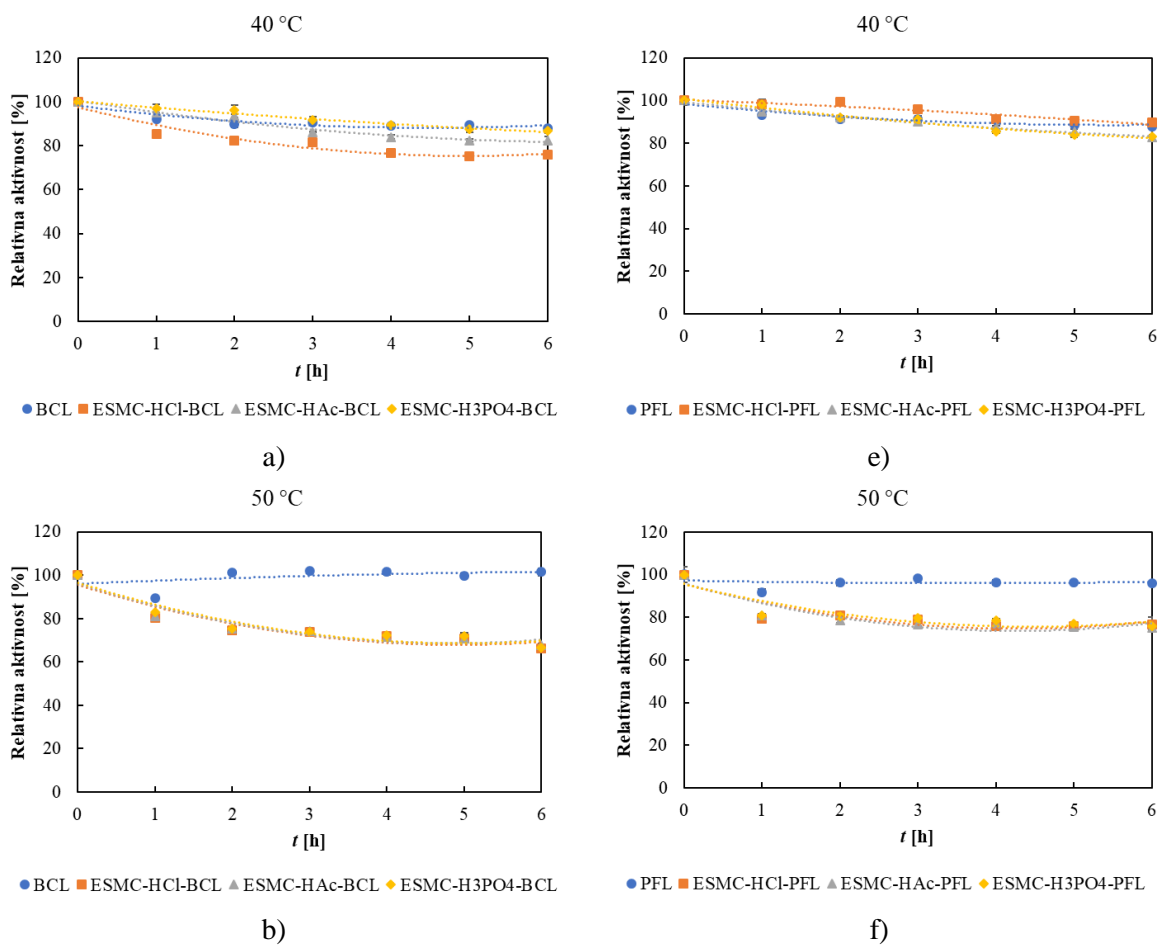
c)

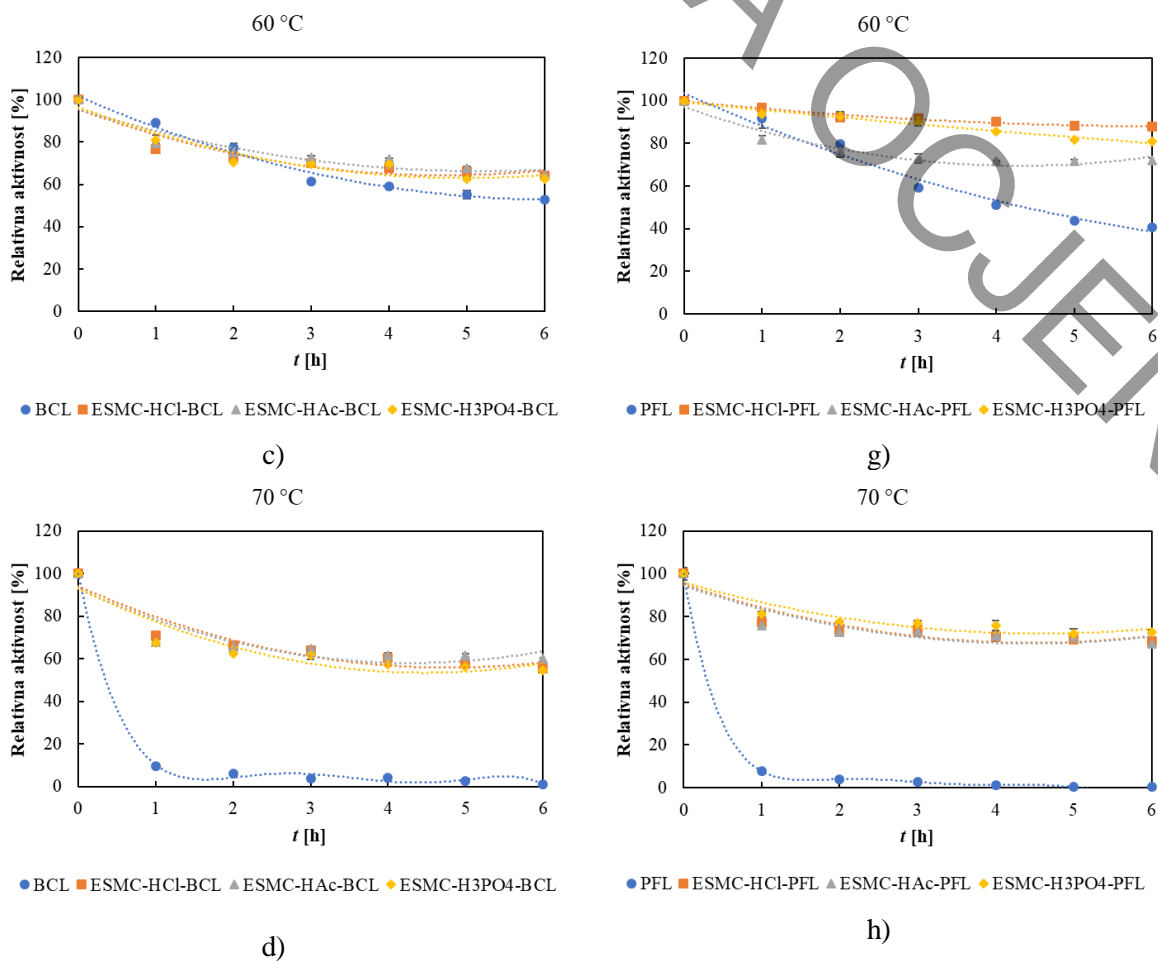


g)



Slika 36 Temperaturna stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.

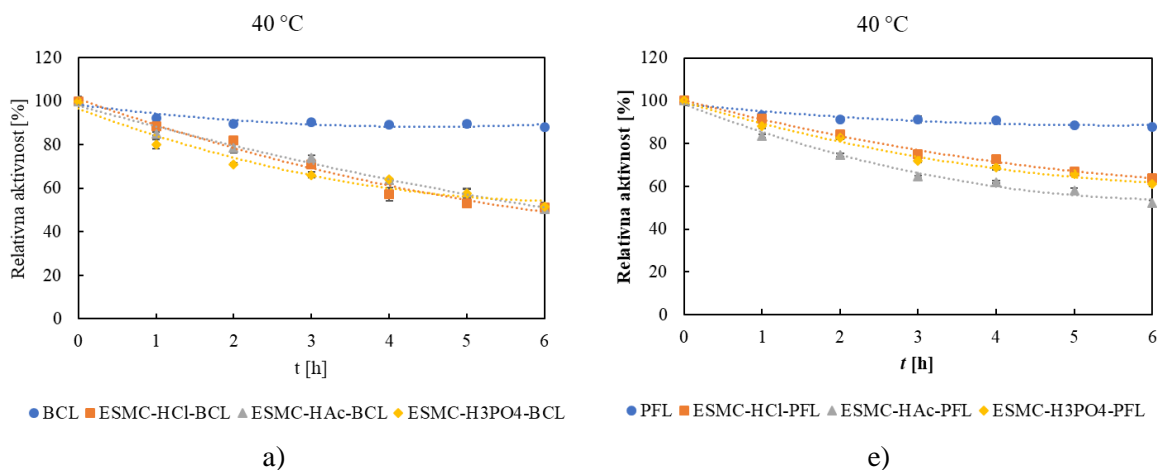


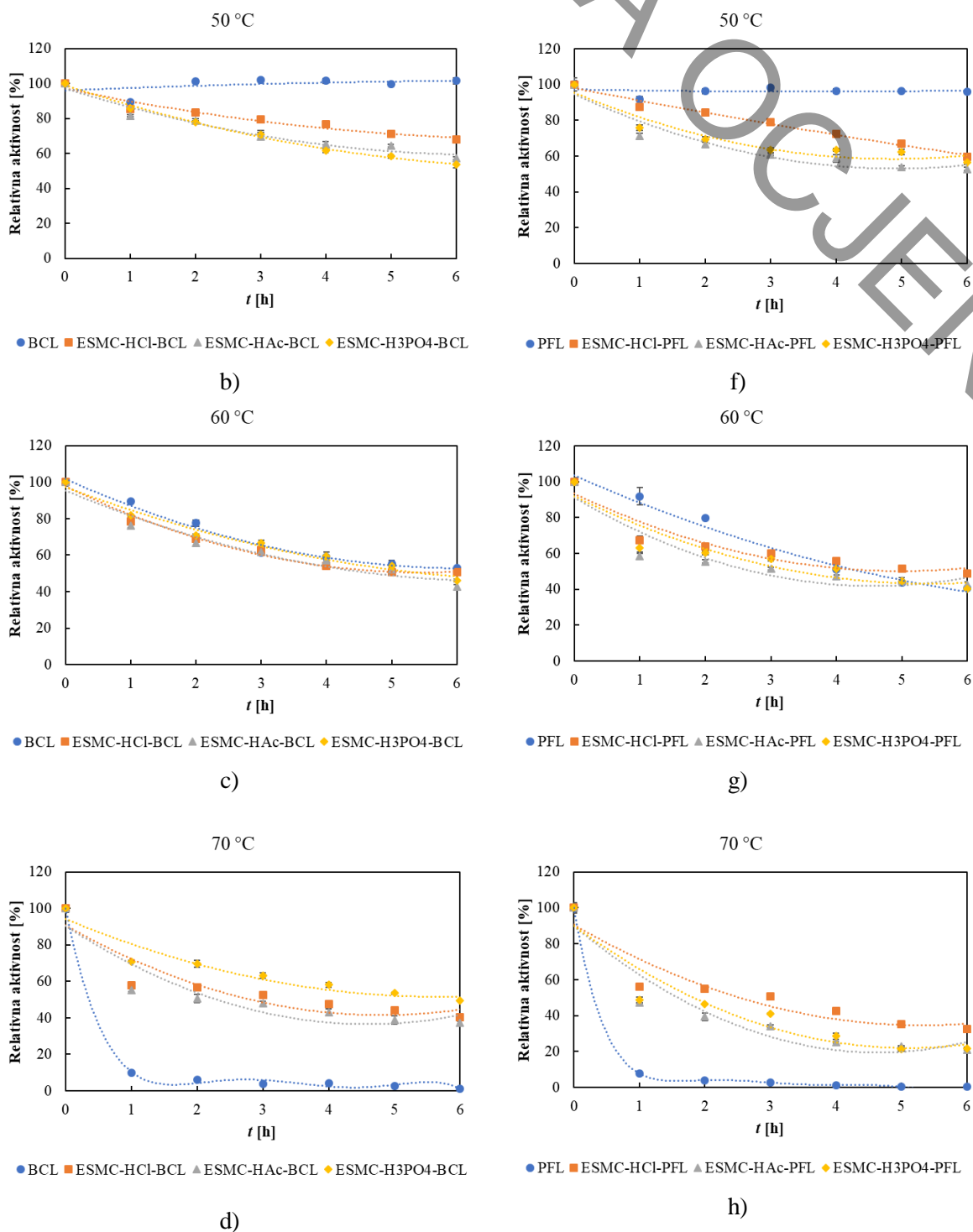


Slika 37 Temperaturna stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem.

a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.





Slika 38 Temperaturna stabilnost slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, c) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, d) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C; e) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 40 °C, f) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 50 °C, g) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 60 °C, h) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza na 70 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Rezultati prikazani **Slikama 36-38** pokazuju da su obje lipaze najstabilnije pri svojoj optimalnoj temperaturi, odnosno pri 50 °C, gdje zadržavaju preko 96 % svoje početne aktivnosti. Pri 40 °C pokazuju nešto nižu, ali i dalje relativno visoku stabilnost, gdje nakon šest sati ostaju na približnih 88 % svoje aktivnosti. S druge strane na višim temperaturama slobodne lipaze gube svoju stabilnost koja pri 60 °C počinje opadati pri čemu za BCL nakon šest sati iznosi $52,88 \pm 0,86$ %, a za PFL $40,85 \pm 0,00$ % početne aktivnosti. Na najvišoj ispitanoj temperaturi od 70 °C obje slobodne lipaze su već nakon sat vremena pale ispod 10 % početne aktivnosti gdje je kroz ostatak sati ispitivanja stabilnosti postepeno došlo do potpune inaktivacije. Generalno, BCL pokazuje nešto veću stabilnost u odnosu na PFL na svim temperaturama. Dalje i sur. (2008) su ispitali temperaturnu stabilnost slobodne BCL i utvrdili da je u potpunosti zadržala svoju aktivnost na 40 °C, dok je pri 50 i 60 °C pokazala izrazit pad stabilnosti tijekom vremena. Najniža zabilježena aktivnost iznosila je 40 % početne vrijednosti na 60 °C, što je niže od rezultata dobivenih u ovom istraživanju. Ono što se prvo može primijetiti pri uspoređivanju temperaturne stabilnosti imobiliziranih sa slobodnim lipazama je to da pri 40 i 50 °C imobilizirane lipaze pokazuju i do 30 % manju stabilnost u odnosu na slobodne. Međutim, na 70 °C bolju stabilnost pokazuju imobilizirane lipaze. Prema tome, može se reći da imobilizacija, neovisno kojom tehnikom, poboljšava temperaturnu stabilnost ispitanih lipaza pri temperaturama većim od 60 °C. U slučaju lipaza imobiliziranih adsorpcijom, na tri niže temperature (≤ 60 °C) zadržale su $63,80 \pm 2,15 - 75,53 \pm 1,13$ % početne aktivnosti za BCL te $55,20 \pm 1,67 - 66,83 \pm 3,00$ % za PFL. Međutim, na 70 °C njihova aktivnost znatno opada, dosežući približno 45 % za BCL te 30 – 40 % za PFL. Jedina iznimka bila je PFL imobilizirana na ESMC-HCl, koja je zadržala $57,09 \pm 1,14$ % svoje početne aktivnost na 70 °C. Aktivnosti u supernatantu kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom (**Prilog 3**), u prvom satu za sve ispitivane temperature, kretala se od 12 do 20 U, da bi se u sljedećim satima u većini slučajeva neznatno smanjila ili ostala približno na istoj vrijednosti. Jedino veće smanjenje aktivnosti u supernatantu zabilježenoj je na najvišoj ispitivanoj temperaturi (70 °C), gdje je aktivnost u supernatantu pala na 8 – 10 U. Navedeno se može objasniti inaktivacijom enzima temperaturom, što je u skladu s rezultatima aktivnosti za slobodne i imobilizirane lipaze, gdje je temperatura od 70 °C također imala najveći inaktivacijski utjecaj. Kod lipaza imobiliziranih kovalentnim vezanjem, nisu ispitivani supernatanti sukladno rezultatima desorpcije koji su pokazali da ne dolazi do otpuštanja lipaze sa nosača u supernatant. Lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem na temperaturi od 60 °C ili nižim su zadržale preko $62,64 \pm 0,52$ pa sve do $86,77 \pm 1,06$ % za BCL, dok su PFL bile stabilnije sa $72,09 \pm 1,12$ do $89,68 \pm 0,47$ % početne

aktivnosti pri čemu su najbolje stabilnosti postignute na optimalnoj temperaturi od 40 °C. Direktno kovalentno vezanje je, dakle, poboljšalo temperaturnu stabilnost PFL u odnosu na BCL, što nije bio slučaj kod slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom.

Za razliku od lipaza imobiliziranih adsorpcijom, lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem su pokazale još bolju stabilnost pri najvišoj ispitanoj temperaturi gdje su BCL zadržale i do $59,92 \pm 0,67$ %, a PFL čak $72,86 \pm 1,03$ %. Zadnje spomenuta vrijednost aktivnosti je ujedno bila i najviša zadržana aktivnost pri 70 °C, a odnosila se na PFL imobiliziranu na ESMC- H_3PO_4 . Dok su se lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem, pokazale nešto stabilnijima u usporedbi sa onima imobiliziranim adsorpcijom, lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem su rezultirale najmanjom stabilnošću pri temperaturama nižim od 60 °C zadržavajući do maksimalnih $68,09 \pm 1,32$ % za BCL pri 50 °C te $63,88$ % za PFL pri 40 °C. Međutim, unatoč nižoj stabilnosti, pri 70 °C su ipak imale bolju stabilnost od slobodnih, s obzirom da je BCL zadržala $37,35 \pm 0,61$ do $49,28 \pm 0,11$ %, a PFL $20,77 \pm 1,43$ do $32,35 \pm 1,00$ %. Generalno, slobodne lipaze (BCL i PFL) najstabilnije su bile na svojoj optimalnoj temperaturi, odnosno pri 50 °C. Isto tako, i većina imobiliziranih lipaza je najbolju temperaturnu stabilnost imala pri svojoj optimalnoj temperaturi, odnosno pri 40 °C. Međutim, većina imobiliziranih lipaza je i pri 50 °C pokazala gotovo jednaku stabilnost, dok su neke od njih čak i pri 60 °C imale približne aktivnosti. Rezultati stabilnosti imobiliziranih lipaza obzirom na vrstu imobilizacijske tehnike ukazuju da PFL pri svim ispitanim temperaturama najbolju stabilnost imaju imobilizirane lipaze direktnim kovalentnim vezanjem. S druge strane, kod BCL nije bio takav slučaj, iako se direktno kovalentno vezanje pokazalo metodom s najstabilnijim imobiliziranim lipazama pri 40 i 70 °C, dok je kod 60 °C prednost imala adsorpcija, a pri 50 °C su se sve tri imobilizacijske tehnike pokazale gotovo jednake rezultate.

Kako bi se uočile moguće statistički značajne razlike između temperaturne stabilnosti pojedinih imobiliziranih lipaza proveden je post-hoc Fisher-ov LSD test za šesti sat temperaturne stabilnosti, a rezultati su prikazani **Tablicama 15 – 17**.

Tablica 15 Fisher-ov LSD test za temperaturnu stabilnost za lipaze imobilizirane adsorpcijom

<i>Temperaturna stabilnost (6h)</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
40 °C [%]	73,64±2,40 ^a	64,23±1,87 ^b	69,51±0,69 ^c	66,28±0,88 ^A	60,97±0,78 ^B	56,30±1,82 ^C
50 °C [%]	63,91±1,67 ^a	66,70±1,42 ^a	75,53±1,13 ^b	65,18±1,88 ^A	60,98±2,62 ^B	60,40±1,91 ^B
60 °C [%]	65,60±0,96 ^a	63,80±2,15 ^a	73,65±2,35 ^b	66,83±3,00 ^A	55,20±1,67 ^B	57,16±0,86 ^B
70 °C [%]	43,54±1,84 ^a	43,83±1,31 ^a	45,93±0,92 ^a	57,09±1,14 ^A	30,27±0,98 ^B	41,93±0,83 ^C

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Tablica 16 Fisher-ov LSD test za temperaturnu stabilnost za lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem

<i>Temperaturna stabilnost (6h)</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
40 °C [%]	75,90±1,36 ^a	82,42±1,96 ^b	86,77±1,06 ^c	89,68±0,47 ^A	82,68±1,43 ^B	83,08±0,00 ^B
50 °C [%]	66,08±0,65 ^a	67,75±0,92 ^b	66,58±0,59 ^b	76,66±3,55 ^A	75,21±1,05 ^A	75,95±0,34 ^A
60 °C [%]	64,28±0,16 ^a	64,47±1,52 ^a	62,64±0,52 ^a	87,66±0,88 ^A	72,09±1,12 ^B	80,75±0,28 ^C
70 °C [%]	55,31±1,04 ^a	59,92±0,67 ^b	54,48±0,93 ^a	68,62±1,88 ^A	67,37±0,98 ^A	72,86±1,03 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test

Tablica 17 Fisher-ov LSD test za temperaturnu stabilnost za lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem

<i>Temperaturna stabilnost (6h)</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
40 °C [%]	51,15±1,61 ^a	50,21±1,18 ^a	51,57±1,76 ^a	63,88±0,54 ^A	52,17±1,13 ^B	60,99±1,11 ^C
50 °C [%]	68,09±1,32 ^a	57,20±0,73 ^b	53,51±1,91 ^c	59,69±0,97 ^A	52,72±0,98 ^B	56,51±1,30 ^C
60 °C [%]	50,64±1,74 ^a	42,63±1,33 ^b	46,11±0,69 ^c	48,96±1,38 ^A	42,45±1,72 ^B	40,35±0,41 ^B
70 °C [%]	40,32±0,68 ^a	37,35±0,61 ^b	49,28±0,11 ^c	32,35±1,00 ^A	20,77±1,43 ^B	21,66±0,80 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test

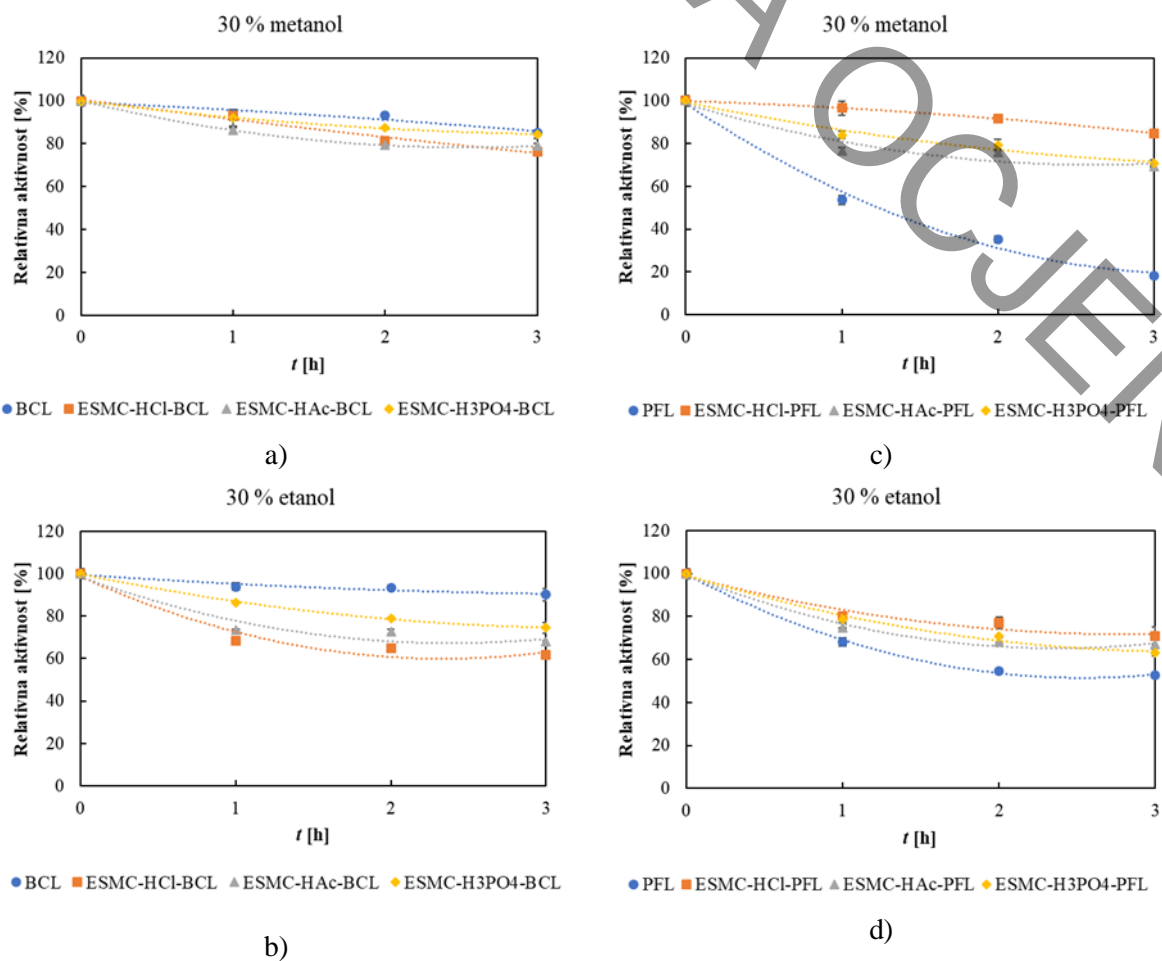
Rezultati temperaturne stabilnosti imobiliziranih lipaza obzirom na korišteni nosač su se statistički značajno razlikovali za obje lipaze (**Tablica 15 – 17**). Većina najstabilnijih BCL imobilizirane su na ESMC-H₃PO₄ nosač dok su za PFL sve imobilizirane lipaze, osim kod direktnog kovalentnog vezanja pri 70 °C, najstabilnije bile one vezane na ESMC-HCl nosač. Dobiveni rezultati ukazuju da su primijenjene tehnike imobilizacije utjecale na poboljšanje toplinske stabilnosti imobiliziranih lipaza pri višim temperaturama što potvrđuju navodi autora Hamdan i sur. (2021), Mendes i sur. (2011) te Ranjbakhsh i sur. (2012). Slične rezultate predstavili su Kharrat i sur. (2011) koji su adsorpcijom imobilizirali lipazu iz bakterije *R. oryzae* na aerogelu silika gela i primijetili tijekom testa termostabilnosti da, iako se slobodna lipaza inaktivira na 60 °C, imobilizirana lipaza zadržava 83 % svoje početne aktivnosti pri istoj temperaturi. Isto tako, nakon imobilizacije na smolu, lipaza iz *Bacillus* J33 također je pokazala povećanu termostabilnost u odnosu na slobodnu lipazu budući da nije primijećen gubitak aktivnosti imobilizirane lipaze čak ni nakon 12 sati inkubacije na 60 °C, dok je slobodni enzim zadržao samo 53 % svoje početne aktivnosti nakon pet sati pri istoj temperaturi. Prema istim autorima na termostabilnost enzima uvelike utječe prisutnost vode, jer je denaturacija povezana s njegovom konformacijskom pokretljivošću u vodenoj smjesi (Nawani i Kaur, 2000). Corrêa i sur. (2022) naveli su da je na 70 °C toplinska deaktivacija lipaze povećana. Međutim,

istraživanja autora Kharrat i sur. (2011) i Mokhtar i sur. (2020) pokazala su da je imobilizacija imala pozitivan učinak na stabilnost lipaze pri visokim temperaturama. Taj učinak može se pripisati činjenici da se lipaza nalazi unutar mikropora nosača, koje pružaju zaštitu i povećavaju otpornost na temperaturne promjene. Osim toga, zbog ograničenja konformacijske fleksibilnosti enzima uslijed brojnih točaka vezivanja na nosač, smanjuju se modifikacije i kretanja enzima pod različitim temperaturnim uvjetima. Zbog toga se često opaža da imobilizirani enzim pokazuje veću toplinsku stabilnost u odnosu na slobodni enzim. Girelli i Scuto (2021) su ispitali temperaturnu stabilnost lakaze imobilizirane na membrane jaja tijekom jednog sata pri 30, 40 i 50 °C te pokazali nešto nižu stabilnost imobiliziranog u odnosu na slobodni enzim. Abdulla i sur. (2017) su ispitivanjem temperaturne stabilnosti BCL imobilizirane na rižinu ljusku i membranu jaja tijekom jednog sata pri 20 – 60 °C utvrdili da imobilizirane lipaze na oba nosača pokazuju najbolju stabilnost u rasponu 30 – 50 °C dok se rižina ljuska pokazala kao bolji nosač zbog veće stabilnosti pri 60 °C.

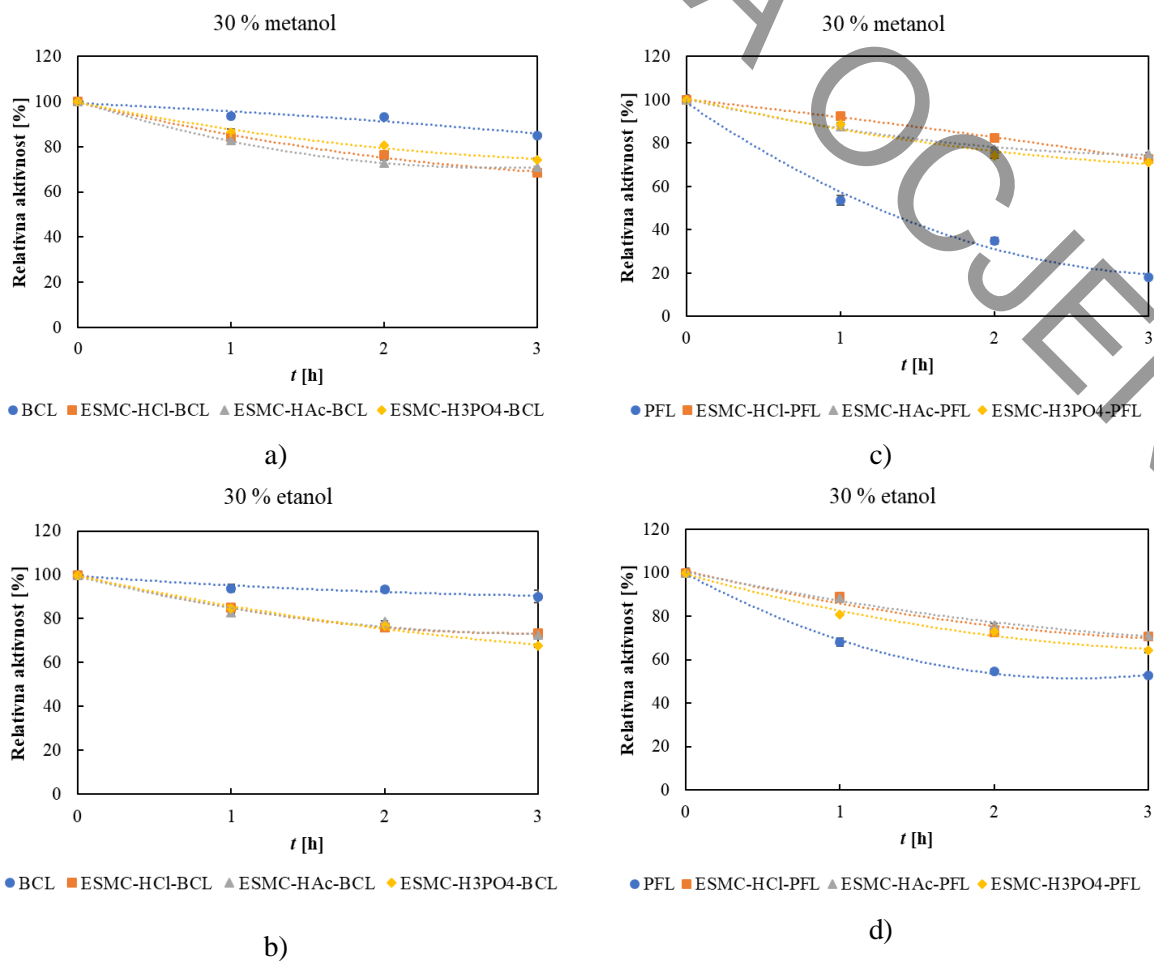
4.5.5. Stabilnost u organskim otapalima

Stabilnost u organskim otapalima je vrlo važno svojstvo lipaza za njezinu primjenu u realnim sustavima, a posebno kod korištenja lipaza u sintezi biodizela, gdje se najčešće koristi metanol kao otapalo te koji može imati inaktivirajući učinak na lipaze. Stabilnost lipaza u organskim otapalima ovisi o korištenom nosaču, načinu vezanja lipaze na isti te također o polaritetu otapala (Abdulla i sur., 2017). Prema Hamdan i sur. (2021) BCL pokazuje toleranciju na širok raspon organskih otapala koja se koriste za proizvodnju biodizela uz zadržavanje visoke aktivnosti tijekom ponovljenih ciklusa sinteze.

Buduci da su se ovdje ispitane lipaze pokazale relativno stabilnima pri različitim vrijednostima pH i temperatura, dodatno je ispitana stabilnost u organskim otapalima zbog daljnje provjere istih u reakcijama funkcionalizacije (sinteze biodizela). Stabilnost u organskim otapalima slobodnih i imobiliziranih lipaza, u okviru ovoga rada, praćena je pri temperaturnom optimumu (50 °C za slobodne lipaze, 40 °C za imobilizirane lipaze) tijekom tri sata korištenjem termobloka (LLG uniBLOCKTHERM, Meckenheim, Njemačka) uz stalno miješanje od 250 okretaja/min. Rezultati su prikazani **Slikama 39 – 41**.



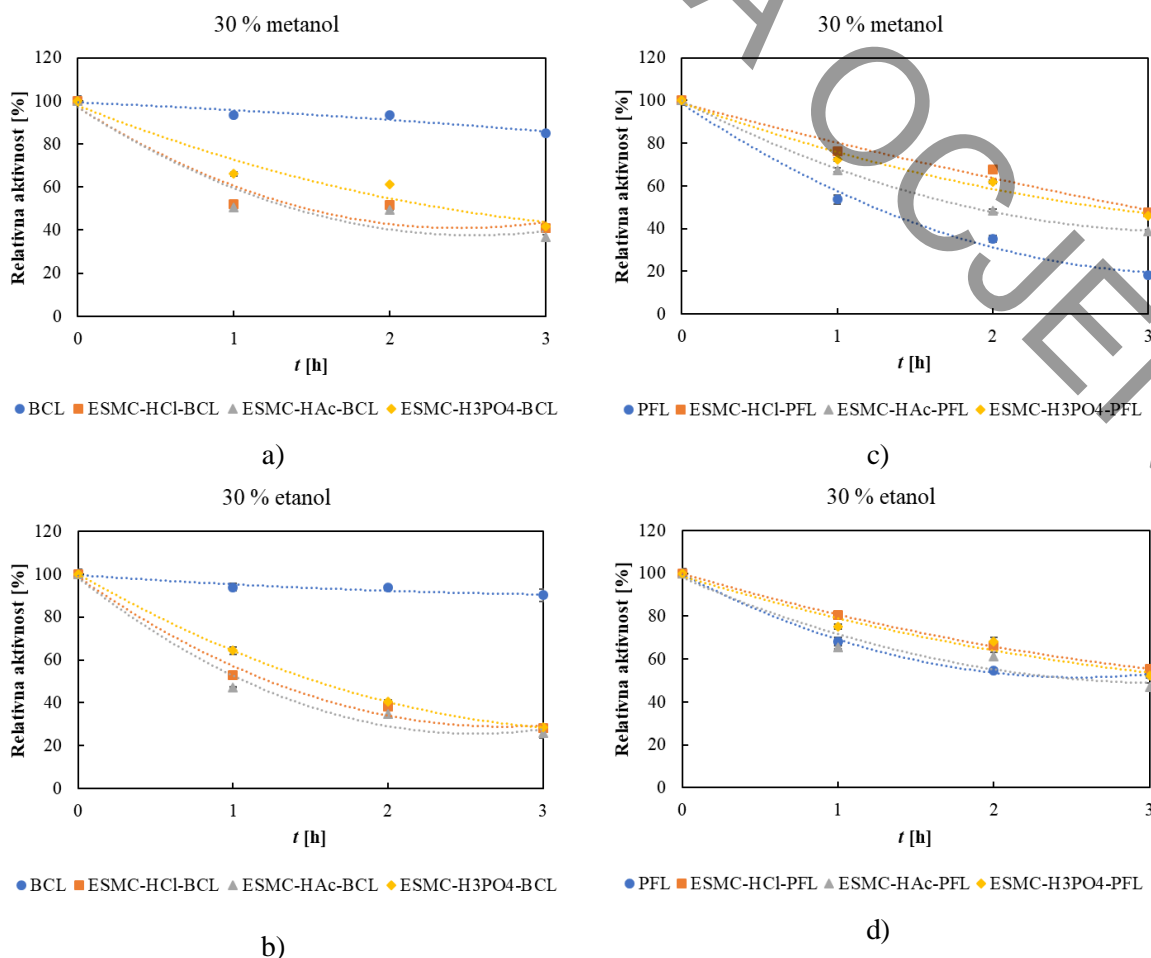
Slika 39 Stabilnost u organskim otapalima slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu; c) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, d) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



Slika 40 Stabilnost u organskim otapalima slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem.

a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu; c) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, d) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



Slika 41 Stabilnost u organskim otapalima slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, b) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu; c) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u metanolu, d) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza u etanolu. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Iz prikazanih rezultata stabilnosti slobodnih lipaza (**Slika 39–41**), može se zaključiti da BCL bolje podnosi prisutnost oba ispitana organska otapala u usporedbi sa PFL, budući da zadržava $85,10 \pm 0,71$ % svoje početne aktivnosti nakon tri sata u metanolu i čak $90,10 \pm 2,84$ % svoje početne aktivnosti u etanolu, dok PFL u etanolu zadržava gotovo upola manje svoje početne aktivnosti ($52,71 \pm 0,97$ %), a u metanolu neočekivano nisku ($18,29 \pm 1,23$ %) vrijednost. Rezultati ukazuju na to da BCL ima znatno veću toleranciju na oba ispitana otapala, dok prisutnost metanola uzrokuje jaču inaktivaciju kod obje slobodne lipaze. S druge strane, kod imobiliziranih lipaza uočen je suprotan trend – na svim nosačima i pri svim tehnikama imobilizacije lipaze su bolje podnosile metanol nego etanol. Jedina iznimka je PFL imobilizirana indirektnim kovalentnim vezanjem, koja je pokazala veću stabilnost u etanolu.

Ono što je bilo iznenađujuće je to da uz visoku toleranciju slobodne BCL na oba otapala, imobilizacijom iste ta tolerancija opada bez obzira na primijenjenu tehniku imobilizacije. Tako

slobodna BCL sa zadržanom spomenutom aktivnošću od $85,10 \pm 0,71$ % u metanolu, opada na $36,56 \pm 1,49$ do $84,46 \pm 1,98$ % početne aktivnosti imobilizacijom. Najveće početne aktivnosti, obzirom na tehniku imobilizacije, zadržane su kod lipaza imobiliziranih adsorpcijom, zatim direktnim kovalentnim vezanjem, a one najniže početne aktivnosti kod lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. Za etanol su rezultati bili slični, odnosno, stabilnost u oba otapala je opala nakon imobilizacije te se kretala u rasponu od $25,93 \pm 2,35$ do $74,46 \pm 2,66$ % početne aktivnosti. Jedina uočena razlika u odnosu na stabilnost u metanolu je da su sve imobilizirane lipaze bez obzira na tehniku imobilizacije imale podjednaku stabilnost u etanolu. Kod PFL je, s druge strane, situacija bila obrnuta te je tako vrlo niska stabilnost slobodnih lipaza uvelike povećana nakon imobilizacije. To se poboljšanje naročito vidjelo kod ispitivanja utjecaja metanola na stabilnost PFL gdje se s niskih $18,29 \pm 1,23$ % zadržane aktivnosti slobodne lipaze imobiliziranim lipazama taj postotak povećao i kretao u rasponu od $38,79 \pm 0,68$ do $84,86 \pm 0,60$ %. Najstabilnija u etanolu, s obzirom na tehniku imobilizacije, se pokazala PFL imobilizirana adsorpcijom, zatim direktnim pa, kao najnestabilnija, indirektnim kovalentnim vezanjem.

Kod utjecaja etanola je povećanje stabilnosti bilo nešto manje, ali svejedno prisutno. Tako je nasuprot $52,71 \pm 0,97$ % zadržane aktivnosti slobodne lipaze, kod imobiliziranih taj postotak bio $46,86 \pm 1,87$ do $71,22 \pm 0,60$ %. I ovdje su se kao i kod BCL, podjednako stabilne pokazale i lipaze imobilizirane adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, s malom prednošću drugih, dok su najmanje stabilne bile lipaze vezane indirektnim kovalentnim vezanjem.

Na temelju stabilnosti lipaza imobiliziranih adsorpcijom u organskim otapalima, odnosno analize aktivnosti lipaza u supernatantu (otpuštenih s nosača) (**Prilog 4**), može se zaključiti da aktivnosti ostaju relativno konstantne tijekom ispitivanog vremenskog razdoblja, bez značajnih oscilacija. Za metanol se aktivnost BCL u supernatantu kreće u rasponu 9 – 16 U, dok je kod PFL lipaze nešto niža, između 1 i 6 U. U slučaju određivanja stabilnosti imobiliziranih lipaza u etanolu, aktivnosti lipaza u supernatantu su veće pa tako za BCL iznose 14 – 22 U te za PFL 6 – 17 U. Kako je već rečeno, u promatranom vremenskom periodu izloženosti imobiliziranih lipaza etanolu, nema većih oscilacija u aktivnosti lipaza u supernatantu već se vrijednosti najvećim dijelom grupiraju oko vrijednosti postignutih u prvom satu. Ono što se kod obje lipaze može primjetiti je to da se najveće aktivnosti lipaza u supernatantu postižu kod imobilizacije na ESMC-HAc nosaču, uz statistički značajnu razliku u odnosu na druga dva nosača (**Tablica 18**).

Kako bi se uočile moguće statistički značajne razlike između stabilnosti u organskim otapalima pojedinih imobiliziranih lipaza proveden je post-hoc Fisher-ov LSD test za treći sat stabilnosti u organskim otapalima, a rezultati su prikazani **Tablicama 18 – 20**.

Tablica 18 Fisher-ov LSD test za stabilnost u organskim otapalima za lipaze imobilizirane adsorpcijom

<i>Stabilnost u organskim otapalima (3h)</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
metanol [%]	76,25±0,91 ^a	78,96±1,12 ^a	84,46±1,98 ^b	84,86±0,60 ^A	69,27±0,58 ^B	70,71±1,58 ^B
etanol [%]	61,67±0,28 ^a	67,85±0,45 ^b	74,46±2,66 ^c	70,86±4,22 ^A	67,00±0,42 ^{A,B}	63,15±1,57 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test

Tablica 19 Fisher-ov LSD test za stabilnost u organskim otapalima za lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem

<i>Stabilnost u organskim otapalima (3h)</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
metanol [%]	68,56±1,10 ^a	71,08±2,61 ^{a,b}	74,28±0,58 ^b	72,65±0,63 ^A	74,85±0,80 ^B	71,13±0,68 ^C
etanol [%]	73,42±0,63 ^a	72,48±0,92 ^a	67,72±0,60 ^b	70,84±0,43 ^A	71,22±0,60 ^A	64,34±0,93 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test

Tablica 20 Fisher-ov LSD test za stabilnost u organskim otapalima za lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem

<i>Stabilnost u organskim otapalima (3h)</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
metanol [%]	40,90±0,68 ^a	36,56±1,49 ^b	41,56±0,25 ^a	47,40±0,94 ^A	38,79±0,68 ^B	45,99±0,46 ^A
etanol [%]	28,16±0,64 ^a	25,93±2,35 ^a	28,50±1,20 ^a	55,42±0,92 ^A	46,86±1,87 ^B	52,33±1,22 ^C

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test

Prema razlikama u stabilnosti u organskim otapalima imobiliziranih lipaza obzirom na vrstu imobilizacijske tehnike i ispitano otapalo, može se primijetiti da je utjecaj metanola na imobilizirane lipaze najmanji kod adsorpcije, a najveći kod indirektnog kovalentnog vezanja. S druge strane, kod ispitivanja utjecaja etanola, kod obje lipaze su se podjednako stabilnima

pokazale lipaze imobilizirane adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, uz malo bolju stabilnost direktnog kovalentnog vezanja. Generalno se može zaključiti da najmanji utjecaj na stabilnosti imobiliziranih lipaza ima metanol što je pozitivno obzirom da se provjera funkcionalnosti imobiliziranih lipaza prema planu istraživanja ovoga rada namjerava provesti u reakciji transesterifikacije odnosno enzimske sinteze biodizela. Dodatno, uzme li se u obzir činjenica da se reakcija transesterifikacije provodi u smjesi ulje:organsko otapalo:voda, vrlo je vjerojatno da stabilizirajući učinak supstrata (ulje) i nastale emulzije (ulje:voda) dodatno poboljšava stabilnost lipaza. Zbog toga je utjecaj organskih otapala u takvoj višekomponentnoj reakcijskoj smjesi znatno niži od utjecaja koji je pronađen u smjesi pufer:organsko otapalo, koja je korištena za procjenu utjecaja organskog otapala na lipaze u okviru ovog rada. Razlike u stabilnosti u organskim otapalima imobiliziranih lipaza obzirom na primijenjeni nosač pokazale su se statistički značajnim (**Tablica 18 – 20**). Uočena je najveća stabilnost PFL imobiliziranih na ESMC-HCl s iznimkom kod kovalentnog vezanja gdje se boljim pokazao ESMC-HAc nosač. U slučaju BCL sve imobilizirane lipaze, osim kod direktnog kovalentnog vezanja pri ispitivanju utjecaja etanola, su se pokazale najstabilnije kada su vezane na ESMC-H₃PO₄.

Općenito rezultati pokazuju da etanol inaktivira lipaze više nego metanol, što nije u skladu s tvrdnjom autora Lotti i sur. (2015) da se inaktivacija lipaza smanjuje kako se povećava broj atoma ugljika u alkoholu, pri čemu je učinak vrste alkohola specifičan za svaku lipazu. Međutim, isti su autori također naveli da je rod *Pseudomonas/Burkholderia* vrlo tolerantan na metanol. Abdulla i sur. (2017) ispitali su stabilnost imobilizirane BCL, koristeći rižinu ljusku i membranu jaja kao nosače, prethodno aktivirane glutaraldehydom, u različitim organskim otapalima, uključujući metanol i etanol, tijekom jednog sata na +4 °C. Njihovi rezultati pokazuju da lipaza imobilizirana na membrani jaja ima bolju stabilnost u odnosu na onu imobiliziranu na rižinu ljusku, što se može pripisati povoljnijim svojstvima membrane jaja. Također, u kontrastu s rezultatima ovog doktorskog rada, imobilizirana BCL na membrani jaja pokazala je bolju stabilnost u etanolu, dok je imobilizirana lipaza na rižinoj ljusci postigla maksimalnu enzimsku aktivnost u metanolu.

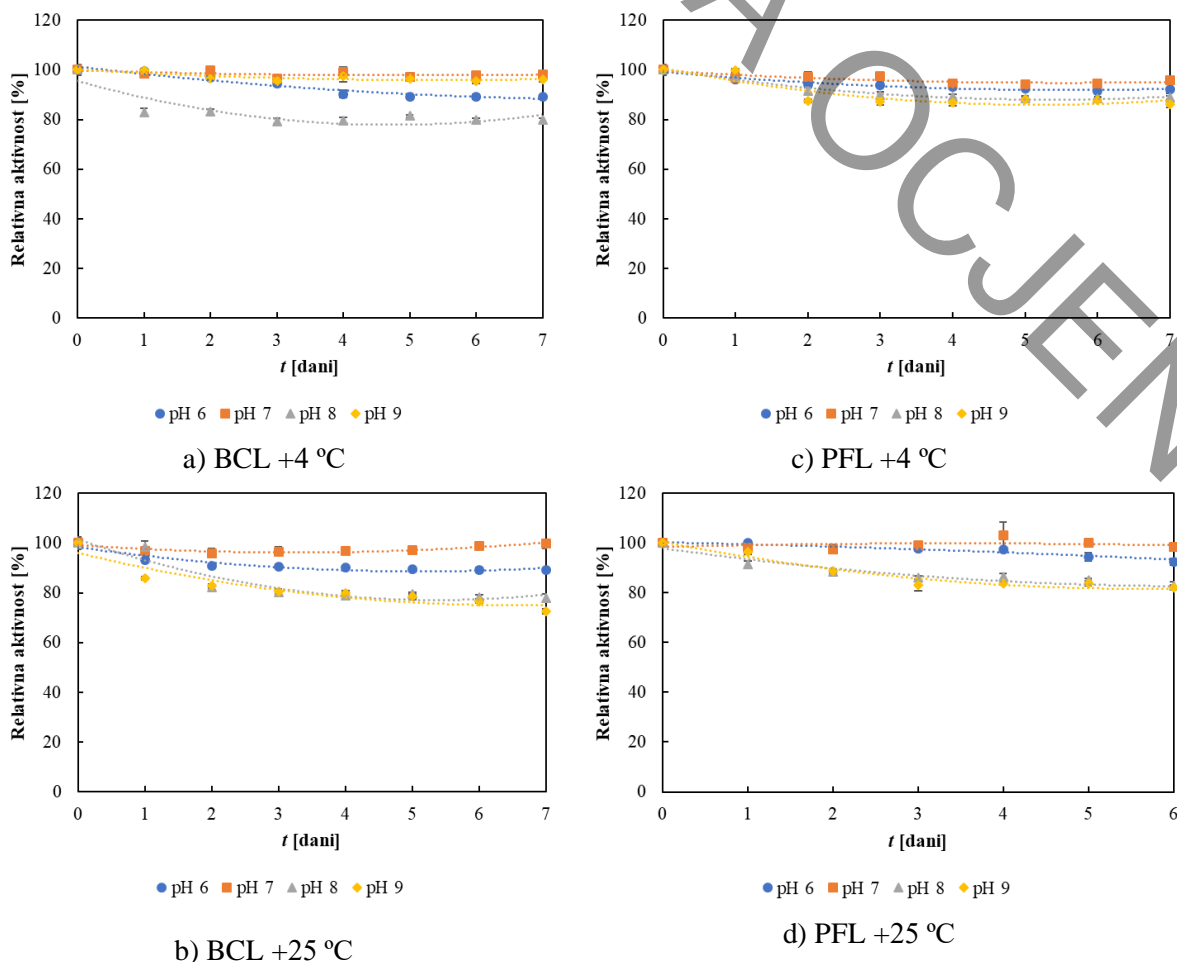
4.5.6. Stabilnost skladištenjem

Stabilnost skladištenjem jedan je od najvažnijih parametara koji se uzimaju u obzir pri imobilizaciji enzima, budući da bi se, nakon imobilizacije, trebala produljiti u odnosu na slobodne enzime (Filho i sur., 2019; Huang i sur., 2007; Mendes i sur., 2011; Ranjbakhsh i sur., 2012). S druge strane, stabilnost enzima na nekom nosaču tijekom duljeg razdoblja ključna je za odabir tog nosača za imobilizaciju enzima (An i sur., 2014). Dugoročna stabilnost enzima u

željenoj formi pri željenim temperaturama vrlo je važna, posebno sa stajališta višestrukosti uporabe u industrijskim procesima koji nisu kontinuirani te ih je do sljedeće upotrebe potrebno skladištiti. Stoga je od velikog značaja odrediti uvijete pravilnog čuvanja imobiliziranih enzima kroz duži period bez narušavanja ili značajnog slabljenja njihove katalitičke sposobnosti.

Iz toga razloga, u okviru ovog doktorskog rada ispitana je stabilnost skladištenjem imobiliziranih lipaza odabranih na temelju najpoželjnijih svojstava. Uz imobilizirane lipaze ispitana je i stabilnost slobodnih lipaza zbog moguće usporedbe te potvrđivanja hipoteze o poboljšanju stabilnosti nakon imobilizacije. Stabilnost skladištenjem slobodnih i imobiliziranih lipaza testirana je tijekom sedam dana na dvije temperature, +25 °C (sobna temperatura) i +4 °C. Budući da su prema literaturnim navodima autora Bisswanger (2014) te Iyer i Ananthanarayan (2008) enzimi najčešće prilično stabilni pri optimalnoj pH vrijednosti upravo se ta pH vrijednost koristi pri testiranju stabilnosti enzima skladištenjem.

Iz tog razloga su slobodne lipaze u ovom istraživanju skladištene u puferu pri optimalnom pH te za provjeru utjecaja lipaze približnih vrijednosti i njihove međusobne usporebe na aktivnost tijekom skladištenja, u puferima pri još tri različite pH vrijednosti. Slobodne lipaze (1 mg/mL) pripremljene su u puferima različitih pH vrijednosti (100 mM fosfatni pufer pH 6, 7 i 8, 100 mM Tris-HCl pufer pH 9). Imobilizirane lipaze skladištene su u liofiliziranom obliku.



Slika 42 Stabilnost skladištenjem slobodnih lipaza na temperaturama 4 i 25 °C.

a) BCL na 4 °C, b) BCL na 25 °C, c) PFL na 4 °C, d) PFL na 25 °C.

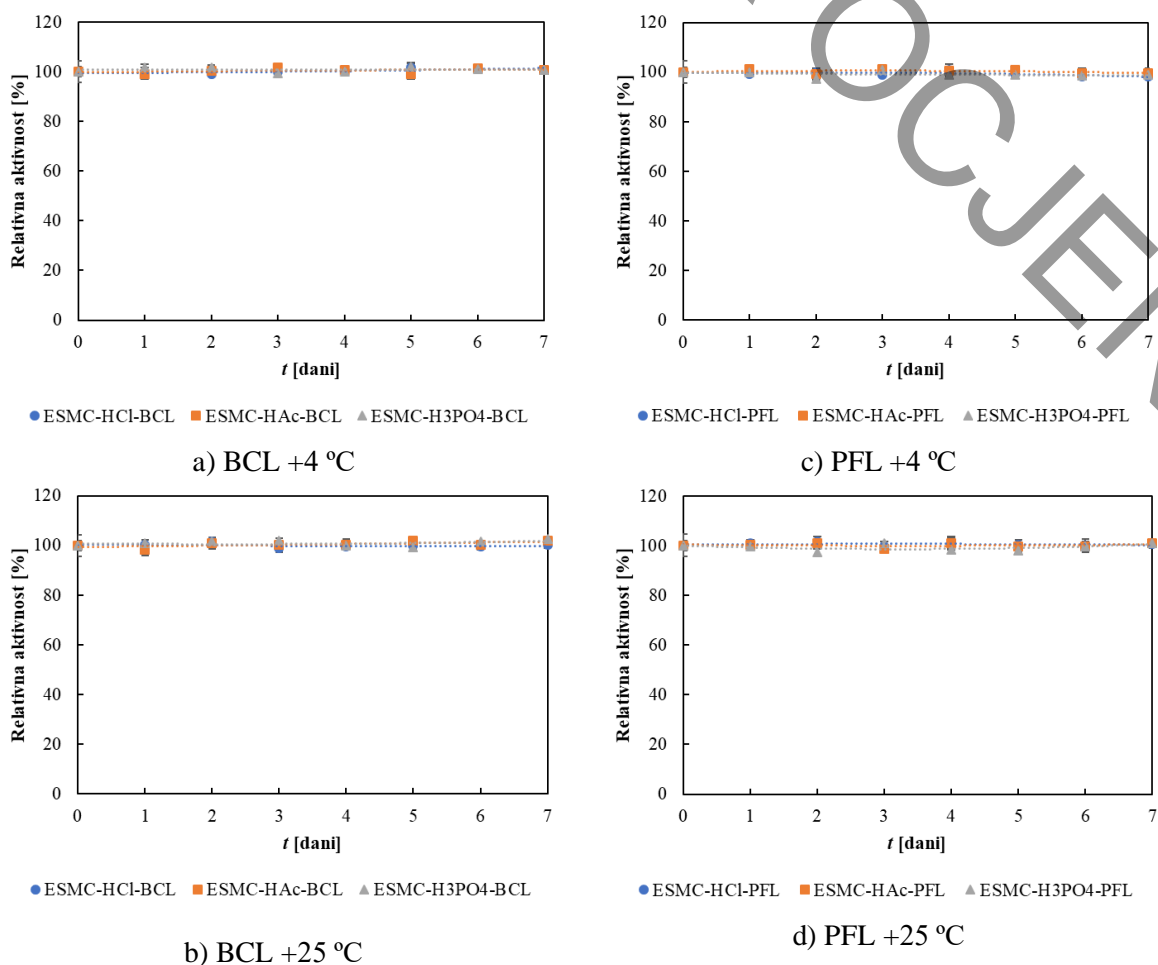
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Slika 42 prikazuje rezultate stabilnosti skladištenjem slobodnih BCL i PFL pri dvije temperature skladištenja te četiri različite pH vrijednosti. Aktivnost slobodnih BCL i PFL u puferskim otopinama tijekom sedmodnevnog skladištenja pri svim ispitanim pH vrijednostima postupno opada, dosežući minimalne vrijednosti zadržavanja početnih aktivnosti (prije skladištenja) od $72,65 \pm 1,02$ % za BCL i $81,55 \pm 1,82$ % za PFL pri 25 °C.

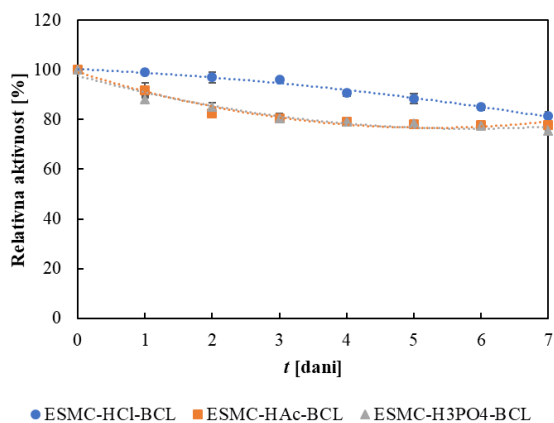
Slobodna BCL je pri + 4 °C pokazala visoku stabilnost, zadržavši $89,14 \pm 0,47$ % aktivnosti pri pH 6, $98,25 \pm 0,96$ % pri pH 7, $79,69 \pm 0,99$ % pri pH 8 te $96,13 \pm 1,12$ % pri pH 9. Pri sobnoj temperaturi, za razliku od stabilnosti pri pH 6, 7 i 8, odstupanje je uočeno za vrijednost pH 9, gdje nakon sedam dana skladištenja aktivnost pada na $72,65 \pm 1,02$ %. PFL nakon sedam dana skladištenja, pri pH 6 ostaje na aktivnosti od $92,33 \pm 1,75$ ili $92,21 \pm 0,92$ %, pri pH 7 $95,76 \pm 0,29$ ili $97,79$ %, pri pH 8 $88,89 \pm 0,62$ ili $81,55 \pm 1,82$ % te pri pH 9 $86,14 \pm 1,14$ ili $81,74 \pm 1,14$ %, s tim da, osim za pH 7, navedene veće vrijednosti relativne aktivnosti odgovaraju stabilnosti pri + 4 °C.

Kod obje slobodne lipaze, na obje temperature skladištenja, pH 7 se pokazao najboljim, jer su lipaze skladištene u fosfatnom puferu te pH vrijednosti zadržale preko 95 % pa do gotovo 100 % početne aktivnosti nakon sedam dana skladištenja. Unatoč već spomenutom literaturnom navodu o znatnoj stabilnosti enzima pri optimalnoj pH vrijednosti (Bisswanger, 2014; Iyer i Ananthanarayan, 2008), ovdje se isti nije mogao potvrditi. Naime, pri skladištenju slobodnih lipaza u fosfatnom puferu njihove optimalne pH vrijednosti (pH 8) obje su pokazale manju stabilnost u odnosu na skladištenje pri nižim pH vrijednostima. Ovo se čini poprilično čudnim, budući da je kod ispitivanja pH stabilnosti najpovoljniji pH bio upravo 8 pri kojem su obje lipaze kroz šest sati zadržale preko 98 % aktivnosti (**Slika 43-45**). Ako se za BCL promotri samo skladištenje pri + 4 °C, vidljivo je da je upravo pH 8 najnepovoljniji gdje BCL opada na $79,69 \pm 0,99$ % svoje početne aktivnosti. S druge strane, pri skladištenju na sobnoj temperaturi, najniža aktivnost od $72,65 \pm 1,02$ % uočena je pri pH 9, što je ujedno i minimalna zabilježena aktivnost skladištenja BCL kroz sedam dana. Najniža vrijednost aktivnosti za PFL nakon sedam dana zabilježena je i pri pH 8 i pH 9 i iznosila je oko 81 % pri sobnoj temperature te $86,14 \pm 1,14$ % na + 4 °C kod skladištenja pri pH 9. Općenito se može zaključiti da su ovdje ispitane slobodne BCL i PFL najduže stabilne ukoliko se skladište na pH vrijednosti ispod svoga pH optimuma, međutim, budući da već kroz sedam dana i u tim uvjetima gube oko 10 % svoje početne aktivnosti, za očekivati je da se u nekom većem mjerilu neće skladištiti na ovaj način već u svojoj praškastoj formi. Nadalje, ako se ova stabilnost promotri u odnosu na korištenje u vidu mogućih kontinuiranih industrijskih procesa koji bi se odvijali na ispitanim pH vrijednostima, može se reći da bi ispitane lipaze bile, prema prikazanim rezultatima, vrlo stabilne kroz čak sedam dana proizvodnje.

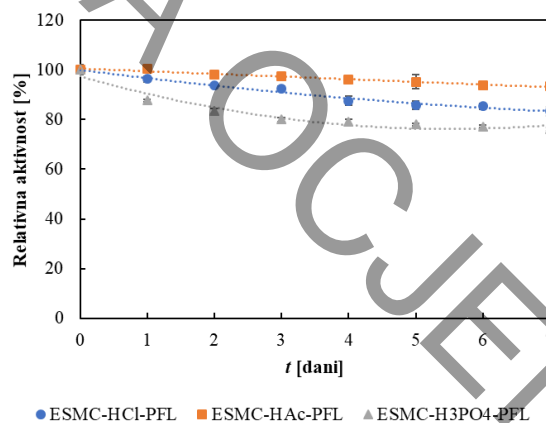
Nadalje, na **Slikama 43 – 45** prikazani su rezultati stabilnosti skladištenjem imobiliziranih lipaza grupirani s obzirom na primjenjenu tehniku imobilizacije.



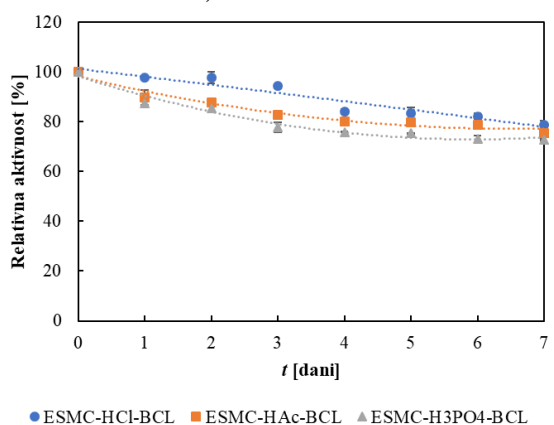
Slika 43 Stabilnost skladištenjem na temperaturama + 4 i + 25 °C lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL na + 4 °C, b) BCL na + 25 °C, c) PFL na + 4 °C, d) PFL na + 25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.



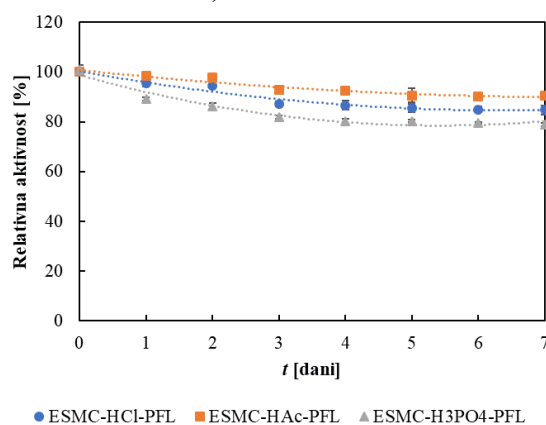
a) BCL +4 °C



c) PFL +4 °C

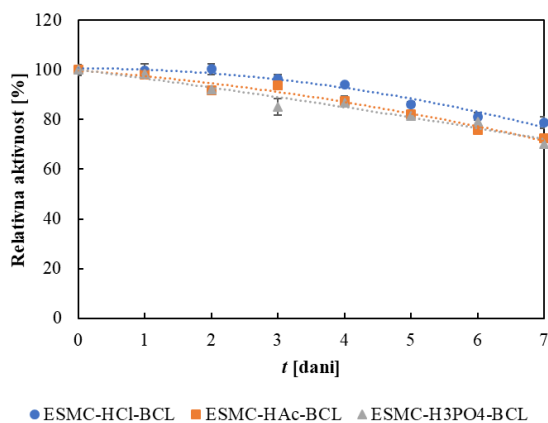


b) BCL +25 °C

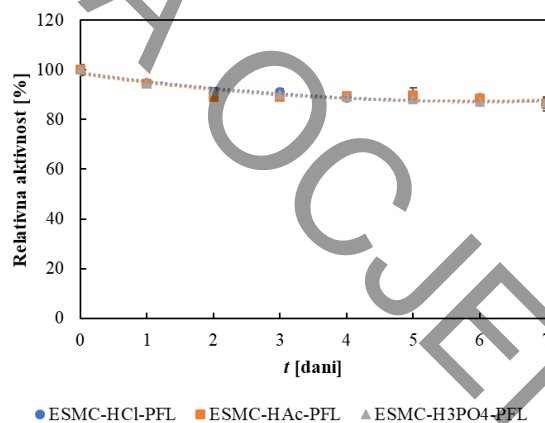


d) PFL +25 °C

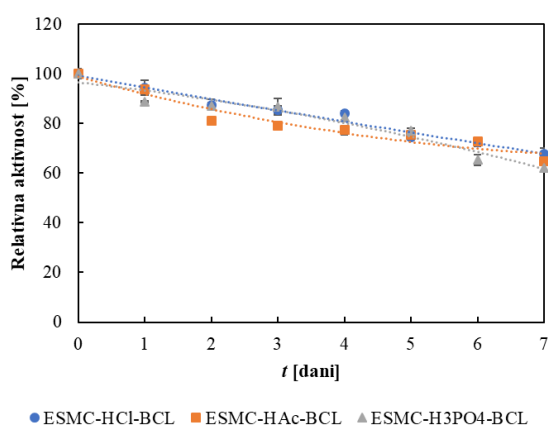
Slika 44 Stabilnost skladištenjem na temperaturama +4 i +25 °C lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL na +4 °C, b) BCL na +25 °C, c) PFL na +4 °C, d) PFL na +25 °C. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



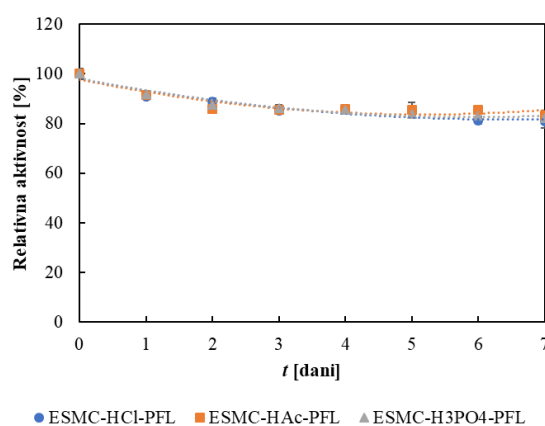
a) BCL +4 °C



c) PFL +4 °C



b) BCL +25 °C



d) PFL +25 °C

Slika 45 Stabilnost skladištenjem na temperaturama +4 i +25 °C lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL na +4 °C, b) BCL na +25 °C, c) PFL na +4 °C, d) PFL na +25 °C.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Na **Slici 43** vidljivo je da su sve lipaze imobilizirane adsorpcijom potpuno stabilne tijekom sedam dana skladištenja budući da su pri obje ispitane temperature skladištenja zadržale 98 – 100 % svoje početne aktivnosti te nije uočena statistički značajna razlika s obzirom na primijenjeni nosač. Ovdje se jedan od ključnih razloga imobilizacije pokazao razumnim i točnim, a to je bolja stabilnost lipaza pri skladištenju što može biti posljedica njihove smanjene fleksibilnosti i osjetljivosti na okoliš. Prema Mokhtar i sur. (2020.) imobilizirana lipaza ima bolju stabilnost skladištenja od slobodne lipaze i pokazuje punu aktivnost (100 %) tijekom dugog razdoblja, što ukazuje na izvrsnu stabilnost biokatalizatora. S druge strane, lipaze imobilizirane direktnim (**Slika 44**) i indirektnim (**Slika 45**) kovalentnim vezanjem su pokazale nešto nižu stabilnost skladištenja u odnosu na lipaze imobilizirane adsorpcijom (**Slika 43**).

Kako bi se uočile moguće statistički značajne razlike za stabilnost skladištenjem između pojedinih imobiliziranih lipaza proveden je post-hoc Fisher-ov LSD test za sedmi dan stabilnosti skladištenjem, a rezultati su prikazani **Tablicama 21 – 23**.

Tablica 21 Fisher-ov LSD test za stabilnost skladištenjem za lipaze imobilizirane adsorpcijom

<i>Stabilnost sklad. (7.dan)</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
4 °C [%]	100,82±0,23 ^a	100,67±1,73 ^a	100,51±0,65 ^a	98,23±1,28 ^A	99,57±1,03 ^A	98,96±2,14 ^A
25 °C [%]	100,25±1,21 ^a	101,81±0,99 ^a	102,61±0,38 ^a	100,66±1,24 ^A	100,93±1,87 ^A	100,95±1,13 ^A

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test

Tablica 22 Fisher-ov LSD test za stabilnost skladištenjem za lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem

<i>Stabilnost sklad. (7.dan)</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
4 °C [%]	81,38±1,78 ^a	77,94±1,11 ^b	75,48±0,30 ^c	83,34±1,76 ^A	93,37±1,34 ^B	76,16±0,70 ^C
25 °C [%]	78,70±0,76 ^a	75,50±1,46 ^b	72,82±0,72 ^c	84,71±0,59 ^A	90,37±0,83 ^B	78,81±0,70 ^C

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test

Tablica 23 Fisher-ov LSD test za stabilnost skladištenjem za lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem

<i>Stabilnost sklad. (7.dan)</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
4 °C [%]	78,80±2,20 ^a	72,36±1,55 ^b	70,09±1,13 ^b	86,08±2,58 ^A	86,35±1,96 ^A	86,85±2,09 ^A
25 °C [%]	67,77±0,84 ^a	64,74±1,00 ^b	62,02±1,61 ^c	80,94±1,17 ^A	83,27±1,07 ^B	82,04±0,53 ^{A,B}

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test

Naime, BCL imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem (**Slika 44** i **Tablica 22**) nakon sedam dana skladištenja zadržavaju maksimalnih $81,38 \pm 1,78$ % početne aktivnosti i to na ESME-HCl nosaču pri skladištenju na +4 °C, do minimalnih $72,82 \pm 0,72$ % pri skladištenju na sobnoj temperaturi. Za sva tri nosača pogodnije se pokazalo skladištenje pri +4 °C. S druge strane, u slučaju PFL na sva tri nosača su pokazale približno jednake stabilnosti na obje temperature, ali uz statistički međusobne značajne razlike u odnosu na korištene nosače. PFL se pokazala stabilnijom od BCL, budući je maksimalno zadržana aktivnost iznosila $93,37 \pm 1,34$ %, a minimalna $76,16 \pm 0,70$ %. Prema iskazanim postotcima zadržane početne aktivnosti tijekom sedmodnevnog skladištenja, može se zaključiti da lipaze imobilizirane

direktnim kovalentnim vezanjem ne pokazuju bolju stabilnost u odnosu na slobodne lipaze, što je suprotno rezultatima imobilizacije adsorpcijom. Međutim, prikazani rezultati bolji su od onih objavljenih od strane autora Abdulla i sur. (2017) koji su pratili stabilnost BCL imobilizirane na membrani ljuske jaja prethodno aktivirane glutaraldehidom, skladištene na +4 °C u Tris-HCl puferu (50 mM, pH 7), gdje je došlo do pada aktivnosti za čak 50 % kroz tjedan dana. Slični rezultati zabilježeni su i kod lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem u okviru ovoga istraživanja (**Slika 45**).

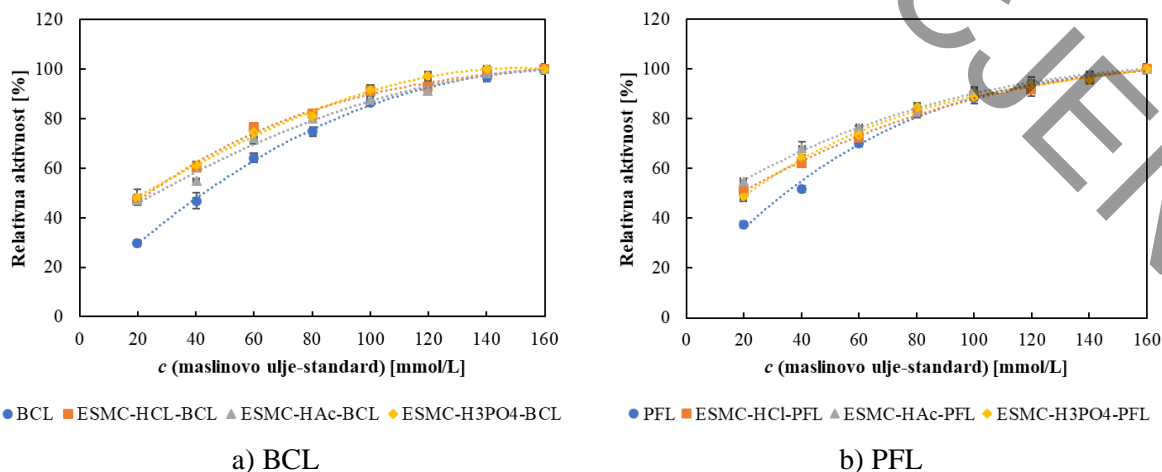
Za BCL i PFL vezane indirektnim kovalentnim vezanjem na sva tri nosača pogodnijim se pokazalo skladištenje pri +4 °C, gdje je BCL nakon sedam dana zadržala maksimalnih $78,80 \pm 2,70$ % i to na ESMC-HCl nosaču uz neznatno manje aktivnosti na druga dva nosača, ali uz statistički značajnu razliku (**Tablica 23**). S druge strane, PFL je pokazala nešto bolju stabilnost zadržavši oko 86 % aktivnosti na sva tri nosača, bez statistički značajne razlike u nosačima. Najniža zabilježena aktivnost nakon sedam dana skladištenja kod PFL lipaze bila je $80,94 \pm 1,17$ %, a kod BCL $62,02 \pm 1,61$ %. Prema Sadighi i sur. (2017) lipaza imobilizirana na nanočestice mezoporoznog silicijevog dioksida obložene polietileniminom i modificirane keliranjem dvovalentnih metalnih iona zadržava 70 % svoje početne aktivnosti nakon 14 dana skladištenja na sobnoj temperaturi. Rezultati prikazani u radu autora Ranjbakhsh i sur. (2012) također pokazuju poboljšanje stabilnosti skladištenjem zbog imobilizacije pri čemu imobilizirana lipaza zadržava više od 64 % svoje aktivnosti nakon 21 dan dok slobodne lipaze ostaju na samo 47 % svoje aktivnosti. Prema Huang i sur. (2007) stabilnost skladištenja imobiliziranog enzima jedan je od značajnih pokazatelja za procjenu svojstava enzima, što imobilizirani enzim čini poželjnijim od onog u slobodnoj formi. Isti autori su pokazali da je zadržana aktivnost imobilizirane lipaze bila 56,2 % nakon 30 dana prilikom čuvanja u fosfatnom puferu (pH 7,0) na 4 °C, dok je za slobodnu lipazu zadržana aktivnost bila 36,6 % nakon 10 dana, a izgubljena je većina početne aktivnosti nakon 30 dana. Ova produžena stabilnost mogla bi se pripisati sprječavanju strukturne denaturacije kao rezultat kovalentnog vezanja biomakromolekula lipaze na biokompatibilnu površinu nanovlaknaste membrane kitozana. An i sur. (2014) su ispitali stabilnost PFL imobilizirane na vunu, na sobnoj temperaturi i pri +4 °C, u otopini Tris pufera i na zraku na sobnoj temperaturi tijekom 80 dana. Uvjeti skladištenja na zraku i sobnoj temperaturi označeni su kao nepovoljni uvjeti čuvanja. Stabilnost skladištenjem enzima imobiliziranih na membrane jaja većinom nije ispitana, već je ispitana dugotrajnost biosenzora (eng. *shelf-life*) koji su dobiveni imobilizacijom enzima na membrane jaja. Iznimka je rad autora Tembe i sur. (2008) koji su stabilnost skladištenjem

tirozinaze, imobilizirane na glutaraldehidom aktivirane membrane jaja, ispitali tijekom sedam mjeseci na +4 i +25 °C te na istim temperaturama utvrdili zadržavanje 83 % i 50 % početne aktivnosti. Također, usporedili su stabilnost skladištenjem tirozinaze imobilizirane na više vrsta nosača. Najbolju stabilnost skladištenjem tirozinaza je pokazala u slučaju imobilizacije na membrane jaja.

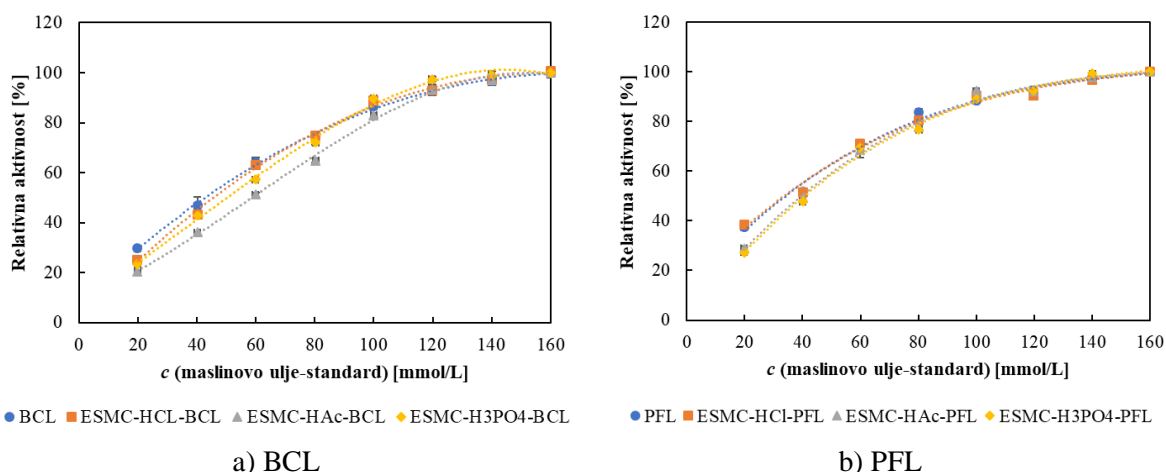
Iz svih rezultata stabilnosti skladištenjem može se zaključiti da je imobilizacija adsorpcijom rezultirala najstabilnijim imobiliziranim lipazama koje u potpunosti zadržavaju početnu aktivnost kroz sedam dana skladištenja na +4 i +25 °C. Nadalje, gledajući stabilnost slobodnih i svih imobiliziranih lipaza, PFL pokazuje bolju skladišnu stabilnost u odnosu na BCL. Osim toga, u najviše slučajeva, lipaze imobilizirane na ESMC-HCl su pokazale bolju stabilnost u odnosu na ostale nosače, uz statistički značajne razlike (**Tablica 21 – 23**).

4.5.7. Kinetika

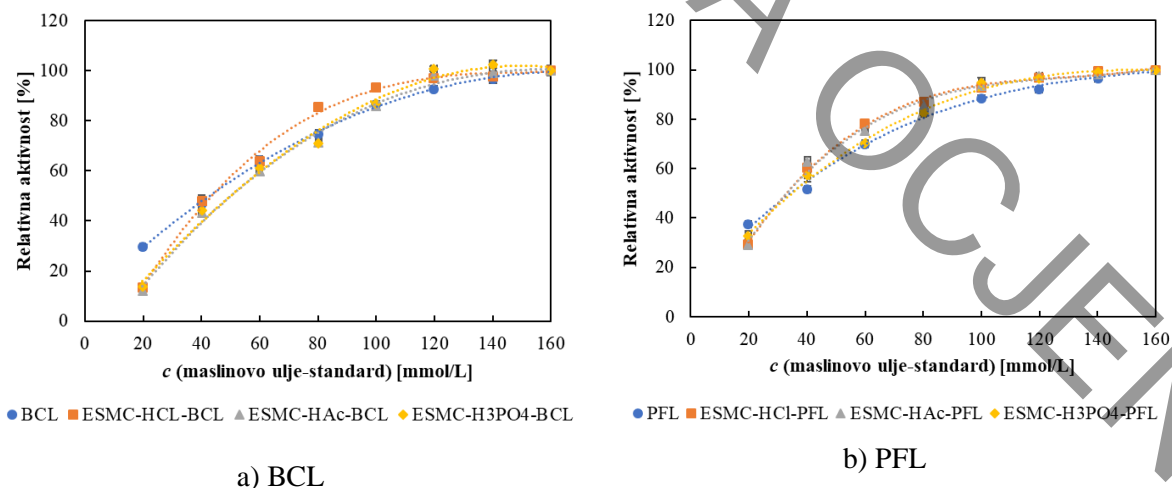
Utjecaj koncentracije supstrata na aktivnost slobodne i imobiliziranih lipaza prikazan je Slikama 46 - 48.



Slika 46 Utjecaj koncentracije supstrata na slobodne i lipaze imobilizirane adsorcijom. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



Slika 47 Utjecaj koncentracije supstrata na slobodne i lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



Slika 48 Utjecaj koncentracije supstrata na slobodne i lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Nelinearnom regresijskom analizom korištenjem usporedbe dva kinetička modela, Michaelis-Menten kinetike i alosterije, utvrđeno je da slobodne lipaze i lipaze imobilizirane adsorpcijom slijede prvi model kinetike odnosno Michaelis-Menten kinetiku, a da su kovalentno imobilizirane lipaze alosterički enzimi. Nakon imobilizacije BCL i PFL na ESMC uočena je promjena kinetičkih parametara, točnije K_m i V_{max} (**Tablice 24 i 25**), što potvrđuje navode autora Pundir i sur. (2009) koji su na membrane kovalentno imobilizirali nekoliko enzima te između ostalog i lipazu te su uočili promjene u navedenim parametrima.

Tablica 24 Kinetički parametri slobodnih lipaza

SLOBODNE LIPAZE	K_m [mmol/L]	V_{max} [U/mL]
BCL	88,51	14,43
PFL	57,25	11,16

Tablica 25 Kinetički parametri imobiliziranih lipaza

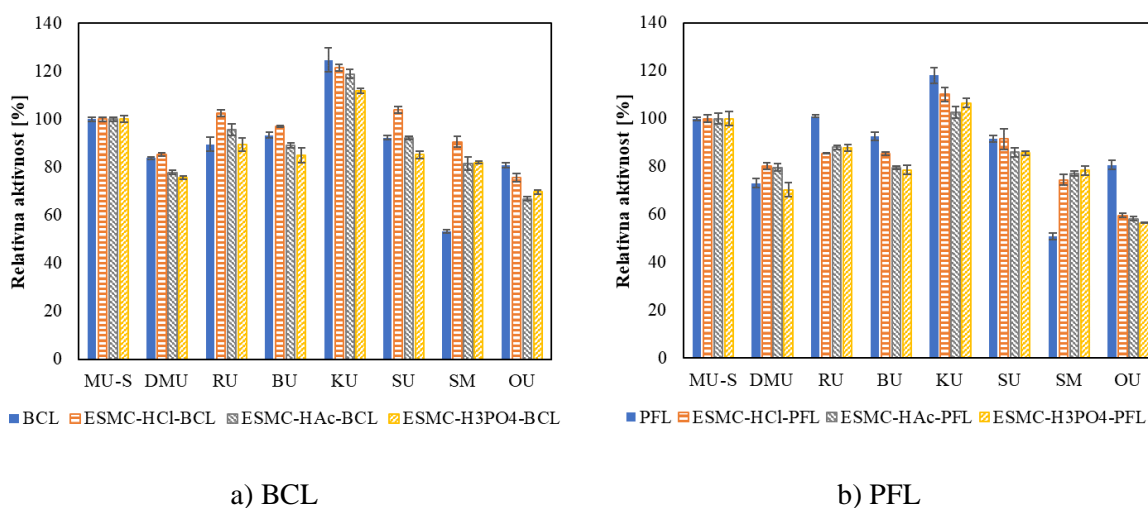
LIPAZA	K_m [mmol/L]	V_{max} [U/g]	h
<i>Lipaze imobilizirane adsorpcijom</i>			
ESMC-HCl-BCL	36,42	760,70	-
ESMC-HAc-BCL	42,77	678,00	-
ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL	37,47	615,00	-
ESMC-HCl-PFL	31,39	664,60	-
ESMC-HAc-PFL	25,05	581,60	-
ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL	31,78	595,10	-
<i>Lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem</i>			
ESMC-HCl-BCL	63,82	482,80	1,334
ESMC-HAc-BCL	104,20	573,40	1,281
ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL	72,80	476,40	1,340
ESMC-HCl-PFL	62,32	643,90	0,9397
ESMC-HAc-PFL	51,77	542,60	1,320
ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL	53,94	571,90	1,335
<i>Lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem</i>			
ESMC-HCl-BCL	46,16	360,60	2,240
ESMC-HAc-BCL	58,99	391,50	1,808
ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL	60,58	398,90	1,731
ESMC-HCl-PFL	34,60	393,60	1,762
ESMC-HAc-PFL	35,60	406,50	1,663
ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL	37,02	428,50	1,490

Vrijednost K_m se kod adsorpcije i indirektnog kovalentnog vezanja smanjila, dok se kod direktnog kovalentnog vezanja varira u ovisnosti o lipazi i nosaču. Vrijednost V_{max} porasla je u sva tri slučaja, odnosno nakon sve tri tehnike imobilizacije za obje lipaze i na svim nosačima. Zbog povećanja vrijednosti V_{max} može se zaključiti da je afinitet lipaza prema supstratu, standardu maslinovog ulja, nakon imobilizacije povećan. Prema Pundir i sur. (2009) K_m i V_{max} enzima ovise o mnogim čimbenicima poput afiniteta supstrata, promjena u mikrookruženju enzima nakon imobilizacije i inhibicije proizvoda. Zbog promjene u mikrookruženju enzima nakon imobilizacije, difuzibilnost supstrata i proizvoda je drugačija od nativnog enzima pa su općenito uočene promjene u K_m i katalitičkoj učinkovitosti. U literaturi se mogu pronaći različiti podaci o kinetičkim parametrima enzima imobiliziranih na membrane jaja kao nosača. Rezultati dobiveni u ovom istraživanju podudaraju se s ranijim nalazima koji ukazuju na smanjenje vrijednosti K_m (Kessi i Arias, 2019; Pundir i sur., 2009) ili njegovo povećanje (Işik i sur., 2021), kao i povećanje vrijednosti V_{max} (Kessi i Arias, 2019; Pundir i sur., 2009).

4.5.8. Supstratna specifičnost

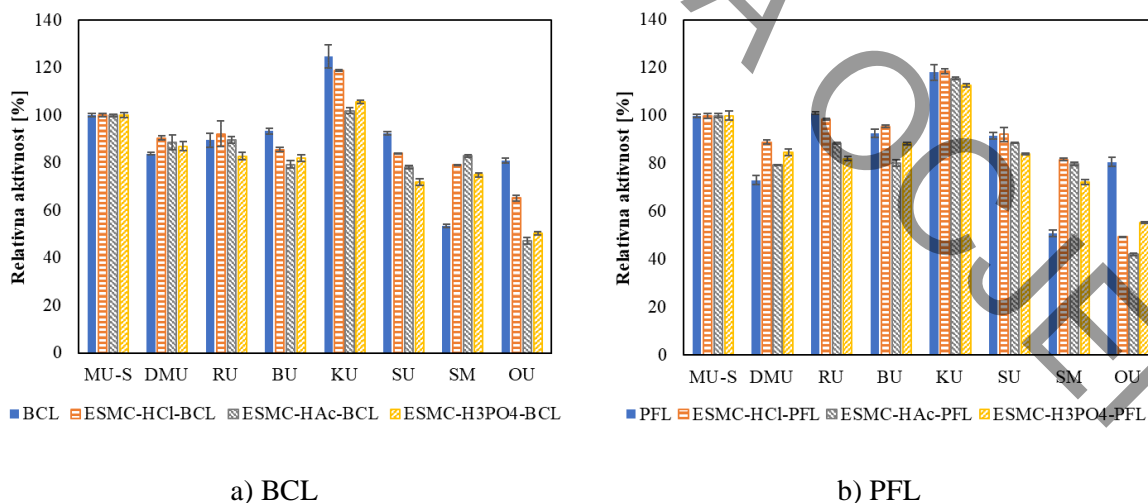
Specifičnost je formalno definirana kao sposobnost enzima da razlikuje dva potencijalna supstrata u prisutnosti oba. U biološkom kontekstu, specifičnost podrazumijeva djelovanje na jedan supstrat u odnosu na mnoštvo drugih metabolita u stanici (Peracchi, 2018). U ovome

doktroskom radu ispitana je supstratna specifičnost slobodnih i imobiliziranih lipaza prema supstratu koji je prirodno svojstven lipazama, a to su lipidi, odnosno ulja i masti. Prvenstveno su odabrana komercijalno dostupna i široko korištena ulja poput suncokretovog, maslinovog, biljnog, repičinog i kokosovog ulja. Osim ulja ispitana je i hidroliza masti prema čemu je odabrana svježa svinjska mast. Osim svega navedenog odabrano je i otpadno ulje iz restorana kako bi se utvrdila razlika specifičnosti lipaza prema svježem i već korištenom ulju i to upravo iz razloga moguće zamjene jestivih ulja otpadnim u reakcijama koje kataliziraju lipaze. Ova ulja/masti su odabrana i zbog mogućeg korištenja istih kao supstrata u reakcijama provjere funkcionalnosti imobiliziranih lipaza na nosače na bazi membrane jaja. Prema tome iz rezultata koji su prikazani na **Slikama 49 – 51** može se zaključiti koja to ulja/masti imobilizirane BCL i PFL preferiraju, tj. u kojima pokazuju najveću aktivnost.



Slika 49 Supstratna specifičnost slobodnih i lipaza imobiliziranih adsorpcijom prema odabranim uljima i masti (MUS-maslinovo ulje - standard, DMU-djevičansko maslinovo ulje, RU-repičino ulje, BU-biljno ulje, KU-kokosovo ulje, SU-suncokretovo ulje, SM – svinjska mast, OU-otpadno ulje). a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

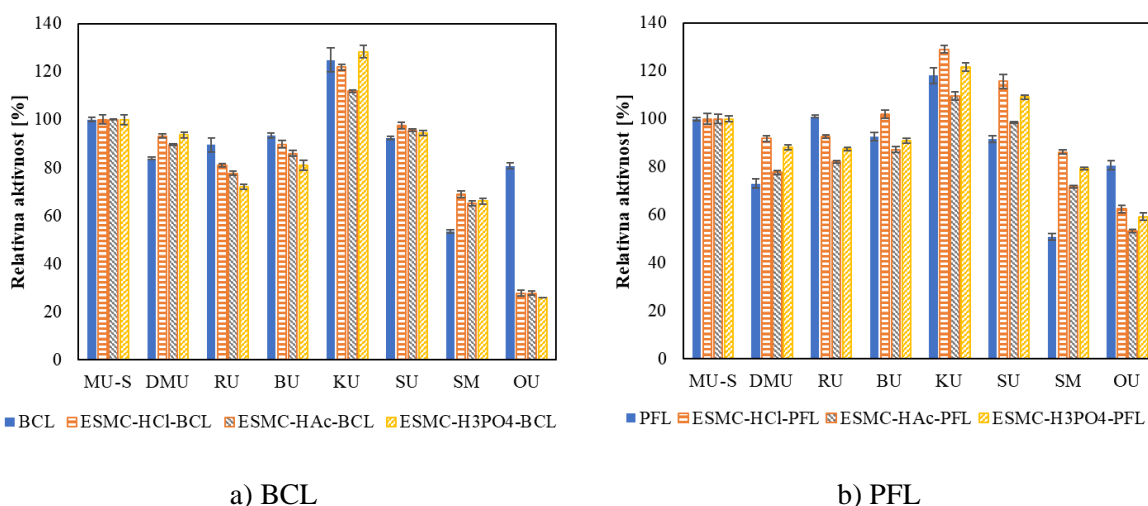


a) BCL

b) PFL

Slika 50 Supstratna specifičnost slobodnih i lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem prema odabranim uljima i masti (MUS-maslinovo ulje – standard, DMU – djevičansko maslinovo ulje, RU-repičino ulje, BU-biljno ulje, KU-kokosovo ulje, SU-suncokretovo ulje, SM- svinjska mast, OU-otpadno ulje). a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



a) BCL

b) PFL

Slika 51 Supstratna specifičnost slobodnih i lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem prema odabranim uljima i masti (MUS-maslinovo ulje – standard, DMU – djevičansko maslinovo ulje, RU – repičino ulje, BU-biljno ulje, KU-kokosovo ulje, SU – suncokretovo ulje, SM – svinjska mast, OU-otpadno ulje). a) BCL – slobodna i imobilizirana lipaza; b) PFL – slobodna i imobilizirana lipaza.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

BCL i PFL lipaze, slobodne i imobilizirane, su pokazale generalno visoku supstratnu specifičnost prema odabranim biljnim uljima i životinjskoj masti (Slike 49 - 51). Iz prikazanog je vidljivo da slobodne i imobilizirane lipaze pokazuju podjednake preferencije prema ispitanim uljima/mastima. Iznimke su zabilježene kod afiniteta prema svježoj svinjskoj masti za BCL i PFL gdje su imobilizirane lipaze pokazale veću aktivnost u odnosu na slobodne lipaze, te u

otpadnom ulju gdje je zamjećeno suprotno. Supstratna specifičnost slobodnih lipaza prema otpadnom ulju je veća u odnosu na imobilizirane.

Kako bi se uočile moguće statistički značajne razlike u pogledu supstratne specifičnosti između pojedinih imobiliziranih lipaza proveden je post-hoc Fisher-ov LSD test, a rezultati su prikazani **Tablicama 26 – 28**.

Tablica 26 Fisher-ov LSD test za supstratnu specifičnost za lipaze imobilizirane adsorpcijom

<i>Sup. spec.</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
MUS [%]	100,00±0,86 ^a	100,00±0,93 ^a	100,00±1,38 ^a	100,00±1,55 ^A	100,00±2,32 ^A	100,00±3,02 ^A
DMU [%]	85,32±0,74 ^a	77,77±0,89 ^b	75,49±0,68 ^c	80,17±1,31 ^A	79,65±1,44 ^A	70,31±2,84 ^B
RU [%]	102,58±1,43 ^a	95,71±2,39 ^b	89,48±2,69 ^c	85,48±0,13 ^A	88,01±0,77 ^B	87,89±1,46 ^B
BU [%]	96,92±0,32 ^a	88,96±1,06 ^b	84,88±3,21 ^c	85,36±0,64 ^A	79,57±0,68 ^B	78,63±1,97 ^B
KU [%]	121,46±1,51 ^a	118,77±1,93 ^a	111,72±1,01 ^b	110,08±3,01 ^A	102,61±2,52 ^B	106,56±1,96 ^{A,B}
SU [%]	103,87±1,52 ^a	92,04±0,67 ^b	85,16±1,46 ^c	91,53±4,36 ^A	85,98±1,89 ^{A,B}	85,56±0,91 ^B
SM [%]	90,57±2,14 ^a	81,35±2,76 ^b	81,90±0,48 ^b	74,47±2,31 ^A	76,95±1,06 ^{A,B}	78,42±1,91 ^B
OU [%]	75,65±1,74 ^a	66,80±0,87 ^b	69,68±0,81 ^c	59,63±0,74 ^A	58,26±0,97 ^A	56,48±0,14 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Tablica 27 Fisher-ov LSD test za supstratnu specifičnost za lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem

<i>Sup. spec.</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
MUS [%]	100,00±0,82 ^a	100,00±0,52 ^a	100,00±1,06 ^a	100,00±0,99 ^A	100,00±0,77 ^A	100,00±2,02 ^A
DMU [%]	90,43±0,86 ^a	88,58±3,09 ^a	86,94±1,95 ^a	88,97±0,98 ^A	79,50±0,11 ^B	84,78±1,30 ^C
RU [%]	92,08±5,36 ^a	89,63±1,47 ^a	82,68±1,56 ^b	98,58±0,31 ^A	88,32±0,34 ^B	82,04±0,82 ^C
BU [%]	85,56±0,97 ^a	79,26±1,64 ^b	81,98±1,33 ^c	95,51±0,56 ^A	80,24± 1,49 ^B	88,32±0,45 ^C
KU [%]	118,77±0,38 ^a	101,84±1,28 ^b	105,61±0,67 ^c	118,37±1,06 ^A	115,54±0,60 ^B	112,61±0,69 ^C
SU [%]	83,95±0,19 ^a	77,98± 0,73 ^b	71,82±1,29 ^c	92,18±2,99 ^A	88,60± 0,20 ^B	83,97±0,39 ^C
SM [%]	79,01±0,19 ^a	82,89±0,57 ^b	74,96±0,88 ^c	81,67±0,50 ^A	79,87±0,64 ^B	72,26±0,90 ^C
OU [%]	65,12±1,23 ^a	47,11±1,46 ^b	50,27±0,76 ^c	49,37±0,13 ^A	42,09±0,40 ^B	55,32±0,33 ^C

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Tablica 28 Fisher-ov LSD test za supstratnu specifičnost za lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem

<i>Sup. spec.</i>	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
MUS [%]	100,00± 1,79 ^a	100,00±0,23 ^a	100,00±2,09 ^a	100,00±2,15 ^A	100,00±1,94 ^A	100,00±1,15 ^A
DMU [%]	93,17±0,87 ^a	89,65±0,43 ^b	93,58±1,24 ^a	91,77±1,06 ^A	77,67±0,78 ^B	88,10±0,94 ^C
RU [%]	81,04±0,75 ^a	77,67±0,84 ^b	72,15±1,03 ^c	92,69±0,76 ^A	82,11±0,52 ^B	87,55±0,68 ^C
BU [%]	89,65±1,55 ^a	85,92±1,08 ^b	80,98±2,16 ^c	101,98±1,68 ^A	87,21±1,27 ^B	90,90±0,92 ^C
KU [%]	121,90±1,22 ^a	111,91±0,53 ^b	128,26±2,52 ^c	129,01±1,53 ^A	109,57±1,71 ^B	121,62±1,72 ^C
SU [%]	97,45±1,28 ^a	95,49±0,51 ^b	94,36±0,94 ^b	115,60±2,89 ^A	98,57±0,41 ^B	109,05±0,79 ^C
SM [%]	68,78±1,38 ^a	65,11±1,03 ^b	66,05±1,28 ^b	86,23±0,74 ^A	71,85±0,53 ^B	79,35±0,39 ^C
OU [%]	27,68±1,28 ^a	27,70±0,80 ^a	25,90±0,00 ^b	62,48±1,50 ^A	53,20±0,73 ^B	59,21±1,59 ^C

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

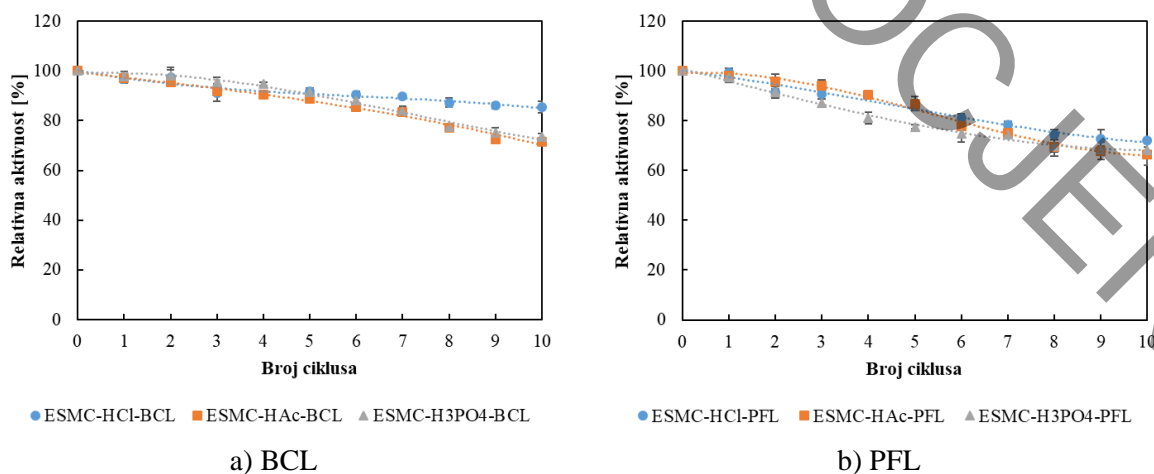
Općenito, sve lipaze su pokazale najveću relativnu aktivnost u kokosovom ulju, i to slobodne lipaze BCL $124,69 \pm 4,99$ % te PFL $118,05 \pm 3,21$ %. Približne aktivnosti su pokazale sve imobilizirane lipaze i to BCL u rasponu $101,84 \pm 1,28$ do $128,26 \pm 2,52$ % te PFL $102,61 \pm 2,52$ do $129,00 \pm 1,53$ %, ovisno o primijenjenoj imobilizacijskoj tehnici i nosaču. Nešto nižu aktivnost, prosječno oko 80 do 100 %, su slobodne i imobilizirane lipaze pokazale prema ostalim komercijalnim uljima, odnosno suncokretovom, biljnom, repičinom i djevičanskom maslinovom ulju. Može se primijetiti da najveće aktivnosti prema kokosovom, ali gotovo i svim drugim uljima pokazuju lipaze imobilizirane na ESMC-HCl nosač, uz statistički značajnu razliku u odnosu na samo jedan ili oba druga nosača (**Tablica 26 – 28**). Iznimka su BCL lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem na ESMC-HAc prema svježoj svinjskoj masti i indirektnim kovalentnim vezanjem na ESMC-H₃PO₄ prema kokosovom ulju, gdje su se ove razlike u relativnim aktivnostima pokazale statistički značajnim u odnosu na druga dva nosača (**Tablica 27**). S druge strane, kod PFL se izdvajaju lipaze imobilizirane adsorpcijom na ESMC-HAc i ESMC-H₃PO₄ za repičino ulje i svježju svinjsku mast, ali bez statistički značajne razlike (**Tablica 26**), te direktnim kovalentnim vezanjem na ESMC-H₃PO₄ za otpadno ulje uz statistički značajnu razliku u odnosu na druga dva nosača (**Tablica 27**). Prema Dalal i sur. (2008) BCL lipaza je također pokazala veću aktivnost prema kokosovom ulju u usporedbi s maslinovim uljem. Drugi autori su svoja istraživanja ograničili na supstratnu specifičnosti lipaza različitog podrijetla te su svi došli do istog zaključka da lipaze pokazuju najveću aktivnost prema kokosovom ulju te nešto nižu prema suncokretovom, repičinom i maslinovom (Lan i sur., 2011; Long i sur., 1998; Ogino i sur., 2000; Venkatesagowda i sur., 2018). Kokosovo ulje je, općenito, kategorizirano kao zasićena mast (ulje) zbog visoke koncentracije zasićenih masnih kiselina. Međutim, za razliku od drugih zasićenih masti, kokosovo ulje sastoji se prvenstveno od triglicerida srednjeg lanca koje tijelo lako probavlja i brzo pretvara u energiju. Prema Pravilniku o jestivim uljima i mastima (Ministarstvo poljoprivrede, NN 11/2019) u kokosovom ulju dominira zasićena laurinska masna kiselina (C12:0) sa udjelom od 45 – 53 % nakon koje slijedi miristinska (C14:0) sa 16 – 21 %, dok u ostalim biljnim uljima poput suncokretovog, repičinog i maslinovog prevladava oleinska kiselina sa različitim prosječnim udjelima. Budući da je prema radu autora Nawani i Kaur (2000) specifičnost lipaza prema masnim kiselinama široka s malom preferencijom za C12:0 i C4:0, ne čudi da su i ovdje ispitane lipaze pokazale najveću aktivnost u kokosovom ulju gdje dominira C12:0. Upravo iz tog razloga, prema Ogino i sur. (2000) lipaze imaju najveću aktivnost u kokosovom ulju jer laurinsku masnu kiselinu lakše hidroliziraju u odnosu na oleinsku. Budući da su lipaze pokazale najveću aktivnost u supstratu koji sadrži dominantu zasićenu masnu kiselinu te je, pri sobnoj

temperaturi, zapravo u krutom stanju i često se naziva kokosovom masti, ne čudi da je visoka aktivnost lipaza pokazana i prema svinjskoj masti, koja također sadrži visok udio laurinske masne kiseline u rasponu od 20 – 32 % (Ministarstvo poljoprivrede, NN 11/2019)). Ono što je iznenađujuće je da su spomenutu visoku specifičnost prema svinjskoj masti zapravo pokazale imobilizirane lipaze ($65,11 \pm 1,02 - 90,57 \pm 2,14$ % za BCL te $71,85 \pm 0,53 - 86,23 \pm 0,74$ % za PFL). S druge strane, u odnosu na imobilizirane lipaze slobodne BCL i PFL pokazale su nižu specifičnost prema istom supstratu ($53,34 \pm 0,72$ % i $50,89 \pm 1,24$ %). Prema ovome se može zaključiti da se preferencija prema svinjskoj masti za BCL i PFL pojavljuje nakon imobilizacije. Još je uočljivo da slobodne lipaze u otpadnom ulju zadržavaju oko 80 % aktivnosti, dok kod imobiliziranih lipaza ona opada na 50 do 75 %. Posebno, kod BCL imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem aktivnost se dodatno smanjuje, čak ispod 25 %. Jedan od mogućih razloga niže aktivnosti imobiliziranih lipaza u odnosu na slobodne, pri korištenju otpadnog ulja, može biti i njegova starost, s obzirom na dulje trajanje ispitivanja supstrate specifičnosti, veliki broj supstrata te ukupni broj testiranih lipaza. Ovo se posebno može uzeti u obzir zbog visoke aktivnosti svih ispitanih lipaza u suncokretovom ulju te tek nešto niže slobodnih lipaza u otpadnom ulju koje je također suncokretovo, a koje je „najsvežije“ bilo upravo kod ispitivanja supstrate specifičnosti slobodnih lipaza. Prema svemu sudeći je došlo do moguće oksidacije ulja te stvaranja komponenti koje bi mogle inhibirati lipaze. Rezultati supstrate specifičnosti za slobodnu BCL u skladu su sa preliminarnim istraživanjima ovog doktorskog rada, a koji su objavljeni u radu Ostojčić i sur. (2021) gdje je BCL pokazala gotovo jednaku aktivnost u djevičanskom maslinovom ulju, repičinom ulju, biljnom ulju i suncokretovom ulju. Sukladno prikazanim rezultatima, imobilizirane BCL i PFL najveću supstratnu specifičnost su pokazale prema kokosovom ulju, što nije bio slučaj u objavljenom radu na temelju preliminarnih rezultata te se to može pripisati različitim proizvodnim markama i/ili velikom broju komercijalno dostupnih ulja.

4.5.9. Višestrukost uporabe

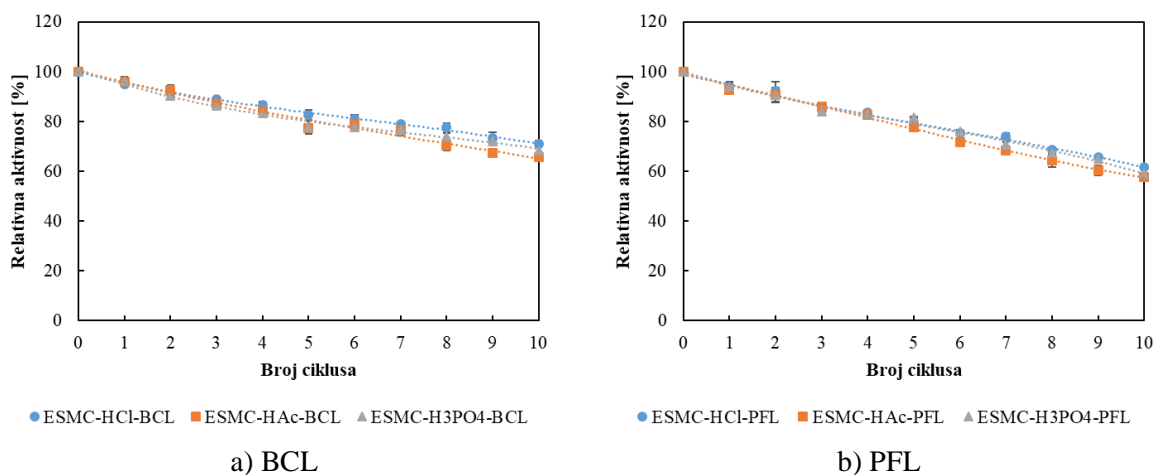
Ponovno korištenje imobiliziranih enzima jedan je od glavnih razloga imobilizacije budući da smanjuje troškove, omogućuje jednostavno izdvajanje iz reakcijske smjese i povećava stabilnost enzima u industrijskim procesima. Za razliku od slobodnih enzima, koji se obično koriste samo jednom i teško ih je izdvojiti iz reakcijske smjese, imobilizirani enzimi mogu se ponovno koristiti kroz nekoliko reakcijskih ciklusa, čineći procese održivijima i isplativijima. Pogodni su i za dugotrajnu upotrebu zbog manje osjetljivosti na nepovoljne uvjete. Rezultati

višestrukosti uporabe imobiliziranih BCL i PFL na pripremljene nosačen na bazi membrane jaja, kroz 10 ciklusa hidrolize *p*NPP-a prikazani su na **Slikama 52 – 54**.



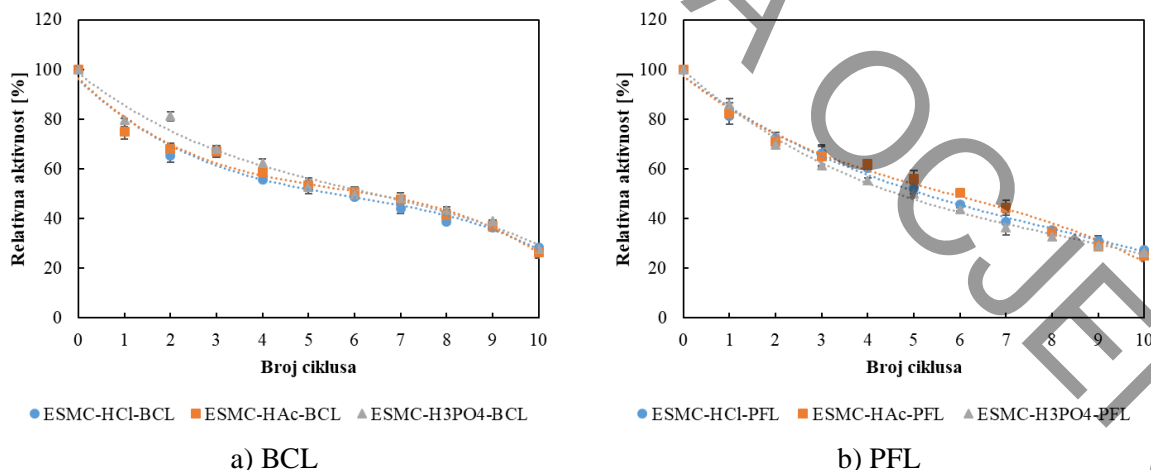
Slika 52 Višestrukost uporabe lipaza imobiliziranih adsorpcijom. a) BCL – imobilizirane lipaza; b) PFL – imobilizirane lipaza.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



Slika 53 Višestrukost uporabe lipaza imobiliziranih direktnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – imobilizirane lipaze; b) PFL – imobilizirane lipaze.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



Slika 54 Višestrukost uporabe lipaza imobiliziranih indirektnim kovalentnim vezanjem. a) BCL – imobilizirane lipaze; b) PFL – imobilizirane lipaze.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da BCL pokazuje bolju višestrukost uporabe od PFL imobilizirane adsorpcijom i direktnim kovalentnim vezanjem, dok je kod indirektnog kovalentnog vezanja višestrukost uporabe podjednaka za sve lipaze, što je pokazala i statistička analiza (**Tablice 29 – 31**).

Tablica 29 Fisher-ov LSD test za višestrukost uporabe za lipaze imobilizirane adsorpcijom

10. ciklus	ESMC-HCl-BCL	ESMC-HAc-BCL	ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL	ESMC-HCl-PFL	ESMC-HAc-PFL	ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL
A [%]	85,46 \pm 2,46 ^a	71,63 \pm 0,17 ^b	73,40 \pm 1,47 ^b	71,89 \pm 0,24 ^A	66,33 \pm 4,25 ^B	68,09 \pm 1,36 ^{A,B}

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Tablica 30 Fisher-ov LSD test za višestrukost uporabe za lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem

10. ciklus	ESMC-HCl-BCL	ESMC-HAc-BCL	ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL	ESMC-HCl-PFL	ESMC-HAc-PFL	ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL
A [%]	70,98 \pm 1,21 ^a	65,54 \pm 1,29 ^b	68,49 \pm 1,39 ^a	61,61 \pm 1,22 ^A	57,77 \pm 1,64 ^B	59,08 \pm 1,59 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Tablica 31 Fisher-ov LSD test za višestrukost uporabe za lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem

10. ciklus	ESMC-HCl-BCL	ESMC-HAc-BCL	ESMC-H ₃ PO ₄ -BCL	ESMC-HCl-PFL	ESMC-HAc-PFL	ESMC-H ₃ PO ₄ -PFL
A [%]	28,44 \pm 0,11 ^a	26,52 \pm 2,34 ^a	27,76 \pm 0,85 ^a	27,57 \pm 0,92 ^A	25,25 \pm 2,54 ^A	26,45 \pm 0,77 ^A

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Kod imobilizacije adsorpcijom, BCL nakon maksimalnog broja testiranih ciklusa (10) zadržava $71,63 \pm 0,17$ do $85,46 \pm 2,45$ % svoje početne aktivnosti, dok je taj postotak za PFL nešto niži i iznosi od $66,33 \pm 4,25$ do $71,89 \pm 0,24$ %. Kod direktnog kovaletnog vezanja, nakon deset ciklusa, BCL zadržava između $65,54 \pm 1,29$ i $70,98 \pm 1,21$ % početne aktivnosti, a PFL između $57,77 \pm 1,64$ i $61,61 \pm 1,22$ %. Kod indirektnog kovaletnog vezanja sve ispitane lipaze, i BCL i PFL, zadržavaju između $25,25 \pm 2,54$ i $28,44 \pm 0,11$ %. Najbolji rezultati ponovne upotrebe imobiliziranih lipaza zabilježeni su u slučaju imobilizacije na ESMC-HCl nosač uz statistički značajnu razliku u odnosu na druga dva nosača kod adsorpcije te u odnosu na ESMC-HAc kod direktnog kovaletnog vezanja (**Tablice 29–31**). Osim toga, prema prikazanim rezultatima najveću mogućnost višestrukosti uporabe pokazuju lipaze imobilizirane adsorpcijom. U svom radu, Jiang i sur. (2017) su zabilježili pad aktivnosti na 5 % za BCL imobiliziran adsorpcijom na membrani ljuske jaja nakon samo 5 ciklusa hidrolize *p*NPP-a, dok je kod oksidiranih membrana ljuske jaja aktivnost ostala na 50 % nakon deset ciklusa. U radu autora Işık i sur. (2021) aktivnost lipaze u istoj reakciji ponovljena je 19 uzastopnih puta kako bi se procijenila opravdanost ponovnog korištenja lipaze imobilizirane umrežavanjem na membrani ljuske jaja. Prema spomenutim autorima, lipaza je zadržala 60 % svoje aktivnosti nakon 16 ponovljenih ciklusa, dok je njena aktivnost nakon 18 uzastopnih korištenja pala ispod 50 %. S druge strane, Abdulla i sur. (2017) su ispitali mogućnost ponovne upotrebe u hidrolizi standarda maslinovog ulja i zabilježili zadržavanje početne aktivnost lipaze od samo 13,5 % nakon deset uzastopnih ciklusa kada je membrana ljuske jaja tretirana glutaraldehidom prije imobilizacije. Na temelju svega navedenog jasno je da su u ovom radu dobiveni najbolji rezultati višestrukosti uporabe lipaza imobiliziranih na pripremljene nosače na bazi membrane jaja.

Rezultati višestrukosti uporabe, jasno su potvrdili sve rezultate biokemijske i operativne karakterizacije imobiliziranih lipaza porijeklom iz *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* na nosače na bazi membrane jaja dobivenih tretiranjem ljuske jaja trima kiseinama te pomogli u odabiru imobiliziranih lipaza najpoželjnijih svojstava za provjeru funkcionalnosti u reakciji transesterifikacije u svrhu sinteze biodizela.

4.5.10. Statistička analiza za krajnji odabir lipaza

Za određivanje statistički značajne razlike među biokemijskim i operativnim svojstvima (pH stabilnost, temperaturna stabilnost, stabilnost u organskim otapalima, supstratna specifičnost) korištena je analiza varijance (ANOVA). S druge strane, kako bi se statistički potkrijepilo ono

što se iz rezultata dalo zaključiti kroz cijelu raspravu, a ticalo se odabira najboljeg nosača na bazi membrane jaja za imobilizaciju BCL i PFL, proveden je post-hoc Fisher test (**Tablice 12 – 23 i 26 – 31**). Rezultati statističke analize ANOVA za sve odabrane imobilizirane lipaze su prikazani **Tablicama 32 – 34**.

Tablica 32 Analiza varijance (ANOVA) imobiliziranih lipaza adsorpcijom

PARAMETAR		SS	DF	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
pH stabilnost	Intercept	4502109	1	4502109	2367621	0.00*
	Lipaza (L)	43000	7	6143	3230	0.00*
	Vrijeme (t)	46392	6	7732	4066	0.00*
	pH	13696	3	4565	2401	0.00*
	L*t	8676	42	207	109	0.00*
	L*pH	16009	21	762	401	0.00*
	t*pH	2761	18	153	81	0.00*
	L*t*pH	4947	126	39	21	0.00*
	Error	852	448	2		
Temperaturna stabilnost	Intercept	3332737	1	3332737	1575269	0.00*
	Lipaza (L)	10685	7	1526	722	0.00*
	Vrijeme (t)	114870	6	19145	9049	0.00*
	Temp. (T)	97134	3	32378	15304	0.00*
	L*t	2439	42	58	27	0.00*
	L*T	91944	21	4378	2069	0.00*
	t*T	18547	18	1030	487	0.00*
	L*t*T	22644	126	180	85	0.00*
	Error	948	448	2		
Stabilnost u organskim otapalima	Intercept	1459443	1	1459443	555490.5	0.00*
	Lipaza (L)	30634	7	4376	1665.7	0.00*
	Vrijeme (t)	28495	3	9498	3615.3	0.00*
	Otapalo (O)	711	1	711	270.7	0.00*
	L*t	11851	21	564	214.8	0.00*
	L*O	6204	7	886	337.3	0.00*
	t*O	356	3	119	45.2	0.00*
	L*t*O	2679	21	128	48.6	0.00*
	Error	462	176	3		
Supstratna specifičnost	Intercept	1706033	1	1706033	486449.9	0.00*
	Lipaza (L)	3335	7	476	135.8	0.00*
	Ulje (U)	42490	7	6070	1730.8	0.00*
	L*U	10997	49	224	64.0	0.00*
	Error	617	176	4		

SS: suma kvadrata; DF: stupnjevi slobode; MS: prosječna vrijednost kvadrata; * $p < 0.05$ statistički značajno

Tablica 33 Analiza varijance (ANOVA) imobiliziranih lipaza direktnim kovalentnim vezanjem

PARAMETAR		SS	DF	MS	F- vrijednost	p- vrijednost
pH stabilnost	Intercept	4733735	1	4733735	3241156	0.00*
	Lipaza (L)	36111	7	5159	3532	0.00*
	Vrijeme (t)	39328	6	6555	4488	0.00*
	pH	28247	3	9416	6447	0.00*
	L*t	7997	42	190	130	0.00*
	L*pH	21314	21	1015	695	0.00*
	t*pH	5473	18	304	208	0.00*
	L*t*pH	5493	126	44	30	0.00*
	Error	654	448	1		
Temperaturna stabilnost	Intercept	4054164	1	4054164	2757609	0.00*
	Lipaza (L)	24724	7	3532	2402	0.00*
	Vrijeme (t)	65202	6	10867	7392	0.00*
	Temp. (T)	95639	3	31880	21684	0.00*
	L*t	4750	42	113	77	0.00*
	L*T	100196	21	4771	3245	0.00*
	t*T	18039	18	1002	682	0.00*
	L*t*T	21445	126	170	116	0.00*
	Error	659	448	1		
Stabilnost u organskim otapalima	Intercept	1467001	1	1467001	893229,4	0.00*
	Lipaza (L)	29280	7	4183	2546,9	0.00*
	Vrijeme (t)	30747	3	10249	6240,4	0.00*
	Otapalo (O)	84	1	84	50,9	0.00*
	L*t	11220	21	534	325,3	0.00*
	L*O	3330	7	476	289,6	0.00*
	t*O	92	3	31	18,7	0.00*
	L*t*O	1779	21	85	51,6	0.00*
	Error	289	176	2		
Supstratna specifičnost	Intercept	1644253	1	1644253	586292,1	0.00*
	Lipaza (L)	2145	7	306	109,3	0.00*
	Ulje (U)	53871	7	7696	2744,1	0.00*
	L*U	16336	49	333	118,9	0.00*
	Error	494	176	3		

SS: suma kvadrata; DF: stupnjevi slobode; MS: prosječna vrijednost kvadrata; * $p < 0.05$ statistički značajno

Tablica 34 Analiza varijance (ANOVA) imobiliziranih lipaza indirektnim kovalentnim vezanjem

PARAMETAR		SS	DF	MS	F-vrijednost	p-vrijednost
pH stabilnost	Intercept	3197856	1	3197856	1085321	0.00*
	Lipaza (L)	164209	7	23458	7962	0.00*
	Vrijeme (t)	159741	6	26624	9036	0.00*
	pH	25122	3	8374	2842	0.00*
	L*t	39217	42	934	317	0.00*
	L*pH	21191	21	1009	342	0.00*
	t*pH	6195	18	344	117	0.00*
	L*t*pH	6553	126	52	18	0.00*
	Error	1320	448	3		
Temperaturna stabilnost	Intercept	2984288	1	2984288	1626804	0.00*
	Lipaza (L)	9222	7	1317	718	0.00*
	Vrijeme (t)	160649	6	26775	14596	0.00*
	Temp. (T)	140762	3	46921	25578	0.00*
	L*t	3857	42	92	50	0.00*
	L*T	76371	21	3637	1982	0.00*
	t*T	25246	18	1403	765	0.00*
	L*t*T	19869	126	158	86	0.00*
	Error	822	448	2		
Stabilnost u organskim otapalima	Intercept	1008825	1	1008825	511891,5	0.00*
	Lipaza (L)	42103	7	6015	3052,0	0.00*
	Vrijeme (t)	88582	3	29527	14982,6	0.00*
	Otapalo (O)	46	1	46	23,4	0.00*
	L*t	16156	21	769	390,4	0.00*
	L*O	4434	7	633	321,4	0.00*
	t*O	174	3	58	29,4	0.00*
	L*t*O	2766	21	132	66,8	0.00*
	Error	347	176	2		
Supstratna specifičnost	Intercept	1689402	1	1689402	623967,7	0.00*
	Lipaza (L)	4760	7	680	251,2	0.00*
	Ulje (U)	83507	7	11930	4406,1	0.00*
	L*U	22168	49	452	167,1	0.00*
	Error	477	176	3		

SS: suma kvadrata; DF: stupnjevi slobode; MS: prosječna vrijednost kvadrata; * $p < 0.05$ statistički značajno

Statistička analiza je pokazala da postoje statistički značajne razlike ($p < 0,05$) u svim ispitanim odabranim lipazama neovisno o primijenjenoj imobilizacijskoj tehnici, vremenu, pH, temperaturi, organskom otapalu i ispitivanom ulju, u odnosu na pH i temperaturna stabilnost, stabilnost u organskim otapalima, kao i supstratnu specifičnost i njihove kombinacije među ispitanim lipazama (**Tablica 32 – 34**).

Kako bi se dodatno uočile moguće statistički značajne razlike između pojedinih imobiliziranih lipaza za sve ispitivane parametre, a s obzirom na primijenjene nosače, proveden je post-hoc Fisher LSD test. Rezultati su prikazani **Tablicama 12 – 23** te **26 – 31** uz prikazane statistički značajne razlike između pojedinih nosača, što je bilo predvidljivo s obzirom na rezultate analize varijance.

Osim toga, napravljena je statistička analiza aktivnosti imobiliziranih lipaza, a rezultati su prikazani **Tablicama 35 – 37**.

Tablica 35 Fisher-ov LSD test za lipaze imobilizirane adsorpcijom

	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
A [U/g]	646,02±36,25 ^a	607,04±8,57 ^b	610,48±12,78 ^b	659,96±19,87 ^A	640,55±21,36 ^A	608,37±32,48 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Tablica 36 Fisher-ov LSD test za lipaze imobilizirane direktnim kovalentnim vezanjem

	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
A [U/g]	369,98±3,04 ^a	353,66±1,82 ^b	348,13±3,68 ^b	440,91±4,39 ^A	445,23±3,41 ^A	463,33±9,37 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Tablica 37 Fisher-ov LSD test za lipaze imobilizirane indirektnim kovalentnim vezanjem

	<i>ESMC-HCl-BCL</i>	<i>ESMC-HAc-BCL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-BCL</i>	<i>ESMC-HCl-PFL</i>	<i>ESMC-HAc-PFL</i>	<i>ESMC-H₃PO₄-PFL</i>
A [U/g]	389,92±2,95 ^a	361,01±4,87 ^b	327,49±3,03 ^c	392,78±8,83 ^A	441,20±3,40 ^B	441,09±9,86 ^B

Srednje vrijednosti s različitim eksponentima unutar retka označavaju statistički značajne razlike; $p < 0,05$, ANOVA, Fisher-ov LSD test)

Iz prikazanih tablica vidljivo je da najveće aktivnosti imobiliziranih lipaza pokazuju one imobilizirane adsorpcijom, uz statistički značajne razlike s obzirom na nosač. Prema tome, BCL i PFL imobilizirane adsorpcijom na ESMC-HCl nosač odabrane su za provjeru funkcionalnosti u sintezi biodizela; ESMC-HCl-BCL-820U, ESMC-HCl-PFL-2770U

4.7. Provjera funkcionalnosti odabrane imobilizirane *Burkholderia cepacia* lipaze u sintezi biodizela

Od dvije odabrane imobilizirane lipaze za provjeru funkcionalnosti u ovom doktorskom radu ispitana je samo BCL imobilizirana lipaza i to u procesu sinteze biodizela u laboratorijskim uvjetima. BCL je odabrana zbog svoje regionespecifičnosti te je kao takva bolja za katalizu transesterifikacije u svrhu sinteze biodizela gdje je za potpunu konverziju triacilglicerola u metilne estere masnih kiselina važno da lipaze cijepaju sve veze s glicerola s masnim kiselinama. Iz istog razloga PFL nije odabrana jer je sn-1(3) specifična te se njenom primjenom vrlo vjerojatno ne bi dobio standardom propisani minimalni udio nastalih metilnih estera masnih kiselina ($\leq 96,5$ %).

Na temelju eksperimentalnih podataka o karakterizaciji BCL te preliminarnih podataka o sintezi biodizela pomoću slobodne BCL (Ostojčić i sur., 2021) provedena je biokatalitička sinteza biodizela sa suncokretovim uljem pri pH 9 i 40 °C. Suncokretovo ulje odabrano je kao najistaknutiji i ujedno najčišći supstrat koji predstavlja idealnu sirovinu na način da sadrži minimalnu količinu slobodnih masnih kiselina, vode i drugih nečistoća koje sadrže druga ulja/masti, svježa ili otpadna, a koje mogu negativno utjecati na reakciju transesterifikacije.

Rezultati su pokazali da jedan sat sinteze biodizela uz ESMC-HCl-BCL-820U kao katalizator daje udio FAME od $97,05 \pm 0,14$ %. Ovi rezultati su u skladu s literaturnim navodima gdje su zabilježene konverzije od 93,4 do 100 % kada je korištena imobilizirana BCL različitim tehnikama na komercijalne nosače, a gdje je sinteza provođena od 12 do 48 h, pri 35 do 50 °C, s metanolom ili etanolom iz različitih ulja poput sojinog, palminog, kokosovog ili jatrofa ulja (Abdulla i Ravindra, 2013; Adnan i sur., 2018; Fan i sur., 2017; Gao i sur., 2016; K. Li i sur., 2017; Sankaran i sur., 2016; Tan i sur., 2010; H. Yang i Zhang, 2019).

4.8. Tehno-ekonomska analiza

U ovom radu provedena je tehno-ekonomska analiza procesa obrade otpadne ljuske jaja (**Slika 6**) s ciljem pripreme nosača na bazi membrane jaja, koji se mogu koristiti u različitim biotehnološkim primjenama, uključujući imobilizaciju lipaza. Proces obuhvaća niz operacija poput mehaničke i kemijske obrade sirovine, što zahtijeva upotrebu vode, kemikalija i energije te angažman laboratorijske opreme i materijala. Stoga je potrebno detaljno sagledati ključne ekonomske pokazatelje, uključujući: (i) troškove ulaznih struja (cijena kemikalija potrebnih za obradu, troškove potrošnje vodovodne vode), (ii) potrošni laboratorijski materijal (filteri), (iii) energetska trošak uređaja, (iv) održivost i okolišne aspekte (procjena uštede resursa, smanjenja

otpada te mogućnost implementacije u industrijske procese bez dodatnog negativnog ekološkog otiska). Prema tome, ova analiza pruža osnovu za donošenje zaključaka o isplativosti i održivosti procesa te, kasnijoj, potencijalnoj primjeni i u industrijskom mjerilu. Posebna pažnja usmjerena je ka mogućnostima smanjenja troškova kroz optimizaciju potrošnje resursa, korištenje jeftinijih ili recikliranih kemikalija te povećanje energetske učinkovitosti. U konačnici, rezultati ove analize mogu poslužiti kao smjernica za razvoj ekonomičnijih i ekološki prihvatljivijih rješenja u sektoru obrade otpada i biotehnologije.

Ovom tehno-ekonomskom analizom primarno se željelo procijeniti isplativost same proizvodnje nosača na bazi membrane jaja iz otpadne ljuske jaja, uz isključivanje utjecaja sporednih procesnih struja. Fokus je stavljen na osnovne operativne troškove, uključujući sirovine, kemikalije, vodu, potrošni laboratorijski materijal i energetska potrošnja uređaja, pri čemu kapitalni troškovi opreme nisu razmatrani. Ovim pristupom omogućena je jasnija procjena ekonomske izvedivosti glavnog proizvodnog procesa prije uključivanja dodatnih čimbenika koji mogu utjecati na ukupnu ekonomsku bilancu. U tehno-ekonomsku analizu uključena je isključivo obrada ljuske jaja klorovodičnom kiselinom, iako su u ovom radu za pripremu nosača korištene tri različite kiseline. Ovakav odabir temelji se na činjenici da su lipaze imobilizirane na membrane jaja dobivene djelovanjem klorovodične kiseline odabrane za ispitivanje funkcionalizacije, čime je opravdano ekonomsko vrednovanje postupka temeljenog na klorovodičnoj kiselini.

U **Tablici 38** prikazane su korištene sirovine, kemikalije i voda, uz navedene jedinične cijene, količine te izračun ukupne cijene za svaku pojedinu stavku. Nakon toga, prikazana je ukupna cijena svih korištenih materijala i resursa. U **Tablici 39** prikazan je energetska trošak korištenih uređaja, pri čemu su istaknute snage svakog pojedinog uređaja, na temelju čega je proveden izračun ukupne potrošnje energije i pripadajućeg troška.

Tablica 38 Prikaz sirovine, kemikalija i vode za pripremu nosača na bazi membrane jaja

<i>MATERIJAL</i>	<i>Jedinična cijena [€]</i>	<i>Količina</i>	<i>Ukupna cijena [€]</i>
Otpadna ljuska jaja (g)	0,00	650,00	0,00
Vodovodna voda (m ³)	2,78*	0,024	0,07
Otopina klorovodične kiseline (10 L)	256,55**	1,00	256,55
Aceton (L)	56,50***	1,00	56,50
Nosač na bazi membrane jaja (ESMC) (g)	0,00	15,00	0,00
UKUPNA CIJENA [€]			313,12

*Cjenik - Vodovod Osijek d.o.o., 2025

** Sigma Aldrich, Hydrochloric Acid, No. 320331, 2025

***Sigma Aldrich, Aceton, Br. 179124, 2025

Tablica 39 Prikaz energetskeg utroška te ukupnog troška za pripremu nosača na bazi membrane jaja

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Uređaj za obradu otpadne ljuske jaja	0,10	4,50	0,45	0,04*
Elektromagnetska miješalica	1,05	0,92	0,97	0,09*
Sušionik	2,00	24,00	48,00	4,32*
Mlin	1,00	0,17	0,17	0,02*
UKUPNA CIJENA [€]				4,47

*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Iz prikazanih podataka u **Tablicama 38 i 39** jasno je vidljivo da je za obradu 650 g ljuske jaja potrebno utrošiti 313,12 € na ulazne materijale za pripremu nosača na bazi membrane jaja što uz energetske trošak, koji iznosi 4,47 €, čini ukupni trošak od 317,59 €.

Analiza troškova pokazuje da sam proces proizvodnje nosača na bazi membrane jaja nije ekonomski isplativ, budući da se iz 650 g ljuske jaja dobije svega 15 g membrana jaja, čija trenutna tržišna cijena iznosi 15,95 € za pakiranje od 50 g (Namaximum - Eggshell Membrane, 2025), odnosno prema tome bi cijena za 15 g membrana iznosila 4,79 €. Usporedbom ukupnih troškova proizvodnje s tržišnom vrijednošću dobivenog proizvoda jasno je da trenutni postupak zahtijeva optimizaciju kako bi postao ekonomski održiv.

Međutim, cilj je bio ispitati i tehno-ekonomsku analizu proizvodnje nosača na bazi membrane jaja uzimajući u obzir mogućnost iskorištavanja sporednih procesnih struja. Naime, nakon ispiranja otpadne ljuske jaja vodom zaostaje otopina proteina bjelanjka jajeta, dok nakon otapanjem ljuske jaja u kiselinu zaostaje otopina kalcijeve soli iz koje se dalje može proizvesti kalcijev klorid visoke čistoće koji zadovoljava uvijete za korištenje u prehrambenoj industriji kao aditiv (*food grade aditiv*) s potencijalnom tržišnom vrijednošću (Strelec i sur., 2024; Strelac, Ostojčić, i sur., 2023; Strelac, Tomičić, i sur., 2023). Dodatno, destilacijom acetona korištenog za ispiranje dobivenih membrana i njegovim vraćanjem u novi ciklus može se ostvariti dodatna ušteda. Ovim pristupom razmatra se mogućnost povećanja ekonomske isplativosti cjelokupnog procesa kroz valorizaciju svih nusprodukata.

Prema tome su redom ispitane sve sporedne procesne struje gdje je prva bila mogućnost dobivanja otopine proteina bjelanjka jajeta iz vodenih otopina od ispiranja otpadne ljuske jaja. Ovdje, budući da su potrošnja kemikalija i vode, kao i energetska potrošnja već uključeni u

gornjem već prikazanom izračunu za samu proizvodnju nosača, jedini su dodatni troškovi filteri i potrošnja energije vakuum pumpe za filtriranje dobivenih otopina, a koji su prikazani u **Tablicama 40 i 41**.

Tablica 40 Prikaz utroška potrošnog materijala za filtraciju otopine proteina bjelanjka jajeta

POTROŠNI MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Whatman filter papir 114 (1 pak = 100 kom)	15,30*	0,01	0,15
Whatman filter papir 1 (1 pak = 100 kom)	12,20**	0,01	0,12
UKUPNA CIJENA [€]			0,27

*Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1114090, 2025

**Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1001090, 2025

Tablica 41 Prikaz energetskog utroška za filtraciju otopine proteina bjelanjka jajeta

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Vakuum pumpa	0,066*	0,50	0,03	0,003*
UKUPNA CIJENA [€]				0,003

*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Iz **Tablica 40 i 41**, vidljivo je da je ukupna dodatna potrošnja za proizvodnju otopine proteina prijanjajućeg sloja bjelanjka jaja svega 0,27 €, a prema Strelec i sur. (2023) iz ove se otopine može dobiti $1,61 \pm 0,34$ g proteina na 100 g ljuske jaja što bi na 650 g ljuske jaja bilo oko 6,5 puta više. Trenutna tržišna cijena proteina iz bjelanjka jaja iznosi 0,2 – 1,10 € za 10 g (Amazon.Com - Egg White Protein Powder, 2025; Egg White Protein - ALLNUTRITION, 2025; Whole Egg Protein Powder - Namaximum, 2025). Međutim, prema Strelec i sur. (2023), od proteina prisutnih u bistrim prijanjajućim otopinama proteina bjelanjaka, najistaknutiji su ovotransferin, lizozim i ovalbumin, čija cijena na tržištu finih kemikalija može doseći i do 388 € po 1 g pročišćenog proteina. Stoga se čini vrlo mogućim da bi se proteini bjelanjaka dobiveni obradom otpadne ljuske jaja mogli koristiti za proizvodnju pročišćenih proteina visoke dodane vrijednosti.

Nadalje, kiselinskom obradom otpadne ljuske jaja, uz izdvajanje membrana jaja, zaostaju otopine pripadajući kalcijevih soli. U ovom istraživanju korištena je klorovodična kiselina, pri čemu je došlo do otapanja kalcijevog karbonata prisutnog u ljusci te formiranja kalcijevog klorida (CaCl_2). Ovisno o uvjetima isparavanja i kristalizacije, moguće je dobiti bezvodni kalcijev klorid (CaCl_2) ili kalcijev klorid dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Ovdje dodatne troškove predstavlja korištenje kemikalija, potrošnog materijala i energije za dobivanje praškastih soli iz otopine soli i membrana jaja, a koji su prikazani u **Tablicama 42 – 44**.

Tablica 42 Prikaz korištenih kemikalija za pripremu praškastih kalcijevih soli

MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Otopina kalcijeve soli (L)	0,00	10,00	0,00
Ca(OH) ₂ (kg)	70,70*	0,10	7,07
2M HCl (L)	13,87**	0,003	0,04
Kalcijeva sol (CaCl ₂ bezv.) (g)	0,00***	663,00	0,00
Kalcijeva sol (CaCl ₂ x 2H ₂ O) (g)	0,00****	708,50	0,00
UKUPNA CIJENA [€]			7,11

*Sigma Aldrich, Calcium Hydroxide, No. 102047, 2025

**Sigma Aldrich, Hydrochloric Acid, No. 320331, 2025

***Sigma-Aldrich, Calcium Chloride, 2025

****Sigma-Aldrich, Calcium Chloride Dihydrate, 2025

Tablica 43 Prikaz utroška potrošnog materijala za pripremu praškastih kalcijevih soli

POTROŠNI MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Whatman filter papir 114 (1 pak = 100 kom)	15,30*	0,01	0,15
Whatman filter papir 1 (1 pak = 100 kom)	12,20**	0,01	0,12
UKUPNA CIJENA [€]			0,27

*Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1114090, 2025

**Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1001090, 2025

Tablica 44 Prikaz energetske utroška za pripremu praškastih kalcijevih soli

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Vakuum pumpa	0,07	3,5	0,25	0,02*
Elektromagnetska mješalica	1,05	0,75	0,79	0,07*
Uparivač	0,05	5,00	0,25	0,02*
Sušionik s raspršivanjem	2,40	1,50	3,60	0,32*
UKUPNA CIJENA [€]				0,43

*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Prema prikazanim tablicama, vidljivo je da trošak za pripremu praškastih soli kalcijevog klorida (bezvodnog ili dihidratnog oblika) iznosi 7,11 € za kemikalije, 0,27 € za potrošni materijal i 0,43 € za energiju na bazi 650 g otpadne ljuske jaja. Prema tome, sveukupno 7,81 €. Međutim, ako se u obzir uzme podatak da se iz obrade 100 g otpadne ljuske jaja može dobiti 102.42 ± 3.31 g bezvodnog kalcijevog klorida (Strelec i sur., 2024) ili 108.74 ± 3.62 g kalcijevog klorida dihidrata (Strelec, Ostojčić, i sur., 2023), a čija tržišna vrijednost varira u širokom rasponu, od 0,01 do 87,30 € po gramu (Sigma-Aldrich, Calcium Chloride, 2025; Sigma-Aldrich, Calcium Chloride Dihydrate, 2025), ovisno o čistoći proizvoda, jasno je da ovaj

sporedni proces dobivanja nosača na bazi membrane jaja uvelike doprinosi ekonomskoj isplativosti.

Kako se vidi na **Slici 6**, kod pripreme nosača na bazi membrane jaja, dobivene membrane jaja se ispiru acetonom. Kako bi se smanjili troškovi i izbjeglo nepotrebno gomilanje otpadnih kemikalija (acetona), aceton se može redestilirati i ponovno koristiti u procesu. Ovaj pristup ne samo da doprinosi ekonomskoj isplativosti postupka, već i smanjuje njegov ekološki otisak, čineći ga održivijim u kontekstu kružnog gospodarstva. Budući da je ovdje ulaz otpadni aceton iz pripreme membrana te da nema potrošnje kemikalija i potrošnog materijala, jedini trošak je energija uparivača koji obavlja redestilaciju otpadnog acetona, a što je prikazano u **Tablici 45**.

Tablica 45 Prikaz energetskeg utroška za redestilaciju acetona

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Rotavapor	1,44	0,50	0,72	0,06*
UKUPNA CIJENA [€]				0,06

*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Iz prikazane tablice je vidljivo da je trošak za redestilaciju otpadnog acetona svega 0,06 €, a poznato je da se prilikom redestilacije postiže prinos od 80 % (**Slika 6**). Time se značajno smanjuje količina otpada i povećava iskoristivost otapala u procesu. U skladu s tim, u sljedećem ciklusu ispiranja membrana moguće je koristiti reciklirani aceton, uz dodatak 20 % svježeg acetona kako bi se osigurala potrebna učinkovitost ispiranja, a čime za svaki ciklus donosi uštedu od 45,20 € ako se u obzir uzme tržišna cijena acetona (*Sigma Aldrich, Acetone, No. 179124*, 2025). Ovaj pristup omogućuje optimizaciju potrošnje kemikalija, smanjenje troškova i doprinosi održivosti procesa.

Iz svega do sada prikazanog, jasno je da sporedne procesne struje koje nastaju tijekom pripreme nosača na bazi membrane jaja – uključujući izdvajanje proteina bjelanjka, dobivanje kalcijevih soli i redestilaciju otpadnog acetona – mogu značajno doprinijeti ekonomskoj isplativosti procesa. Iskorištavanjem ovih nusproizvoda smanjuju se troškovi sirovina, optimizira se potrošnja kemikalija te se minimizira generiranje otpada. Time se ne povećava samo održivost cjelokupnog postupka, već se i proces usklađuje s osnovama kružnog gospodarstva i principima *zero-waste* modela čineći ga ekološki prihvatljivijim i ekonomski konkurentnijim.

Konačna tehno-ekonomska analiza usmjerena je na glavni cilj ovog doktorskog rada – imobilizaciju lipaza na nosače na bazi membrane jaja. Baza za analizu je imobilizacija lipaza provedena na 15 g nosača dobivenih iz 650 g otpadne ljuske jaja, pri čemu su utrošci kemikalija prikazani u **Tablici 46** za BCL te u **Tablici 47** za PFL. Neovisno o korištenoj lipazi, utrošci

potrošnog materijala prikazani su u **Tablici 48**, dok su energetske zahtjevi procesa analizirani u **Tablici 49**. Ovi podaci omogućuju cjelovitu procjenu isplativosti i održivosti postupka, ističući potencijal primjene nosača na bazi membrane jaja kao ekonomski prihvatljive i ekološki održive platforme za enzimске biokatalizatore.

Tablica 46 Prikaz korištenih ulaznih sirovina i kemikalija za imobilizaciju BCL

MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Nosač na bazi membrane jaja (g)	0,00	15,00	0,00
BCL (50 g)	192,00*	0,04	7,69
Fosfatni pufer (1 L)	1,71**	0,30	0,51
Imobilizirana BCL (g)	0,00	15,00	0,00
UKUPNA CIJENA [€]			8,20

*Sigma-Aldrich, Amano Lipase PS, No. 534641, 2025

**Sigma-Aldrich, Di-Sodium Hydrogen Phosphate Anhydrous, No. 1.06585, 2025; Sigma-Aldrich, Sodium Dihydrogen Phosphate Anhydrous, No. 1.06370, 2025

Tablica 47 Prikaz korištenih ulaznih sirovina i kemikalija za imobilizaciju PFL

MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Nosač na bazi membrane jaja (g)	0,00	15,00	0,00
PFL (50 g)	210,00*	0,04	8,40
Tris-HCl pufer (1 L)	1,69**	0,30	0,51
Imobilizirana PFL (g)	0,00	15,00	0,00
UKUPNA CIJENA [€]			8,91

*Sigma-Aldrich, Amano Lipase from *Pseudomonas Fluorescens*, No. 534730, 2025

**Sigma Aldrich, Hydrochloric Acid, No. 320331, 2025; Sigma-Aldrich, Tris Base Solid, No. 1.08382, 2025

Tablica 48 Prikaz utrošaka potrošnog materijala za imobilizaciju lipaza

POTROŠNI MATERIJAL	Jedinična cijena [€]	Količina	Ukupna cijena [€]
Epruveta (1 pak = 500 kom)	263,00*	0,06	15,78
Whatman filter papir 1 (1 pak = 100 kom)	12,20**	0,04	0,48
UKUPNA CIJENA [€]			16,26

*Sigma-Aldrich, Falcon Tube, No. CLS352099, 2025

**Sigma Aldrich, Whatman Filter Paper, No. WHA1001090, 2025

Tablica 49 Prikaz energetskih utrošaka za imobilizaciju lipaza

UREĐAJ	Snaga [kW]	Radni sati [h]	Potrošnja [kWh]	Ukupna cijena [€]
Rotator	0,02	1,00	0,02	0,00*
Vakuum pumpa	0,07	0,25	0,02	0,00*

Ultra-freezer	0,80	6,00	4,91	0,44*
Liofilizator	1,00	24,00	24,00	2,16*
UKUPNA CIJENA [€]				2,60

*HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene), 2025

Imobilizacijom BCL ili PFL na 15 g pripremljenih nosača na bazi membrane jaja može se dobiti 15 g imobiliziranih lipaza, uz zanemarive gubitke tijekom filtracije. Iz prikazanih tablica vidljivo je da je utrošak kemikalija za imobilizaciju gotovo jednak, iako ne identičan, zbog razlika u vrsti, odnosno cijeni slobodnih lipaza i pripadajućih odgovarajućih pufera. S druge strane, bez obzira na odabranu lipazu, utrošak potrošnog materijala i energije ostaje isti.

Ukupni trošak imobilizacije BCL iznosi 27,06 € dok za PFL 27,77 €. Usporedbom s komercijalno dostupnim imobiliziranim enzimima, poput *Pseudomonas cepacia* lipaze na komercijalnom nosaču, čija cijena iznosi 134,00 € za 10 g ili 480,90 € za 50 g (*Sigma-Aldrich, Lipase, Immobilized on Immobead 150 from Pseudomonas Cepaci, No. 54327, 2025*), jasno je da je imobilizacija na nosače dobivene iz otpada ekonomski isplativa alternativa.

Provedena tehno-ekonomska analiza pripreme nosača na bazi membrane jaja i imobilizacije lipaza na iste pokazala je da ovaj pristup predstavlja ekonomski isplativu i održivu alternativu u odnosu na komercijalne nosače. Proces pripreme nosača temeljen na otpadu iz prehrambene industrije ne zahtijeva skupe kemikalije niti visoku potrošnju energije, što značajno smanjuje troškove proizvodnje. Troškovi imobilizacije BCL i PFL pokazali su se minimalnim u usporedbi s tržišno dostupnim imobiliziranim lipazama, pri čemu ukupna cijena iznosi manje od 28 € za 15 g imobiliziranog enzima. S obzirom na to da komercijalno dostupne imobilizirane lipaze dosežu visoke cijene, jasno je da metoda korištenja nosača dobivenih iz otpada značajno smanjuje ekonomske barijere i doprinosi kružnoj ekonomiji. Osim ekonomske isplativosti, predložena metoda predstavlja i ekološki prihvatljivo rješenje smanjenja otpada iz prehrambene industrije te njegovom transformacijom u vrijedne proizvode. Ovi rezultati potvrđuju potencijal daljnjeg razvoja i potencijalne primjene ovakvih nosača u biotehnoškim procesima.

Iako u dostupnoj literaturi nema podataka o tehno-ekonomskoj analizi obrade otpada od ljuske jaja kiselinama u svrhu dobivanja nosača za imobilizaciju enzima, postoji nekoliko radova koji su prikazali tehno-ekonomske analize korištenja otpada uz zaključke da upravljanje otpadom pokazuje značajne dugoročne ekonomske koristi kroz održivost upravljanja otpadom i smanjujući pritisak na okoliš (Adamu i Ibrahim, 2024; Hsu, 2021; Jamasb i Nepal, 2010; Khan i sur., 2022).

ZA OČJENU

5. ZAKLJUČCI

Cilj ovog doktorskog rada bio je pripremiti nosače na bazi membrane jaja otapanjem kalcificiranog matriksa otpadne ljuske jaja različitim kiselinama te na tako pripremljene nosače imobilizirati komercijalno dostupne lipaze iz bakterija *Burkholderia cepacia* (BCL) i *Pseudomonas fluorescens* (PFL) primjenom imobilizacijskih tehnika adsorpcije te direktnog i indirektnog kovalentnog vezanja. Nakon provedenih imobilizacija trebalo je odabrati najbolje imobilizirane lipaze na temelju biokemijskih i operativnih svojstava u odnosu na slobodne lipaze. Odabranim imobiliziranim lipazama je zatim trebalo provjeriti funkcionalnost u reakciji transesterifikacije s ciljem sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima. Nakon svega navedenog, primjenom tehno-ekonomske analize cilj je bio napraviti procjenu ekonomičnosti/prihvatljivosti proizvodnje krajnje odabranih imobiliziranih lipaza na nosače na bazi membrane jaja.

Definirane su hipoteze doktorskog rada iz kojih su izvedeni sljedeći zaključci na osnovi dobivenih rezultata:

Hipoteza 1: Otapanjem kalcificiranog matriksa otpadne ljuske jaja 5 % kloridnom, 10 % octenom i 15 % *o*-fosfornom kiselinom moguće je dobiti funkcionalni materijal na bazi membrane jaja koji svojim svojstvima udovoljava uporabi kao nosač za imobilizaciju enzima.

Na temelju analize kemijskog sastava te dodatne analize infracrvenog spektra kao i fizičkih parametara boje te mikrostrukturiranosti površine utvrđeno je da nema velikih razlika s obzirom na utjecaj kiselina na pripremljene nosače na bazi membrane jaja. Dodatno, prihvatljivost pripremljenih nosača na bazi membrane jaja za uporabu kao nosač za imobilizaciju lipaza uključivalo je određivanje veličine čestica granulometrijskom analizom gdje je pokazano da se većina čestica nalazi u rasponu 200 – 300 μm što je odgovaralo zahtjevu za nosače za imobilizaciju enzima.

Hipoteza 2: Lipaze imobilizirane na pripremljene nosače na bazi membrane jaja pokazuju poboljšana biokemijska i operativna svojstva u odnosu na slobodne lipaze.

Biokemijskom i operativnom karakterizacijom slobodnih i pripremljenih imobiliziranih lipaza utvrđeno je da imobilizirane lipaze pokazuju bolju stabilnost pri višim temperaturama kao i bolju stabilnost skladištenjem na +4 i +25 °C u trajanju od 7 dana u odnosu na slobodne lipaze. Osim toga, mogu se uspješno koristiti kroz 10 ciklusa ponovne uporabe u reakciji hidrolize *p*NPP-a

pri čemu lipaze imobilizirane adsorpcijom na nosače na bazi membrane jaja zadržavaju i do 85 % svoje početne aktivnosti.

Hipoteza 3: Lipaze imobilizirane na pripremljene nosače na bazi membrane jaja mogu se uspješno koristiti u postupku sinteze biodizela u kotlastom reaktoru u laboratorijskim uvjetima.

Rezultati sinteze biodizela pokazali su da je jedan sat reakcije transesterifikacije jestivog suncokretovog ulja uz prisustvo metanola i imobilizirane *Burkholderia cepacia* lipaze dovoljan za proizvodnju 97 % metilnih estera masnih kiselina što u potpunosti udovoljava propisane pravilnike.

Hipoteza 4: Tehno-ekonomska analiza pokazuje da odabrane imobilizirane lipaze na nosače na bazi membrane jaja imaju velik potencijal za primjenu u industrijskoj proizvodnji.

Provedena tehno-ekonomska analiza pripreme nosača na bazi membrane jaja i imobilizacije lipaza na iste pokazala je da ovaj pristup predstavlja ekonomski isplativu i održivu alternativu u odnosu na komercijalne nosače. Proces pripreme nosača temeljen na otpadu iz prehrambene industrije ne zahtijeva skupe kemikalije niti visoku potrošnju energije, što značajno smanjuje troškove proizvodnje. Troškovi imobilizacije BCL i PFL pokazali su se minimalnim u usporedbi s tržišno dostupnim imobiliziranim lipazama. S obzirom na to da komercijalne imobilizirane lipaze dosežu visoke cijene, jasno je da metoda korištenja nosača dobivenih iz otpada značajno smanjuje ekonomske barijere i doprinosi cirkularnoj ekonomiji. Osim ekonomske isplativosti, predložena metoda predstavlja i ekološki prihvatljivo rješenje smanjenja otpada iz prehrambene industrije te njegovu transformacijom u vrijedne biokatalizatore. Ovi rezultati potvrđuju potencijal daljnjeg razvoja i primjene ovakvih nosača/biokatalizatora u industrijskim procesima.

ZA OČJENU

6. LITERATURA

- Abdulla, R., i Ravindra, P. (2013). Immobilized *Burkholderia cepacia* lipase for biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. oil. *Biomass and Bioenergy*, 56, 8–13.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2013.04.010>
- Abdulla, R., Sanny, S. A., i Derman, E. (2017). Stability studies of immobilized lipase on rice husk and eggshell membrane. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 206, 012032. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/206/1/012032>
- Abeyrathne, E. D. N. S., Lee, H. Y., i Ahn, D. U. (2014). Sequential separation of lysozyme, ovomucin, ovotransferrin, and ovalbumin from egg white. *Poultry Science*, 93(4), 1001–1009.
<https://doi.org/10.3382/ps.2013-03403>
- Adamu, M., i Ibrahim, Y. E. (2024). Environmental sustainability and cost-benefit analysis of concrete containing date palm ash and eggshell powder: A response surface methodology approach. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 9, 100636.
<https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100636>
- Adnan, M., Li, K., Wang, J., Xu, L., i Yan, Y. (2018). Hierarchical ZIF-8 toward Immobilizing *Burkholderia cepacia* Lipase for Application in Biodiesel Preparation. *Internation Journal of Molecular Sciences*, 19(5), 1424.
- Ahmad, R., i Sardar, M. (2015). Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochemistry i Analytical Biochemistry*, 04(02).
<https://doi.org/10.4172/2161-1009.1000178>
- Ahmed, T. A. E., Suso, H.-P., i Hincke, M. T. (2017). In-depth comparative analysis of the chicken eggshell membrane proteome. *Journal of Proteomics*, 155, 49–62.
<https://doi.org/10.1016/j.jprot.2017.01.002>
- Ahmed, T. A. E., Suso, H.-P., Maqbool, A., i Hincke, M. T. (2019). Processed eggshell membrane powder: Bioinspiration for an innovative wound healing product. *Materials Science and Engineering: C*, 95, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.054>
- Aina, S. T., Plessis, B. J. D., Mjimba, V., i Brink, H. G. (2022). From Waste to Best Valorization and Upcycling of Chicken Eggshells. In *Waste Management*. CRC Press.

- Aini, B. N., Siddiquee, S., Ampon, K., Rodrigues, K. F., i Suryani, S. (2015). Development of glucose biosensor based on ZnO nanoparticles film and glucose oxidase-immobilized eggshell membrane. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 4, 46–56.
<https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2015.03.004>
- Al-Awwal, N. Y., i Ali, U. L. (2015). *Proximate Analyses of Different Samples of Egg Shells Obtained from Sokoto Market in Nigeria*. 438.
- Ali, Z., Tian, L., Zhao, P., Zhang, B., Ali, N., Khan, M., i Zhang, Q. (2016). Immobilization of lipase on mesoporous silica nanoparticles with hierarchical fibrous pore. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.10.011>
- Alleoni, A. C. C. (2006). Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scientia Agricola*, 63, 291–298. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162006000300013>
- Amazon.com—Egg White Protein Powder. (2025). <https://www.amazon.com/Its-Just-Protein-Non-GMO-Unflavored/dp/B07N8G3Q1H?th=1> (13.1.2025.)
- An, J. D., Patterson, D. A., McNeil, S., i Hossain, M. M. (2014). Immobilization of lipase on woolen fabrics: Enhanced effectiveness in stain removal. *Biotechnology Progress*, 30(4), 806–817.
<https://doi.org/10.1002/btpr.1912>
- Andualema, B., i Gessesse, A. (2012). Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. *Biotechnology*, 11(3), 100–118. <https://doi.org/10.3923/biotech.2012.100.118>
- AOAC. (2002). AOAC INTERNATIONAL. <https://www.aoac.org/scientific-solutions/standards-and-official-methods/>
- Aravindan, R., Anbumathi, P., i Viruthagiri, T. (2007). Lipase applications in food industry. *IJBT Vol.6(2) [April 2007]*. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/3016>
- Baláž, M. (2014). Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science. *Acta Biomaterialia*, 10(9), 3827–3843. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.020>
- Baláž, M., Bujňáková, Z., Baláž, P., Zorkovská, A., Danková, Z., i Briančin, J. (2015). Adsorption of cadmium(II) on waste biomaterial. *Journal of Colloid and Interface Science*, 454, 121–133.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.03.046>

- Ballesteros, L. F., Teixeira, J. A., i Mussatto, S. I. (2014). Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3493–3503. <https://doi.org/10.1007/s11947-014-1349-z>
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C., i Fernandez-Lafuente, R. (2015). Strategies for the one-step immobilization–purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnology Advances*, 33(5), 435–456. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>
- Bashir, A. S. M., i Manusamy, Y. (2015, March 1). *Characterization of Raw Egg Shell Powder (ESP) as A Good Bio-filler. | Journal of Engineering Research iamp; Technology | EBSCOhost*. <https://openurl.ebsco.com/contentitem/gcd:101796288?sid=ebsco:plink:crawlerid=ebsco:gcd:101796288>
- Bernardo, M. L. R., i Azarcon, A. C. (2012). A Randomized Controlled Trial on the Effects of Oral Collagen Treatment on the Media) Knee Joint Space and Functional Outcome among Veterans Memorial Medical Center Patients Diagnosed with Osteoarthritis of the Knee. *PARM Proceedings*, 4(1), 1–8.
- Bessashia, W., Berredjem, Y., Hattab, Z., i Bououdina, M. (2020). Removal of Basic Fuchsin from water by using mussel powdered eggshell membrane as novel bioadsorbent: Equilibrium, kinetics, and thermodynamic studies. *Environmental Research*, 186, 109484. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109484>
- Bisswanger, H. (2014). Enzyme assays. *Perspectives in Science*, 1(1), 41–55. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>
- Bora, L., Gohain, D., i Das, R. (2013). Recent advances in production and biotechnological applications of thermostable and alkaline bacterial lipases. *JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*, 88(11), 1959–1970. <https://doi.org/10.1002/jctb.4170>
- Braham, S. A., Siar, E.-H., Arana-Peña, S., Carballares, D., Morellon-Sterling, R., Bavandi, H., de Andrades, D., Kornecki, J. F., i Fernandez-Lafuente, R. (2021). Effect of Concentrated Salts Solutions on the Stability of Immobilized Enzymes: Influence of Inactivation Conditions and

- Immobilization Protocol. *Molecules*, 26(4), Article 4.
<https://doi.org/10.3390/molecules26040968>
- Brena, B., González-Pombo, P., i Batista-Viera, F. (2013). Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In J. M. Guisan (Ed.), *Immobilization of Enzymes and Cells* (Vol. 1051, pp. 15–31). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_2
- Brígida, A. I. S., Pinheiro, Á. D. T., Ferreira, A. L. O., i Gonçalves, L. R. B. (2008). Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B by Adsorption to Green Coconut Fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 146(1–3), 173–187. <https://doi.org/10.1007/s12010-007-8072-4>
- Budžaki, S., Velić, N., Ostojčić, M., Stjepanović, M., Rajs, B. B., Šereš, Z., Maravić, N., Stanojev, J., Hessel, V., i Strelec, I. (2022). Waste Management in the Agri-Food Industry: The Conversion of Eggshells, Spent Coffee Grounds, and Brown Onion Skins into Carriers for Lipase Immobilization. *Foods*, 11(3), 409. <https://doi.org/10.3390/foods11030409>
- Cao, S.-L., Huang, Y.-M., Li, X.-H., Xu, P., Wu, H., Li, N., Lou, W.-Y., i Zong, M.-H. (2016). Preparation and Characterization of Immobilized Lipase from *Pseudomonas Cepacia* onto Magnetic Cellulose Nanocrystals. *Scientific Reports*, 6(1), 20420.
<https://doi.org/10.1038/srep20420>
- Casas-Godoy, L., Duquesne, S., Bordes, F., Sandoval, G., i Marty, A. (2012). Lipases: An Overview. In G. Sandoval (Ed.), *Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols* (pp. 3–30). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_1
- Cavalcante, F. T. T., Neto, F. S., Rafael de Aguiar Falcão, I., Erick da Silva Souza, J., de Moura Junior, L. S., da Silva Sousa, P., Rocha, T. G., de Sousa, I. G., de Lima Gomes, P. H., de Souza, M. C. M., i dos Santos, J. C. S. (2021). Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. *Fuel*, 288, 119577. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119577>
- Cespugli, M., Lotteria, S., Navarini, L., Lonzarich, V., Del Terra, L., Vita, F., Zweyer, M., Baldini, G., Ferrario, V., Ebert, C., i Gardossi, L. (2018). Rice Husk as an Inexpensive Renewable Immobilization Carrier for Biocatalysts Employed in the Food, Cosmetic and Polymer Sectors. *Catalysts*, 8(10), 471. <https://doi.org/10.3390/catal8100471>

- Chandra, P., Enespa, Singh, R., i Arora, P. K. (2020). Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 169.
<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>
- Chattopadhyay, S., i Sen, R. (2012). A comparative performance evaluation of jute and eggshell matrices to immobilize pancreatic lipase. *Process Biochemistry*, 47(5), 749–757.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.02.003>
- Chauhan, M., i Garlapati, V. K. (2013). Production and Characterization of a Halo-, Solvent-, Thermo-tolerant Alkaline Lipase by *Staphylococcus arlettae* JPBW-1, Isolated from Rock Salt Mine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(6), 1429–1443. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0433-6>
- Chen, X., Zhu, L., Wen, W., Lu, L., Luo, B., i Zhou, C. (2019). Biomimetic mineralisation of eggshell membrane featuring natural nanofiber network structure for improving its osteogenic activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 179, 299–308.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.009>
- Chi, Y., Liu, R., Lin, M., i Chi, Y. (2022). A novel process to separate the eggshell membranes and eggshells via flash evaporation. *Food Science and Technology*, 42, e07522.
- Chi, Y., Wang, Y., Li, M., Ren, J., i Chi, Y. (2019). Numerical simulation and experimental study on eggshell membrane separation device. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 12(2), Article 2. <https://doi.org/10.25165/ijabe.v12i2.3058>
- Chioke, O. J., Ogbonna, C. N., Onwusi, C., i Ogbonna, J. C. (2018). Lipase in biodiesel production. *African Journal of Biochemistry Research*, 12(8), 73–85.
<https://doi.org/10.5897/AJBR2018.0999>
- Choi, H.-J. (2017). Use of methyl esterified eggshell membrane for treatment of aqueous solutions contaminated with anionic sulfur dye. *Water Science and Technology*, 76(10), 2638–2646.
<https://doi.org/10.2166/wst.2017.346>
- Choi, M. M. F. (2005). Application of a long shelf-life biosensor for the analysis of l-lactate in dairy products and serum samples. *Food Chemistry*, 92(3), 575–581.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.011>

- Choi, M. M. F., Pang, W. S. H., Wu, X., i Xiao, D. (2001). An optical glucose biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilisation platform. *The Analyst*, 126(9), 1558–1563.
<https://doi.org/10.1039/b103205b>
- Choi, M. M. F., i Yiu, T. P. (2004). Immobilization of beef liver catalase on eggshell membrane for fabrication of hydrogen peroxide biosensor. *Enzyme and Microbial Technology*, 34(1), 41–47.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2003.08.005>
- Choudhury, P., i Bhunia, B. (2015). Industrial application of lipase: A review. *BioPharm Journal*, 1(2), 41–47.
- Cjenik—Vodovod Osijek d.o.o. (2025). <https://vodovod.com/cjenik> (13.1.2025.)
- Corici, L., Ferrario, V., Pellis, A., Ebert, C., Lotteria, S., Cantone, S., Voinovich, D., i Gardossi, L. (2016). Large scale applications of immobilized enzymes call for sustainable and inexpensive solutions: Rice husks as renewable alternatives to fossil-based organic resins. *RSC Advances*, 6(68), 63256–63270. <https://doi.org/10.1039/C6RA12065B>
- Corrêa, W. M., Bortolozo, A. D., Osório, W. R., i da Silva Padilha, G. (2022). Physical adsorption used to the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase into powder polymeric supports. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 147(4), 3071–3081.
<https://doi.org/10.1007/s10973-021-10714-5>
- Cui, C., Tao, Y., Li, L., Chen, B., i Tan, T. (2013). Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 91, 59–66.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.03.001>
- Dalal, S., Singh, P. K., Raghava, S., Rawat, S., i Gupta, M. N. (2008). Purification and properties of the alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* A.T.C.C. 25609. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 51(1), 23–31. <https://doi.org/10.1042/BA20070186>
- Dias, M. R. G., de Pauloveloso, A., do Amaral, L. F. M., Betim, R. T., Nascimento, M. G., i Pilissão, C. (2018). Immobilization of *Burkholderia cepacia* on Pristine or Functionalized Multi-Walled Carbon Nanotubes and Application on Enzymatic Resolution of (RS)-1-Phenylethanol. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 29(9), 1876–1884.

- D'Souza, S. F., Kumar, J., Jha, S. K., i Kubal, B. S. (2013). Immobilization of the urease on eggshell membrane and its application in biosensor. *Materials Science and Engineering: C*, 33(2), 850–854. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.11.010>
- Egg White Protein—ALLNUTRITION*. (2025).
[//allnutrition.com/ALLNUTRITION_Egg_White_Protein-opis40738.html](https://allnutrition.com/ALLNUTRITION_Egg_White_Protein-opis40738.html) (13.1.2025.)
- El-Ghonemy, D. H., Ali, T. H., Hassanein, N. M., Abdellah, E. M., Fadel, M., Awad, G. E. A., i Abdou, D. A. M. (2021). Thermo-alkali-stable lipase from a novel *Aspergillus niger*: Statistical optimization, enzyme purification, immobilization and its application in biodiesel production. *Preparative Biochemistry i Biotechnology*, 51(3), 225–240.
<https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1805759>
- EN HRN 14214*. (2019). HRN4You - Hrvatski zavod za norme.
<https://repositorij.hzn.hr/norm/HRN+EN+14214%3A2019>
- Fan, Y., Ke, C., Su, F., Li, K., i Yan, Y. (2017). Various Types of Lipases Immobilized on Dendrimer-Functionalized Magnetic Nanocomposite and Application in Biodiesel Preparation. *Energy i Fuels*, 31(4), 4372–4381. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.7b00036>
- Faridi, H., i Arabhosseini, A. (2018). Application of eggshell wastes as valuable and utilizable products: A review. *Research in Agricultural Engineering*, 64(2), 104–114.
<https://doi.org/10.17221/6/2017-RAE>
- Ferreira, M. M., Santiago, F. L. B., Silva, N. A. G. da, Luiz, J. H. H., Fernández-Lafuente, R., Mendes, A. A., i Hirata, D. B. (2018). Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. *Process Biochemistry*, 67, 55–63.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.028>
- Filho, D. G., Silva, A. G., i Guidini, C. Z. (2019). Lipases: Sources, immobilization methods, and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(18), 7399–7423.
<https://doi.org/10.1007/s00253-019-10027-6>
- Folch, J., Lees, M., i Stanley, G. H. S. (1957). A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)

- Franssen, M. C. R., Steunenberg, P., Scott, E. L., Zuilhof, H., i Sanders, J. P. M. (2013). Immobilised enzymes in biorenewables production. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6491. <https://doi.org/10.1039/c3cs00004d>
- Gao, J., Yin, L., Feng, K., Zhou, L., Ma, L., He, Y., Wang, L., i Jiang, Y. (2016). Lipase Immobilization through the Combination of Bioimprinting and Cross-Linked Protein-Coated Microcrystal Technology for Biodiesel Production. *Industrial i Engineering Chemistry Research*, 55(42), 11037–11043. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b03273>
- Ghadi, A., Tabandeh, F., Mahjoub, S., Mohsenifar, A., Roshan, F. T., i Alavije, R. S. (2015). Fabrication and Characterization of Core-Shell Magnetic Chitosan Nanoparticles as a Novel carrier for Immobilization of Burkholderia cepacia Lipase. *Journal of Oleo Science*, 64(4), 423–430. <https://doi.org/10.5650/jos.ess14236>
- Girelli, A. M., Astolfi, M. L., i Scuto, F. R. (2020). Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere*, 244, 125368. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125368>
- Girelli, A. M., i Scuto, F. R. (2021). Eggshell membrane as feedstock in enzyme immobilization. *Journal of Biotechnology*, 325, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.10.016>
- Guerrand, D. (2017). Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *OCL Oilseeds and Fats Crops and Lipids*, 24(4), D403. <https://doi.org/10.1051/ocl/2017031>
- Gupta, R., Gupta, N., i Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), 763–781. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8>
- Guy, R. C., i Sahi, S. S. (2006). Application of a lipase in cake manufacture. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(11), 1679–1687. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2540>
- Hamdan, S. H., Maiangwa, J., Ali, M. S. M., Normi, Y. M., Sabri, S., i Leow, T. C. (2021). Thermostable lipases and their dynamics of improved enzymatic properties. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(19), 7069–7094. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11520-7>

- Han, C., Chen, Y., Shi, L., Chen, H., Li, L., Ning, Z., Zeng, D., i Wang, D. (2023). Advances in eggshell membrane separation and solubilization technologies. *Frontiers in Veterinary Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1116126>
- Hasan, F., Shah, A. A., i Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235–251. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.016>
- HEP ELEKTRA d.o.o. - Tarifne stavke (cijene). (2025). hep.hr.
<https://www.hep.hr/elektra/kucanstvo/tarifne-stavke-cijene/1547>
- Hettiarachchy, N. S., Feliz, D. J., Edwards, J. S., i Horax, R. (2018). 21—The use of immobilized enzymes to improve functionality. In R. Y. Yada (Ed.), *Proteins in Food Processing (Second Edition)* (pp. 569–597). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00022-X>
- Hincke, M., Nys, Y., Gautron, J., Mann, K., Rodriguez-Navarro, A., i McKee, M. (2012). The eggshell: Structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 17, 1266–1280.
- Hsu, E. (2021). Cost-benefit analysis for recycling of agricultural wastes in Taiwan. *Waste Management*, 120, 424–432. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2020.09.051>
- Hu, X., Zhao, X., i Hwang, H. (2007). Comparative study of immobilized *Trametes versicolor* laccase on nanoparticles and kaolinite. *Chemosphere*, 66(9), 1618–1626.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.004>
- Huang, X.-J., Ge, D., i Xu, Z.-K. (2007). Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. *European Polymer Journal*, 43(9), 3710–3718. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.06.010>
- Işık, C., Saraç, N., Teke, M., i Uğur, A. (2021). A new bioremediation method for removal of wastewater containing oils with high oleic acid composition: *Acinetobacter haemolyticus* lipase immobilized on eggshell membrane with improved stabilities. *New Journal of Chemistry*, 45(4), 1984–1992. <https://doi.org/10.1039/D0NJ05175F>

- Ismail, A. R., i Baek, K.-H. (2020). Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1624–1639. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.021>
- Ittrat, P., Chacho, T., Pholprayoon, J., Suttiwarayanon, N., i Charoenpanich, J. (2014). Application of agriculture waste as a support for lipase immobilization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(3), 77–82. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.02.002>
- Iyer, P. V., i Ananthanarayan, L. (2008). Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, 43(10), 1019–1032. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.06.004>
- Jamasb, T., i Nepal, R. (2010). Issues and options in waste management: A social cost–benefit analysis of waste-to-energy in the UK. *Resources, Conservation and Recycling*, 54(12), 1341–1352. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2010.05.004>
- Jensen, G. S., Shah, B., Holtz, R., Patel, A., i Donald, C. L. (2016). Reduction of facial wrinkles by hydrolyzed water-soluble egg membrane associated with reduction of free radical stress and support of matrix production by dermal fibroblasts. *Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology*, 9, 357–366.
- Jia, H., Hanate, M., Aw, W., Itoh, H., Saito, K., Kobayashi, S., Hachimura, S., Fukuda, S., Tomita, M., Hasebe, Y., i Kato, H. (2017). Eggshell membrane powder ameliorates intestinal inflammation by facilitating the restitution of epithelial injury and alleviating microbial dysbiosis. *Scientific Reports*, 7(1), 43993. <https://doi.org/10.1038/srep43993>
- Jiang, C., Cheng, C., Hao, M., Wang, H., Wang, Z., Shen, C., i Cheong, L.-Z. (2017). Enhanced catalytic stability of lipase immobilized on oxidized and disulfide-rich eggshell membrane for esters hydrolysis and transesterification. *International Journal of Biological Macromolecules*, 105, 1328–1336. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.166>
- Joshi, P., Joshi, H. C., Sanghi, S. K., i Kundu, S. (2010). Immobilization of monoamine oxidase on eggshell membrane and its application in designing an amperometric biosensor for dopamine. *Microchimica Acta*, 169(3), 383–388. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0346-9>

- Kalman, D. S., i Hewlings, S. (2020). The effect of oral hydrolyzed eggshell membrane on the appearance of hair, skin, and nails in healthy middle-aged adults: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 19(6), 1463–1472.
- Kattimani, V., Panga, G. S. K., i K, G. E. (2022). Eggshell membrane separation methods-waste to wealth-a scoping review. *Journal of Poultry Research*, 19(1), Article 1.
<https://doi.org/10.34233/jpr.1131361>
- Kessi, E., i Arias, J. L. (2019). Using Natural Waste Material as a Matrix for the Immobilization of Enzymes: Chicken Eggshell Membrane Powder for β -Galactosidase Immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(1), 101–115. <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2805-4>
- Khan, A. H., Sharholly, M., Alam, P., Al-Mansour, A. I., Ahmad, K., Kamal, M. A., Alam, S., Pervez, Md. N., i Naddeo, V. (2022). Evaluation of cost benefit analysis of municipal solid waste management systems. *Journal of King Saud University - Science*, 34(4), 101997.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101997>
- Kharrat, N., Ali, Y. B., Marzouk, S., Gargouri, Y.-T., i Karra-Châabouni, M. (2011). Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*, 46(5), 1083–1089. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.029>
- Kiers, J. L., i Bult, J. H. F. (2021). Mildly Processed Natural Eggshell Membrane Alleviates Joint Pain Associated with Osteoarthritis of the Knee: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Journal of Medicinal Food*, 24(3), 292–298. <https://doi.org/10.1089/jmf.2020.0034>
- King`ori, A. M. (2011). A Review of the Uses of Poultry Eggshells and Shell Membranes. *International Journal of Poultry Science*, 10(11), 908–912.
<https://doi.org/10.3923/ijps.2011.908.912>
- Ko, C.-H., Yeh, K.-W., Wang, Y.-N., Wu, C.-H., Chang, F.-C., Cheng, M.-H., i Liou, C.-S. (2012). Impact of methanol addition strategy on enzymatic transesterification of jatropha oil for biodiesel processing. *Energy*, 48(1), 375–379. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2012.06.042>

- Kodali, V. K., Gannon, S. A., Paramasivam, S., Raje, S., Polenova, T., i Thorpe, C. (2011). A Novel Disulfide-Rich Protein Motif from Avian Eggshell Membranes. *PLOS ONE*, 6(3), e18187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018187>
- Kojima, Y., i Shimizu, S. (2003). Purification and characterization of the lipase from *Pseudomonas fluorescens* HU380. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(3), 219–226. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)80185-8](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)80185-8)
- Kulkarni, N., i Gadre, R. V. (2002). Production and properties of an alkaline, thermophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* NS2W. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28(6), 344–348. <https://doi.org/10.1038/sj/jim/7000254>
- Kulshreshtha, G., Diep, T., Hudson, H.-A., i Hincke, M. T. (2022). High value applications and current commercial market for eggshell membranes and derived bioactives. *Food Chemistry*, 382, 132270. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132270>
- Kumar, A., Mukhia, S., Kumar, N., Acharya, V., Kumar, S., i Kumar, R. (2020). A Broad Temperature Active Lipase Purified From a Psychrotrophic Bacterium of Sikkim Himalaya With Potential Application in Detergent Formulation. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 642. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00642>
- Lan, D., Hou, S., Yang, N., Whiteley, C., Yang, B., i Wang, Y. (2011). Optimal Production and Biochemical Properties of a Lipase from *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 7216–7237.
- Li, B., Lan, D., i Zhang, Z. (2008a). Chemiluminescence flow-through biosensor for glucose with eggshell membrane as enzyme immobilization platform. *Analytical Biochemistry*, 374(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.036>
- Li, B., Lan, D., i Zhang, Z. (2008b). Chemiluminescence flow-through biosensor for glucose with eggshell membrane as enzyme immobilization platform. *Analytical Biochemistry*, 374(1), 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.036>
- Li, J., Ng, D. H. L., Ma, R., Zuo, M., i Song, P. (2017). Eggshell membrane-derived MgFe₂O₄ for pharmaceutical antibiotics removal and recovery from water. *Chemical Engineering Research and Design*, 126, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2017.07.005>

- Li, K., Fan, Y., He, Y., Zeng, L., Han, X., i Yan, Y. (2017). Burkholderia cepacia lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis. *Scientific Reports*, 7(1), 16473. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16626-5>
- Liu, C.-H., Lu, W.-B., i Chang, J.-S. (2006). Optimizing lipase production of *Burkholderia* sp. By response surface methodology. *Process Biochemistry*, 41(9), 1940–1944. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.04.013>
- Long, K., Ghazali, H. M., Ariff, A., Man, Y. C., i Bucke, C. (1998). Substrate preference of mycelium-bound lipase from a strain of *Aspergillus flavus* Link. *Biotechnology Letters*, 20(4), 369–372.
- Lotti, M., Pleiss, J., Valero, F., i Ferrer, P. (2015). Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. *Biotechnology Journal*, 10, 22–30.
- Ly, B., Dyer, E., Feig, J., Chien, A., i Bino, S. (2020). Research Techniques Made Simple: Cutaneous Colorimetry: A Reliable Technique for Objective Skin Color Measurement. *The Journal of Investigative Dermatology*, 140, 3-12.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.11.003>
- M. M. Cordeiro, C., i T. Hincke, M. (2011). *Recent Patents on Eggshell: Shell and Membrane Applications* [Text]. Bentham Science Publishers. <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/pfna/2011/00000003/00000001/art00001>
- Martins, S. R., dos Santos, A., Fricks, A. T., Lima, Á. S., Mattedi, S., Silva, D. P., Soares, C. M., i Cabrera-Padilla, R. Y. (2017). Protic ionic liquids influence on immobilization of Lipase *Burkholderia cepacia* on hybrid supports. *Journal of Chemical Technology i Biotechnology*, 92(3), 633–641. <https://doi.org/10.1002/jctb.5044>
- Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M., i Fernandez-Lafuente, R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1451–1463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>
- Mehta, A., Guleria, S., Sharma, R., i Gupta, R. (2021). 6—The lipases and their applications with emphasis on food industry. In R. C. Ray (Ed.), *Microbial Biotechnology in Food and Health* (pp. 143–164). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819813-1.00006-2>

- Mendes, A. A., Giordano, R. C., Giordano, R. D. L. C., i De Castro, H. F. (2011). Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 68(1), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.10.002>
- Meng, Y., Li, S., Yuan, H., Zou, D., Liu, Y., Zhu, B., i Li, X. (2015). Effect of lipase addition on hydrolysis and biomethane production of Chinese food waste. *Bioresource Technology*, 179, 452–459. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.015>
- Mensah, R. A., Jo, S. B., Kim, H., Park, S.-M., Patel, K. D., Cho, K. J., Cook, M. T., Kirton, S. B., Hutter, V., Sidney, L. E., Alves-Lima, D., Lin, H., Lee, J.-H., Kim, H.-W., i Chau, D. Y. (2021). The eggshell membrane: A potential biomaterial for corneal wound healing. *Journal of Biomaterials Applications*, 36(5), 912–929. <https://doi.org/10.1177/08853282211024040>
- Mignardi, S., Archilletti, L., Medeghini, L., i De Vito, C. (2020). Valorization of Eggshell Biowaste for Sustainable Environmental Remediation. *Scientific Reports*, 10(1), 2436. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59324-5>
- Ministarstvo poljoprivrede. (2019). *Pravilnik o jestivim uljima i mastima*. Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske.
- Mittal, A., Teotia, M., Soni, R. K., i Mittal, J. (2016). Applications of egg shell and egg shell membrane as adsorbents: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 223, 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2016.08.065>
- Mohan, C. (2003). *Buffers A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*. <http://ir.kib.ac.cn/handle/151853/17037>
- Mohidem, N. A., Mohamad, M., Rashid, M. U., Norizan, M. N., Hamzah, F., i Mat, H. bin. (2023). Recent Advances in Enzyme Immobilisation Strategies: An Overview of Techniques and Composite Carriers. *Journal of Composites Science*, 7(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/jcs7120488>
- Mokhtar, N. F., Abd. Rahman, R. N. Z. R., Muhd Noor, N. D., Mohd Shariff, F., i Mohamad Ali, M. S. (2020). The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method. *Catalysts*, 10(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/catal10070744>

- Moore, M. A., i Akoh, C. C. (2017). Enzymatic Interesterification of Coconut and High Oleic Sunflower Oils for Edible Film Application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(4), 567–576. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-2969-z>
- Mortazavi, S., i Aghaei, H. (2020). Make proper surfaces for immobilization of enzymes: Immobilization of lipase and α -amylase on modified Na-sepiolite. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.103>
- Mulinari, J., Oliveira, J. V., i Hotza, D. (2020). Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials. *Biotechnology Advances*, 42, 107581. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107581>
- Mustranta, A., Forssell, P., i Poutanen, K. (1993). Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in nonaqueous systems. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(2), 133–139. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90037-3](https://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90037-3)
- Nakano, T., Ikawa, N., i Ozimek, L. (2003). Chemical composition of chicken eggshell and shell membranes. *Poultry Science*, 82(3), 510–514. <https://doi.org/10.1093/ps/82.3.510>
- Namaximum—Eggshell Membrane*. (2025). <https://www.namaximum.com/eggshell-membrane/> (13.1.2025.)
- Nawani, N., i Kaur, J. (2000). Purification, characterization and thermostability of lipase from a thermophilic *Bacillus* sp. J33. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 206(1), 91–96. <https://doi.org/10.1023/A:1007047328301>
- Negi, S. (2019). Lipases: A Promising Tool for Food Industry. In B. Parameswaran, S. Varjani, i S. Raveendran (Eds.), *Green Bio-processes: Enzymes in Industrial Food Processing* (pp. 181–198). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-13-3263-0_10
- Nguyen, H. H., i Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157–163. <https://doi.org/10.5757/ASCT.2017.26.6.157>
- Nikolić, M., Srdić, V., i Antov, M. (2009). Immobilization of lipase into mesoporous silica particles by physical adsorption. *Biocatalysis and Biotransformation*, 27(4), 254–262. <https://doi.org/10.1080/10242420903049895>

- Nimkande, V. D., i Bafana, A. (2022). A review on the utility of microbial lipases in wastewater treatment. *Journal of Water Process Engineering*, 46, 102591. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2022.102591>
- Norouzian, D., Akbarzadeh, A., Mirdamadi, S., Khetami, S., i Farhanghi, A. (2007). Immobilization of mushroom tyrosinase by different methods in order to transform L-tyrosine to L-3,4 dihydroxyphenylalanine (L-dopa). *Biotechnology*, 6(3), 436–439.
- Nunes, P. A., Pires-Cabral, P., i Ferreira-Dias, S. (2011). Production of olive oil enriched with medium chain fatty acids catalysed by commercial immobilised lipases. *Food Chemistry*, 127(3), 993–998. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.071>
- Nys, Y., i Gautron, J. (2007). Structure and Formation of the Eggshell. In R. Huopalahti, R. López-Fandiño, M. Anton, i R. Schade (Eds.), *Bioactive Egg Compounds* (pp. 99–102). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-37885-3_15
- Ogino, H., Nakagawa, S., Shinya, K., Muto, T., Fujimura, N., Yasuda, M., i Ishikawa, H. (2000). Purification and characterization of organic solvent-stable lipase from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(5), 451–457. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)89095-7](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)89095-7)
- Ostojčić, M., Budžaki, S., Flanjak, I., Bilić Rajs, B., Barišić, I., Tran, N. N., Hessel, V., i Strelec, I. (2021). Production of biodiesel by *BURKHOLDERIA CEPACIA* lipase as a function of process parameters. *Biotechnology Progress*, 37(2), e3109. <https://doi.org/10.1002/btpr.3109>
- Padilha, G. da S., Santana, J. C. C., Alegre, R. M., i Tambourgi, E. B. (2012). Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55, 7–19. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000100002>
- Paiva, A. L., Balcão, V. M., i Malcata, F. X. (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases☆. *Enzyme and Microbial Technology*, 27(3), 187–204. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00206-4)

- Palacios, D., Busto, M. D., i Ortega, N. (2014). Study of a new spectrophotometric end-point assay for lipase activity determination in aqueous media. *LWT - Food Science and Technology*, 55(2), 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.10.027>
- Park, J.-Y., i Park, K.-M. (2022). Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review. *Journal of Chemistry*, 2022(1), 7609019. <https://doi.org/10.1155/2022/7609019>
- Park, S., Choi, K. S., Lee, D., Kim, D., Lim, K. T., Lee, K.-H., Seonwoo, H., i Kim, J. (2016). Eggshell membrane: Review and impact on engineering. *Biosystems Engineering*, 151, 446–463. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.10.014>
- Peracchi, A. (2018). The Limits of Enzyme Specificity and the Evolution of Metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(12), 984–996. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.09.015>
- Pleiss, J., Fischer, M., i Schmid, R. D. (1998). Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1), 67–80. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(98\)00030-9](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00030-9)
- Prekajski, M. D., Babić, B. M., Bučevac, D., Pantić, J. R., Gulicovski, J. J., Miljković, M., i Matović, B. (2014). Synthesis and characterization of biomorphic CeO₂ obtained by using egg shell membrane as template. *Processing and Application of Ceramics*, 8(2), 81–85. <https://doi.org/10.2298/PAC1402081P>
- Priji, P., Sajith, S., Faisal, P. A., i Benjamin, S. (2016). Microbial Lipases—Properties and Applications. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(2), 799–807.
- Pundir, C., Bhambi, M., i Chauhan, N. (2009). Chemical activation of egg shell membrane for covalent immobilization of enzymes and its evaluation as inert support in urinary oxalate determination. *Talanta*, 77(5), 1688–1693. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.10.004>
- Quilles Junior, J. C., Ferrarezi, A. L., Borges, J. P., Brito, R. R., Gomes, E., da Silva, R., Guisán, J. M., i Boscolo, M. (2016). Hydrophobic adsorption in ionic medium improves the catalytic properties of lipases applied in the triacylglycerol hydrolysis by synergism. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(12), 1933–1943. <https://doi.org/10.1007/s00449-016-1667-9>
- Rajendran, A., Palanisamy, A., i Thangavelu, V. (2009). Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52(1), 207–219.

- Ranjbakhsh, E., Bordbar, A. K., Abbasi, M., Khosropour, A. R., i Shams, E. (2012). Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 179, 272–276.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.10.097>
- Rao, A., Fernández, M. S., Cölfen, H., i Arias, J. L. (2015). Distinct Effects of Avian Egg Derived Anionic Proteoglycans on the Early Stages of Calcium Carbonate Mineralization. *Crystal Growth i Design*, 15(5), 2052–2056. <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b00342>
- Ray, S., Barman, A., Kumar, P., Singh, B., i Kumar, S. (2017). Chicken eggshell powder as dietary calcium source in chocolate cakes. *The Pharma Innovation*, 6(9), 01–04.
- Réhault-Godbert, S., Guyot, N., i Nys, S. (2019). The Golden Egg: Nutritional Value, Bioactivities, and Emerging Benefits for Human Health. *Nutrients*, 11(3), 684.
- Ribeiro, A., Vilarinho, C., Araújo, J., i Carvalho, J. (2015, March 13). *Development of an Integrated Process for Eggshell Valorization*. ASME 2014 International Mechanical Engineering Congress and Exposition. <https://doi.org/10.1115/IMECE2014-38836>
- Ribeiro, G. C. de A., Fernandes, P., i de Assis, S. A. (2018). Production, characterization, and immobilization of inulinase produced by *Pseudozyma* sp. (CCMB 306). *Chemical Engineering Communications*, 205(8), 1060–1068.
<https://doi.org/10.1080/00986445.2018.1430575>
- Rios, N. S., Neto, D. M. A., dos Santos, J. C. S., Fehine, P. B. A., Fernández-Lafuente, R., i Gonçalves, L. R. B. (2019). Comparison of the immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on divinylsulfone or *p*-benzoquinone activated support. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 936–945. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.106>
- Rodríguez-Navarro, A. B., Marie, P., Nys, Y., Hincke, M. T., i Gautron, J. (2015). Amorphous calcium carbonate controls avian eggshell mineralization: A new paradigm for understanding rapid eggshell calcification. *Journal of Structural Biology*, 190(3), 291–303.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.04.014>

- Sachan, S., Iqbal, M. S., i Singh, A. (2018). Extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa* JCM5962(T): Isolation, identification, and characterization. *International Microbiology*, 21(4), 197–205. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0016-z>
- Sadighi, A., Motevalizadeh, S. F., Hosseini, M., Ramazani, A., Gorgannezhad, L., Nadri, H., Deiham, B., Ganjali, M. R., Shafiee, A., Faramarzi, M. A., i Khoobi, M. (2017). Metal-Chelate Immobilization of Lipase onto Polyethylenimine Coated MCM-41 for Apple Flavor Synthesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 182(4), 1371–1389. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2404-9>
- Salleh, S., Serri, N. A., Hena, S., i Tajarudin, H. A. (2016). Preliminary studies on immobilization of lipase using chicken eggshell. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 36, 012026. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/36/1/012026>
- Sánchez, D. A., Tonetto, G. M., i Ferreira, M. L. (2018). Burkholderia cepacia lipase: A versatile catalyst in synthesis reactions. *Biotechnology and Bioengineering*, 115(1), 6–24. <https://doi.org/10.1002/bit.26458>
- Sankaran, R., Show, P. L., i Chang, J.-S. (2016). Biodiesel production using immobilized lipase: Feasibility and challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(6), 896–916. <https://doi.org/10.1002/bbb.1719>
- Sarmah, N., Revathi, D., Sheelu, G., Yamuna Rani, K., Sridhar, S., Mehtab, V., i Sumana, C. (2018). Recent advances on sources and industrial applications of lipases. *Biotechnology Progress*, 34(1), 5–28. <https://doi.org/10.1002/btpr.2581>
- Sharma, A., Bardhan, D., i Patel, R. (2009). Optimization of physical parameters for lipase production from *Arthrobacter* sp. BGCC#490. *IJBB Vol.46(2) [April 2009]*. <http://nopr.niscpr.res.in/handle/123456789/4055>
- Shi, Y., Zhou, K., Li, D., Guyonnet, V., Hincke, M. T., i Mine, Y. (2021). Avian Eggshell Membrane as a Novel Biomaterial: A Review. *Foods*, 10(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/foods10092178>

Sigma aldrich, Acetone, No. 179124. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigald/179124?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec> (13.1.2025.)

Sigma aldrich, Calcium hydroxide, No. 102047. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/102047> (13.1.2025.)

Sigma aldrich, Hydrochloric acid, No. 320331. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigald/320331?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec> (13.1.2025.)

Sigma aldrich, Whatman filter paper, No. WHA1001090. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/wha1001090> (13.1.2025.)

Sigma aldrich, Whatman filter paper, No. WHA1114090. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/wha1114090> (13.1.2025.)

Sigma-aldrich, Amano Lipase from Pseudomonas fluorescens, No. 534730. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/534730> (13.1.2025.)

Sigma-Aldrich, Amano Lipase PS, No. 534641. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/aldrich/534641> (13.1.2025.)

Sigma-aldrich, Calcium chloride. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/substance/calciumchloride1109810043524> (13.1.2025.)

Sigma-aldrich, Calcium chloride dihydrate. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/substance/calciumchloridedihydrate1470110035048>
(13.1.2025.)

Sigma-aldrich, di-Sodium hydrogen phosphate anhydrous, No. 1.06585. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/106585?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec> (13.1.2025.)

Sigma-aldrich, Falcon tube, No. CLS352099. (2025).

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/cls352099> (13.1.2025.)

Sigma-Aldrich, Lipase, immobilized on Immobead 150 from Pseudomonas cepaci, No. 54327. (2025).
<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/sigma/54327?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec> (13.1.2025.)

Sigma-aldrich, Sodium dihydrogen phosphate anhydrous, No. 1.06370. (2025).
<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/106370?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec> (13.1.2025.)

Sigma-aldrich, Tris Base solid, No. 1.08382. (2025).
<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/product/mm/108382?msocid=2c5885d40bb56a9a15d191540ac86bec> (13.1.2025.)

Singh, A. K., Roychoudhury, A., i Jha, S. K. (2016). Reusable Glucose Sensor Based on Enzyme Immobilized Egg-shell Membrane. *Analytical Sciences*, 32(10), 1077–1082.
<https://doi.org/10.2116/analsci.32.1077>

Snyder, T. (2016). *Eggshell membrane separation process* (United States Patent US9370778B2).
<https://patents.google.com/patent/US9370778B2/en>

Statista. (2024). Statista. <https://www.statista.com/statistics/263972/egg-production-worldwide-since-1990/> (19.12.2024.)

Strelec, I., Ostojčić, M., Brekalo, M., Hajra, S., Kim, H.-J., Stanojev, J., Maravić, N., i Budžaki, S. (2023). Transformation of eggshell waste to egg white protein solution, calcium chloride dihydrate, and eggshell membrane powder. *Green Processing and Synthesis*, 12(1), 20228151.
<https://doi.org/10.1515/gps-2022-8151>

Strelec, I., Peranović, K., Ostojčić, M., Aladić, K., Pavlović, H., Djerdj, I., Tatar, D., Maravić, N., Skoko, Ž., i Budžaki, S. (2024). Eggshell waste transformation to calcium chloride anhydride as food-grade additive and eggshell membranes as enzyme immobilization carrier. *Green Processing and Synthesis*, 13(1). <https://doi.org/10.1515/gps-2023-0254>

Strelec, I., Tomičić, K., Zajec, M., Ostojčić, M., i Budžaki, S. (2023). Eggshell-Waste-Derived Calcium Acetate, Calcium Hydrogen Phosphate and Corresponding Eggshell Membranes. *Applied Sciences*, 13(13), 7372. <https://doi.org/10.3390/app13137372>

- Svendsen, A. (2000). Lipase protein engineering. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(2), 223–238. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(00\)00239-9](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(00)00239-9)
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., i Wang, F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, 28(5), 628–634. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.012>
- Tembe, S., Kubal, B. S., Karve, M., i D'Souza, S. F. (2008). Glutaraldehyde activated eggshell membrane for immobilization of tyrosinase from *Amorphophallus companulatus*: Application in construction of electrochemical biosensor for dopamine. *Analytica Chimica Acta*, 612(2), 212–217. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.031>
- Torres-Mansilla, A. C., i Delgado-Mejía, E. (2017). Influence of separation techniques with acid solutions on the composition of eggshell membrane. *International Journal of Poultry Science*, 16, 451–456.
- Torres-Mansilla, A., Hincke, M., Voltes, A., López-Ruiz, E., Baldión, P. A., Marchal, J. A., Álvarez-Lloret, P., i Gómez-Morales, J. (2023). Eggshell Membrane as a Biomaterial for Bone Regeneration. *Polymers*, 15(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/polym15061342>
- Tsai, W. T., Yang, J. M., Lai, C. W., Cheng, Y. H., Lin, C. C., i Yeh, C. W. (2006). Characterization and adsorption properties of eggshells and eggshell membrane. *Bioresource Technology*, 97(3), 488–493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.02.050>
- Uredba (EZ) br. 1069/2009. (2011). Europska komisija, EC.
- Vandeginste, V. (2021). Food waste eggshell valorization through development of new composites: A review. *Sustainable Materials and Technologies*, 29, e00317. <https://doi.org/10.1016/j.susmat.2021.e00317>
- Vemuri, G., Banerjee, R., i Bhattacharyya, B. C. (1998). Immobilization of lipase using egg shell and alginate as carriers: Optimization of reaction conditions. *Bioprocess Engineering*, 19(2), 111–114. <https://doi.org/10.1007/s004490050490>

- Venkaiah, B., i Kumar, A. (1995). A process for the recovery and immobilization of starch phosphorylase from starch-based industrial. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 21(1), 77–85.
- Venkatesagowda, B., Ponugupaty, E., Barbosa-Dekker, A. M., i Dekker, R. F. H. (2018). The Purification and Characterization of Lipases from *Lasiodiplodia theobromae*, and Their Immobilization and Use for Biodiesel Production from Coconut Oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 185(3), 619–640. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2670-6>
- Verma, N., Thakur, S., i Bhatt, A. K. (2012). Microbial lipases: Industrial applications and properties (a review). *International Research Journal of Biological Sciences*, 1(8), 88–92.
- Waheed, M., Butt, M. S., Shehzad, A., Adzahan, N. M., Shabbir, M. A., Rasul Suleria, H. A., i Aadil, R. M. (2019). Eggshell calcium: A cheap alternative to expensive supplements. *Trends in Food Science i Technology*, 91, 219–230. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.021>
- Walton, H. V., Cotterill, O. J., i Vandepopuliere, J. M. (1973). Composition of Shell Waste from Egg Breaking Plants1. *Poultry Science*, 52(5), 1836–1841. <https://doi.org/10.3382/ps.0521836>
- Wang, X., Yu, X., i Xu, Y. (2009). Homologous expression, purification and characterization of a novel high-alkaline and thermal stable lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(2), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.05.004>
- Wangrunroj, N., Soontorntepwarakul, N., Samattai, S., i Tangboriboon, N. (2018). Characteristics on Physical-Chemical-Thermal Properties of Eggshell Membrane for Biomaterial Applications. *Defect and Diffusion Forum*, 382, 342–346. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/DDF.382.342>
- Whole Egg Protein Powder—Namaximum*. (2025). <https://www.namaximum.com/whole-egg-protein-powder/> (13.1.2025.)
- Wrolstad, R. E., Acree, T. E., Decker, E. A., Penner, M. H., Reid, D. S., Schwartz, S. J., Shoemaker, C. F., Smith, D., i Sporns, P. (2004). *Handbook of Food Analytical Chemistry* (1st ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/0471709085>

- Wu, B., Zhang, G., Shuang, S., i Choi, M. M. F. (2004). Biosensors for determination of glucose with glucose oxidase immobilized on an eggshell membrane. *Talanta*, 64(2), 546–553.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.03.050>
- Xiao, D., i Choi, M. M. F. (2002). Aspartame Optical Biosensor with Bienzyme-Immobilized Eggshell Membrane and Oxygen-Sensitive Optode Membrane. *Analytical Chemistry*, 74(4), 863–870.
<https://doi.org/10.1021/ac001097a>
- Xu, L., Cui, G., Ke, C., Fan, Y., i Yan, Y. (2018). Immobilized Burkholderia cepacia Lipase on pH-Responsive Pullulan Derivatives with Improved Enantioselectivity in Chiral Resolution. *Catalysts*, 8(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/catal8010013>
- Yang, H., i Zhang, W. (2019). Surfactant Imprinting Hyperactivated Immobilized Lipase as Efficient Biocatalyst for Biodiesel Production from Waste Cooking Oil. *Catalysts*, 9(11), Article 11.
<https://doi.org/10.3390/catal9110914>
- Yang, J., Guo, D., i Yan, Y. (2007). Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from Burkholderia cepacia strain G63. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 45(3–4), 91–96.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.12.007>
- Yang, Q.-S., Li, S.-W., Zhu, J.-Q., i Li, X. (2019). An Investigation on the Viscoelastic Behavior of Eggshell Membrane by Nanoindentation Technology. *International Journal of Applied Mechanics*, 11(8), 1950078.
- Zaak, H., Fernandez-Lopez, L., Velasco-Lozano, S., Alcaraz-Fructuoso, M. T., Sassi, M., Lopez-Gallego, F., i Fernandez-Lafuente, R. (2017). Effect of high salt concentrations on the stability of immobilized lipases: Dramatic deleterious effects of phosphate anions. *Process Biochemistry*, 62, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.018>
- Zdarta, J., Meyer, A., Jesionowski, T., i Pinelo, M. (2018). A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. *Catalysts*, 8(2), 92.
<https://doi.org/10.3390/catal8020092>

- Zhang, G., Liu, D., Shuang, S., i Choi, M. M. F. (2006a). A homocysteine biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilization platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 936–942. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.08.011>
- Zhang, G., Liu, D., Shuang, S., i Choi, M. M. F. (2006b). A homocysteine biosensor with eggshell membrane as an enzyme immobilization platform. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 936–942. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.08.011>
- Zhang, Y. W., Zhang, L., Hui, T., Guo, X. Y., i Peng, Z. Q. (2015). Influence of partial replacement of NaCl by KCl, l-histidine and l-lysine on the lipase activity and lipid oxidation in dry-cured loin process. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 966–973. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.073>
- Zhang, Y., Wen, G., Zhou, Y., Shuang, S., Dong, C., i Choi, M. M. F. (2007a). Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1791–1797. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.038>
- Zhang, Y., Wen, G., Zhou, Y., Shuang, S., Dong, C., i Choi, M. M. F. (2007b). Development and analytical application of an uric acid biosensor using an uricase-immobilized eggshell membrane. *Biosensors and Bioelectronics*, 22(8), 1791–1797. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.08.038>

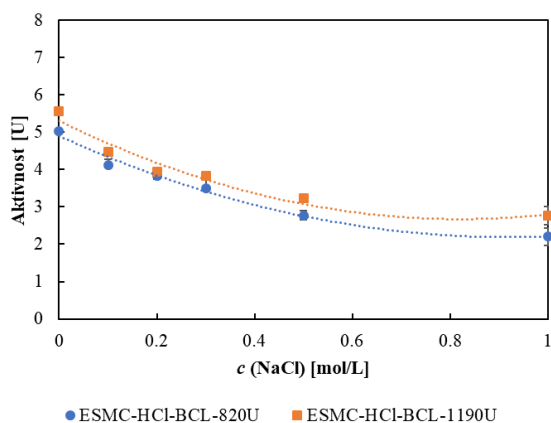
NA
OCJENU

7. ŽIVOTOPIS PRISTUPNICE

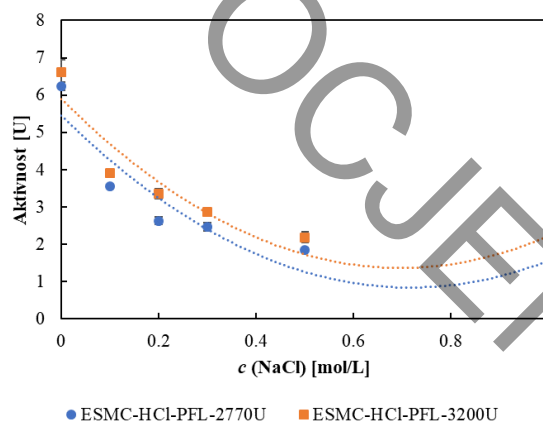
Marta Ostojčić rođena je 16. kolovoza 1994. godine u Puli, Republika Hrvatska. Osnovnu školu završila je u mjestu prebivališta, Donjim Andrijevcima, dok je prirodoslovno-matematički smjer gimnazije završila u Slavonskom Brodu. Godine 2013. upisuje prijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija na Prehrambeno-tehnološkom fakultetu Osijek te u rujnu 2016. godine stječe akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke prehrambene tehnologije. Diplomski studij Procesno inženjerstvo upisuje 2016. godine na istom fakultetu te u travnju 2018. godine stječe akademski naziv magistre inženjerke procesnog inženjerstva. Od 1. lipnja 2018. godine zaposlena je kao asistent na Zavodu za energiju, okoliš i održivi razvoj Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek gdje u svibnju 2019. godine upisuje poslijediplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija i nutricionizam, smjer Prehrambena tehnologija. Do sada je sudjelovala na 16 domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova, bila autor i koautor na devet znanstvenih radova iz skupine A1, četiri znanstvena rada iz skupine A2 i četiri poglavlja u knjizi. Dobitnica je dvije stipendije za izvrsnost te dekanove nagrade za ostvaren najbolji uspjeh tijekom I. godine diplomskog studija. Stručno se usavršavala na Sveučilištima u Mostaru, Beču, Sarajevu, Novom Sadu, Bratislavi, Braunschweigu i Pragu.

ZA OCJENU

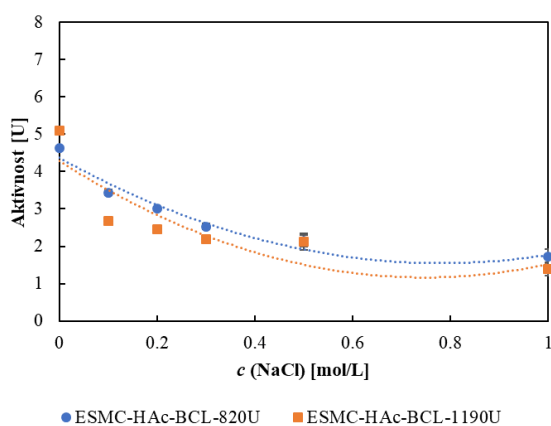
8. PRILOZI



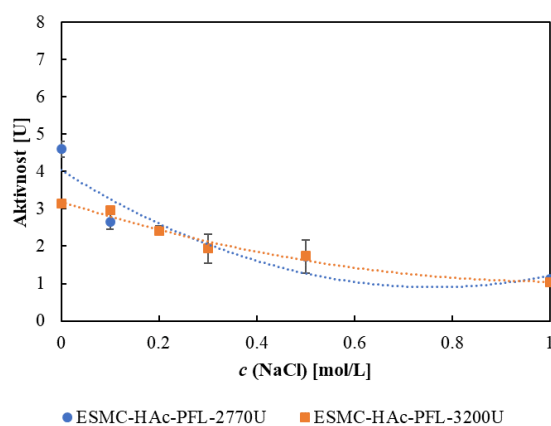
a) ESMC-HCl-BCL



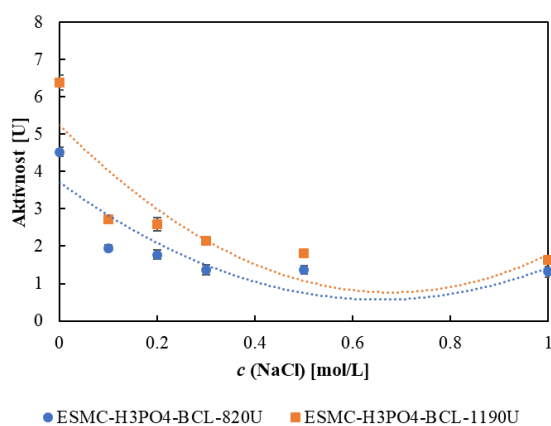
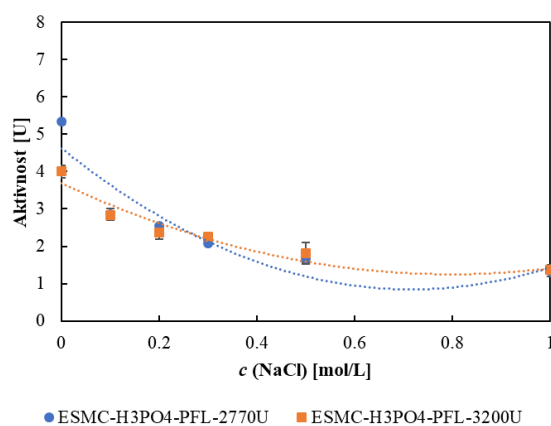
d) ESMC-HCl-PFL



b) ESMC-HAc-BCL

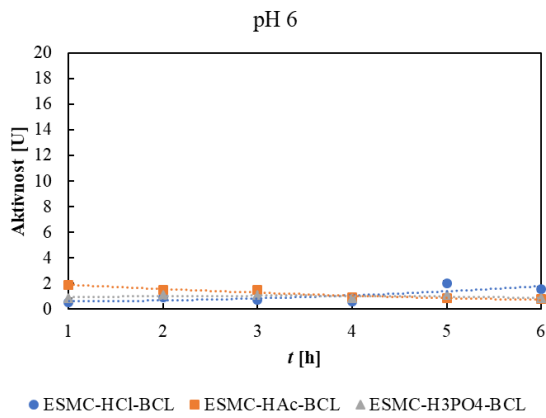


e) ESMC-HAc-PFL

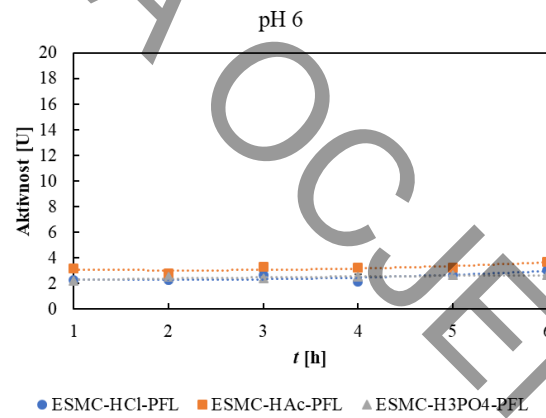
c) ESMC-H₃PO₄-BCLf) ESMC-H₃PO₄-PFL

Prilog 1 Desorpcija lipaza imobiliziranih adsorpcijom – aktivnost lipaze u supernatantu.
 a) ESMC-HCl-BCL, b) ESMC-HAc-BCL, c) ESMC-H₃PO₄-BCL; d) ESMC-HCl-PFL, e)
 ESMC-HAc-PFL, f) ESMC-H₃PO₄-PFL.

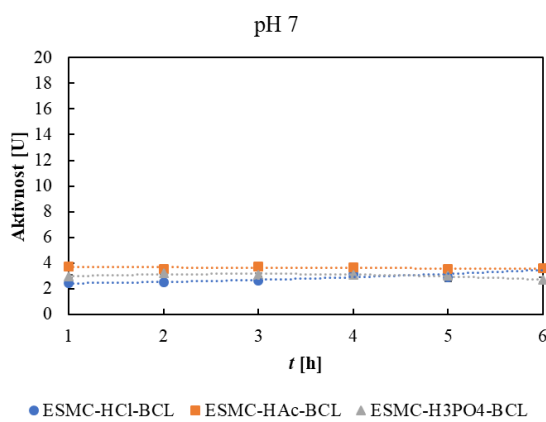
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.



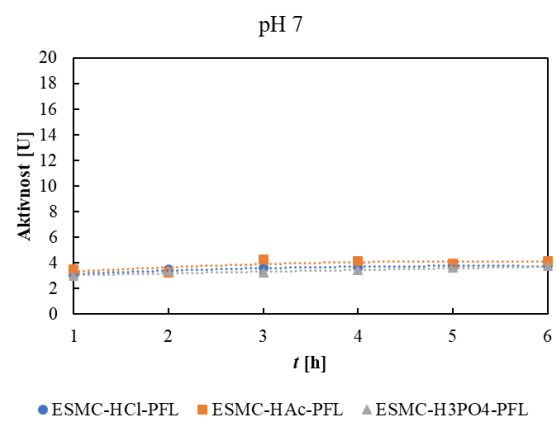
a)



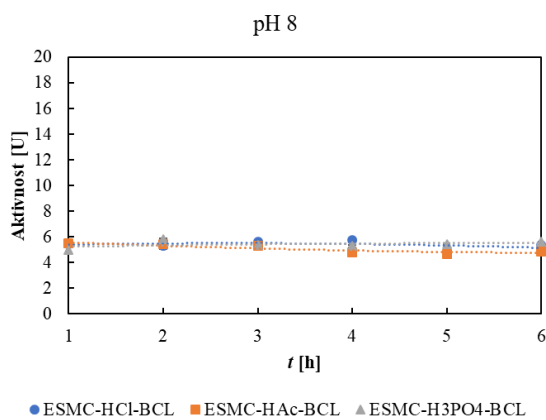
e)



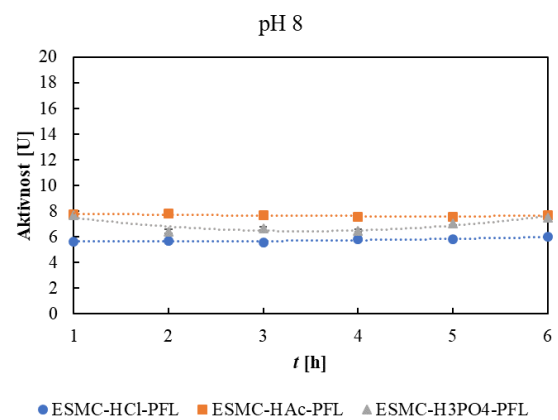
b)



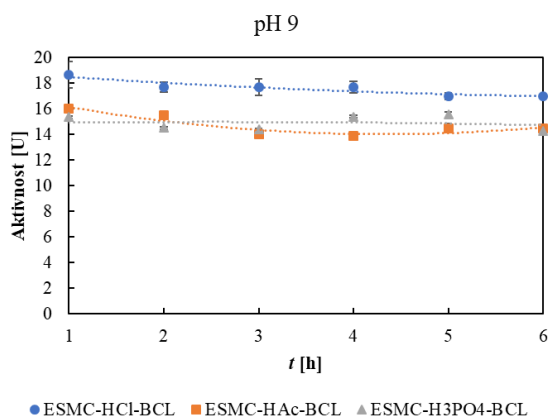
f)



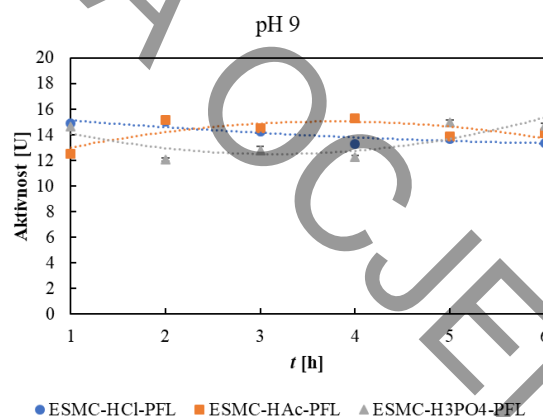
c)



g)



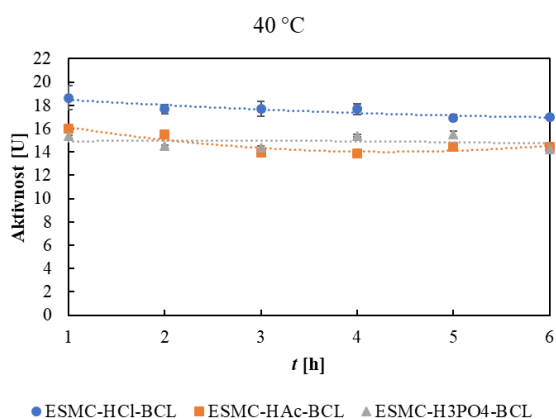
d)



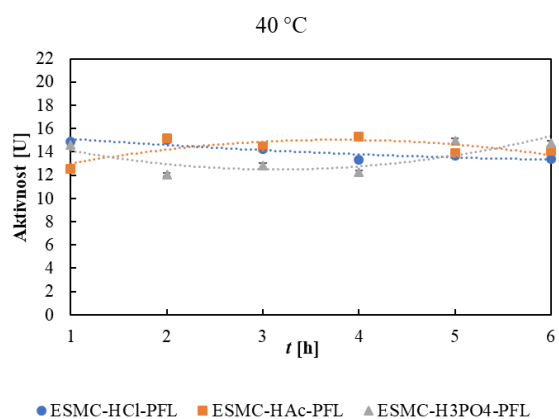
h)

Prilog 2 pH stabilnost lipaza imobiliziranih adsorpcijom – aktivnost lipaze u supernatantu. a) BCL pH 6, b) BCL pH 7, c) BCL pH 8, d) BCL pH 9; e) PFL pH 6, f) PFL pH 7, g) PFL pH 8, h) PFL pH 9.

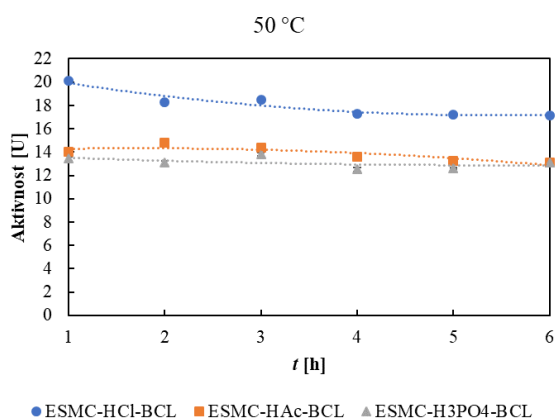
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.



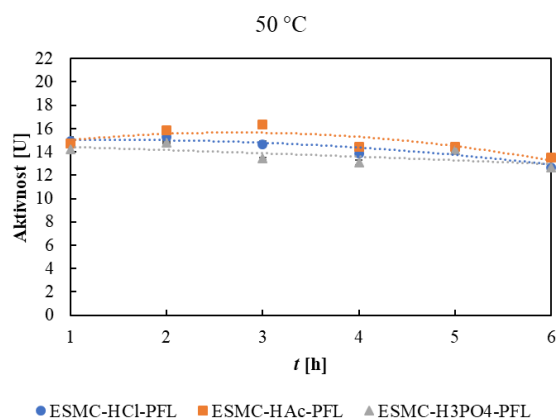
a)



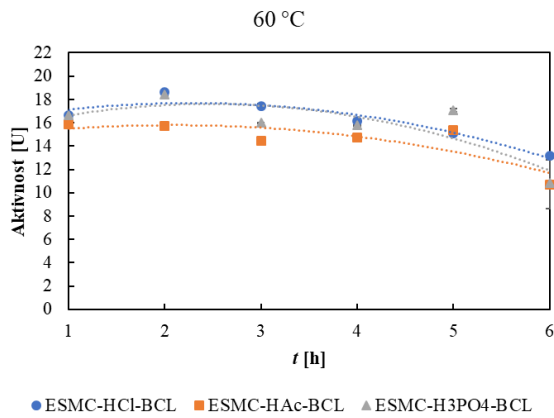
e)



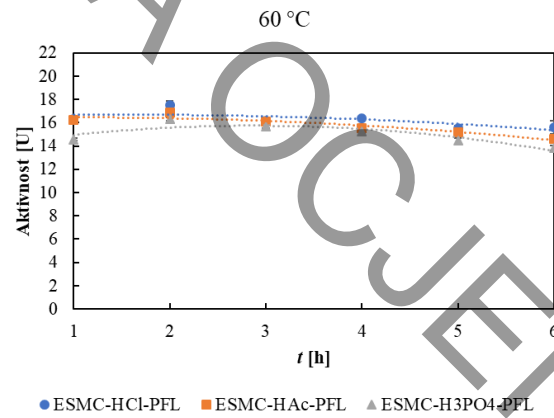
b)



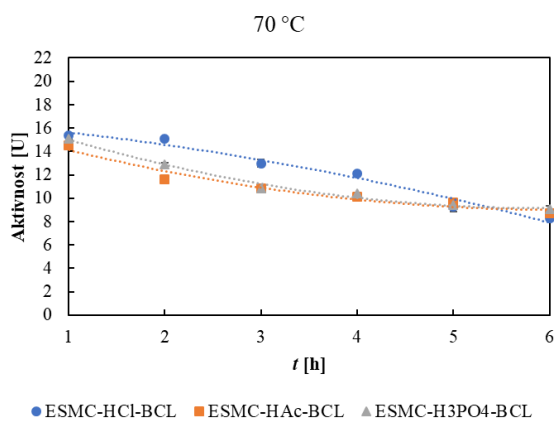
f)



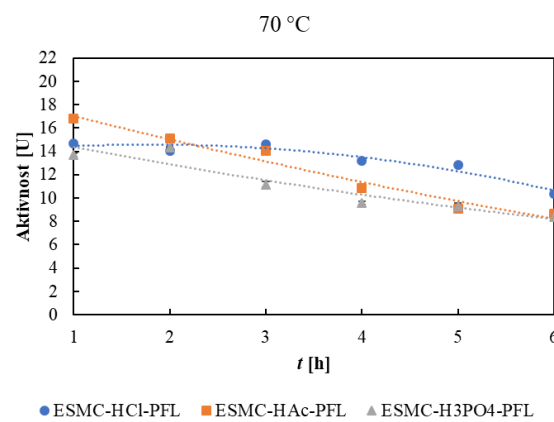
c)



g)



d)

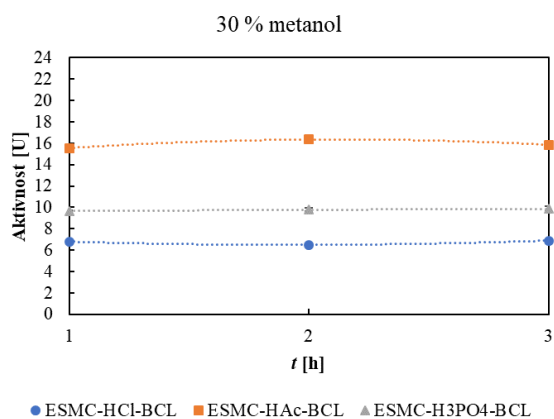


h)

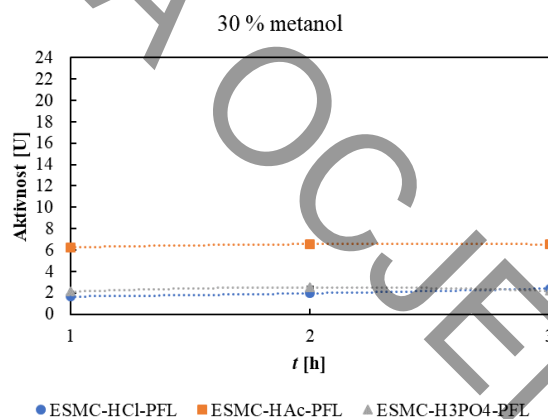
Prilog 3 Temperaturna stabilnost lipaza imobiliziranih adsorpcijom – aktivnost lipaza u supernatantu.

a) BCL 40 °C, b) 50 °C, c) BCL 60 °C, d) BCL 70 °C; e) 40 °C, f) PFL 50 °C, g) PFL 60 °C, h) PFL 70 °C.

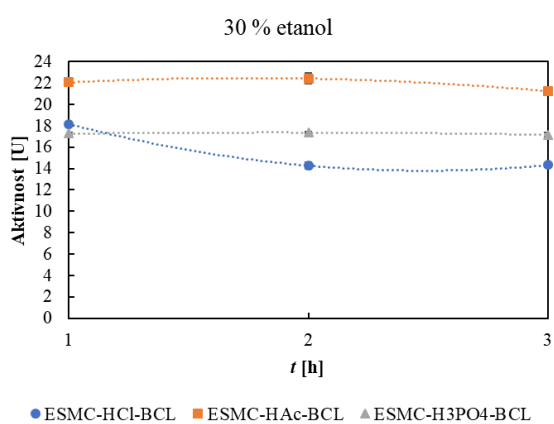
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija tri neovisna određivanja.



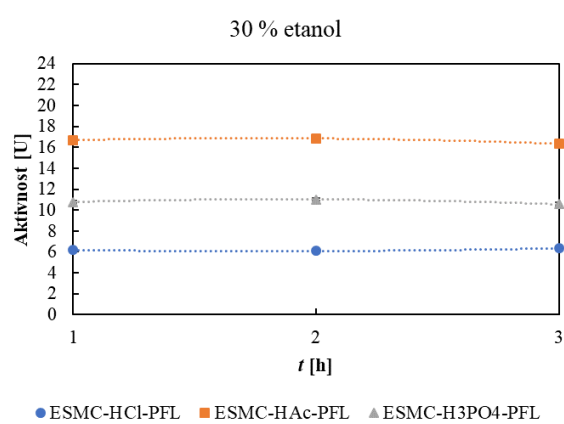
a)



c)



b)



d)

Prilog 4 Stabilnost u organskim otapalima – aktivnost lipaze u supernatantu.

a) BCL u metanolu, b) BCL u etanolu; c) PFL u metanolu, d) PFL u etanolu.

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija tri neovisna određivanja.

Prilog 5 Pregled znanstvenih radova i poglavlja u knjigama objavljenih iz teme doktorske disertacije

RESEARCH ARTICLE

Production of biodiesel by *Burkholderia cepacia* lipase as a function of process parameters

Marta Ostožčić¹ | Sandra Budžaki¹  | Ivana Flanjak¹ | Blanka Bilić Rajs¹ | Iva Barišić¹ | Nghiep Nam Tran² | Volker Hessel² | Ivica Strelec¹

¹Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Osijek, Croatia

²School of Chemical Engineering and Advanced Materials, The University of Adelaide, Adelaide, Australia

Correspondence

Sandra Budžaki, Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 18, Osijek HR-31000, Croatia.

Email: sandra.budzaki@ptfos.hr

Abstract

Despite the already established route of chemically catalyzed transesterification reaction in biodiesel production, due to some of its shortcomings, biocatalysts such as lipases present a vital alternative. Namely, it was noticed that one of the key shortcomings for the optimization of the enzyme catalyzed biodiesel synthesis process is the information on the lipase activity in the reaction mixture. In addition to making optimization difficult, it also makes it impossible to compare the results of the independent research. This article shows how lipase intended for use in biodiesel synthesis can be easily and accurately characterized and what is the enzyme concentration that enables achievement of the desired level of fatty acid methyl esters (FAME) in the final product mixture. Therefore, this study investigated the effect of two different activity loads of *Burkholderia cepacia* lipase on the biodiesel synthesis varying the pH and temperature optimal for lipase activity. The optimal lipase pH and temperature were determined by two different enzyme assays: spectrophotometric and titrimetric. The *B. cepacia* lipase pH optimum differentiated between assays, while the lipase optimally hydrolyzed substrates at 50°C. The analysis of FAME during 24 hr of biodiesel synthesis, at two different enzyme concentrations, pH 7, 8, and 10, and using two different buffers, revealed that the transesterification reaction at optimal pH, 1 hr reaction time and lipase activity load of 250 U per gram of reaction mixture was sufficient to produce more than 99% FAME.

KEYWORDS

biodiesel, *Burkholderia cepacia* lipase, pH optimum, substrate specificity, temperature optimum

1 | INTRODUCTION

Given that the field of biofuels and thus biodiesel is one of the fastest growing research areas in the last few decades, a huge research activity has been evolved.^{1–8} One of the most adopted biodiesel production processes is the chemically catalyzed transesterification reaction during which a mixture of fatty acid methyl esters (FAME) (biodiesel) and glycerol is formed from triacylglycerol and methanol with NaOH as a catalyst. However, in such catalyzed transesterification, some unwanted compounds are formed as products of side reactions (e.g., soaps) which need to be removed from the final product, increasing the cost of the whole production process and subsequently the

product itself, biodiesel.^{1,8} A solution, or at least part of the solution, lies in the introduction of biocatalysts such as the enzyme lipase in the process of transesterification as a catalyst.^{1,2,4,8}

In the abundance of published papers in the period 2008–2020, it can be observed that one of the key shortcomings for optimizing the process of biocatalytic synthesis of biodiesel is the information about the activity of lipase added to the reaction mixture. These data are very important for the possibility of assessing the cost-effectiveness of the process of enzymatic synthesis of biodiesel with the aim of research, development and commercialization of biocatalytic biodiesel synthesis. However, there is only few research which fills the knowledge gap on the effect of lipase concentration on FAME production.

Research Article

Ivica Strelec, Katarina Peranović, Marta Ostojčić, Krunoslav Aladić, Hrvoje Pavlović, Igor Djerdj, Dalibor Tatar, Nikola Maravić, Željko Skoko, and Sandra Budžaki*

Eggshell waste transformation to calcium chloride anhydride as food-grade additive and eggshell membranes as enzyme immobilization carrier

<https://doi.org/10.1515/gps-2023-0254>

received December 15, 2023; accepted April 18, 2024

Abstract: In continuation of our efforts to fully utilize eggshell waste (ESW), here we report the possibility of ESW transformation to calcium chloride (CaCl_2) anhydride of food-grade additive purity and eggshell membranes (ESMs) as potential enzyme immobilization carriers. ESW chemical transformation by 5% (w/v) hydrochloric acid to CaCl_2 solution and ESM completely devoid of the remnants of ESW calcium carbonate was performed in the constructed 15 L batch reactor during 4 h at room temperature, followed by separation of ESM from CaCl_2 solution by filtration. ESW-derived CaCl_2 solution containing the excess hydrochloric acid was neutralized by adding calcium hydroxide, concentrated to approximately 1/8th of volume, and spray dried. Separated ESM was washed with water and acetone, dried, and ground to a size of less than 0.5 mm. The ESW transformation process produced 102.42 ± 3.31 g of CaCl_2 anhydrous and 2.48 ± 0.28 g of ESM per 100 g of ESW dry matter. ESW-derived CaCl_2 fulfilled all criteria for food-grade additive,

while obtained ESM showed their suitability for *Burkholderia cepacia* lipase immobilization by adsorption.

Keywords: eggshell waste utilization, hydrochloric acid treatment, calcium chloride anhydride, eggshell membranes, lipase immobilization

1 Introduction

Calcium chloride (CaCl_2) is an inorganic salt of calcium and chlorine, registered in the European Union (EU) under the Regulation on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH), whose manufacturing and/or import to the European Economic Area comprise about 100,000 tons annually [1]. It has been used in road deicing, dust control, road stabilization, concrete curing, oil well drilling, tire ballasting, for the production of washing and cleaning products, anti-freeze products, fertilizers, plant protection products, adsorbents, water treatment chemicals, and heat transfer fluids, as well as food-grade additive [2–5].

Currently, the industrial production of CaCl_2 is based on three different processes: (a) hydrochloric acid treatment of limestone as the dominant one, where CaCl_2 is produced by chemical reaction between limestone calcium carbonate and hydrochloric acid; (b) Solvay process where the reaction between sodium chloride and calcium carbonate in the presence of ammonia as the catalyst results with sodium carbonate as the main product and CaCl_2 as a by-product of the chemical reaction; and by (c) purification of naturally occurring brine CaCl_2 (such as those one present in salt lakes) [2–5].

Besides limestone, which is a natural and geologically created deposit of calcium carbonate in the form of calcite crystals, another natural form of calcite crystal is the eggshell [6], accounting for the major part of eggshell waste

* **Corresponding author: Sandra Budžaki**, Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia, e-mail: sandra.budzaki@ptfos.hr

Ivica Strelec, Katarina Peranović, Marta Ostojčić, Krunoslav Aladić, Hrvoje Pavlović: Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia

Igor Djerdj, Dalibor Tatar: Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Cara Hadrijana 8/a, 31000 Osijek, Croatia

Nikola Maravić: Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia

Željko Skoko: Department of Physics, Faculty of Science, University of Zagreb, Bijenička c. 32, 10000 Zagreb, Croatia

Article

Eggshell-Waste-Derived Calcium Acetate, Calcium Hydrogen Phosphate and Corresponding Eggshell Membranes

Ivica Strelec ^{*}, Klara Tomičić, Marko Zajec, Marta Ostojčić and Sandra Budžaki 

Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia; tomicic.klara@gmail.com (K.T.); marko.zajec96@gmail.com (M.Z.); marta.ostojcic@ptfos.hr (M.O.); sandra.budzaki@ptfos.hr (S.B.)

* Correspondence: ivica.strelec@ptfos.hr

Featured Application: Calcium acetate monohydrate and calcium hydrogen phosphate anhydrous of food-grade additive purity, as well as corresponding eggshell membranes as a valuable by-product, has been produced from eggshell waste by commonly used industrial processes which might be easily transferable on the industrial scale level.

Abstract: The development of innovative transformation techniques for various wastes generated by the agri-food industry is one of the goals of sustainable waste management oriented toward “zero-waste” approach. This includes the production of bulk and fine chemicals, bioactive compounds, enzymes and functional materials from various waste. The present research shows the possibility of the production of value-added products from eggshell waste using chemical transformation by acetic and *o*-phosphoric acid at a laboratory scale level. Eggshell-derived calcium acetate monohydrate and calcium hydrogen phosphate, both of high purity, as well as corresponding eggshell membranes as valuable by-products, were produced. Chemical transformation of 100 g of eggshell waste with 10% (*w/v*) acetic acid resulted in 111.41 ± 2.13 g of calcium acetate monohydrate and 2.90 ± 0.14 g of eggshell membranes, with a chemical yield in calcium acetate monohydrate of $79.16 \pm 1.98\%$. On the other hand, the transformation of 100 g of eggshell waste in 15% (*w/v*) *o*-phosphoric acid yielded 77.06 ± 6.21 g of calcium hydrogen phosphate and 2.94 ± 0.08 g of eggshell membranes, with a chemical yield in calcium hydrogen phosphate of $71.36 \pm 5.58\%$. Eggshell-derived calcium hydrogen phosphate met all prescribed criteria for food-grade additive, as determined by physicochemical analysis. On the other hand, calcium acetate monohydrate met the majority, except water insoluble and formic acid and oxidizable impurities content. Based on the obtained results, it can be concluded that the proposed eggshell waste transformation process by two different acids might be useful for the production of calcium acetate and calcium hydrogen phosphate as food-grade additives, as well as eggshell membranes as valuable by-products.



Citation: Strelec, I.; Tomičić, K.; Zajec, M.; Ostojčić, M.; Budžaki, S. Eggshell-Waste-Derived Calcium Acetate, Calcium Hydrogen Phosphate and Corresponding Eggshell Membranes. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 7372. <https://doi.org/10.3390/app13137372>

Academic Editor: Lorenzo Favaro

Received: 15 May 2023

Revised: 9 June 2023

Accepted: 15 June 2023

Published: 21 June 2023

Keywords: eggshell waste utilization; acid treatment; calcium acetate; calcium hydrogen phosphate; eggshell membranes



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Huge amounts of eggshell waste (ESW) have been produced worldwide annually, but the majority of it unfortunately ends up in landfills, presenting a significant ecological burden, as well as a potential biohazard [1–4]. This is quite surprising since numerous scientific reports and patents [3,5–16] clearly show the multiple usage possibilities of ESW. Regardless of the fact that ESW may be used to produce low-value added products, such as fertilizers or food for pets and animals, or to produce single value-added products, there is still a multitude of possibilities for ESW utilization, especially those oriented toward the production of high value-added products approaching the “zero-waste” model.

Research Article

Ivica Strelec, Marta Ostojčić, Mirna Brekalo, Sugato Hajra, Hoe-Joon Kim, Jovana Stanojev, Nikola Maravić, and Sandra Budžaki*

Transformation of eggshell waste to egg white protein solution, calcium chloride dihydrate, and eggshell membrane powder

<https://doi.org/10.1515/gps-2022-8151>

received December 21, 2022; accepted April 13, 2023

Abstract: The present study investigated the possibility of complete utilization of eggshell waste (ESW) transforming it to adherent egg white protein solution, calcium chloride dihydrate, and eggshell membranes (ESM). Adherent egg white protein solution was obtained by washing ESW three times with distilled water at 25°C, followed by filtration, and analyzed for the protein content and lysozyme activity. ESM and calcium chloride were obtained simultaneously by the exposure of washed eggshells to 5% hydrochloric acid treatment at 25°C for 3 h, followed by separation by filtration. The separated ESM were washed, dried, and milled to powder and analyzed for protein and lipid content. The

calcium chloride solution was exposed to the neutralization of excess hydrochloric acid by calcium hydroxide, followed by evaporation to one-tenth of volume. Calcium chloride crystals were precipitated from the concentrated solution with acetone, separated by filtration, dried at 110°C, and analyzed for chemical composition and purity. The obtained results revealed that 100 g of ESW can be transformed to 1.61 ± 0.34 g of adherent white proteins containing 485,821 U of lysozyme activity, 2.84 ± 0.16 g of ESM powder, and 108.74 ± 3.62 g of calcium chloride dihydrate of high purity.

Keywords: eggshell waste utilization, adherent egg white proteins, eggshell membranes, calcium chloride, lysozyme

* **Corresponding author: Sandra Budžaki**, Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia, e-mail: sandra.budzaki@ptfos.hr

Ivica Strelec: Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia, e-mail: ivica.strelec@ptfos.hr

Marta Ostojčić: Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia, e-mail: marta.ostojcic@ptfos.hr

Mirna Brekalo: Faculty of Food Technology Osijek, University of Osijek, Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Croatia, e-mail: mirna.brekalo@ptfos.hr

Sugato Hajra: Department of Robotics and Mechatronics Engineering, Daegu Gyeongbuk Institute of Science & Technology (DGIST), Daegu 42988, Republic of Korea, e-mail: sugatohajra@dgist.ac.kr

Hoe-Joon Kim: Department of Robotics and Mechatronics Engineering, Daegu Gyeongbuk Institute of Science & Technology (DGIST), Daegu 42988, Republic of Korea, e-mail: joonkim@dgist.ac.kr

Jovana Stanojev: BioSense Institute, University of Novi Sad, Dr Zorana Đinđića 1, 21000 Novi Sad, Serbia, e-mail: jovana.stanojev@biosense.rs

Nikola Maravić: Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia, e-mail: maravic@uns.ac.rs





1 Introduction

One of the greatest problems worldwide is the enormous accumulation of waste of all kinds, and among them are those from the agri-food industry whose accelerated development caused by exponential population growth and concomitant increased demand for food, results in the generation of large amounts of waste. However, agri-food industry waste is not just a waste that can be simply discarded, since it presents a source of high-value biocomponents that can be used as secondary raw materials for the production of various high-value-added products such as chemicals, fine chemicals, nutraceuticals, pharmaceuticals, enzymes, etc. [1–3]. However, the implementation of the proposed waste management models is still not efficient in terms of significantly reducing the amount of waste generated in the agri-food industry. The reason for this lies in the fact that different ways of waste utilization are still far from the “zero waste” model, which is the main challenge of sustainable waste management and the foundation of the circular bio-economy.

Among the various wastes produced in the agri-food industry, eggshell waste (ESW) is prominent. A total of 1,141 scientific papers related to the possibilities of using

Review

Waste Management in the Agri-Food Industry: The Conversion of Eggshells, Spent Coffee Grounds, and Brown Onion Skins into Carriers for Lipase Immobilization

Sandra Budžaki ^{1,*} , Natalija Velić ¹, Marta Ostojčić ¹, Marija Stjepanović ¹ , Blanka Bilić Rajs ¹, Zita Šereš ², Nikola Maravić ², Jovana Stanojević ³, Volker Hessel ⁴  and Ivica Strelec ¹ 

- ¹ Faculty of Food Technology Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Croatia; nvelic@ptfos.hr (N.V.); mostojcic@ptfos.hr (M.O.); marija.nujic@ptfos.hr (M.S.); blanka.bilic@ptfos.hr (B.B.R.); ivica.strelec@ptfos.hr (I.S.)
- ² Faculty of Technology Novi Sad, University of Novi Sad, Bulevar Cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Serbia; zita.seres@uns.ac.rs (Z.Š.); maravic@uns.ac.rs (N.M.)
- ³ BioSense Institute, University of Novi Sad, Dr Zorana Djindjica 1, 21000 Novi Sad, Serbia; jovana.stanojevi@biosense.rs
- ⁴ School of Chemical Engineering and Advanced Materials, North Terrace Campus, The University of Adelaide, Adelaide 5005, Australia; volker.hessel@adelaide.edu.au
- * Correspondence: sandra.budzaki@ptfos.hr



Citation: Budžaki, S.; Velić, N.; Ostojčić, M.; Stjepanović, M.; Rajs, B.B.; Šereš, Z.; Maravić, N.; Stanojević, J.; Hessel, V.; Strelec, I. Waste Management in the Agri-Food Industry: The Conversion of Eggshells, Spent Coffee Grounds, and Brown Onion Skins into Carriers for Lipase Immobilization. *Foods* **2022**, *11*, 409. <https://doi.org/10.3390/foods11030409>

Academic Editor: Remedios Yáñez

Received: 9 January 2022

Accepted: 28 January 2022

Published: 30 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: One of the major challenges in sustainable waste management in the agri-food industry following the “zero waste” model is the application of the circular economy strategy, including the development of innovative waste utilization techniques. The conversion of agri-food waste into carriers for the immobilization of enzymes is one such technique. Replacing chemical catalysts with immobilized enzymes (i.e., immobilized/heterogeneous biocatalysts) could help reduce the energy efficiency and environmental sustainability problems of existing chemically catalysed processes. On the other hand, the economics of the process strongly depend on the price of the immobilized enzyme. The conversion of agricultural and food wastes into low-cost enzyme carriers could lead to the development of immobilized enzymes with desirable operating characteristics and subsequently lower the price of immobilized enzymes for use in biocatalytic production. In this context, this review provides insight into the possibilities of reusing food industry wastes, namely, eggshells, coffee grounds, and brown onion skins, as carriers for lipase immobilization.

Keywords: eggshells; spent coffee grounds; brown onion skins; conversion techniques; enzyme immobilization

1. Introduction

The development of a new generation of immobilized (heterogeneous) biocatalysts is a priority in line with the growing interest in industrial products obtained in a healthy and sustainable way [1], regardless of the following product groups: food, chemicals (biofuels), or pharmaceuticals. Indeed, it is expected that new and/or improved existing technologies will be needed in the coming decades to follow the trend towards sustainable production and to allow better utilization of waste from the agri-food industry, for which all fossil reserves are still exploited today. Selected recent studies presented in this review confirm that there is no lack of potential for the above-mentioned topic. Replacing chemical catalysts with biocatalysts, and particularly immobilized (heterogeneous) ones, can address outstanding issues of energy efficiency, environmental friendliness, and cost-effectiveness of the process.

The study on the life cycle assessment of biodiesel production in relation to the use of different catalysts shows that the negative environmental impact of biodiesel production decreases when heterogeneous biocatalysts (immobilized lipases) are used compared to the use of chemical catalysts or homogeneous biocatalysts, mainly due to their repeated

U: Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda
prehrambene industrije – Knjiga 3.

ISBN: ??

Urednici: Drago Šubarić
Borislav Miličević

©2021 Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku,
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Poglavlje 12

TRANSFORMACIJA LJUSKE KOKOŠJIH JAJA U PROIZVODE DODANE VRIJEDNOSTI

Ivica Strelec*, Marta Ostojčić, Sandra Budžaki

*Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
Franje Kuhača 18, 31000 Osijek, Hrvatska, *ivica.strelec@ptfos.hr*

SAŽETAK

Ljuska kokošjih jaja ostatak je prvenstveno poljoprivredne proizvodnje, obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava i obrta, ali isto tako i restorana i domaćinstava, koji s obzirom na kemijski sastav predstavlja nadasve vrijednu sirovinu za proizvodnju niza različitih proizvoda dodane vrijednosti. U ovom će se poglavlju zainteresirane upoznati sa svim aspektima vezanim uz mogućnost pretvorbe ljuske jaja u proizvode dodane vrijednosti, počevši s podacima o godišnje nastalim količinama, detaljnim kemijskim sastavom ljuske jaja i njenih pojedinih strukturnih dijelova, zakonskim aktima i podaktima koji reguliraju njenu uporabu/iskorištenje te višestrukim mogućnostima transformacije u paletu čitavog niza proizvoda dodane vrijednosti.

Ključne riječi: ljuska kokošjih jaja, uporaba, membrane jaja, kalcificirani matriks, visokovrijedni proteini

UVOD

Ljuska kokošjih jaja otpad je poljoprivredno-prehrambene, farmaceutske i biotehnološke industrije, određenih obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava i obrta, ali isto tako i restorana i domaćinstava, čija se ukupna godišnje nastala količina može procijeniti na temelju podataka o ukupnoj masi proizvedenih kokošjih jaja te činjenice da ljuska jaja čini 10 – 11 % ukupne mase jaja (Mignardi i sur., 2020.). Prema podacima Organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO), u 2018. godini u svijetu ukupno je proizvedeno 78.949.623 t

U: Neke mogućnosti iskorištenja nusproizvoda
prehrambene industrije – Knjiga 5.

ISBN: 978-953-7005-97-9

Urednici: Drago Šubarić
Midhat Jašić
Stela Jokić

©2024 Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku,
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek

Poglavlje 19

LIZOZIM IZ BJELANJKA JAJETA I NJEGOVA PRIMJENA U PREHRAMBENOJ INDUSTRIJI

Marta Ostožić*, Marija Stjepanović, Mirna Brekalo, Ivica Strelec, Sandra Budžaki,
Drago Šubarić

*Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek,
Franje Kuhača 18, 31 000 Osijek, Hrvatska, *marta.ostojcic@ptfos.hr*

SAŽETAK

Ljuska kokošjih jaja nastaje kao otpad industrije, restorana i kućanstava; s jedne strane predstavlja opterećenje okoliša, a s druge strane ogroman potencijal za daljnje korištenje. Među ostalim prednostima, prijanjajući sloj bjelanjka čini 10 – 15 % mase otpadne ljuske jajeta, a s obzirom na to da sadrži oko 11 % proteina koristi se kao sirovina za proizvodnju pročišćenih proteina, između kojih i lizozima, čiji prosječni udio u ukupnim proteinima bjelanjka jajeta iznosi oko 3,5 %. Lizozim je enzim iz podskupine glikozidaza koji hidrolizira β -vezu između *N*-acetilmuraminske kiseline i *N*-acetilglukozamina peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterija i na taj način sprječava njihovo razmnožavanje. Upravo zbog toga Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) i mnoge zemlje dopuštaju upotrebu lizozima u određenim prehrambenim proizvodima u obliku aditiva (E1105) s osnovnim tehnološko-funkcionalnim djelovanjem konzervansa. Najvažnija upotreba lizozima u prehrambenoj industriji u proizvodnji je vina i piva gdje ograničava proliferaciju bakterija mliječne kiseline te za inhibiciju rasta bakterija razreda *Clostridia* tijekom sazrijevanja sira, dok se još može koristiti i za kontroliranje pojave toksina, ali i za povećanje dugotrajnosti proizvoda. Ako se u obzir uzme da je najvažniji izvor lizozima kao aditiva za industrijsku upotrebu upravo bjelanjak jajeta te da su kokošja jaja mogući izvor alergena za određenu populaciju ljudi, sve su veće potrebe za njegovom kontrolom i isticanjem na deklaraciji proizvoda. Cilj ovog poglavlja jest dati pregled izolacije lizozima iz (prijanjućeg sloja) bjelanjka otpadne ljuske kokošjih jaja, opisati njegovu primjenu u prehrambenoj industriji, kao i moguću problematiku, uz metode detekcije i kvantifikacije.