

Primjena umjetne inteligencije u predviđanju i optimiranju sastava vodenih dvofaznih sustava za ekstrakciju enzima

Ana Jurinjak Tušek¹, Renata Vičević², Nera Bebek², Anita Šalić²,
Bruno Zelić^{2,3}

¹Sveučilište u Zagrebu Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Pierottijeva ulica 6, 10000 Zagreb

²Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Trg Marka Marulića 19, 10000 Zagreb

³Sveučilište Sjever, Trg Žarka Dolinara 1, 48000 Koprivnica

Sažetak: Napredak u razvoju niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. Deep Eutectic Solvent, DES) i njihovoj primjeni u vodenim dvofaznim sustavima (engl. Aqueous Two-Phase System, ATPS) otvorio je nova područja istraživanja u selektivnoj ekstrakciji biomolekula, osobito enzima. Zbog velikog broja mogućih kombinacija sastava, fizikalno-kemijskih svojstava i procesnih uvjeta, eksperimentalna optimizacija ATPS temeljenih na DES često je dugotrajna i zahtjevna za provedbu. U posljednje vrijeme se umjetna inteligencija (engl. Artificial Intelligence, AI) i napredni matematički modeli sve više koriste kao podrška razumijevanju i predviđanju ponašanja kompleksnih ekstrakcijskih sustava, uključujući ATPS. U ovom radu prikazani su razvoj i primjena suvremenih AI modela, uključujući strojno učenje, nelinearne regresijske modele i metode dubokog učenja, za predviđanje učinkovitosti ekstrakcije i očuvanja enzimske aktivnosti u DES nakon ekstrakcije. Pri tome je naglasak dan na potencijal AI-podržanog modeliranja u dizajnu selektivnih, održivih i ekonomičnih ekstrakcijskih sustava.

Ključne riječi: umjetna inteligencija, ATPS temeljen na DES, ekstrakcija enzima, strojno učenje

1. Uvod

Ekstrakcija je jedan od ključnih separacijskih procesa koji se temelji na potpunom ili djelomičnom odjeljivanju tvari iz smjese pomoću otapala. Provodi se na temelju različite topljivosti tvari u otapalima koja se međusobno ne miješaju. Prema agregatnom stanju faza, procesi ekstrakcije dijele se na ekstrakciju kapljevinakrutina, plin-kapljevinak i kapljevinakapljevinak. Konvencionalne metode separacije ekstrakcijom kaplje-

vina-kapljevina imaju niz nedostataka kao što su velika potrošnja energije te upotreba organskih otapala koja mogu biti toksična, štetna za okoliš i nisu biorazgradiva [1].

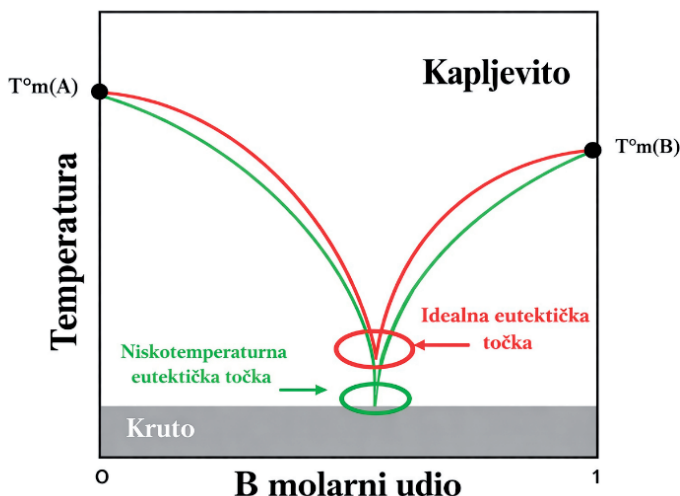
Kao potencijalno rješenje tih problema sve više se primjenjuju vodeni dvofazni sustavi (engl. *Aqueous Two-Phase System*, ATPS) koji nastaju miješanjem dviju kapljevi- na sličnih fizikalno-kemijskih svojstava koje zajedno ne tvore jednu homogenu fazu, već formiraju dvije kapljevite faze. Zbog tog svojstva, ATPS su jedan od primjera ekstrakcije kapljevina-kapljevina [2]. Za njihovo formiranje mogu se koristiti i zelena otapala poput niskotemperaturnih eutektičkih otapala (engl. *Deep Eutectic Solvent*, DES). Primjena ATPS-a u separacijskim procesima pokazala se opravdanom alternativom konvencionalnim metodama ekstrakcije zbog niže potrošnje energije tijekom provedbe procesa, manjih troškova, veće selektivnosti i njihove biorazgradivosti. Također, prilikom ekstrakcije prirodnih spojeva, kakvi su primjerice enzimi, potrebni su blagi separacijski uvjeti kako bi se spriječio gubitak njihove aktivnosti. ATPS se većinom sastoje od vode, polimera i soli te oponašaju prirodno stanično okruženje za enzime, što produljuje njihovu aktivnost [3].

1.1 Niskotemperaturna eutektička otapala

DES-ovi se definiraju kao eutektičke smjese Lewisovih i/ili Brønstedovih kiselina i baza koje mogu sadržavati različite anionske i/ili kationske vrste. Takve smjese karakterizira znatno niže talište u odnosu na pojedinačne komponente, a snižavanje tališta posljedica je snažnih međumolekulskih interakcija između početnih komponenti. U pravilu jedna komponenta djeluje kao donor protona (engl. *Hydrogen Bond Donor*, HBD), dok druga preuzima ulogu akceptora (engl. *Hydrogen Bond Acceptor*, HBA) [4, 5]. DES-ovi se najčešće dobivaju kompleksiranjem kvaterne amonijeve soli s metalnom soli ili donatorom vodikove veze [6]. U kontekstu zelenih otapala, ionske kapljevine i DES-ovi ubrajaju se među najperspektivnija zelena otapala. Iako dijele slična fizikalno-kemijska svojstva, poput niske hlapljivosti, povišene viskoznosti, dobre kemijske i toplinske stabilnosti te nezapaljivosti, DES-ovi se od ionskih kapljevi- na razlikuju po tome što nisu nužno u potpunosti ionske prirode te se mogu pripremiti i iz neionskih spojeva. Osim toga, u odnosu na ionske kapljevine, DES-ovi su često sigurniji za rukovanje, pokazuju bolju biorazgradivost te su ekonomski povoljniji za pripremu. Zbog navedenih svojstava, DES-ovi se danas koriste u širokom rasponu područja, uključujući elektrodepoziciju, sintezu nanomaterijala, biotransformaciju, sintezu lijekova i sustava za dostavu lijekova te ekstrakciju bioaktivnih spojeva [7].

Na faznom dijagramu (Slika 1) prikazana je ovisnost temperature tališta eutektičke smjese komponenata A i B o njihovu međusobnom omjeru, uz istodobni prikaz tališta pojedinačnih čistih komponenti. Dijagram jasno ilustrira karakteristično sniženje tališta u eutektičkoj točki u odnosu na tališta polaznih tvari, što je temeljno obilježje DES sustava. Ovo sniženje temperature tališta posljedica je snažnih međumole-

kulskih interakcija, ponajprije vodikovih veza između HBA i HBD, koje rezultiraju formiranjem guste, stabilizirane supramolekulske mreže. Takva mreža narušava kristalnu rešetku pojedinačnih komponenti i time značajno smanjuje temperaturu tališta smjese [8].



Slika 1: Fazni dijagram eutektičkog otapala koje se sastoji od dvije komponente

1.2 Enzim glukoza-dehidrogenaza

Enzim glukoza-dehidrogenaza (GDH) pripada skupini enzima oksidoreduktaza. Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije u metaboličkim procesima. Enzim GDH katalizira oksidaciju β -D-glukoze u D-glukono- δ -lakton (glukonolakton) uz istodobnu redukciju koenzima nikotinamid-adenin dinukleotida (fosfat) NAD(P)^+ u NAD(P)H pri čemu glukonolakton spontano hidrolizira u glukonsku kiselinu [9]. Enzim GDH je prisutan u raznim mikroorganizmima poput *Bacillus magaterium*, *Bacillus subtilis*, *Gluconobacter suboxydans*, *Halobacterium mediterraneus*, *Thermoplasma acidophilum*, *Sulfobus solfataricus* i *Haloferax mediterranei*. Ovisno o izvoru, enzim GDH se značajno razlikuje po svojim biokemijskim karakteristikama, odnosno prema specifičnoj aktivnosti i stabilnosti, ali i po afinitetu prema koenzimima NAD^+ i NADP^+ [10]. NAD^+ je ključni koenzim u enzimskim oksidoredukcijskim procesima, no njegova stabilnost u vodenim otopinama često predstavlja ograničenje u dugoročnim enzimskim primjenama. Istraživanjima je pokazano da DES-ovi značajno produžuju stabilnost NAD^+/NADH sustava, zadržavajući koenzim nepromijenjen tijekom više od 50 dana. Ova sposobnost DES-a da istovremeno posluži kao otapalo i stabilizacijski medij ukazuje na njegov potencijal u primjenama koje zahtijevaju trajnost enzimskih sustava, uključujući ekstrakciju bioaktivnih spojeva te regeneraciju koenzima [11].

1.3 Matematičko modeliranje u dizajnu DES-ova

Korištenjem statističkih i kemometrijskih metoda moguće je unaprijed predvidjeti fizikalno-kemijska svojstva DES-ova te njihovu kompatibilnost s ciljnim biomolekulama. U ranijim istraživanjima korištena je Spearmanova korelacijska matrica koja je omogućila identifikaciju odnosa između pH, viskoznosti, gustoće, molekularnih deskriptora DES-ova (σ -profili) i biokatalitičkih svojstava (aktivnost i stabilnost enzima formijat-dehidrogenaze (FDH), stabilnost NADH, topljivost CO₂) [12]. Rezultati dobiveni korištenjem korelacija omogućuju određivanje strukturnih obilježja DES-ova koja su povoljna za određenu reakciju, što smanjuje potrebu za eksperimentalnim istraživanjem i time štedi vrijeme i resurse. Modeli koji opisuju kvantitativni odnos strukture i aktivnosti (engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR) i modeli koji opisuju kvantitativni odnos strukture i svojstava (engl. *Quantitative Structure-Property Relationship*, QSPR) temelje se na pretpostavci da se svojstva molekula (ili smjesa poput DES-ova) mogu predvidjeti na temelju njihovih strukturnih značajki izraženih pomoću različitih deskriptora [9]. Kao molekularni deskriptori najčešće se koriste σ -profilni deskriptori, snažni molekularni deskriptori koji potječu iz COSMO-RS (engl. *Conductor-like Screening Model for Real Solvents*). Oni opisuju raspodjelu naboja po molekularnoj površini, mapirajući koliko su polarna ili nepolarna različita područja molekule te kako mogu sudjelovati u elektrostatskim ili vodikovim vezama [13]. Ovi deskriptori mogu se ugraditi u prediktivne modele, a do sada je nekoliko metoda strojnog učenja uspješno primijenjeno na σ -profile:

- 1) **Linearna regresija** i njene ostale varijante poput operatora najmanjeg apsolutnog smanjenja i selekcije (engl. *Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*, LASSO) i Ridge regresije. Kada se ti modeli primjenjuju na σ -profile, mogu se identificirati područja molekularne polarosti koja najsnažnije doprinose svojstvu od interesa [14].
- 2) **Metode temeljene na stablima odlučivanja tj. slučajnoj šumi** (engl. *Random Forest*, RF) imaju sposobnost modeliranja nelinearnih odnosa bez potrebe za opsežnim predprocesiranjima podataka zbog čega se često koriste u računalnoj kemiji. Kada se treniraju na σ -profilima, modeli mogu opisati složene obrasce interakcije između distribucija površinske polarosti i molekularnih svojstava [15].
- 3) **Neuronske mreže i duboko učenje**. Umjetne neuronske mreže (engl. *Artificial Neural Networks*, ANN) i arhitekture dubokog učenja pokazale su veliki potencijal u zadacima molekularnog modeliranja. Budući da su σ -profili kontinuirani i višedimenzionalni, služe kao izvrstan ulaz za neuronske modele [15, 16]. Konvolucijske neuronske mreže (engl. *Convolution Neural Networks*, CNN) mogu se prilagoditi za tretiranje σ -profila kao 1D "signala" raspodjele površinskog naboja [13, 17]. Rekurentne neuronske mreže (engl. *Recurrent Neural Networks*, RNN) i transformatori također se mogu koristiti kada su vremenski ili sekvencijalni odnosi između odjeljaka profila značajni [18].

- 4) **Metode jezgre** (engl. *Kernel methods*, KM) i **potpornih vektora** (engl. *Support Vector Machines*, SVM). Regresija potpornih vektora (engl. *Support Vector Regression*, SVR) s funkcijama jezgre može modelirati nelinearne ovisnosti između σ -profila i molekularnih svojstava [19]. Budući da σ -profili često kodiraju suptilne razlike u molekularnom polaritetu, metode jezgre su posebno učinkovite u razlikovanju malih varijacija u kemijskim skupovima podataka [20].
- 5) **Nenadzirano učenje** (engl. *Unsupervised Learning*, UL) i **smanjenje dimenzionalnosti** (engl. *Dimensionality Reduction*, DR). Metode smanjenja dimenzionalnosti poput analize glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) ili autoenkodera često se primjenjuju za komprimiranje σ -profila u manji skup latentnih varijabli uz očuvanje većine varijance. Ove smanjene značajke zatim se mogu grupirati pomoću metoda poput k -srednjih vrijednosti (engl. *k-means*) ili hijerarhijskog grupiranja (engl. *Hierarchical Clustering*, HC) kako bi se grupirale molekule sa sličnim raspodjelama polariteta [21].

2. Materijali i metode

Radi razvoja integriranog eksperimentalno-računalnog sustava za optimiranje ekstrakcije enzima GDH u ATPS temeljenih na DES, najprije je provedena sveobuhvatna fizikalno-kemijska karakterizacija odabranih DES-ova. Na temelju dobivenih podataka izrađeni su kvantitativni modeli koji povezuju strukturne i empirijske deskriptore DES-ova s njihovim relevantnim svojstvima. Tako razvijeni modeli potom su korišteni za prediktivno određivanje optimalnih uvjeta ekstrakcije, uz istodobno očuvanje enzimске aktivnosti i stabilnosti u odabranom sustavu. Konačni cilj bio je uspostaviti integrirani okvir koji omogućuje razvoj korisnički orijentirane aplikacije za racionalan odabir DES-a i optimiranje uvjeta ekstrakcije.

2.1 Fizikalno-kemijska karakterizacija DES-ova

Provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija svih pripremljenih DES-ova na način da je određena njihova gustoća (ρ), pH-vrijednost, polarnost (E_{NR}), dinamička viskoznost (η), aktivitet vode u DES-u (a_w) te boja (L^* , a^* , b^* , c , h). Sva mjerenja provedena su u tri ponavljanja.

2.2 Određivanje koncentracije proteina i praćenje aktivnosti enzima GDH

Za određivanje koncentracije proteina u uzorcima korištena je linearizirana Bradfordova metoda, koja se temelji na vezivanju kiseloplavog kopolimera Coomassie

Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) s proteinskim amino skupinama u kiselom mediju, u kojem je boja prisutna u svom anionskom obliku. Boja selektivno reagira s aminokiselinskim ostacima, pri čemu najveći afinitet pokazuje prema argininu, ali može ostvariti interakcije i s tirozinom, histidinom, lizinom, triptofanom i fenilalaninom. Praćenje aktivnosti enzima GDH provedeno je spektrofotometrijski ($\lambda = 340$) na temelju reakcije oksidacije glukoze katalizirane enzimom GDH, pri čemu nastaju glukonolakton i NADH.

2.3. Provedba šaržne ekstrakcije enzima GDH primjenom ATPS temeljenih na DES

Za formiranje ATPS temeljenog na DES koristio se dikalijev hidrogenfosfat (K_2HPO_4) zbog svoje dobre topljivosti u vodi u visokim koncentracijama. Nakon provedene šaržne ekstrakcije u formiranom dvofaznom sustavu gornji sloj (ekstraktna faza, E) sadržavao je eutektičko otapalo s ekstrahiranim enzimom GDH, dok je donji sloj (rafinatna faza, R) sadržavao otopinu K_2HPO_4 sa zaostalim enzimom. Učinkovitost ekstrakcije enzima GDH (E_{GDH} , jednadžba 1) i koeficijent raspodjele (K_p , jednadžba 2) izračunati su na temelju volumena faza i koncentracije enzima u pojedinoj fazi.

$$E_{GDH} = \frac{\gamma_{P,E} V_E}{\gamma_{P,E} V_E + \gamma_{P,R} V_R} \cdot 100 \% \quad (1)$$

$$K_p = \frac{\gamma_{P,E}}{\gamma_{P,R}} \quad (2)$$

Pri tome su $\gamma_{P,E}$ masena koncentracija proteina u ekstraktnoj fazi (mg cm^{-3}), $\gamma_{P,R}$ masena koncentracija proteina u rafinatnoj fazi (mg cm^{-3}), V_E volumen ekstraktno faze (cm^3) i V_R volumen rafinatne faze (cm^3).

Relativna aktivnost (R.A.) enzima u ekstraktnoj i rafinatnoj fazi izražena je kao omjer izmjerene aktivnosti u svakoj fazi i aktivnosti referentnog (kontrolnog) uzorka tj. aktivnosti izmjerene u $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ Tris-HCl puferu pH = 7,5.

2.4. Statistička analiza i matematičko modeliranje

Statistička analiza provedena je u programskom paketu Statistica 14.0, a korelacije između eksperimentalnih podataka analizirane su uz Spearmanove korelacijske matrice unutar navedenog programa. Svi spojevi korišteni za pripremu DES sustava geometrijski i energetski su optimirani pomoću programskog paketa BIOVIA TmoleX19 2021. Kvantno-kemijski proračuni provedeni su metodom teorije funkcionala gustoće (engl. *Density Functional Theory*, DFT). COSMO datoteka sadrži σ -profil krivulju koja kvan-

titativno prikazuje površinski naboj polarne molekule duž skale polariteta, a softver ju generira za svaku optimiranu molekulu. Pri tome su HBA karakterizirani vrhovima u području negativnog potencijala, HBD vrhovima u području pozitivnog potencijala, dok su nepolarne molekule karakterizirane vrhovima oko nultog potencijala.

Odnos između fizikalno-kemijskih svojstava DES sustava (kao što su pH, gustoća, viskoznost, polarnost, aktivitet i boja) te DES deskriptora, učinkovitosti ekstrakcije (E_{GDH}) i relativne aktivnosti enzima GDH (R.A.) modeliran je uz pretpostavku da se učinkovitost ekstrakcije i relativna aktivnost enzima GDH mogu izraziti kao funkcije fizikalno-kemijskih svojstava DES sustava i S_{mix}^i deskriptora [22]. Odnos fizikalno-kemijskih svojstava DES sustava prikazan je jednadžbom 3:

$$f(\text{pH}, \rho, \eta, E_{\text{NR}}, a_w, L^*, a^*, b^*, c, h, S_{\text{mix}}^1, S_{\text{mix}}^2, S_{\text{mix}}^3, S_{\text{mix}}^4, S_{\text{mix}}^5, S_{\text{mix}}^6, S_{\text{mix}}^7, S_{\text{mix}}^8, S_{\text{mix}}^9, S_{\text{mix}}^{10}) \quad (3)$$

Na temelju korelacijske matrice, odabrane su ulazne varijable koje pokazuju značajnu korelaciju s obje zavisne varijable, učinkovitošću ekstrakcije i relativnom aktivnošću enzima GDH. Odnosi između zavisnih i nezavisnih varijabli analizirani su primjenom ANN.

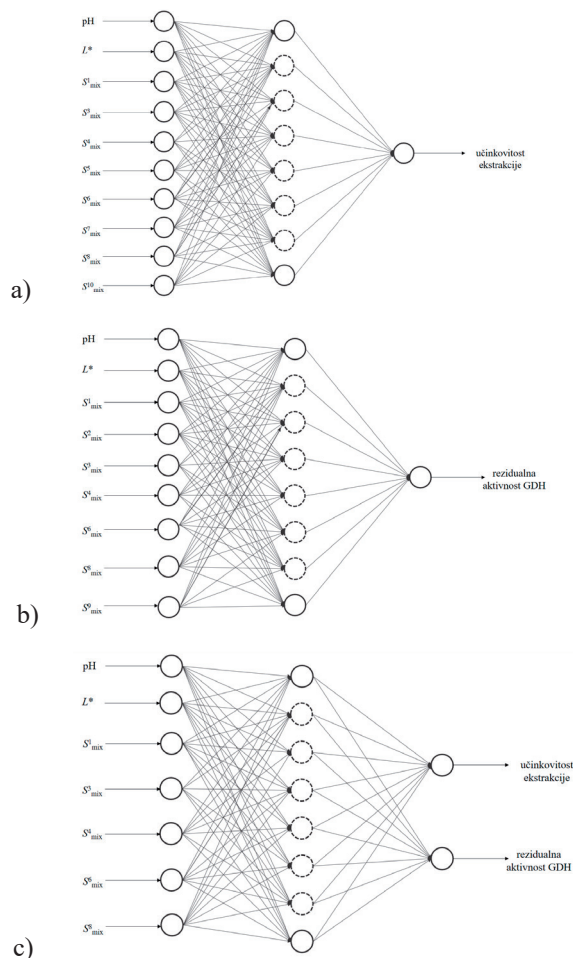
Pomoću programskog paketa Statistica 14.0 razvijene su višeslojne perceptronske (engl. *Multiple Layer Perceptron*, MLP) neuronske mreže. Arhitektura ANN uključivala je ulazni sloj s 10, 13 ili 14 neurona (odabrane su ulazne varijable značajne za odabranu izlaznu varijablu te za kombinaciju obiju izlaznih varijabli), skriveni sloj i izlazni sloj s dva neurona (za učinkovitost ekstrakcije i relativnu aktivnost enzima GDH). Shema MLP mreža koje su primijenjene prikazane su na Slici 2.

Za ANN modele odabrane su varijable koje su pokazale statistički značajnu korelaciju ($p < 0,05$) s učinkovitošću ekstrakcije i relativnom aktivnošću enzima GDH te su korištene kao ulazni neuroni u MLP mreži. Kako bi se osigurala robusnost modela, korištena je unakrsna validacija (engl. *cross-validation*) putem nasumičnog poduzorkovanja. Algoritam propagacije pogreške unatrag korišten je za treniranje ANN modela, osiguravajući pouzdano predviđanje i točnost predikcije. Primjenjivost razvijenih kalibracijskih modela ocijenjena je pomoću koeficijenta determinacije za kalibraciju (R_{kal}^2), prilagođenog koeficijenta determinacije za kalibraciju ($R_{\text{kal,adj}}^2$) i korijena srednje kvadratne pogreške za kalibraciju (engl. *Root Mean Square Error for Calibration*, RMSEC). Prediktivna sposobnost modela ocijenjena je pomoću koeficijenta determinacije za predikciju (R_{pred}^2), prilagođenog koeficijenta determinacije za predikciju ($R_{\text{pred,adj}}^2$), korijena srednje kvadratne pogreške za predikciju (engl. *Root Mean Square Error for Prediction*, RMSEP), standardne pogreške predviđanja (engl. *Standard Error of Prediction*, SEP), omjera predviđanja i odstupanja (engl. *Ratio of Prediction to Deviation*, RPD) te omjera raspona pogreške (engl. *Ratio of the Error Range*, RER) [23].

Utjecaj S_{mix}^i deskriptora na učinkovitost ekstrakcije i relativnu aktivnost enzima GDH modeliran je korištenjem polinomnog modela odzivne površine drugog reda prema jednadžbi 4:

$$E_{\text{GDH}} \text{ ili R. A.} = \beta_0 + \sum_{i=1}^{10} \beta_i \cdot (S_{\text{mix}}^i)_i + \sum_{i=1}^{10} \beta_{ii} \cdot (S_{\text{mix}}^i)_i^2 + \sum_{i=1}^9 \sum_{j=i+1}^{10} \beta_{ij} \cdot (S_{\text{mix}}^i)_i \cdot (S_{\text{mix}}^j)_j \quad (4)$$

gdje su odabrana izlazna varijabla, odnosno učinkovitost ekstrakcije ili relativna aktivnost enzima GDH, β_0 je slobodni član, a β_i , β_{ii} i β_{ij} su regresijski koeficijenti za linearne, kvadratne i interakcijske članove. Optimiranje je provedeno primjenom funkcije poželjnosti (engl. *desirability function*).



Slika 2: Shema MLP mreža primijenjenih za predviđanje učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH u ATPS temeljenih na DES, a) ANN model za predviđanje učinkovitosti ekstrakcije, b) ANN model za predviđanje relativne aktivnosti enzima GDH, c) ANN model za simultano predviđanje učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnost enzima GDH

3. Rezultati i rasprava

Provedena je analiza korelacija između fizikalno-kemijskih svojstava DES sustava, DES deskriptora, učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH s ciljem razvoja prediktivnog modela za učinkovito predviđanje učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH. Rezultati su podijeljeni na analizu raspodjele podataka, razvoj modela umjetnih neuronskih mreža za predviđanje učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH te optimiranje i odabir DES-a na temelju funkcije poželjnosti.

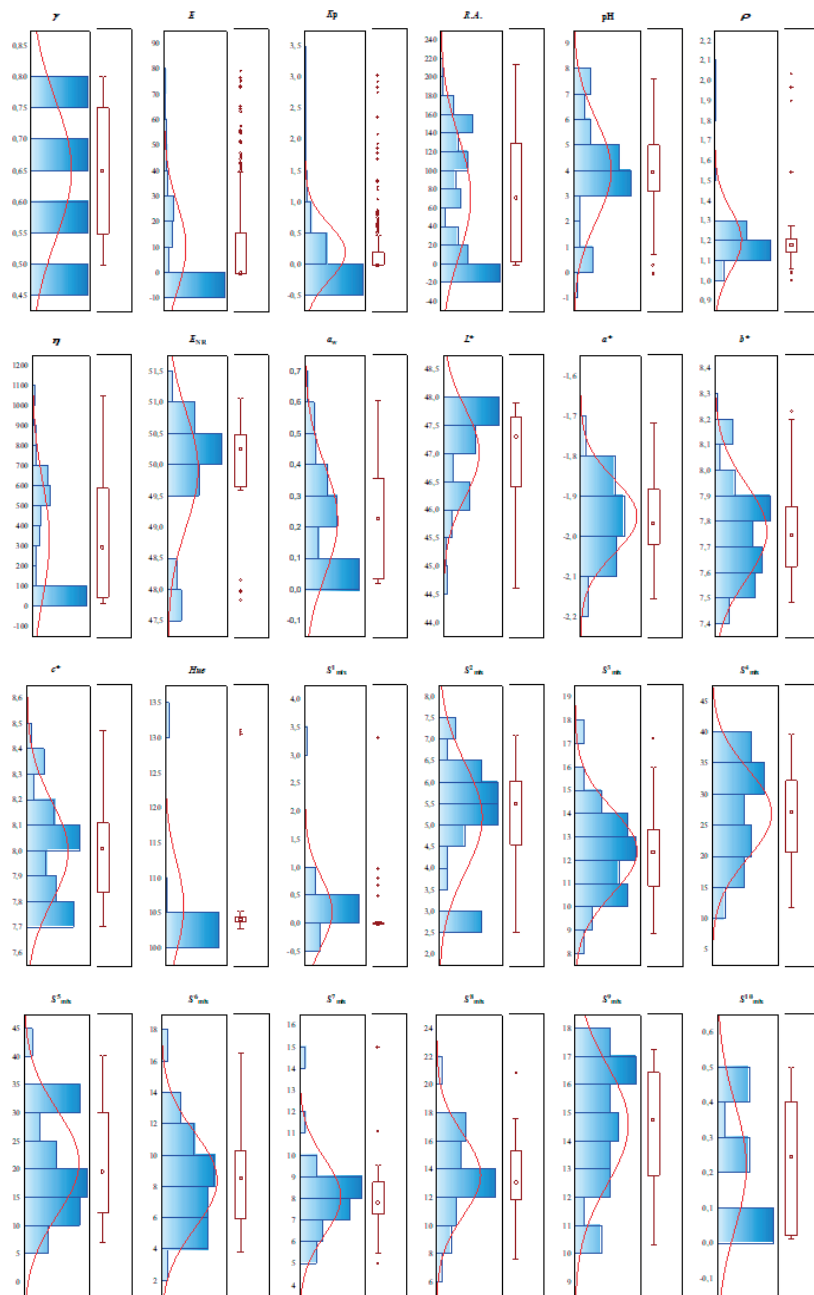
3.1. Analiza raspodjele podataka i korelacijska matrica

U prvom koraku analize podataka provedena je analiza raspodjele svih analiziranih varijabli, no u prikazanim rezultatima (Slika 3) vidljivo je da varijable ne prate normalnu raspodjelu pa je veza između σ -profila i fizikalno-kemijskih svojstva DES-ova analizirana primjenom Spearmanove korelacijske matrice. Ona se temelji na rangiranim vrijednostima i stoga obuhvaća monotone, nelinearne ovisnosti koje su uobičajene u složenim kemijskim sustavima, što je čini prikladnom za DES-ove, gdje jake mreže vodikovih veza, molekularni polaritet i strukturna heterogenost često rezultiraju nelinearnim trendovima između molekularnih deskriptora i svojstava mase.

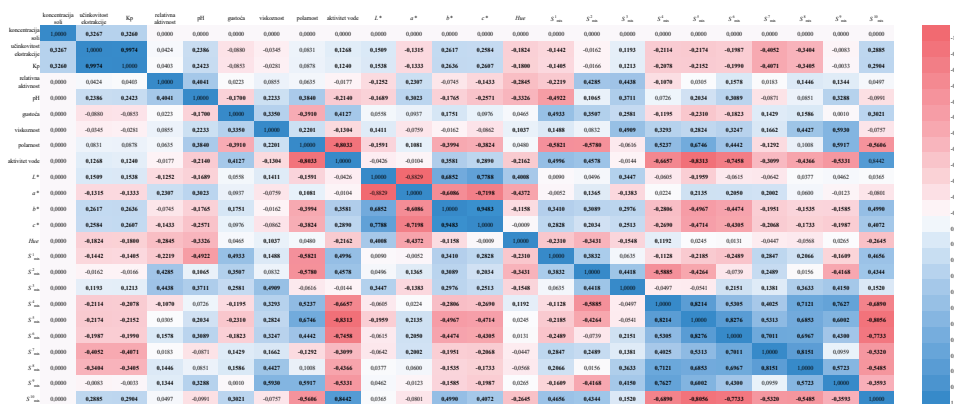
Prema rezultatima prikazanim na Slici 4, na učinkovitost ekstrakcije značajno utječu koncentracija soli u vodenom dvofaznom sustavu ($r = 0,3267$), pH ($r = 0,2386$), aktivitet vode ($r = -0,1268$), L^* koordinata boje ($r = 0,1509$), a^* koordinata boje ($r = -0,1315$), b^* koordinata boje ($r = 0,2617$), c^* koordinata boje ($r = 0,2584$), Hue koordinata boje ($r = -0,1824$), S^1_{mix} ($r = -0,1442$), S^3_{mix} ($r = 0,1193$), S^4_{mix} ($r = -0,2114$), S^5_{mix} ($r = -0,2174$), S^6_{mix} ($r = -0,1987$), S^7_{mix} ($r = -0,4052$), S^8_{mix} ($r = -0,3404$) i S^{10}_{mix} ($r = 0,2885$).

Prema rezultatima korelacijske analize na aktivnost enzima u vodenom dvofaznom sustavu s odabranim DES-ovima signifikantno utječe pH ($r = 0,4041$), L^* koordinata boje ($r = 0,1252$), a^* koordinata boje ($r = 0,2307$), c^* koordinata boje ($r = -0,1433$), Hue koordinata boje ($r = -0,2845$), S^1_{mix} ($r = -0,2219$), S^2_{mix} ($r = 4285$), S^3_{mix} ($r = 0,4438$), S^4_{mix} ($r = -0,1070$), S^6_{mix} ($r = 0,1578$), S^8_{mix} ($r = 0,1446$) i S^9_{mix} ($r = 0,1344$).

Vidljivo je da određeni σ -profili značajno utječu i na učinkovitost ekstrakcije enzima GDH i na njegovu aktivnosti u DES-u. Stoga su kao signifikantne varijable za razvoj modela u kojem su zavisne varijable učinkovitost ekstrakcije i aktivnost odabrani pH, L^* koordinata boje, S^1_{mix} , S^3_{mix} , S^4_{mix} , S^6_{mix} i S^8_{mix} s obzirom na to da pokazuju značajnu korelaciju i s relativnom aktivnošću i s učinkovitošću ekstrakcije enzima GDH.



Slika 3: Raspodjela podataka fizikalno-kemijskih svojstava DES sustava, DES deskriptora, učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH



Slika 4: Spearmanova korelacijska matrica odnosa između učinkovitosti ekstrakcije, relativne aktivnosti enzima GDH, fizikalno-kemijskih svojstava i molekulskih deskriptora DES-ova u vodenim dvofaznim sustavima. Korelacije označene podebljano statistički su značajne na razini $p < 0,05$

3.2. Modeli umjetnih neuronskih mreža za predviđanje učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH

U svrhu predviđanja učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH u ATPS temeljenih na DES razvijeni su ANN modeli. Arhitektura ANN koja je izabrana za predikciju učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH na temelju fizikalno-kemijskih svojstava DES-ova i DES molekularnih deskriptora prikazana je u Tablici 1, a prediktivna svojstva odabranih optimalnih ANN modela prikazana su u Tablici 2.

Razvijene su tri vrste ANN modela u kojima su za odabir optimalne mreže uzeti u obzir koeficijenti determinacije, pogreške učenja, testiranja i validacije te broj neurona u skrivenom sloju. Manji broj neurona u skrivenom sloju znači jednostavniju mrežu i stoga pouzdaniji model. Na temelju tih kriterija, odabrane su optimalne mreže, koje su označene podebljano u Tablici 1.

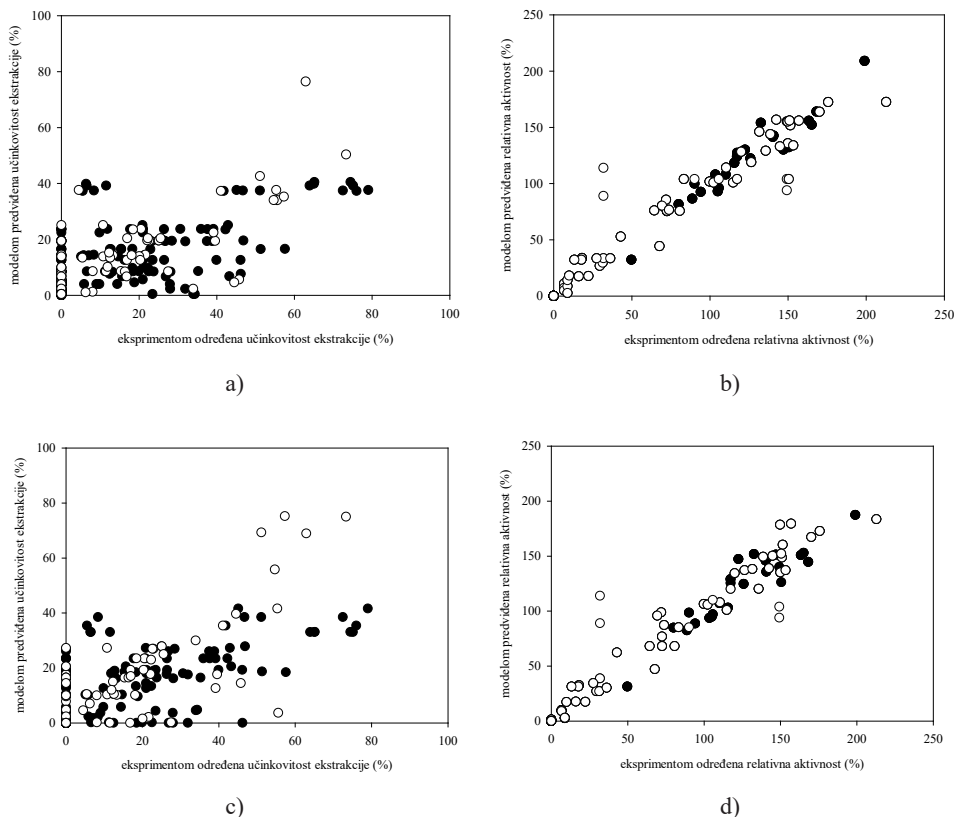
Usporedba eksperimentalnih i ANN modelima predviđenih učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima prikazana je grafički (Slika 5). Odnos između eksperimentalnih i matematičkim modelom predviđenih podataka analiziran je primjenom ključnih statističkih parametara: koeficijenta determinacije (R^2), omjera predviđanja i odstupanja (RPD) i omjera raspona pogreške (RER) (Tablica 2).

Tablica 1: Arhitektura umjetnih neuronskih mreža izabranih za predikciju učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH na temelju fizikalno-kemijskih svojstava DES-ova i DES molekularnih deskriptora

Izlazna varijabla	ANN model	R ² _{treniranje/} RMSE _{treniranje}	R ² _{testiranje/} RMSE _{testiranje}	R ² _{validacija/} RMSE _{validacija}	Skrivena aktivacijska funkcija	Izlazna aktivacijska funkcija
Učinkovitost ekstrakcije	MLP 10-4-1	0,8126 72,3029	0,7392 77,6535	0,6009 117,7158	Tangens hiperbolni	Eksponecijalna funkcija
	MLP 10-12-1	0,7972 73,9895	0,7579 75,6252	0,6157 108,4585	Tangens hiperbolni	Eksponecijalna funkcija
	MLP 10-13-1	0,8121 76,8171	0,7870 84,9618	0,5505 119,3271	Funkcija identiteta	Eksponecijalna funkcija
	MLP 10-8-1	0,8446 67,4848	0,7473 74,2853	0,6233 112,7156	Logistička funkcija	Eksponecijalna funkcija
	MLP 10-8-1	0,7935 64,4851	0,7397 71,5705	0,6606 114,5802	Logistička funkcija	Eksponecijalna funkcija
Relativna aktivnost	MLP 9-13-1	0,9914 40,0279	0,9887 41,0307	0,9871 47,5497	Tangens hiperbolni	Eksponecijalna funkcija
	MLP 9-13-1	0,9906 37,3611	0,9894 44,0087	0,9860 51,2402	Eksponecijalna funkcija	Funkcija identiteta
	MLP 9-12-1	0,9927 31,2702	0,9912 34,3306	0,9889 40,7519	Tangens hiperbolni	Tangens hiperbolni
	MLP 9-6-1	0,9905 39,7888	0,9889 44,3481	0,9860 51,4748	Tangens hiperbolni	Logistička funkcija
	MLP 9-5-1	0,9930 24,9667	0,9929 33,1221	0,9893 39,2425	Tangens hiperbolni	Eksponecijalna funkcija
Učinkovitost ekstrakcije i relativna aktivnost	MLP 7-10-2	0,8797 125,9281	0,8402 142,1075	0,8294 176,4003	Tangens hiperbolni	Funkcija identiteta
	MLP 7-5-2	0,8892 126,2442	0,8541 150,6011	0,8288 188,7286	Logistička funkcija	Tangens hiperbolni
	MLP 7-11-2	0,8860 122,2001	0,8414 129,4710	0,8304 172,8911	Eksponecijalna funkcija	Logistička funkcija

S $R^2_{\text{pred}} > 0,75$ za predviđanje relativne aktivnosti modeli MLP 9-5-1 i MLP 7-11-2 pokazuju snažnu prediktivnu sposobnost, što ih čini pouzdanim alatom za predviđanje relativne aktivnosti enzima GDH u ATPS-ima temeljenim na DES-u. Osim toga, utvrđeno je da su spomenuti modeli izvrstan prediktivni alat na temelju RPD vrijednosti za relativnu aktivnost enzima GDH ($RPD > 2$). RPD vrijednost veća od 2

ukazuje na to da je model ne samo točan, već i vrlo prikladan za točna predviđanja u različitim eksperimentalnim uvjetima. To naglašava potencijal modela za optimiranje procesa ekstrakcije enzima bez potrebe za opsežnim eksperimentima pokušaja i pogreške. Na temelju RER vrijednosti, razvijeni ANN modeli (MLP 9-5-1 i MLP 7-11-2) mogu se koristiti za kontrolu kvalitete ($10 < \text{RER} < 15$) podataka relativne aktivnosti enzima GDH. S druge strane, razvijeni modeli nisu se pokazali dovoljno pouzdanima za predviđanje učinkovitosti ekstrakcije te zahtijevaju daljnja unapređenja. Dobiveni rezultati upućuju na potrebu odabira optimalnih DES-ova za svaki enzim zasebno.



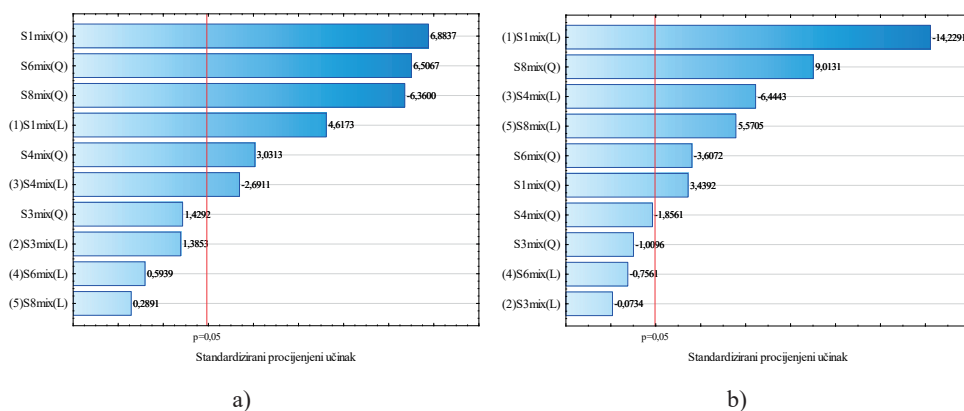
Slika 5: Usporedba eksperimentalnih i ANN modelima predviđenih učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH, a) učinkovitost ekstrakcije prema modelu MLP 10-12-1, b) relativna aktivnost prema modelu MLP 9-5-1, c) učinkovitost ekstrakcije prema modelu MLP 7-11-2, d) relativna aktivnost prema modelu MLP 7-11-2 (• - kalibracija, o - predikcija)

Tablica 2: Prediktivna svojstva odabranih modela umjetnih neuronskih mreža za previđanje učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH

ANN model	Izlazna varijabla	R^2_{pred}	$R^2_{pred,adj}$	RMSEP	SEP	RPD	RER
MLP 10-12-1	Učinkovitost ekstrakcije	0,5394	0,4669	11,0444	0,8223	1,4719	5,6952
MLP 9-5-1	Relativna aktivnost	0,9327	0,9276	16,9099	1,3181	3,8207	12,5842
MLP 7-11-2	Učinkovitost ekstrakcije	0,6511	0,6245	10,2843	0,8550	1,6365	6,1161
	Učinkovitost ekstrakcije	0,9419	0,9375	15,6667	1,3626	4,1239	13,5228

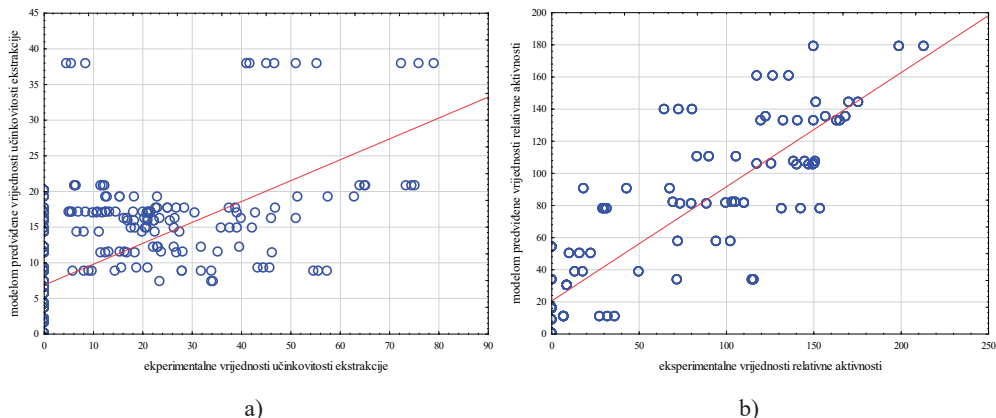
3.2. Optimiranje i odabir DES-a na temelju funkcije poželjnosti

Funkcija poželjnosti primijenjena je na model odzivne površine u svrhu odabira otapala koje će osigurati maksimume učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti enzima GDH. Analiza je provedena primjenom Pareto dijagrama koji je prikazan na Slici 6. Usporedba eksperimentalnih i modelom odzivnih površina predviđenih vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti prikazana je na Slici 7, analiza odstupanja modela odzivnih površina za predviđene vrijednosti učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti prikazana je na Slici 8, dok su profili predviđenih vrijednosti i funkcije poželjnosti za učinkovitost ekstrakcije i relativnu aktivnost prikazani na Slici 9.

**Slika 6:** Pareto dijagram utjecaja izabranih nezavisnih varijabli na a) učinkovitost ekstrakcije i b) relativnu aktivnost. (L) predstavlja linearnu, a (Q) kvadratnu interakciju varijabli

Na Slici 6a vidljivo je da na učinkovitost ekstrakcije najveći utjecaj imaju S^1_{mix} , S^6_{mix} i S^8_{mix} u kvadratnom članu te S^1_{mix} u linearnom članu. Važno je napomenuti da je uočeno da S^1_{mix} i S^6_{mix} u kvadratnom članu imaju pozitivan utjecaj na učinkovitost

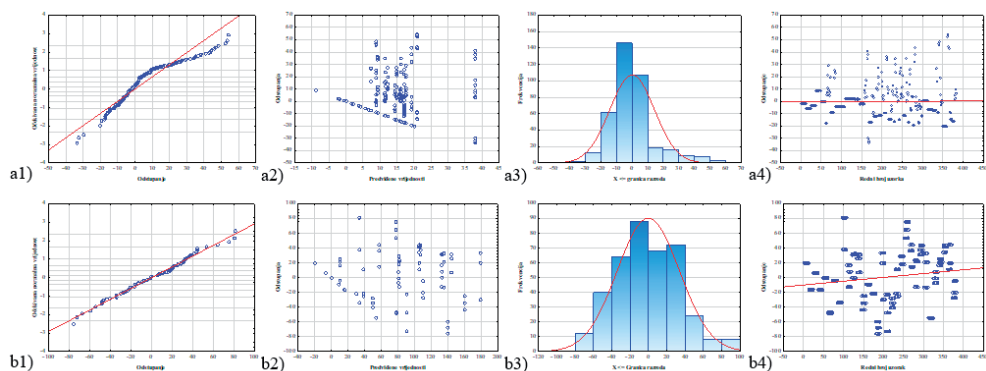
ekstrakcije, dok S_{mix}^8 u kvadratnom članu ima negativan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije. Nadalje, na Slici 6b vidljivo je da S_{mix}^1 , S_{mix}^4 i S_{mix}^8 u linearnom članu te S_{mix}^8 u kvadratnom članu imaju najveći utjecaj na relativnu aktivnost enzima GHD.



Slika 7: Usporedba eksperimentalnih i modelom odzivnih površina predviđenih vrijednosti za a) učinkovitost ekstrakcije ($R^2 = 0,5929$) i b) relativnu aktivnost ($R^2 = 0,7103$)

Usporedba eksperimentalnih i modelom odzivnih površina predviđenih vrijednosti, učinkovitosti ekstrakcije (Slika 7a, $R^2 = 0,5929$) i relativne aktivnosti (Slika 7b, $R^2 = 0,7103$) ukazuje na značajno raspršenje podataka posebno u slučaju učinkovitosti ekstrakcije. Prema literaturi, model se može smatrati primjenjivim ako koeficijent determinacije koji opisuje razliku između eksperimentalnih vrijednosti i predviđenih vrijednosti modela prelazi 0,75 [24]. Na temelju toga razvijeni modeli odzivnih površina zahtijevaju poboljšanje, no osim visoke vrijednosti R^2 potrebno je analizirati i odstupanja kako bi znali da je model primjenjiv [25].

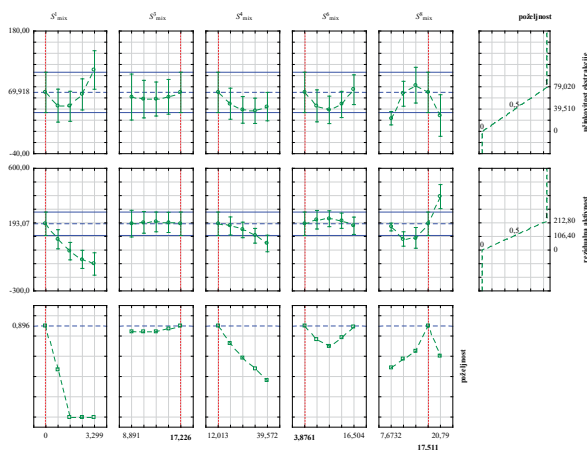
Odstupanja iz prilagođenog modela su razlike između opaženih odgovora i odgovarajućeg predviđanja odgovora izračunatog pomoću regresijske funkcije. Može se primijetiti da su za oba razvijena RSM modela odstupanja normalno distribuirana (Slike 8a1 i 8b1). Odstupanja su grupirana približno duž ravne linije i stoga je pretpostavka normalnosti zadovoljena. Histogrami koji prikazuju raspodjelu podataka također su potvrdili normalnu raspodjelu odstupanja (Slike 8a3 i 8b3). Prema navedenim slikama, dobiveni su tipični histogrami u obliku zvona s niskim nedostatkom simetrije. Slike 8a2 i 8b2 prikazuju odstupanja u odnosu na predviđene vrijednosti, a može se vidjeti da grafikonu ne pokazuju nikakav praktični obrazac, tj. odstupanja se ponašaju nasumično, što sugerira da modeli dobro odgovaraju eksperimentalnim podacima. Nadalje, Slike 8a4 i 8b4 prikazuju odstupanja u odnosu na redoslijed eksperimentalnih podataka kako bi se provjerilo može li redoslijed eksperimentalnih izvođenja utjecati na podatke. Primijećeno je da odstupanja variraju oko središnje vrijednosti bez očitih odstupanja.



Slika 8: Analiza odstupanja modela odzivnih površina za predviđene vrijednosti a) učinkovitosti ekstrakcije i b) relativne aktivnosti. 1) prikaz normalne raspodjele odstupanja, 2) odstupanja u odnosu na predviđene vrijednosti, 3) histogram odstupanja, 4) odstupanja u odnosu na redosljed podataka

Optimiranje vrijednosti DES deskriptora za istovremeno postizanje maksimalne učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti na temelju profila poželjnosti dobivenih iz modela odzivne površine provedeno je korištenjem funkcije poželjnosti (Slika 9). Skala poželjnosti je u rasponu od 0 (nepoželjno) do 1 (vrlo poželjno). Značajni σ -profili odabrani su na temelju funkcija poželjnosti, a njihove optimalne vrijednosti za postizanje maksimalne relativne aktivnosti i učinkovitosti ekstrakcije su sljedeće: $S^1_{\text{mix}} = 0$, $S^3_{\text{mix}} = 17,226$, $S^4_{\text{mix}} = 12,013$, $S^6_{\text{mix}} = 3,876$ i $S^8_{\text{mix}} = 17,511$.

Pretragom interne baze σ -profila odabrana su eutektička otapala s najbližim vrijednostima te su prikazana u Tablici 3. Također, prikazani su i dobiveni rezultati nakon provedene šaržne ekstrakcije i mjerenja aktivnosti enzima u navedenim sustavima. Na temelju dobivenih rezultata kao optimalni DES odabran je ChCl:U (1:2, 20% H₂O (w/w)).



Slika 9: Profili predviđenih vrijednosti i funkcije poželjnosti za učinkovitost ekstrakcije i relativnu aktivnost

Tablica 3: Rezultati šaržne ekstrakcije enzima GDH i relativne aktivnosti primjenom ATPS temeljenih na optimalnim DES-ovima

DES	$\gamma_{K_2HPO_4}$ (mg cm ⁻³)	K_p (-)	R (-)	E_{GDH} (%)	R.A.
ChCl:U:Gly (1:2:2, 20% H ₂ O (w/w))	0,5	nema razdvajanja faza			133,92 ± 10,42
	0,6				
	0,7				
	0,8				
ChCl:U:Gly (1:2:2, 30% H ₂ O (w/w))	0,5	nema razdvajanja faza			132,35 ± 12,80
	0,6				
	0,7				
	0,8				
ChCl:U (1:2, 20% H ₂ O (w/w))	0,5	nema razdvajanja faza			153,62 ± 9,31
	0,6				
	0,7	0,86	0,37 ± 0,01	24,11 ± 2,01	
	0,8	0,71	0,20 ± 0,01	9,86 ± 3,02	
ChCl:U (1:2, 30% H ₂ O (w/w))	0,5	nema razdvajanja faza			143,51 ± 9,23
	0,6				
	0,7				
	0,8	0,5	0,15 ± 0,001	6,70 ± 2,21	
ChCl:U (1:2, 20% H ₂ O (w/w))	0,5	nema razdvajanja faza			126,85 ± 9,44
	0,6				
	0,7				
	0,8	0,86	0,48 ± 0,02	29,23 ± 2,82	

4. Zaključak

U radu je razvijen sustavan i prediktivan pristup dizajnu ATPS temeljenih na DES za ekstrakciju enzima GDH. Umjesto tradicionalne metode pokušaja i pogreške, korištena je metodologija temeljena na racionalnom odabiru DES formulacija prema poznatim fizikalno-kemijskim svojstvima te je dodatno podržana računalnim modeliranjem i optimiranjem. Primjena Spearmanove korelacijske analize omogućava odabir relevantnih ulaznih varijabli za razvoj robusnih prediktivnih modela. Uspješnim odabirom sedam zajedničkih ulaznih varijabli (pH, L^* , S^1_{mix} , S^3_{mix} , S^4_{mix} , S^6_{mix} , S^8_{mix}), koje su se pokazale značajno koreliranim i s učinkovitošću ekstrakcije i s relativnom aktivnošću enzima GDH, osigurana je robusnost razvijenih modela i smanjen rizik od prekomjernog prilagođavanja. Razvijeni ANN modeli postigli su visoke RPD vrijednosti (> 2) i RER vrijednosti pogodne za kontrolu učinkovitosti ekstrakcije i relativne aktivnosti na temelju odabranih ulaznih varijabli modela (pH, L^* , S^1_{mix} , S^3_{mix} ,

S_{mix}^4 , S_{mix}^6 , S_{mix}^8). Funkcijom poželjnosti utvrđeni su optimalni σ -profili za postizanje maksimalne relativne aktivnosti i učinkovitosti ekstrakcije: $S_{\text{mix}}^1 = 0$, $S_{\text{mix}}^3 = 17,226$, $S_{\text{mix}}^4 = 12,013$, $S_{\text{mix}}^6 = 3,876$ i $S_{\text{mix}}^8 = 17,511$.

Zahvala

Rad je izrađen u okviru projekta "Integrirani mikrosustav za enzimatsku proizvodnju biovodika (MicroBioH₂)" financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (IP-2022-10-2175).

5. Literatura

- [1] Hong Geow, C.; Ching Tan, M., Pin Yeap, S., Ling Chin, N.: A review on extraction techniques and its future applications in industry, *European Journal of Lipid Science and Technology*, **123** (2021) 2000302, <https://doi.org/10.1002/ejlt.202000302>
- [2] Yang, A. H.: Aqueous Two-Phase Extraction Advances for Bioseparation, *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, **4** (2013) 1, <https://doi.org/10.4172/2155-9821.1000140>
- [3] Ura, T.; Yoshida, T., Mikawa, T., Shiraki, K.: Polymer-engineered condensates for enzyme activation, *Polymer Journal*, **57** (2025) 885-896, <https://doi.org/10.1038/s41428-025-01042-8>
- [4] Ijardar, S. P.; Singh, V., Gardas, R. L.: Revisiting the Physicochemical Properties and Applications of Deep Eutectic Solvents, *Molecules*, **27** (2022) 1368, <https://doi.org/10.3390/molecules27041368>
- [5] Aktaş, H.; Kurek, M. A.: Deep eutectic solvents for the extraction of polyphenols from food plants, *Food Chemistry*, **444** (2024) 138629, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138629>
- [6] Smith, E. L.; Abbott, A. P., Ryder, K. S.: Deep eutectic solvents (DESs) and their applications, *Chemical Reviews*, **114** (2014) 11060-11082, <https://doi.org/10.1021/cr300162p>
- [7] Ling, J. K. U.; Hadinoto, K.: Deep Eutectic Solvent as Green Solvent in Extraction of Biological Macromolecules: A Review, *International Journal of Molecular Sciences*, **23** (2022) 3381, <https://doi.org/10.3390/ijms23063381>
- [8] Mani, K. A.; Kumar, L., Barrios, N., Agate, S., Mittal, A., Yarbrough, J., Jameel, H., Lucia, L. A., Pal, L.: Emergence of deep eutectic solvents (DES): Chemistry, preparation, properties, and applications in biorefineries and critical materials, *Progress in Materials Science*, **157** (2026) 101586, <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2025.101586>.
- [9] Li, J.; Zhao, T., Yang, Q., Du, S., Xu, L.: A review of quantitative structure-activity relationship: The development and current status of data sets, molecular descriptors and mathematical models, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **256** (2025) 105278, <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2024.105278>
- [10] Pongtharangkul, T.; Chuekitumchorn, P., Suwanampa, N., Payongsri, P., Honda, K., Panbangred, W.: Kinetic properties and stability of glucose dehydrogenase from *Bacillus amylo-*

- liquefaciens* SB5 and its potential for cofactor regeneration, *AMB Express*, **5** (2015) 68, <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0157-9>
- [11] Radović, M.; Hok, L., Panić, M., Cvjetko Bubalo, M., Vianello, R., Viković, M., Radojčić Redovniković, I.: Deep eutectic solvents as a stabilising medium for NAD coenzyme: unravelling the mechanism behind coenzyme stabilisation effect, *Green Chemistry*, **24** (2022) 7661-7674, <https://doi.org/10.1039/D2GC02656B>
- [12] Logarušić, M.; Šubar, K., Nikolić, M., Jurinjak Tušek, A., Damjanović, A., Radović, M., Radojčić Redovniković, I., Žnidaršič-Plazl, P., Kroutil, W., Cvjetko Bubalo, M.: Harnessing the potential of deep eutectic solvents in biocatalysis: design strategies using CO₂ to formate reduction as a case study, *Frontiers in Chemistry*, **12** (2024) 1467810, <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1467810>
- [13] Abranches, D. O.; Maginn, E. J., Colón, Y. J.: Boosting Graph Neural Networks with molecular mechanics: A case study of sigma profile prediction, *Journal of Chemical Theory and Computation*, **19** (2023) 9318-9328, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c00871>
- [14] Sharma, A.; Garg, A., Li, L., Chatterjee, I., Lee, B.-S., Garg, A.: Machine learning for deep eutectic solvents: advances in property prediction and molecular design, *Journal of Molecular Liquids*, **437** (2025) 128317, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.3c01003>
- [15] Wang, Y.-X.; Hou, X.-J., Zeng, J., Wu, K.-J., He, Y.: Random forest models to predict the densities and surface tensions of deep eutectic solvents, *AIChE Journal*, **69** (2023) e18095, <https://doi.org/10.1002/aic.18095>
- [16] Radović, M.; Jurinjak Tušek, A., Reiter, T., Kroutil, W., Cvjetko Bubalo, M., Radojčić Redovniković, I.: Rational design of deep eutectic solvents for the stabilization of dehydrogenases: an artificial neural network prediction approach, *Frontiers in Chemistry*, **12** (2024) 1436049, <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1436049>
- [17] Abranches, D. O.; Maginn, E. J., Colón, Y. J.: Stochastic machine learning via sigma profiles to build a digital chemical space, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **121** (2024) e2404676121, <https://doi.org/10.1073/pnas.2404676121>
- [18] Segler, M. H. S.; Kogej, T., Tyrchan, C., Waller, M. P.: Generating focused molecule libraries for drug discovery with Recurrent Neural Networks, *ACS Central Science*, **4** (2018) 120-131, <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00512>
- [19] Nordness, O.; Kelkar, P., Lyu, Y., Baldea, M., Stadtherr, M. A., Brennecke, J. F.: Predicting thermophysical properties of dialkylimidazolium ionic liquids from sigma profiles, *Journal of Molecular Liquids*, **334** (2021) 116019, <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.116019>
- [20] Scherer, C.; Scheid, R., Andrienko, D., Bureau, T.: Kernel-based machine learning for efficient simulations of molecular liquids, *Journal of Chemical Theory and Computation*, **16** (2020) 3194-3204, <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.9b01256>
- [21] Schmidt, S.; Schindler, M., Eriksson, L.: Block-wise exploration of molecular descriptors with Multi-block Orthogonal Component Analysis (MOCA), *Molecular Informatics*, **41** (2022) 2100165, <https://doi.org/10.1002/minf.202100165>
- [22] Bekavac, N.; Radović, M., Jurinjak Tušek, A., Cvjetko Bubalo, M., Zelić, B., Šalić, A.: Smart design of deep eutectic solvent-based aqueous two-phase systems for efficient lipa-

- se extraction, *Chemical Engineering Journal*, **521** (2025) 166384, <https://doi.org/10.1016/j.cej.2025.166384>
- [23] Fearn, T.: Assessing calibrations: SEP, RPD, RER and R2, *NIR News*, **13** (2002) 12-13, <https://doi.org/10.1255/nirn.689>
- [24] Le Man, H.; Behera, S. K., Park, H. S.: Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate, *International Journal of Environmental Science and Technology*, **7** (2010) 157-164, <https://doi.org/10.1007/BF03326124>
- [25] Matešić, N.; Jurina, T., Benković, M., Panić, M., Valinger, D., Gajdoš Kljusurić, J., Jurinjak Tušek, A.: Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Cannabis sativa* L.: optimization and kinetics study, *Separation Science and Technology*, **56** (2021) 2047-2060, <https://doi.org/10.1080/01496395.2020.1804938>