

Kinetička karakterizacija ketoreduktaze u reakciji oksidacije optički aktivnog alkohola

Karamatić, Lea

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:227114>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-07**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lea Karamatić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja Lea Karamatić

Predala je izrađen završni rad dana: 18. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Helena Otmačić Čurković, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Filip Car, viši asistent, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: 21. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lea Karamatić

KINETIČKA KARAKTERIZACIJA KETOREDUKTAZE U REAKCIJI OKSIDACIJE OPTIČKI AKTIVNOG
ALKOHOLA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

prof. dr. sc. Helena Otmačić Čurković

dr. sc. Filip Car

Zagreb, rujan 2023.

Srdačno se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na velikoj pomoći i strpljenju pri izradi rada. Zahvaljujem i asistentu mag.appl.chem. Emeriku Leakoviću na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Neizmjeno hvala mojim roditeljima, bratu, sestri, Andri i cijeloj mojoj obitelji te mojim prijateljima na velikoj podršci i ljubavi. Hvala vam svima što ste vjerovali u mene.

SAŽETAK

KINETIČKA KARAKTERIZACIJA KETOREDUKTAZE U REAKCIJI OKSIDACIJE OPTIČKI AKTIVNOG ALKOHOLA

U ovome radu ispitala se kinetika enzima ketoreduktaze u reakciji oksidacije optički aktivnog alkohola. Također se ispitala i kinetika povratne reakcije, redukcije ketona, i kinetika reakcije regeneracije koenzima NAD^+ uz enzim NADH oksidazu. Sve tri reakcije su opisane dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetičkim modelom uz uključene dokazane inhibicije pojedinih komponenata reakcijske smjese. Na osnovu kinetičkog modela i procijenjenih parametara postavljen je matematički model procesa u kotlastom reaktoru s i bez regeneracije koenzima. Simulacije pomoću modela napravljene su u programu Scientist, te je pokazano da je regeneracija koenzima nužna ne samo za reduciranje količine potrebnog koenzima već i za pomicanje ravnoteže u željenom smjeru. Simulacijama je dobiveno da je u reakciji oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima postignuta konverzija od 97,24%.

Ključne riječi: enzim, regeneracija koenzima, kinetika, simulacija, oksidacija alkohola, KRED, NOX

ABSTRACT

KINETIC CHARACTERIZATION OF KETOREDUCTASE IN THE OXIDATION OF OPTICALLY ACTIVE ALCOHOL

In this work, the kinetics of the enzyme ketoreductase in the oxidation reaction of optically active alcohol was studied. The kinetics of the reverse reaction, the reduction of ketones, and the kinetics of the regeneration of the coenzyme NAD^+ catalysed by NADH oxidase were also examined. All three reactions are described by the two-substrate Michaelis-Menten kinetic model, with included proven inhibitions of components of the reaction mixture. Based on the kinetic model and the estimated parameters, a mathematical model of the process in the batch reactor with and without coenzyme regeneration was set up. It was shown that coenzyme regeneration is not only necessary to reduce the amount of coenzyme required, but also to shift the equilibrium in the desired direction. The simulations showed that a conversion of 97.24% was achieved in the alcohol oxidation reaction with coenzyme regeneration.

Keywords: enzyme, coenzyme regeneration, kinetics, simulation, alcohol oxidation, KRED, NOX

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Enzimi	2
2.1.1. Podjela enzima	3
2.1.2. Stabilnost enzima	3
2.2. Oksidoreduktaze	4
2.3. Koenzim nikotinamid adenin dinukleotid	5
2.4. Regeneracija koenzima	6
2.5. Modeliranje biotransformacija	7
2.5.1. Kinetički model	7
2.5.2. Reaktorski model	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Aparatura	11
3.1.1. Analitička vaga	11
3.1.2. Homogenizator	11
3.1.3. Spektrofotometar	12
3.1.4. Aparatura za određivanje koncentracije kisika	13
3.2. Analitičke metode	13
3.2.1. Kinetička karakterizacija reakcija u procesu	13
3.2.2. Određivanje kinetike enzima KRED u reakciji oksidacije alkohola	14
3.2.3. Određivanje kinetike enzima ADH u povratnoj reakciji redukcije ketona	15
3.2.4. Određivanje kinetike enzima NOX u reakciji regeneracije koenzima	16
3.2.5. Obrada podataka	16
4. MATEMATIČKI MODEL PROCESA	18
4.1. Kinetički model procesa	18
4.2. Reaktorski model	19
5. REZULTATI I RASPRAVA	20
5.1. Kinetička karakterizacija enzima KRED u reakciji oksidacije alkohola	20
5.2. Kinetička karakterizacija enzima KRED u reakciji redukcije ketona	23
5.3. Kinetička karakterizacija enzima NOX u reakciji regeneracije koenzima	25
5.4. Simulacija reakcije oksidacije optički aktivnog alkohola	28
6. ZAKLJUČAK	33
8. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICE	36
9. PRILOG	38

1. UVOD

Industrijska biotehnologija, koja se temelji na biokatalizi, uključuje upotrebu stanica ili njezinih dijelova (enzima) za sintezu industrijski korisnih produkata u kemijskom i prehrambenom sektoru i proizvodnji biogoriva. Biokataliza je i zelena i održiva tehnologija.

Tijekom posljednjih desetljeća upotreba enzima dobivenih iz prirodnih izvora ili generiranim metodama značajno se povećala. Enzimska sposobnost kataliziranja novih reakcija novih supstrata, prepoznata je kao vrijedan alat za istraživanje i sintezu. Proteinski inženjering omogućio je optimizaciju postojećih enzima i izum posve novih biokatalitičkih reakcija koje su prije bile nepoznate u prirodi. (Sheldon et al., 2017)

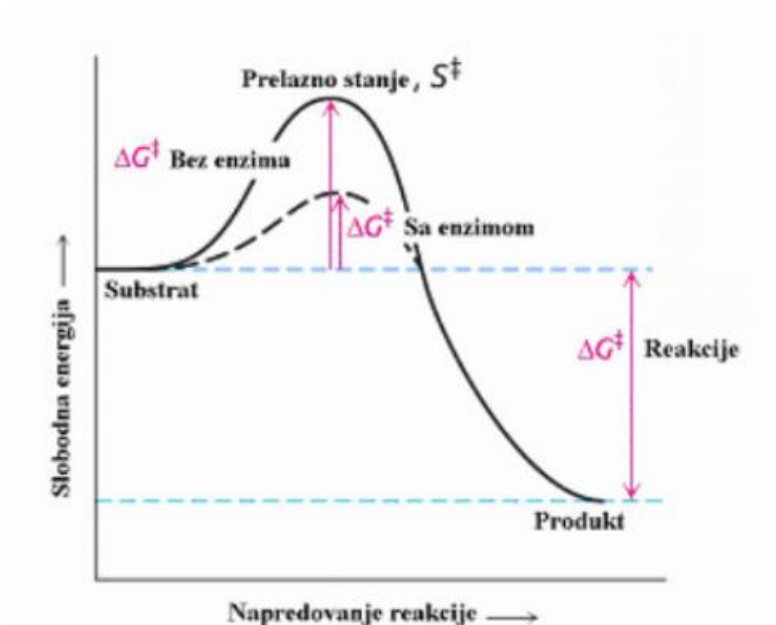
Matematički modeli, posebice korišteni u kombinaciji s računalnim tehnikama, su vrlo učinkovit alat u traženju optimalnih radnih uvjeta u dizajnu, radu i kontroli enzimskih reaktora. (Illanes, 2008) Primjenom reakcijskog inženjerstva moguće je skratiti vrijeme trajanja reakcije, smanjiti nastajanje nusprodukata, pozitivno utjecati na enzimsku stabilnost, koncentraciju produkta i ostale procesne značajke. Simulacijama je moguće bez opsežnog eksperimentiranja odrediti koji je tip reaktora najbolji za proučavanu reakciju. (Milčić et al., 2019)

2. OPĆI DIO

2.1. Enzimi

Enzimi ili biokatalizatori su po svojoj prirodi globularni proteini te nastaju spajanjem aminokiselina. Primarne strukture proteina su uvjetovane lancima aminokiselina, koje su genetski određene DNK kodom gena. Promjenom redoslijeda lanaca mijenja se struktura i funkcija enzima. (Findrik Blažević, 2017)

Enzimi se sastoje od proteinskog dijela i od pripadne prostetičke grupe (neproteinski dio). Neki enzimi takve grupe vežu reverzibilno, pa se protein tada naziva apoenzim, a prostetička grupa koenzim. Svaka biokemijska reakcija katalizirana je jednim specifičnim enzimom. Enzimi ubrzavaju reakcije i preko milijun puta, a djeluju tako da smanjuju energiju aktivacije reakcije kao što je prikazano na Slici 1. Enzimi, za razliku od kemijskih katalizatora, djeluju stereospecifično, tj. reagiraju samo s jednim od dva moguća enantiomera. Također enzimi ne mogu utjecati na smjer reakcija, već samo ubrzavaju uspostavljanje ravnoteže. (Karlson, 1984)



Slika 2.1. Prikaz načina djelovanja enzima

Struktura enzima je organizirana u četiri strukturalna nivoa. Primarna struktura proteina je definirana lancima aminokiselina. Kod sekundarne strukture razlikujemo planarnu strukturu i strukturu uzvojnice. Ukoliko se peptidni lanci preklapaju i povezuju kovalentnim vezama dolazi do nastajanja tercijarne strukture te takvi proteini mogu biti aktivni biokatalizatori. Najboljim biokatalizatorima smatraju se globularni proteini koji imaju najkompleksniju kvartarnu strukturu. (Findrik, 2017)

2.1.1. Podjela enzima

Prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju (NC-IUBMB) enzimi su podijeljeni u šest skupina s obzirom na reakcije koje kataliziraju:

- a) oksidoreduktaze (kataliziraju reakcije oksidacije/redukcije koje uključuju izmjenu elektrona i atoma vodika i kisika)
- b) transferaze (kataliziraju reakcije prijenosa funkcionalnih grupa od molekula donora do molekula akceptora)
- c) hidrolaze (kataliziraju reakcije hidrolize)
- d) liaze (kataliziraju reakcije nehidrolitičkog i neoksidativnog cijepanja kemijskih veza)
- e) izomeraze (kataliziraju reakcije promjene supstrata u njegov izomer)
- f) ligaze (kataliziraju reakcije kovalentnog vezanja dviju molekula) (Illanes, 2008)

2.1.2. Stabilnost enzima

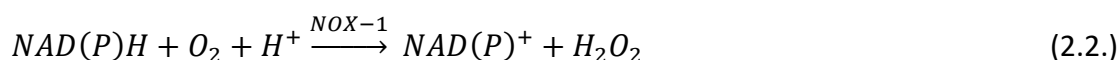
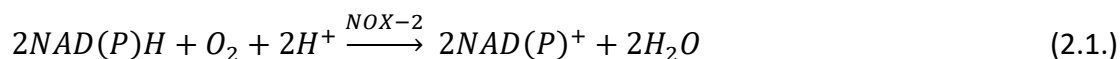
Stabilnost enzima značajna je za produktivnost procesa koji enzimi kataliziraju. Veze koje stabiliziraju trodimenzionalnu strukturu enzima osjetljive su na promjene pH, temperature, ionske jakost, itd. S obzirom na tu osjetljivost, struktura enzima važna je za stabilnost. Kod enzima može doći i do inaktivacije uslijed makromolekularne strukture enzima. (Findrik, 2017) Stabilnost proteina rezultat je ravnoteže između velikih i suprotnih entropijskih i entalpijskih učinaka te su oba ovisna o temperaturi. (Kristjánsson et al., 1991) Za biokatalizatore važna je operacijska ili procesna stabilnost koja ukazuje na dugoročnu stabilnost pod određenim uvjetima. Uz operacijsku stabilnost, postoji i stabilnost u uvjetima skladištenja koja ovisi o fizikalnim uvjetima pri kojima se enzim čuva (temperatura, pH, vlažnost itd.). (Bommarius et al., 2004)

2.2. Oksidoreduktaze

Oksidoreduktaze , uključujući oksidazu, oksigenazu, peroksidazu, dihidrogenazu i ostale, su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije. (Trisolini et al., 2019) Takve reakcije uključuju vezanje kisika, prijenos hidrida te ekstrakciju protona. (Mansour, 202.) Organizmi koriste oksidoreduktaze za sintezu biomolekula, razgradnju te uklanjanje molekula i metabolizam egzogenih molekula poput lijekova. (Mansour, 2021) Oksidoreduktaze ovise o kofaktoru ili koenzimu koji služi kao izvor hidrida. Najčešće su to koenzimi NADH i NADPH. (Wang et al., 2017) S obzirom na svojstva intrinzične enantioselektivnosti, specifičnosti i dobre biorazgradivosti koriste se u industrijske svrhe (prehrambenoj industriji, medicini, itd.).

Alkohol dehidrogenaza (ADH) važan je enzim za stereoselektivne reakcije redukcije i oksidacije alkohola, ketona i aldehida. ADH (ponekad nazivani i ketoreduktaze ,KRED) su prirodni redoks katalizatori sposobni katalizirati oksidaciju alkohola i redukciju karbonilnih spojeva. (Silva de Miranda et al., 2022) Problem reverzibilnosti kod takvih reakcija riješen je uz pomoć regeneracije koenzima NAD(P)H. (Huisman et al., 2009) Takvim pristupom osim što se pomiče ravnoteže udesno, smanjuje se potrošnja koenzima te shodno tome i troškovi procesa. (Findrik, 2017) Alkohol dehidrogenaza prisutan je kod sve tri domene živih bića: prabakterijama, bakterijama i eukariotama. Kod reakcija redukcije aldehida ili ketona, ADH preferira blago kiseli medij dok kod reakcija oksidacije alkohola alkalni medij. Međutim reakcije se mogu odvijati u neutralnom mediju. Optimalna radna temperatura trebala bi se nalaziti na sjecištu krivulje aktivnosti(rastuća) i stabilnosti(padajuća). (Silva de Miranda et al., 2022)

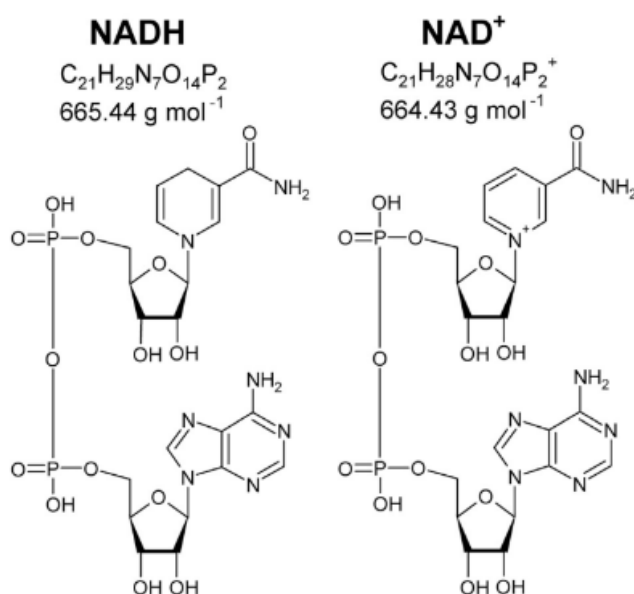
Nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) oksidaza (NOX) smatra se glavnim izvorom reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). NADH oksidaze nalaze se u raznim skupinama eukariota, ali ne i u prokariotima te igraju ključne uloge u raznim biološkim procesima, kao što su prijenos signala i sinteza hormona. (Sumimoto, 2008). Ovi enzimi kataliziraju oksidaciju NAD(P)H na način da istodobno reduciraju molekularni kisik do molekule vode (H_2O), NOX-2 (Jedn. 2.1.), ili vodikovog peroksida (H_2O_2) (Jedn. 2.2.), NOX-1. Koriste se u regeneraciji koenzima, obzirom da za oksidaciju NAD(P)H trebaju samo kisik, a produkti reakcije su voda ili vodikov peroksid koji u pravilu ne utječu na kinetiku glavne reakcije (Gao et al., 2019).



2.3. Koenzim nikotinamid adenin dinukleotid

Koenzimi su organske molekule malih molekulskih masa koje se reverzibilno povezuju s enzimom i nisu dio njegove strukture. U reakcijama dehidrogenaza služe kao intermedijarni prijenosnici elektrona, a mogu još prenositi i specifične atome ili funkcionalne skupine. (Illanes, 2008)

NAD⁺ i NADH važni su koenzimi u reakcijama koje kataliziraju dehidrogenaze. NADH jest reducens koji se oksidira u NAD⁺, a glavna razlika u strukturama NADH i NAD⁺ jest u hidridnom ionu i to je prikazano na Slici 2.2. (Ying, 2006)

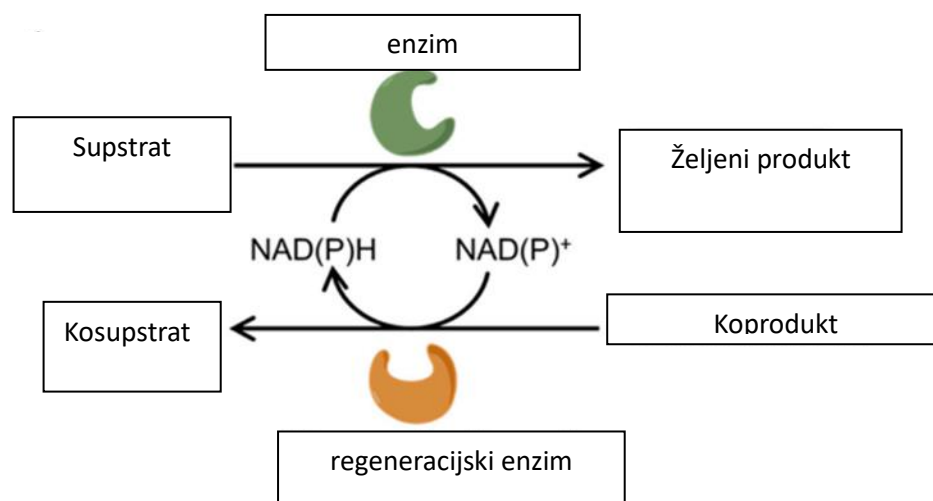


Slika 2.2. Kemijske strukture NAD⁺ i NADH

2.4. Regeneracija koenzima

Regeneracije koenzima omogućava korištenje skupih koenzima, u količinama manjim od stehiometrijskih, i provođenje termodinamički nepovoljnih reakcija. Regeneracija se može provesti pomoću nekoliko metoda: enzimska regeneracija, kemijska regeneracija, homogena katalitička regeneracija, heterogena katalitička regeneracija, elektrokemijska regeneracija i fotokatalitička regeneracija.

Za regeneraciju NADH nužan je prijenos protona (katalitički i nekatalitički) i dva elektrona s hidridnih donora. Kako je regeneracija reverzibilni proces, oksidirani ili reducirani oblik koenzima pretvara se u početni oblik i predstavlja jedan od supstrata početne reakcije. Mehanizam regeneracije prikazan je na Slici 2.3. Aktivnost regeneracije koenzima mjeri se frekvencijom obrta i brojem obrta kod in situ regeneracijskog sustava.



Slika 2.3. Prikaz mehanizma regeneracije koenzima

Enzimska regeneracija jest jedina primjenjiva metoda regeneracije NADH u industrijskim mjerilima. Razlozi tomu su visoka aktivnost, blagi uvjeti rada, niska energija i selektivnost. Iako se ova metoda koristi u industrijskim mjerilima mjesta za napredak i razvoj ima. Jedan od problema jest nastanak nusprodukata topljivih u vodi koji zahtijevaju skupo odvajanje i pročišćivanje produkta te mogu uzrokovati deaktivaciju enzima. Također je potrebno održavati pH optimalnim kako se ne bi narušilo enzimsko djelovanje. (Wang et al., 2017)

2.5. Modeliranje biotransformacija

Bioprocеси kod kojih se reakcije odvijaju u jednom ili dva stupnja te se mogu odvijati u stanici ili izvan nje nazivaju se biotransformacije. Takve transformacije karakterizira sličnost struktura reaktanata i produkata i katalizirane su pročišćenim enzimima ili enzimima u cijelim stanicama (ne)živih mikroorganizama. (Findrik, 2017)

Procjena procesa koji su najprikladniji za provedbu biokatalize omogućena je modeliranjem i simulacijom. Modeliranjem se mogu opisati stvarne i moguće izvedbe bioreaktora na osnovi dobro utemeljene teorije. Iz teorije se dobiva matematički model koji služi kao radni model procesa, a sastoji se od kinetičkog i reaktorskog modela. Rješavanje modela zahtjeva poznavanje prirode svih važnih parametara, utjecaj parametara na proces i kako se oni mogu definirati u kvantitativnom smislu. Također se moraju odrediti i varijable i njihovi odvojeni učinci. Time se može riješiti matematički model i odrediti valjanost modela usporedbom rezultata simulacije modela s dobivenim eksperimentalnim podacima. (Dunn et al., 2003)

Modeliranje i simuliranje doprinosi razvoju i procjeni strategija upravljanja procesom, predviđanju stabilnosti enzima i smanjenju troškova procesa.

2.5.1. Kinetički model

Kinetički model enzimske reakcije je matematički izraz koji opisuje vezu između brzine enzimske reakcije i veličine stanja reakcijskog sustava : koncentracije, temperature i/ili tlaka. Najčešće tlak nije značajna veličina kod enzimskih reakcija jer se one uglavnom izvode pri atmosferskom tlaku.

Provođenjem eksperimentalnih kinetičkih istraživanja postavlja se kinetički model. Prvotno se odabire model za koji se smatra da bi mogao biti najbolji za određenu reakciju. Izbor najboljeg model provodi se metodom analize pogreške. (Findrik, 2017)

Kinetika enzimskih reakcija opisana je Michaelis-Menteničin modelom. Oni su 1913. godine postavili jednadžbu za najjednostavniji slučaj reakcije s jednim supstratom. S dobrom aproksimacijom model jest primjenjiv na većinu enzimskih reakcija. Mehanizam reakcije odvija

se u dva koraka. Svaka enzimaska reakcija započinje stvaranjem enzim-supstrat-kompleksa (ES), a zatim slijedi nepovratna reakcija gdje se kompleks raspada na konačni produkt (P) i nepromijenjeni biokatalizator tj. enzim (E). Kinetički model prikazan je jednadžbama 2.3. i 2.4. (Karlson, 1984)



Oznaka k_1 označava konstantu brzine napredujuće reakcije nastajanja enzim-supstrat-kompleksa, k_2 označava konstantu brzine povratne reakcije raspada enzim-supstrat-kompleksa, a k_3 konstantu brzine reakcije nastajanja produkta ili katalitička konstanta enzima te sve određuju eksperimentalno. (Findrik, 2017) Michaelis Menten jednadžba za predviđanje kinetike enzima (2.5.) najšire je prihvaćena i primjenjivana kinetika. (Karlson 1984)

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m + c_S} \quad (2.5.)$$

Navedenom jednadžbom opisuje se brzina potrošnje supstrata r_S [$\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$] u ovisnosti o koncentraciji supstrata c_S [mmol dm^{-3}]. Dva karakteristična parametra ove jednadžbe su: maksimalna brzina reakcije V_m i Michaelisova konstanta K_m . Izrazi za te parametre dani su jednadžbama 2.6. i 2.7.

$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad (2.6.)$$

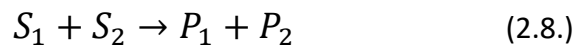
$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.7.)$$

Iz izraza 2.4. može se zaključiti da se na maksimalnu brzinu reakcije može utjecati promjenom koncentracije enzima. Michaelisova konstanta karakteristična je veličina za svaki enzim te ima dimenziju koncentracije [mmol dm^{-3}]. Ako je konstanta velika onda enzim nema dobar afinitet prema supstratu. Maksimalna brzina reakcije ostvarena je kada se sve molekule enzima nalaze u kompleks enzim-supstrat te nema slobodnog enzima [$\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$].

Unosom vrijednosti za brzinu prema koncentraciji supstrata za određene vrijednosti V_m i K_m dobije se hiperbola ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata prikazana na Slici 4.

(Karlson, 1984) Hiperbola se može podijeliti na tri područja kinetike: područje kinetike prvog reda, područje Michaelis-Menteničine kinetike, područje kinetike nultog reda. Kod niskih koncentracija supstrata ($c_s \ll K_m$), pri stalnoj koncentraciji enzima, vrijedi kinetika reakcija prvog reda te je brzina linearno proporcionalna koncentraciji supstrata. U području visokih koncentracija ($c_s \gg K_m$), prisutna je kinetika nultog reda gdje brzina ne ovisi o koncentraciji supstrata. Brzina reakcije asimptotski se približava graničnoj vrijednosti maksimalne brzine reakcije. (Baković, 2017)

Kada je prisutan koenzim ili neki drugi supstrat reakcija je dvosupstratna (2.8.) te slijedi dvosupstratnu Michealis – Menteničinu kinetiku danu izrazom 2.9. :



$$r = \frac{V_m \cdot c_{s1} \cdot c_{s2}}{(K_m^{s1} + c_{s1}) \cdot (K_m^{s2} + c_{s2})} \quad (2.9.)$$

2.5.1.1. Inhibicija enzima

Inhibicija enzima podrazumijeva smanjenje ili blokiranje aktivnosti enzima na određenom specifičnom aktivnom mjestu pomoću inhibitora. Postoje tri vrste inhibicije: kompetitivna, nekompetitivna i antikompetitivna. Kod kompetitivne (jedn. 2.10.), inhibitor se reverzibilno veže na isto mjesto za koje se supstrat veže. Kada se inhibitor veže na mjestu koje nije aktivno mjesto enzima dolazi do nekompetitivne inhibicije(jedn. 2.11.). U slučaju kad se inhibitor ne veže za slobodni enzim, već za enzim-supstrat- kompleks javlja se antikompetitivna inhibicija (jedn. 2.12.) (Karlson, 1984) U slučaju kada sam supstrat u većim koncentracijama inhibira reakciju najčešće se radi o antikompetitivnoj inhibiciji. Navedene inhibicije supstrata uključuju se u Michaelis-Menteničin model.

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + \left(1 + \frac{c_I}{k_i}\right) + c_S} \quad (2.10.)$$

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{(K_m^S + c_S) \left(1 + \frac{c_I}{K_i}\right)} \quad (2.11.)$$

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S \cdot \left(1 + \frac{c_I}{k_i}\right)} \quad (2.12.)$$

U izrazima 2.10. – 2.12. c_i predstavlja koncentraciju inhibitora [mmol dm^{-3}], a K_i konstantu inhibicije [mmol dm^{-3}].

2.5.2. Reaktorski model

Enzimski reaktori, procesni uređaji, konstruirani su slično kemijskim reaktorima te se kao katalizatori koriste enzimi. Postoji više izvedbi enzimskih reaktora : kotlasti, protočno kotlasti i cijevni.

Idealni kotlasti reaktor karakteriziran je homogenošću sastava reakcijske smjese. Procesi u kotlastom reaktoru odvijaju se nestacionarno odnosno supstrat, dodan na početku reakcije, s vremenom se troši dok se koncentracija produkta s vremenom povećava. Kod idealnog kotlastog reaktora pretpostavlja se rad pri konstantnoj temperaturi i volumenu. Ukupno vrijeme rada računa se kao zbroj vremena trajanja reakcije i vremena potrebnog za punjenje i pražnjenje reaktora.

Reaktorski modeli su bilance tvari u reaktorima koje se temelje na Zakonu o očuvanju mase. Bilanca tvari za kotlasti reaktor idealnog miješanja dana je jednadžbom 2.13.

$$r_A \cdot V = - \frac{dn_A}{dt} \quad (2.13.)$$

U izrazu 2.13. brzina potrošnje komponente A [$\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$] označena je s r_A , V volumen reakcijske smjese u bioreaktoru [dm^{-3}], t vrijeme [min] i n_A je množina komponente A [mol dm^{-3}].

Uz konstantni volumen reakcijske smjese brzina reakcije je dana izrazom 2.14.

$$r_A = - \frac{dc_A}{dt} \quad (2.14.)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Analitička vaga

Za provođenje eksperimenta sve potrebne odvage reaktanata vagane su na analitičkoj vagi *Shimadzu*. (Slika 3.1.)



Slika 3.1. Analitička vaga Shimadzu

3.1.2. Homogenizator

Svi uzorci homogenizirani su na homogenizatoru Vortex 3- IKA . (Slika 3.2.)



Slika 3.2. Homogenizator Vortex 3- IKA

3.1.3. Spektrofotometar

Za analizu spektra elektromagnetskog zračenja koristi se uređaj spektrofotometar koji se sastoji od izvora zračenja, monokromatora i detektora. Bilježenjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao ovisno o valnoj duljini nastaje spektar. (Macan et al., 2019) Intenzitet elektromagnetskog zračenja I_0 smanjuje se prolazom kroz otopinu koja može apsorbirati to zračenje. Smanjenje intenziteta ovisi o koncentraciji tvari (c) koja apsorbira zračenje, svjetlosnom putu kroz uzorak (b) i molarnom apsorpcijskom koeficijentu (ϵ). Princip rada spektrofotometra temelji se na Lambert-Beerovom zakonu kojim je dan odnos intenziteta prije i poslije prolaza kroz uzorak: (Ašperger, 2023)

$$\log \frac{I_0}{I} = A = c \cdot b \cdot \epsilon$$

(3.1.)

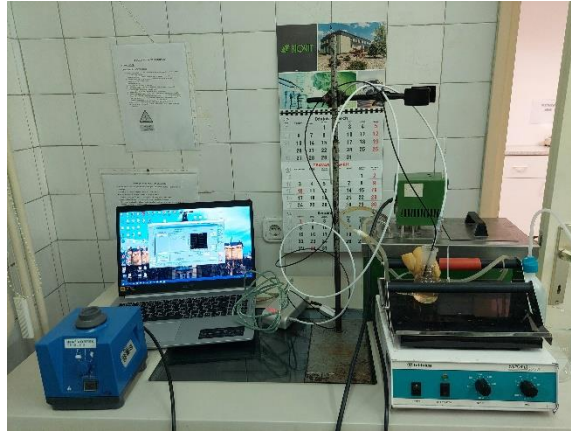
U ovom radu korišten je spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* (Slika 3.3.) NADH apsorbira svjetlost na 340nm, te se aktivnost enzima koji proizvodi ili troši NADH može se mjeriti opadanjem ili povećanjem apsorpcije na 340nm.



Slika 3.3. Spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

3.1.4. Aparatura za određivanje koncentracije kisika

Koncentracija kisika određena je kisikovom elektrodom uz pomoć programa Pyro Oxygen Logger. Variranjem protoka dušika i zraka dobio se željeni udio kisika. Na Slici 3.4. prikazana je aparatura.

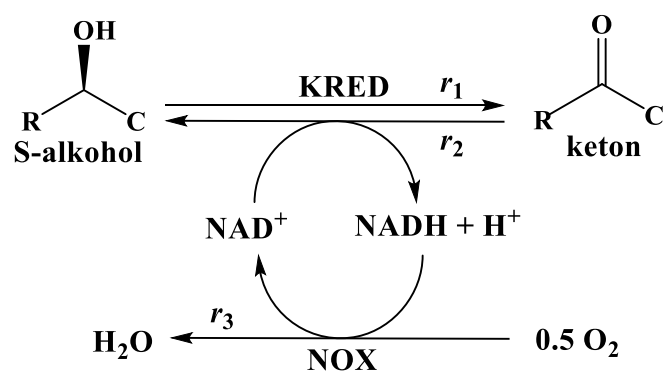


Slika 3.4. Aparatura za određivanje koncentracije kisika

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Kinetička karakterizacija reakcija u procesu

Proces se sastoji od reakcije oksidacije S-alkohola katalizirane ketoreduktazom (KRED) i reakcije regeneracije koenzima katalizirane NADH oksidazom. Shema procesa prikazana je na Slici 3.6.



Slika 3.6. Shematski prikaz reakcije

Oksidacija S-alkohola je povratna reakcija, te kinetička karakterizacija enzima KRED zahtjeva određivanje kinetike enzima u reakciji oksidacije alkohola i povratne reakcije redukcije ketona. Reakcija oksidacije koenzima NADH je nepovratna te je nužno ispitati kinetiku samo u jednom smjeru.

Sva mjerenja provodila su se pri temperaturi od $T=25^{\circ}\text{C}$. Zbog osjetljivosti na promjenu pH korišten je fosfatni pufer (pH=8) koncentracije $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1 \text{ M}$. Volumen kvarcne kivete u kojoj se mjerila kinetika iznosio je 1cm^3 . Uz pomoć spektrofotometra mjerila se promjena apsorbancije s vremenom te se mjerilo na valnoj duljini od 340nm. Kod svih variranja i ispitivanja koncentracija enzima bila je jednaka i iznosila je $\gamma_{\text{KRED}} = 0,72 \text{ mg/cm}^3$. Iz izmjerene promjene apsorbancije s vremenom izračunala se volumna aktivnost $A_V [\text{U/ml}]$ dana izrazom 3.2. i specifična aktivnost enzima $A_S [\text{U/mg}]$ dana izrazom 3.3.

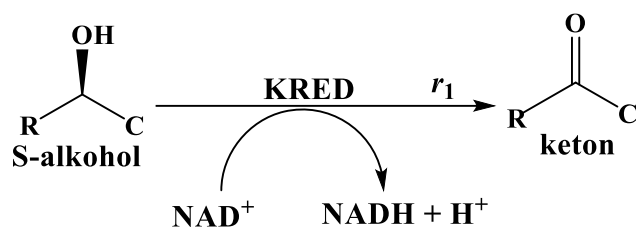
$$A_V = \frac{V_r}{\epsilon_{340} \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (3.2.)$$

$$A_S = \frac{A_V}{\gamma_E} \quad (3.3)$$

U izrazu 3.2. ukupni volumen uzorka u kiveti označen je s $V_r [\text{ml}]$, ϵ_{340} ekstinkcijski koeficijent pri $\lambda=340 \text{ nm}$ [$\epsilon(\text{NADPH})_{340} = 6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$], d je promjer kvarcne kivete [cm], V_E je volumen dodanog enzima [mL], γ_E je koncentracija dodanog enzima [mg/mL], a $\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$ je promjena apsorbancije u vremenu [min^{-1}].

3.2.2. Određivanje kinetike enzima KRED u reakciji oksidacije alkohola

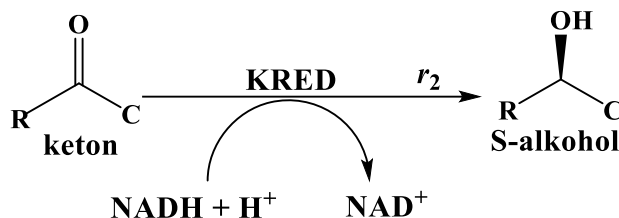
Za ispitivanje kinetike reakcije oksidacije alkohola katalizirane KRED-om (Slika 3.7) mjerio se utjecaj alkohola i NAD^+ na početnu reakcijsku brzinu te u svrhu ispitivanja inhibicije utjecaj ketona i NADH. Za procjenu parametara V_m i K_m napravljena su dva seta mjerenja u kojem je ispitan utjecaj pojedinih supstrata na brzinu reakcije: variranje koncentracije alkohola u rasponu $0,09 - 11,25 \text{ mmol/dm}^3$ uz konstantnu koncentraciju NAD^+ ($c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol/dm}^3$), te variranje koncentracija NAD^+ u rasponu od $0,0025 - 3,75 \text{ mmol/dm}^3$ uz konstantnu koncentraciju alkohola ($c_{\text{S-AOH}} = 4,5 \text{ mmol/dm}^3$).



Slika 3.7. Shematski prikaz reakcije oksidacije alkohola

S obzirom na moguću inhibiciju enzima nastalim produktima bilo je potrebno ispitati i inhibiciju ketonom i NADH-om. Za ispitivanje inhibicije ketonom variralo se koncentracijama ketona u rasponu 0 - 5,5 mmol/dm³. Kod ispitivanja inhibicije NADH-om koncentracije NADH varirale su od 0 - 0,216 mmol/dm³. U oba ispitivanja koncentracije alkohola i NAD⁺ bile su stalne i iznosile su $c_{\text{S-AOH}} = 4,5 \text{ mmol/dm}^3$ i $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol/dm}^3$. Kod svih variranja i ispitivanja koncentracija enzima bila je jednaka i iznosila je $\gamma_{\text{KRED}} = 0,72 \text{ mg/cm}^3$.

3.2.3. Određivanje kinetike enzima ADH u povratnoj reakciji redukcije ketona



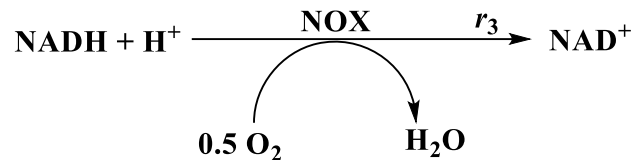
Slika 3.8. Shematski prikaz reakcije redukcije ketona

Kod određivanja kinetike enzima u reakciji redukcije ketona postupak je bio isti (Slika 3.8.), ali su u ovome slučaju reaktanti bili keton i NADH, dok se za produkte alkohol i NAD⁺ ispitivala inhibicija. Variranjem koncentracije ketona u intervalu 0,005 - 7,5 mmol/dm³ ispitivao se njihov utjecaj na brzinu reakcije. Za vrijeme ispitivanja koncentracija NADH nije se mijenjala i iznosila je $c_{\text{NADH}} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$. U postupku variranja NADH koncentracija NADH bila je u rasponu od 0,005 - 0,12 mmol/dm³, a koncentracija ketona cijelo je vrijeme bila ista $c_{\text{K}} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$.

Za vrijeme ispitivanja inhibicije koncentracije ketona ($c_{\text{K}} = 1 \text{ mmol/dm}^3$) i NADH ($c_{\text{NADH}} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$) nisu se mijenjale. Koncentracija alkohola varirala je od 0 - 49,5

mmol/dm³, dok je koncentracija NAD⁺ varirala od 0 - 9 mmol/dm³. Kod svih variranja i ispitivanja koncentracija enzima bila je jednaka i iznosila je $\gamma_{KRED} = 0,72 \text{ mg/cm}^3$.

3.2.4. Određivanje kinetike enzima NOX u reakciji regeneracije koenzima



Slika 3.9. Shematski prikaz regeneracije koenzima

Kao i u prethodno opisanim postupcima i kod ovog određivanja kinetike variralo se koncentracijama NADH i kisika te se ispitala inhibicija NAD⁺-om, kao produktom reakcije te alkoholom i ketonom kao komponentama reakcijske smjese. Kod variranja koncentracija NADH, raspon koncentracija bio je od 0,002 - 0,2 mmol/dm³, dok je koncentracija kisika iznosila $c_{\text{O}_2} = 0,233 \text{ mmol/dm}^3$, a koncentracija enzima NOX iznosila je $\gamma_{\text{NOX}} = 0,20 \text{ mg/cm}^3$.

Kontroliranjem unosa plinovitog dušika i zraka u reaktor varirala se koncentracija kisika te se koncentracija mijenjala od 0,004 - 0,098 mmol/dm³, a koncentracija NOX i NADH iznosile su $\gamma_{\text{NOX}} = 0,4 \text{ mg/cm}^3$ i $c_{\text{NADH}} = 0,17 \text{ mmol/dm}^3$. U sva tri ispitivanja inhibicije koncentracije enzima NOX ($\gamma_{\text{NOX}} = 0,2 \text{ mg/cm}^3$), NADH ($c_{\text{NADH}} = 0,17 \text{ mmol/dm}^3$) i O₂ ($c_{\text{O}_2} = 0,233 \text{ mmol/dm}^3$) bile su konstantne. Koncentracija NAD⁺ varirala je od 0 - 6,75 mmol/dm³, koncentracija alkohola od 0 - 87,57 mmol/dm³, dok je koncentracija ketona varirala od 0 - 9,73 mmol/dm³.

3.2.5. Obrada podataka

Obrada eksperimentalnih podataka odrađena je u programskom paketu *Scientist*. Nelinearnom regresijom uz pomoć metode najmanjeg kvadrata ili simpleks metode procijenjeni su parametri modela. Cilj tih metoda jest pronalazak minimalnog zbroja kvadrata greške između podataka izračunatih pomoću modela i eksperimentalnih podataka.

Uz pomoć matematičkog modela te eksperimentalnih podataka provedena je i simulacija. Prilikom simulacija pomoću modela odnosno za predviđanje promjene koncentracija reaktanata i produkata tijekom određenog vremena korišteni su kinetički

parametri (Michaelis-Menteničina konstanta, maksimalna brzina reakcije i konstante inhibicije).

4. MATEMATIČKI MODEL PROCESA

Matematički model procesa koji se odvija u reaktoru sastoji se od kinetičkog i reaktorskog modela procesa. Za postavljanje matematičkog modela reakcije oksidacije optički aktivnog alkohola pretpostavili su se idealni uvjeti procesa točnije idealno miješanje u reaktoru, konstantna temperatura procesa i konstantan volumen reaktora.

4.1. Kinetički model procesa

Kinetički model postavljen je na temelju eksperimentalnih istraživanja i sastoji se od jednadžbi za oksidaciju alkohola (4.1.), redukciju ketona (4.2.) i regeneraciju koenzima (4.3.).

Dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom (alkohol) i kompetitivnim inhibicijama produktima (keton i NAD⁺) opisana je reakcija oksidacije optički aktivnog alkohola.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot \gamma_{KRED} \cdot c_{S-AOH} \cdot c_{NAD^+}}{\left(c_{S-AOH} + K_m^{S-AOH} \left(1 + \frac{c_K}{K_{i1}^K} \right) \right) \cdot \left(c_{NAD^+} + K_m^{NAD^+} + \frac{c_{NAD^+}^2}{K_{iS}^{NAD^+}} \right)} \quad (4.1.)$$

Reakcija redukcije ketona također je opisana dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom (keton) i kompetitivnim inhibicijama produktima (alkohol i NADH)

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot \gamma_{KRED} \cdot c_K \cdot c_{NADH}}{\left(c_K + K_m^K \left(1 + \frac{c_{S-AOH}}{K_{i2}^{S-AOH}} \right) + \frac{c_K^2}{K_{iS}^K} \right) \cdot \left(c_{NADH} + K_{m2}^{NADH} \cdot \left(1 + \frac{c_{NAD^+}}{K_{i2}^{NAD^+}} \right) \right)} \quad (4.2.)$$

Reakcija regeneracije koenzima također je opisana dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnim inhibicijama produktima, alkoholom, ketonom i NAD⁺.

$$r_3 = \frac{V_{m3} \cdot \gamma_{NOX} \cdot c_{NADH} \cdot c_{O_2}}{\left(K_m^{NADH} \left(1 + \frac{c_{NAD^+}}{K_{i3}^{NAD^+}} + \frac{c_{S-AOH}}{K_{i3}^{S-AOH}} + \frac{c_K}{K_{i3}^K} \right) + c_{NAD} \right) \cdot (c_{O_2} + K_m^{O_2})} \quad (4.3.)$$

4.2. Reaktorski model

Reaktorski model za kotlasti reaktor za oksidaciju alkohola bez regeneracije koenzima se sastoji od bilančnih jednažbi za alkohol (4.4.), keton (4.5.), NAD⁺(4.6.) i NADH (4.7.).

$$\frac{dc_{S-AOH}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (4.4.)$$

$$\frac{dc_K}{dt} = r_1 - r_2 \quad (4.5.)$$

$$\frac{dc_{NAD^+}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (4.6.)$$

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (4.7.)$$

Reaktorski model za kotlasti reaktor za oksidaciju alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu NOX-om se sastoji od bilance tvari za alkohol (4.8.), keton (4.9.), NAD⁺(4.10.) i NADH (4.11.) i kisik (4.12.).

$$\frac{dc_{S-AOH}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (4.8.)$$

$$\frac{dc_K}{dt} = r_1 - r_2 \quad (4.9.)$$

$$\frac{dc_{NAD^+}}{dt} = -r_1 + r_2 + r_3 \quad (4.10.)$$

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 \quad (4.11.)$$

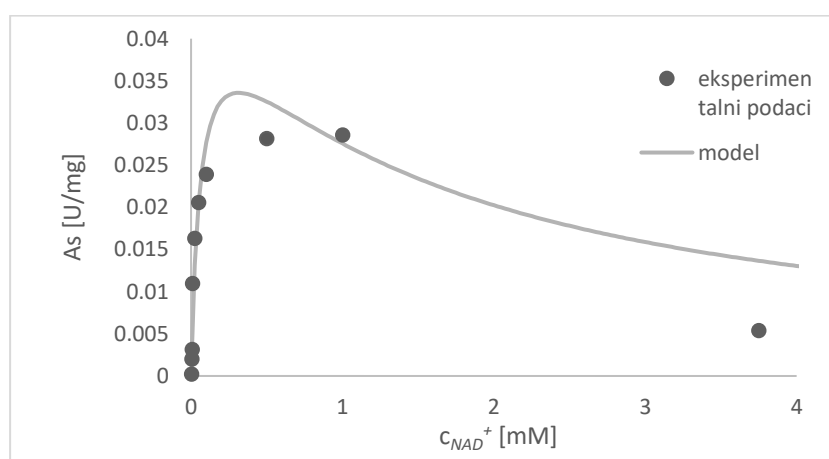
$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = k_L a (c_{O_2}^* - c_{O_2}) - 0.5 \cdot r_3 \quad (4.12.)$$

5. REZULTATI I RASPRAVA

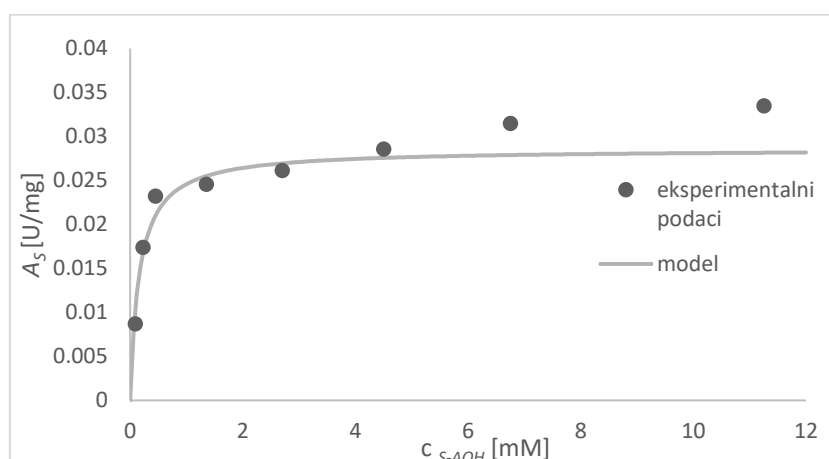
U ovome se radu određivala kinetika enzima ketoreduktaze u reakciji oksidacije alkohola. Korišteni enzim za aktivnost treba prisustvo koenzima. Koenzim se treba regenerirati kako bi se izbjeglo njegovo dodavanje u stehiometrijskom omjeru te je u tu svrhu korišten enzim NADH oksidaza koja je također kinetički karakteriziran. Svi kinetički parametri procijenjeni su u programskom paketu Scientist (Prilozi 1-9). Simulacijama procesa u kotlastom reaktoru pomoću matematičkog modela (Prilozi 10 -13) se odredila konverzija supstrata u slučaju bez i s regeneracijom koenzima.

5.1. Kinetička karakterizacija enzima KRED u reakciji oksidacije alkohola

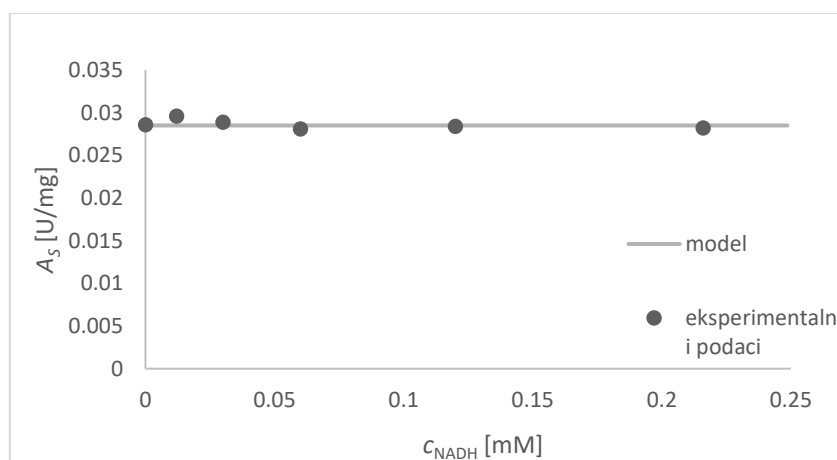
Kinetička karakterizacija ketoreduktaze u reakciji oksidacije alkohola određena je ispitivanjem ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentracijama supstrata, alkohola i NAD^+ , što je prikazano na Slikama 5.1. i 5.2.. Ispitane su i ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentracijama produkta, NADH i ketona, što je prikazano na Slikama 5.3. i 5.4..



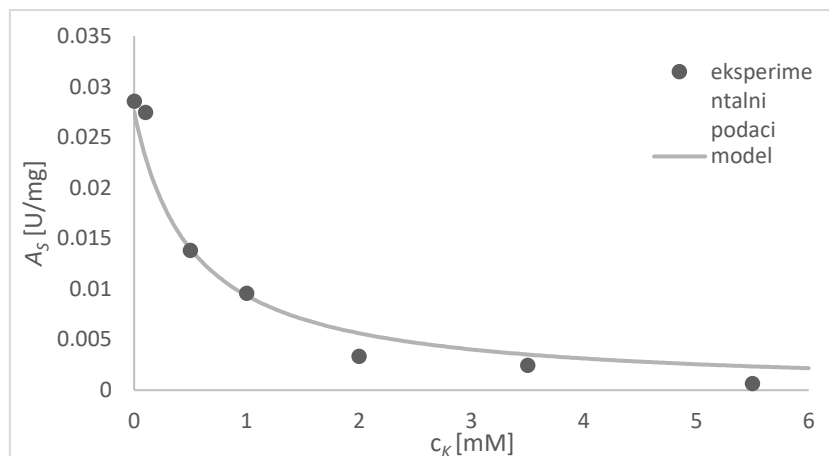
Slika 5.1. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije alkohola o koncentraciji NAD^+ ($c_{\text{NAD}^+} = 0,0025\text{--}3,75$ mM; $\gamma_{\text{KRED}} = 0,072$ mg /cm³; $c_{\text{S-AOH}} = 4,5$ mM; $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ\text{C}$)



Slika 5.2. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije alkohola o koncentraciji S-alkohola ($c_{S-AOH} = 0,09-11,25$ mM; $\gamma_{KRED} = 0,072$ mg /cm³; $c_{NAD^+} = 1$ mM; $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25$ °C)



Slika 5.3. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije alkohola o koncentraciji NADH ($c_{NADH} = 0-0,216$ mM; $\gamma_{KRED} = 0,072$ mg /cm³; $c_{NAD^+} = 1$ mM; $c_{S-AOH} = 4,5$ mM; $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25$ °C)



Slika 5.4. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije alkohola o koncentraciji ketona ($c_K = 0-5,5$ mM; $\gamma_{KRED} = 0,072$ mg /cm³; $c_{NAD^+} = 1$ mM; $c_{S-AOH} = 4,5$ mM; $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ\text{C}$)

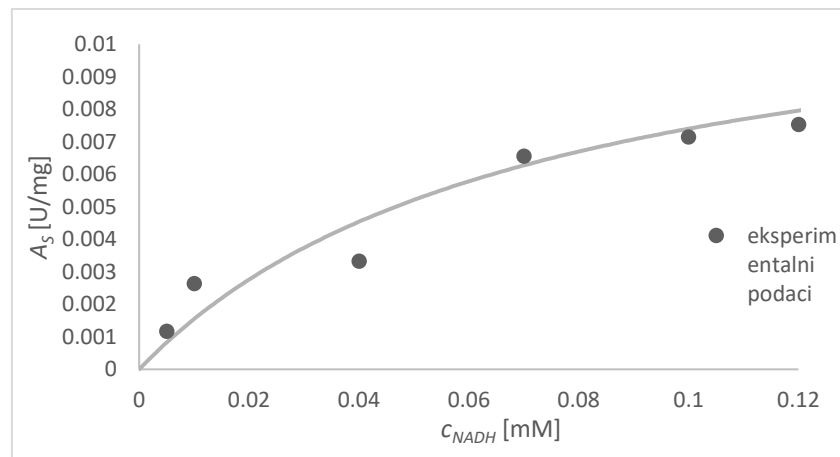
Grafičkim prikazom ovisnosti početne reakcijske brzine o supstratima primijećena je inhibicija supstratom NAD^+ te je detektirana i kompetitivna inhibicija produktom, ketonom. Kinetika reakcije oksidacije alkohola opisana je dvosupstratnom Michealis – Menteničinom jednadžbom s inhibicijom supstratom te s kompetitivnom inhibicijom produktom (Jedn 4.1.). U slučaju inhibicije produktom NAD^+ inhibicija nije detektirana (Slika 5.3) jer nije uočena promjena reakcijske brzine s porastom koncentracije NADH. Iz vrijednosti parametara modela, prikazanih u Tablici 5.1, može se zaključiti kako je NAD^+ specifičniji supstrat od alkohola. Niska vrijednost procijenjene konstante inhibicije za keton ukazuje na značajnu inhibiciju reakcije ovom komponentom.

Tablica 5.1. Kinetički parametri u reakciji oksidacije alkohola

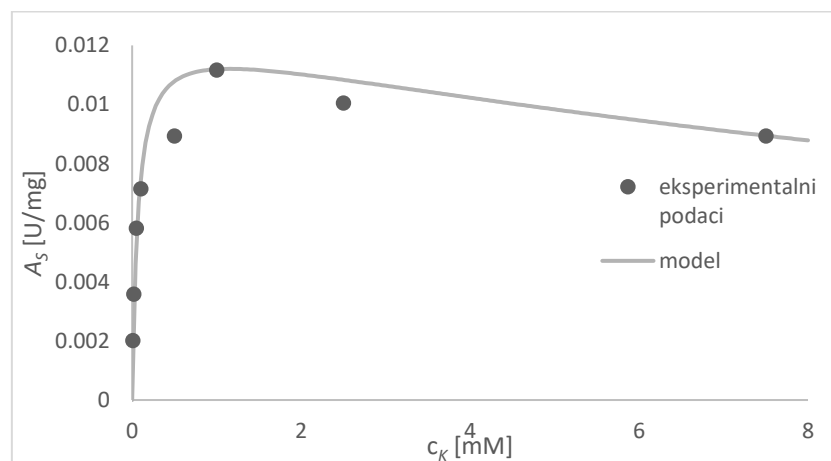
PARAMETAR	JEDINICA	VRIJEDNOST
V_{m1}	U mg ⁻¹	0,049 ± 0,011
$K_m^{\text{NAD}^+}$	mM	0,065 ± 0,029
$K_m^{\text{S-AOH}}$	mM	0,162 ± 0,063
$K_{is}^{\text{NAD}^+}$	mM	1,530 ± 0,855
K_{i1}^K	mM	0,018 ± 0,003

5.2. Kinetička karakterizacija enzima KRED u reakciji redukcije ketona

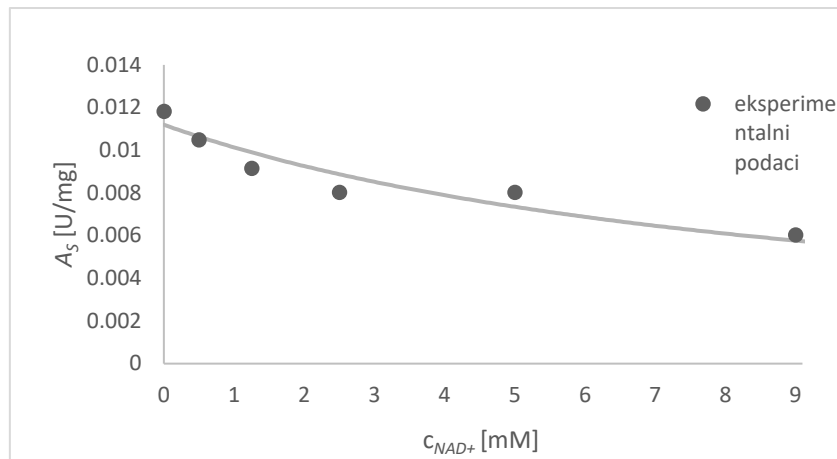
Kinetička karakterizacija enzima u povratnoj reakciji redukcije ketona određena je ispitivanjem ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentracijama supstrata, ketona i NADH, što je prikazano na Slikama 5.5. i 5.6.. Ispitane su i inhibicije produktima, alkoholom i NAD^+ , što je prikazano na Slikama 5.7. i 5.8..



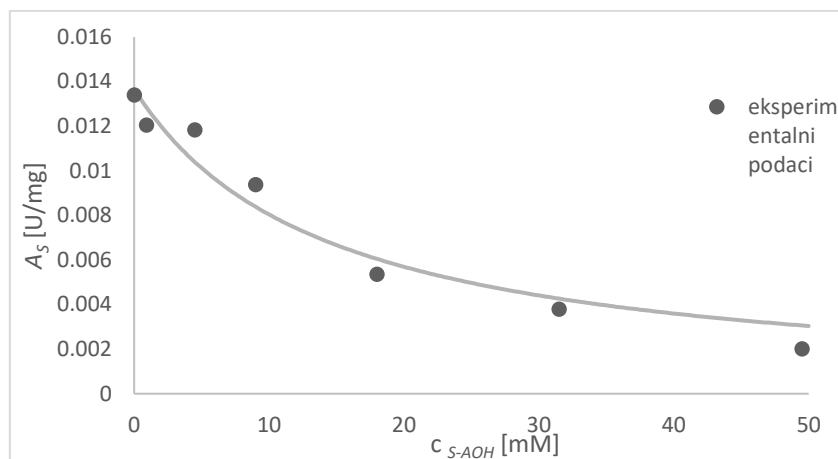
Slika 5.5. Ovisnost reakcijske brzine u reakciji redukcije ketona o koncentraciji NADH ($c_{\text{NADH}} = 0,005\text{-}0,120$ mM; $\gamma_{\text{KRED}} = 0,072$ mg /cm³; $c_{\text{K}} = 0,1$ mM; $c_{\text{fosfatni puffer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ\text{C}$)



Slika 5.6. Ovisnost reakcijske brzine u reakciji redukcije ketona o koncentraciji ketona ($c_{\text{K}} = 0,005\text{-}7,5$ mM; $\gamma_{\text{KRED}} = 0,072$ mg /cm³; $c_{\text{NADH}} = 0,1$ mM; $c_{\text{fosfatni puffer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ\text{C}$)



Slika 5.7. Ovisnost reakcijske brzine u reakciji redukcije ketona o koncentraciji NAD^+ ($c_{NAD^+} = 0-9$ mM; $\gamma_{KRED} = 0,072$ mg /cm³; $c_{NADH} = 0,1$ mM; $c_K = 1$ mM; $c_{fosfatni\ pufer} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ C$)



Slika 5.8. Ovisnost reakcijske brzine u reakciji redukcije ketona o koncentraciji S-alkohola ($c_{S-AOH} = 0-49,5$ mM; $\gamma_{KRED} = 0,072$ mg /cm³; $c_{NADH} = 0,1$ mM; $c_K = 1$ mM; $c_{fosfatni\ pufer} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ C$)

Grafičkim prikazom ovisnosti početne reakcijske brzine o supstratima primijećena je inhibicija supstratom ketonom te je detektirana i kompetitivna inhibicija produktima, S-alkoholom i NAD^+ -om. Kinetika reakcije redukcije ketona opisana je dvosupstratnom Michealis – Menteničinom jednadžbom s inhibicijom supstratom te s kompetitivnim inhibicijama produktima reakcije (Jedn. 4.2.). Iz vrijednosti parametara modela, prikazanih u Tablici 5.2., može se zaključiti kako je keton nešto specifičniji supstrat od NADH. U slučaju inhibicije produktom NAD^+ -om inhibicija nije toliko izražena jer je konstanta inhibicije ($K_{i\ NAD^+}$) veća od

Michaelis-Menteničine konstante (K_m) za NADH. Iz istog razloga ni inhibicija alkoholom iako veća od inhibicije NAD⁺ nije značajna obzirom da je njena vrijednost veća od Michaelis-Menteničine konstante za keton.

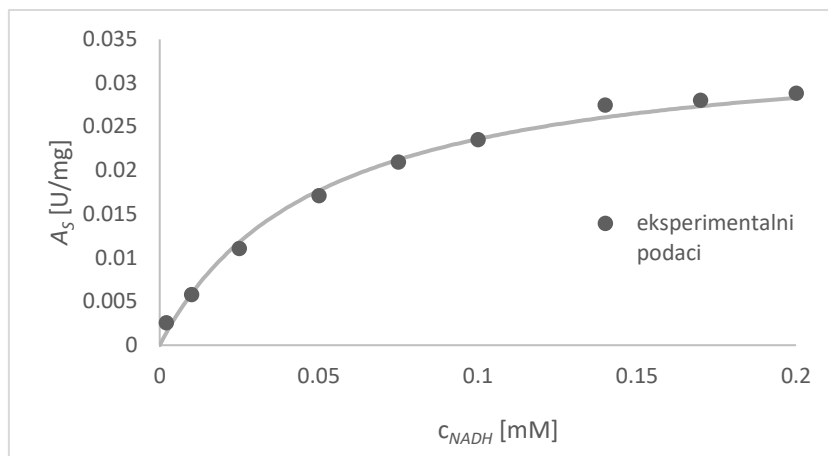
Tablica 5.2. Kinetički parametri u reakciji redukcije ketona

PARAMETAR	JEDINICA	VRIJEDNOST
V_{m2}	U mg ⁻¹	0,022 ± 0,007
K_{m2}^{NADH}	mM	0,072 ± 0,052
K_m^K	mM	0,069 ± 0,016
K_{is}^K	mM	18,988 ± 10,178
K_{i2}^{S-AOH}	mM	0,882 ± 0,186
$K_{i2}^{NAD^+}$	mM	4,017 ± 0,613

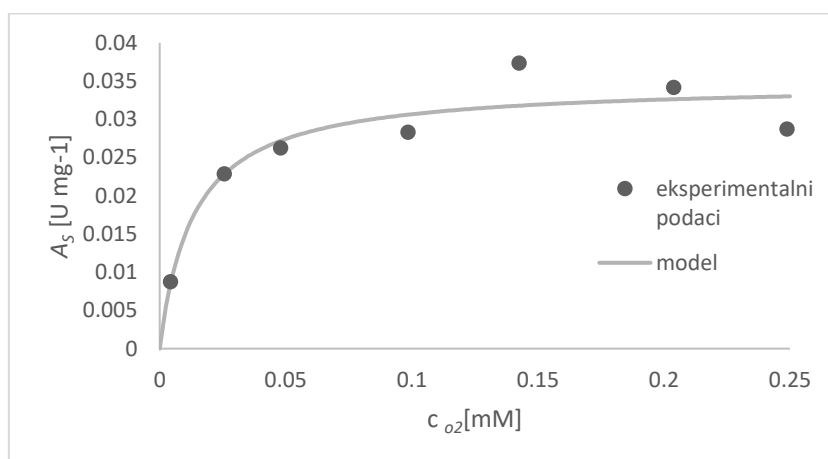
Ako se usporede kinetički parametri dobiveni za unaprijednu reakciju oksidacije (Tablica 5.1.) i za povratnu reakciju redukcije (Tablica 5.2) po vrijednostima maksimalnih brzina reakcije može se zaključiti da je reakcija pomaknuta u željenom smjeru odnosno da enzim preferira reakciju oksidacije. No obzirom da je enzim specifičniji za keton u odnosu na alkohol te na značajnu inhibiciju supstratom NAD⁺ u željenoj reakciji, vjerojatno provođenjem ove reakcije sa stehiometrijskim omjerom reaktanata reakcija neće biti potpuna u smjeru oksidacije. Stoga je u ovom slučaju regeneracija koenzima nužna ne samo da se uštedi na njegovoj potrošnji već i da pomakne ravnotežu u željenom smjeru.

5.3. Kinetička karakterizacija enzima NOX u reakciji regeneracije koenzima

Kinetička karakterizacija regeneracije enzima određena je ispitivanjem ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentracijama supstrata, kisika i NADH, što je prikazano na Slikama 5.9. i 5.10.. Ispitane su inhibicije inhibicije produktom, NAD⁺, te ketonom i alkoholom kao komponentama reakcijske smjese, što je prikazano na Slikama 5.11. - 5.13..

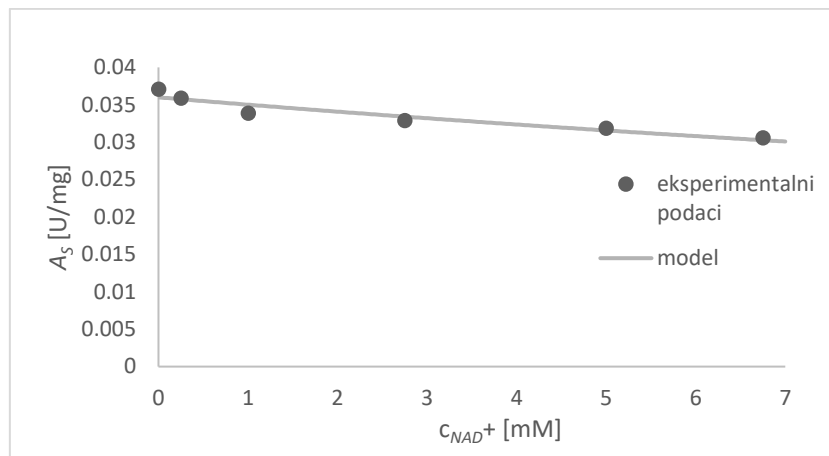


Slika 5.9. Ovisnost reakcijske brzine u reakciji oksidacije NADH o koncentraciji NADH ($c_{NADH} = 0,002-0,200$ mM; $c_{O_2} = 0,233$ mmol/dm³; $\gamma_{NOX} = 0,2$ mg/cm³; $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ\text{C}$)

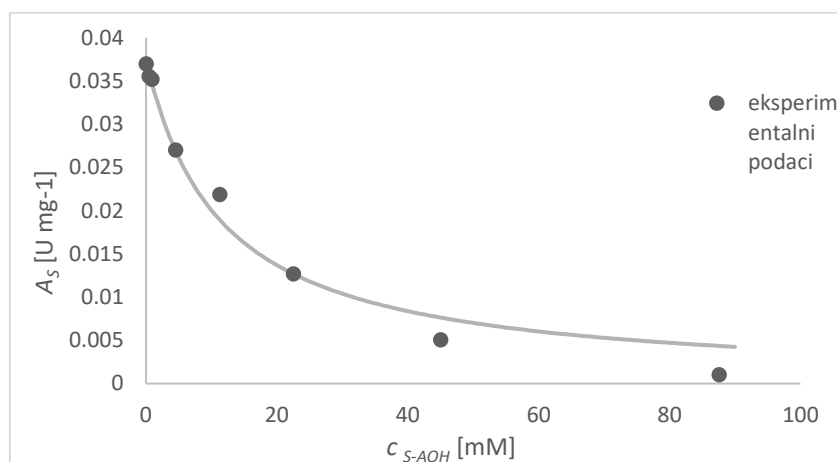


Slika 5.10. Ovisnost reakcijske brzine u reakciji oksidacije NADH o koncentraciji kisika ($c_{O_2} = 0,004-0,098$ mM; $\gamma_{NOX} = 0,4$ mg/cm³; $c_{NADH} = 0,17$ mM; $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ\text{C}$)

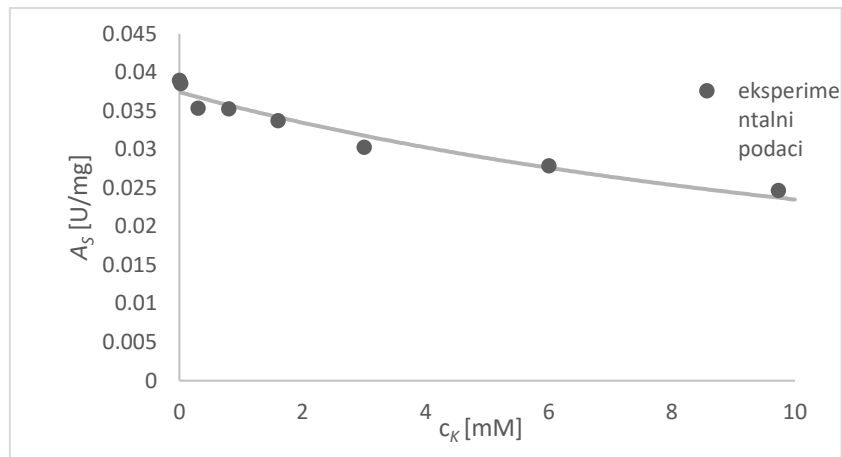
Grafičkim prikazom ovisnosti početne reakcijske brzine o produktom NAD⁺, te S-alkoholom i ketonom (slike 5.11 – 5.13) uočeno je da porastom koncentracije svih triju komponenata dolazi do smanjenja reakcijske brzine odnosno do inhibicije reakcije. Sukladno tome, kinetika reakcije regeneracije koenzima uz NOX opisana je dvosupstratnom Michealis – Menteničinom jednadžbom s kompetitivnim inhibicijama produktima (Jedn.4.3.).



Slika 5.11. Ovisnost reakcijske brzine u reakciji oksidacije NADH o koncentraciji NAD^+ ($c_{NAD^+} = 0-6,75$ mM; $\gamma_{NOX} = 0,2$ mg/cm³; $c_{NADH} = 0,17$ mM; $c_{CO_2} = 0,233$ mmol/dm³; $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ\text{C}$)



Slika 5.12. Ovisnost reakcijske brzine u reakciji oksidacije NADH o koncentraciji S-alkohola ($c_{S-AOH} = 0-87,57$ mM; $\gamma_{NOX} = 0,2$ mg/cm³; $c_{NADH} = 0,17$ mM; $c_{CO_2} = 0,233$ mmol/dm³; $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ\text{C}$)



Slika 5.13. Ovisnost reakcijske brzine u reakciji oksidacije NADH o koncentraciji ketona ($c_K = 0-7,5$ mM; $\gamma_{NOX} = 0,2$ mg/cm³; $c_{NADH} = 0,17$ mM; $c_{O_2} = 0,233$ mmol/dm³; $c_{\text{fosfatni puffer}} = 0,1$ M; pH = 8; $T = 25^\circ\text{C}$)

Iz vrijednosti parametara modela, prikazanih u Tablici 5.3., može se zaključiti kako je kisik specifičniji supstrat od NADH. Inhibicija produktom NAD⁺-om najmanje je izražena u odnosu na inhibicije alkoholom i ketonom, jer je konstanta inhibicije (K_{i,NAD^+}) veća od Michaelis-Menteničine konstante (K_m), no ni inhibicije s ketonom i S-alkoholom nisu previše značajne.

Tablica 5.3. Kinetički parametri u reakciji regeneracije enzima

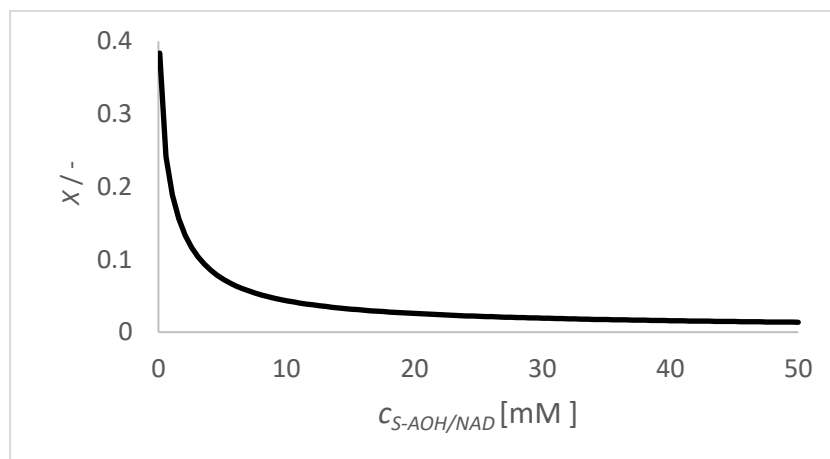
PARAMETAR	JEDINICA	VRIJEDNOST
V_{m3}	U mg ⁻¹	0,039 ± 0,002
K_{m3}^{NADH}	mM	0,058 ± 0,001
$K_m^{O_2}$	mM	0,013 ± 0,003
$K_{i3}^{NAD^+}$	mM	9,120 ± 1,648
K_{i3}^K	mM	4,313 ± 0,536
K_{i3}^{S-AOH}	mM	2,942 ± 0,457

5.4. Simulacija reakcije oksidacije optički aktivnog alkohola

Simulacija reakcije oksidacije alkohola uz enzim ketoreduktazu bez i s regeneracijom koenzima u kotlastom reaktoru napravljena je korištenjem modela opisanog u poglavlju 4, u

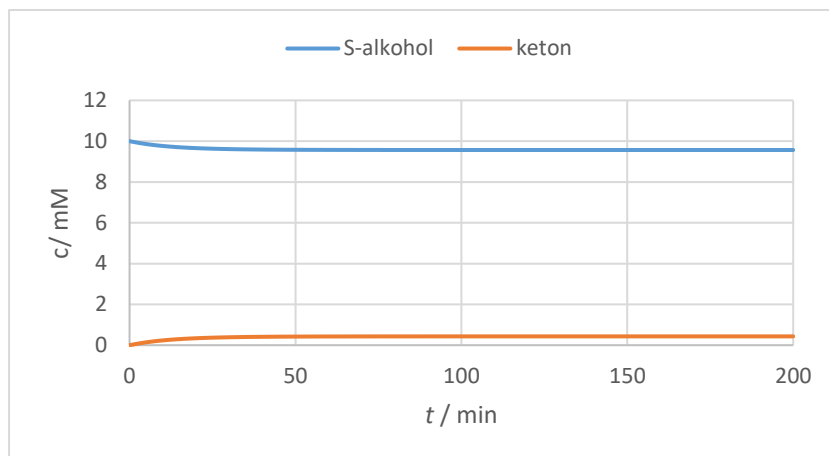
programu Scientistu. Simulacija se provodila uz prethodno određene kinetičke parametre procesa.

Na Slici 5.14. prikazana je simulacijama dobivena ovisnost konverzije o koncentracijama supstrata točnije alkohola i NAD^+ , koje su ekvimolarne, u procesu bez regeneracije koenzima (Prilog 10). Iz prikaza se može vidjeti da konverzija pada s porastom koncentracije supstratom. Navedeno je u skladu s dobivenim kinetičkim modelom za reakciju oksidacije katalizirane KRED-om (Jedn. 4.1.). Naime prilikom ispitivanja kinetike uočena je značajna inhibicija supstratom, NAD^+ . Povećanjem njegove koncentracije dolazi do smanjenja brzine reakcije oksidacije te time povratna reakcija više dolazi do izražaja što direktno utječe na konverziju.



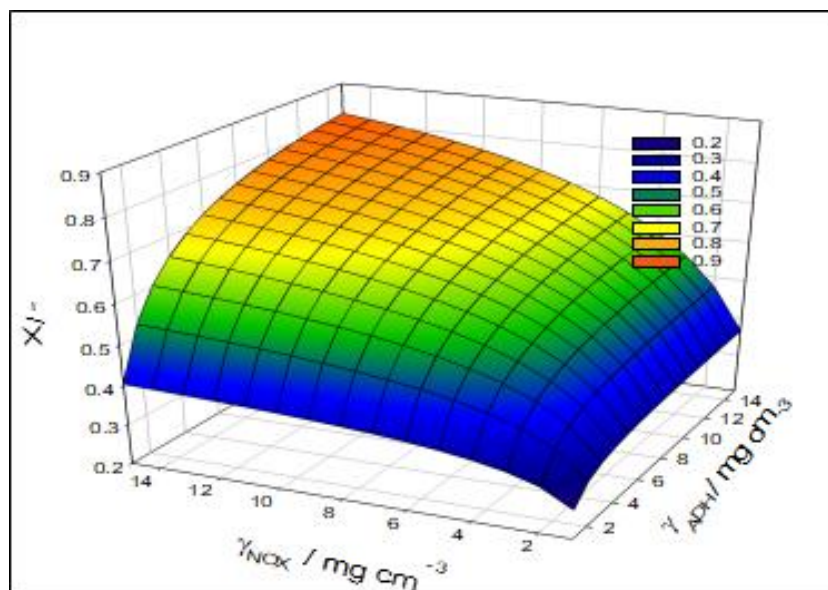
Slika 5.14. Ovisnost konverzije o koncentracijama s-alkohola i ketona u reakciji oksidacije alkohola katalizirane KRED-om bez regeneracije koenzima ($\gamma_{\text{KRED}} = 15 \text{ mg/cm}^3$; $t = 2000 \text{ min}$)

Navedeno je i vidljivo iz vremenske ovisnosti koncentracije alkohola i ketona za slučaj kada je početna koncentracija supstrata iznosila 10 mM (Prilog 11, Slika 5.15). Nakon 200 minuta provođenja reakcije bez regeneracije koenzima postignuta je iznimno niska ravnotežna konverzija od 4,32% .

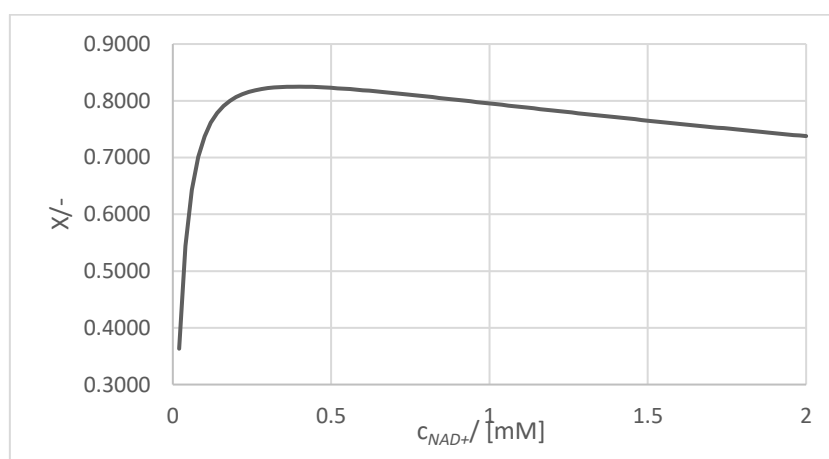


Slika 5.15. Simulacija promjene koncentracijama s-alkohola i ketona s vremenom u reakciji oksidacije alkohola katalizirane KRED-om bez regeneracije koenzima ($c_{S-AOH} = 10\text{mM}$; $c_{NAD^+} = 10\text{mM}$; $\gamma_{KRED} = 15 \text{ mg / cm}^3$)

Ispitani su i utjecaji koncentracije enzima i koenzima na konverziju reakcije oksidacije optički aktivnog alkohola uz regeneraciju koenzima. Kao konačni rezultati simulacija uzimani su oni dobiveni u 2000 minuti (Prilozi 12 i 13, Slike 5.16 i 5.17). Iz ovisnosti konverzije S-alkohola o koncentraciji enzima (Slika 5.16) može se vidjeti da konverzija konstantno raste s porastom upotrijebljene količine enzima. Navedeno upućuje da vrijeme od 2000 minuta nije dovoljno za postizanje konačne konverzije alkohola pri odabranim koncentracija supstrata. Također može se vidjeti da porast koncentracije oba enzima u istoj mjeri utječe na povećanje konverzije. Stoga je za simulaciju procesa uz različite koncentracije koenzima uzeta najveća koncentracija oba enzima (Prilog 13, Slika 5.17). Na slici se vidi da konverzija raste s porastom koncentracije NAD^+ , a potom opada. Navedeno je u skladu s kinetičkim mjerenjima u kojima je uočena inhibicija supstratom NAD^+ (Slika 5.1). Naime može se vidjeti da se maksimalna konverzija postiže pri koncentraciji koenzima NAD^+ od 0.4 mM. Pri istoj koncentraciji se postiže i najveća brzina reakcije.



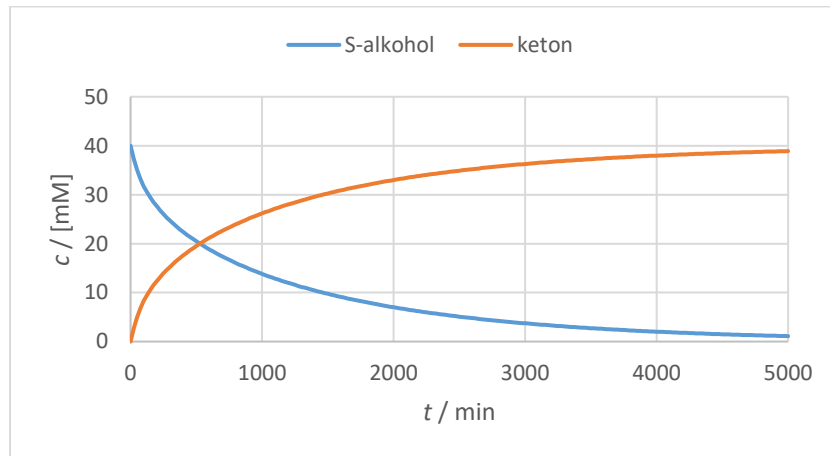
Slika 5.16. Simulacija ovisnosti konverzije o koncentraciji enzima u reakciji oksidacije alkohola katalizirane KRED-om uz regeneraciju koenzima NOX- om ($c_{S-AOH} = 40 \text{ mM}$; $c_{O_2} = 0,23 \text{ mM}$; $c_{NAD^+} = 0,5 \text{ mM}$; $t = 2000 \text{ min}$)



Slika 5.17. Simulacija ovisnosti konverzije alkohola u reakciji oksidacije katalizirane KRED-om o koncentraciji NAD^+ uz regeneraciju koenzima NOX-om ($c_{S-AOH} = 40 \text{ mM}$; $c_{O_2} = 0,23 \text{ mM}$; $\gamma_{KRED} = 15 \text{ mg/cm}^3$; $\gamma_{NOX} = 15 \text{ mg/cm}^3$; $t = 2000 \text{ min}$)

Obzirom da je prilikom ispitivanja ovisnosti konverzije o koncentraciji koenzima dobivena najveća konverzija od 83,45% pri koncentraciji NAD^+ od 0,4 mM ista koncentracija korištena i u simulaciji prikazanoj na Slici 5.18 (Prilog 14).

U ovom slučaju simulirana je vremenska promjena koncentracije alkohola i ketona u reakciji oksidacije alkohola uz KRED uz regeneraciju koenzima NOX-om tijekom 5000 minuta. Može se vidjeti da ni nakon 5000 minuta nije postignuta potpuna konverzija što upućuje na nedovoljnu aktivnost enzima u ovoj reakciji. No konverzija je ipak znatno veća nego u procesu bez regeneracije koenzima i iznosi 97,23 %. Navedeno upućuje da je metoda regeneracije uspješno pomakla ravnotežu procesa u željenom smjeru.



Slika 5.18. Simulacija promjene koncentracijama S-alkohola i ketona s vremenom u reakciji oksidacije alkohola katalizirane KRED-om uz regeneraciju koenzima NOX-om ($c_{S-AOH} = 40$ mM; $c_{O_2} = 0,23$ mM; $c_{NAD^+} = 0,4$ mM; $\gamma_{KRED} = 15$ mg /cm³; $\gamma_{NOX} = 15$ mg /cm³)

6. ZAKLJUČAK

Kinetika enzima ketoreduktaze u reakciji oksidacije optički aktivnog alkohola opisana je s dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom ,NAD⁺ i kompetitivnom inhibicijom produktom, ketonom. U reakciji redukcije ketona kinetika enzima S-ketoreduktaze također je opisana s dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom, ketonom i kompetitivnom inhibicijom produktima, S-alkoholom i NAD⁺-om. Kinetika enzima NOX u reakciji regeneracije koenzima opisana je dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktima, S-alkoholom, ketonom i NAD⁺-om.

Na osnovi kinetičkog i reaktorskog modela, u kotlastom reaktoru, postavljen je matematički model reakcije oksidacije optički aktivnog alkohola. Iz postavljenog matematičkog modela provedene su simulacije i određena je ravnotežna konverzija alkohola u reakcije bez regeneracije koenzima te je iznosila 4,32%. Konverzija alkohola u reakciji s regeneracijom koenzima iznosila je 97,23% . Iz dobivenih konverzija može se zaključiti kako je za reakciju oksidacije optički aktivnog alkohol nužno provoditi regeneraciju koenzima zbog pomicanja ravnoteže.

7. LITERATURA

1. Ašperger D., Karakterizacija materijala (nastavni tekst), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (202.) 15.
2. Baković T., Matematičko modeliranje proizvodnje optički aktivnog diola korištenjem višeenzimskog sustava, završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017) 15
3. Bommarius A. S., Riebel B. R., Biocatalysis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim (2004) 30-37.
4. De Miranda A.S., Milagre C., Hollmann F., Alcohol Dehydrogenases as Catalysts in Organic Synthesis, *Frontiers in Catalysis* 2 (2022) 2.
5. Dunn I. J., Heinzle E., Ingham J, Pfenosil J. E., Biological Reaction Engineering Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples, Second, Completely Revised Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim (2003) 101-115.
6. Findrik Blažević Z., Bioreaktori, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017)
7. Gao H., Li J., Sivakumar D., Kim T.S., Patel S.K.S, Kalia V.C., Kim I.W., Zhang Y.W., Lee J.K., NADH oxidase from *Lactobacillus reuteri*: A versatile enzyme for oxidized cofactor regeneration, *International Journal of Biological Macromolecules* 123 (2019) 629-636
8. Huisman G.W., Liang J., Krebber A., Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases, Elsevier, *Current Opinion in Chemical Biology* 14 (2009) 2-7.
9. Karlson P., Biokemija; Školska knjiga, Zagreb (1984) 51-69.
10. Kristjánsson M.M., Kinsella J.E., Protein and Enzyme Stability: Structural, Thermodynamic, and Experimental Aspects, *Advances in Food and Nutrition Research* 35 (1991) 239-240.
11. Illanes A., Enzyme Biocatalysis: Principles and applications, Springer (2008) 1-19.; 364.
12. Macan J., Dolar D., Brnardić I., Fizikalna kemija, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2019) 90.
13. Mansour M.A., Oxidoreductase, *IntechOpen Book Series* 19 (2021) 3-17.
14. Milčić N., Česnik M., Sudar M., Findrik Blažević Z., Primjena matematičkog modeliranja u razvoju enzimskih kaskadnih reakcija, *Kemija u industriji* 68 (2019) 427-436.
15. Miloš M., Osnove biokemije, interna skripta, Kemijsko – tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split (2009). 43 – 48.
16. Sheldon R.A., Woodley
17. J.M., Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chemical Reviews* 118 (2017) 801-838.
18. Sumimoto H., Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species, *The Febs journal*, 275 (2008) 3249-3277.

19. Trisolini L., Gambacorta N., Gorgoglion R., From different amino acid sequences to similar protein shapes for playing an ancient function, *Journal of Clinical Medicine* 8 (2019) 1.
20. Wang X., Saba T., Yiu H.P. H., Howe F.R., Anderson James A., Shi J., Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways, *Chem* 2 (2017) 621-654.
21. Ying, W., NAD⁺ and NADH in brain functions, brain diseases and brain aging, *Frontiers in Bioscience-Landmark* 12 (2006)

8. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICE

Grčki simboli

γ – masena koncentracija enzima [mg mL^{-1}]

ε – molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{mL}^{-1}$]

λ – valna duljina [nm]

Simboli

A_s – specifična aktivnost biokatalizatora [U mg^{-1}]

A_v – aktivnost biokatalizatora po volumenu [U ml^{-1}]

b – duljina puta elektromagnetskog zračenja kroz uzorak [cm]

c – koncentracija [mmol dm^{-3}]

c_s – koncentracija supstrata [mmol dm^{-3}]

d – promjer kvarcne kivete [cm]

E_a – energija aktivacije

k – konstanta brzine reakcije [min^{-1}]

k_d – konstanta inaktivacije biokatalizatora [min^{-1}]

K_i – konstanta inhibicije [mmol dm^{-3}]

K_m – Michaelis–Menteničina konstanta [mmol dm^{-3}]

pH – negativni logaritam koncentracije H^+ iona u otopini

r – brzina potrošnje supstrata (brzina reakcije) [$\text{mmol dm}^{-3} \text{mol}^{-1}$]

T – temperatura [$^{\circ}\text{C}$]

t – vrijeme [min]

V – volumen [dm^3]

V_m – maksimalna brzina enzimatski katalizirane reakcije [$\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$]

V_r – ukupni volumen u kvarcnoj kiveri [dm^3]

Skraćenice

ABS – apsorbancija

E – enzim

ES – enzim-supstrat kompleks

NAD^+ - nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH – reducirani oblik NAD^+

P – produkt

S – supstrat

S-AOH – optički aktivni alkohol

K – keton

NOX – NADH oksidaza

KRED – ketoreduktaza

9. PRILOG

Prilog 1 – reakcija oksidacije alkohola (variranje koncentracije NAD^+ i alkohola, procjena V_{m1} , $K_m^{\text{NAD}^+}$, $K_m^{\text{S-AOH}}$ i $K_{is}^{\text{NAD}^+}$)

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: c
```

```
DepVars: r1, r2
```

```
Params: Vm, KmNAD, KmR, KisNAD
```

```
r1=Vm*c*cR/((KmNAD+c+(c^2)/KisNAD)*(KmR+cR))
```

```
r2=Vm*c*cNAD/((KmNAD+cNAD+(cNAD^2)/KisNAD)*(KmR+c))
```

```
cR=4.5
```

```
cNAD=1
```

```
Vm=0.02
```

```
KmNAD=0.01
```

```
KmR=0.001
```

```
KisNAD=10
```

Prilog 2 - reakcija oksidacije alkohola (inhibicija ketonom ketona, procjena K_{i1}^K)

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: c
```

```
DepVars: r
```

```
Params: Vm, KmNAD, KmR, KiRK
```

```
r=Vm*cNAD*cR/((KmNAD+cNAD+(cNAD^2)/KisNAD)*(KmR*(1+c/KiRK)+cR))
```

```
cNAD=1
```

```
cR=4.5
```

```
Vm=0.049072234651612035
```

```
KmNAD=0.064528772829863093
```

```
KmR=0.161703034533100753
```

```
KisNAD=1.52980419701718384
```

```
KiRK=0.017815967545815999
```

```
***
```

Prilog 3 – reakcija redukcije ketona (variranje koncentracije NADH i alkohola, procjena V_{m2} , K_{m2}^{NADH} , K_m^K i K_{is}^K)

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r1, r2

Params: Vm, KmNADH, KmRK, KisRK

$r1 = Vm * c * cRK / ((KmNADH + c) * (KmRK + cRK + (cRK^2) / KisRK))$

$r2 = Vm * c * cNADH / ((KmNADH + cNADH) * (KmRK + c + (c^2) / KisRK))$

cRK=0.1

cNADH=0.1

Vm=0.1

KmNADH=0.1

KmRK=0.1

KisRK=1

Prilog 4 - reakcija redukcije ketona (inhibicija NAD^+ -om, procjena $K_{i2}^{NAD^+}$)

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: cNAD

DepVars: r

Params: Vm, KmNADH, KmRK, KisRK, KiNAD

$r = Vm * cNADH * cRK / ((KmNADH * (1 + cNAD / KiNAD) + cNADH) * (KmRK + cRK + (cRK^2) / KisRK))$

cRK=1

cNADH=0.1

Vm=0.021665384343486038

KmNADH=0.072484038505734996

KmRK=0.069221346252613752

KisRK=18.988341863682578

KiNAD=1

Prilog 5 - reakcija redukcije ketona (inhibicija alkoholom, procjena K_{i2}^{S-AOH})

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: cR

DepVars: r

Params: Vm, KmNADH, KmRK, KisRK, KiR

$r = Vm * cNADH * cRK / ((KmNADH + cNADH) * (KmRK * (1 + cR / KiR) + cRK + (cRK^2) / KisRK))$

cRK=1

cNADH=0.1

Vm=0.021665384343486038

KmNADH=0.072484038505734996

KmRK=0.069221346252613752

KisRK=18.988341863682578

KiR=0.881797608

Prilog 6 – regeneracija koenzima (variranje koncentracije NADH i kisika, procjena V_{m3} , K_{m3}^{NADH} i $K_m^{O_2}$)

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r1, r2

Params: Vm, KmNADH, KmO

$r1 = Vm * c * cO / ((KmNADH + c) * (KmO + cO))$

$r2 = Vm * c * cNADH / ((KmNADH + cNADH) * (KmO + c))$

cO=0.2335125

cNADH=0.4

Vm=0.02

KmNADH=0.05

KmO=0.15

Prilog 7 – regeneracija koenzima (inhibicija NAD⁺-om, procjena $K_{i3}^{NAD^+}$)

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNADH, KmO, KiNAD

$r = Vm * cNADH * cO / ((KmNADH * (1 + c/KiNAD) + cNADH) * (KmO + cO))$

cO=0.2335125

cNADH=0.17

Vm=0.0398361806

KmNADH=0.0584203012

KmO=0.0133828341

KiNAD=0.1

Prilog 8 – regeneracija koenzima (inhibicija alkoholom, procjena K_{i3}^{S-AOH})

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNADH, KmO, KiR

$r = Vm * cNADH * cO / ((KmNADH * (1 + c/KiR) + cNADH) * (KmO + cO))$

cO=0.2335125

cNADH=0.17

Vm=0.0398361806

KmNADH=0.0584203012

KmO=0.0133828341

KiR=0.1

Prilog 9 – regeneracija koenzima (inhibicija ketonom, procjena K_{i3}^K)

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNADH, KmO, KiRK

$r = Vm * cNADH * cO / ((KmNADH * (1 + c/KiRK) + cNADH) * (KmO + cO))$

cO=0.2335125

cNADH=0.17

Vm=0.0398361806

KmNADH=0.0584203012

KmO=0.0133828341

KiRK=0.1

Prilog 10 – simulacija oksidacije alkohola u kotlastom reaktoru bez regeneracije koenzima, ovisnost konverzije o koncentraciji supstrata

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t,NAD
DepVars: cR,cRK,cNAD,cNADH,X
Params: Vm1, KmNAD,KmR,KiRK,Vm2,KmNADH, KmRK, KisRK,KiR,KiNAD
//kineticki model
r1=Vm1*ADH*cNAD*cR/((KmNAD+cNAD+(cNAD^2)/KisNAD)*(KmR*(1+cRK/KiRK)+cR))
r2=Vm2*ADH*cNADH*cRK/((KmNADH*(1+cNAD/KiNAD)+cNADH)*(KmRK*(1+cR/KiR)+cRK+(cRK^2)/KisRK))
//reaktorski model
cR'=-r1+r2
cRK'=r1-r2
cNAD'=-r1+r2
cNADH'=r1-r2
X=cRK/NAD
//pocetni uvjeti
t=0
NAD=0.1
ADH=15
cR=NAD
cRK=0
cNAD=NAD
cNADH=0
//parametri
Vm1=0.049072234651612035
KmNAD=0.064528772829863093
KmR=0.161703034533100753
KisNAD=1.52980419701718384
KiRK=0.017815967545815999
Vm2=0.021665384343486038
KmNADH=0.072484038505734996
KmRK=0.069221346252613752
KisRK=18.988341863682578
KiR=0.881797608
KiNAD=4.01679482595541426
***
```

Prilog 11 – simulacija oksidacije alkohola u kotlastom reaktoru bez regeneracije koenzima pri početnim koncentracija alkohola i NAD⁺ od 10 mM

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t
DepVars: cR,cRK,cNAD,cNADH
Params: Vm1, KmNAD,KmR,KiRK,Vm2,KmNADH, KmRK, KisRK,KiR,KiNAD
//kineticki model
r1=Vm1*ADH*cNAD*cR/((KmNAD+cNAD+(cNAD^2)/KisNAD)*(KmR*(1+cRK/KiRK)+cR))
r2=Vm2*ADH*cNADH*cRK/((KmNADH*(1+cNAD/KiNAD)+cNADH)*(KmRK*(1+cR/KiR)+cRK+(cRK^2
)/KisRK))
//reaktorski model
cR'=-r1+r2
cRK'=r1-r2
cNAD'=-r1+r2
cNADH'=r1-r2
crk
//pocetni uvjeti
t=0
ADH=15
cR=10
cRK=0
cNAD=10
cNADH=0
//parametri
Vm1=0.049072234651612035
KmNAD=0.064528772829863093
KmR=0.161703034533100753
KisNAD=1.52980419701718384
KiRK=0.017815967545815999
Vm2=0.021665384343486038
KmNADH=0.072484038505734996
KmRK=0.069221346252613752
KisRK=18.988341863682578
KiR=0.881797608
KiNAD=4.01679482595541426
***
```

Prilog 12 – simulacija oksidacije alkohola u kotlastom reaktoru s regeneracijom koenzima, ovisnost konverzije o koncentraciji enzima

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t,ADH,NOX
DepVars: cR,cRK,cNAD,cNADH,cO
Params: Vm1, KmNAD,KmR,KiRK,Vm2,KmNADH, KmRK,
KisRK,KiR,KiNAD,Vm3,KmNADH3,KmO,KiR3,KiNAD3,KiRK3
//kineticki model
r1=Vm1*ADH*cNAD*cR/((KmNAD+cNAD+(cNAD^2)/KisNAD)*(KmR*(1+cRK/KiRK)+cR))
r2=Vm2*ADH*cNADH*cRK/((KmNADH*(1+cNAD/KiNAD)+cNADH)*(KmRK*(1+cR/KiR)+cRK+(cRK^2
)/KisRK))
r3=Vm3*NOX*cNADH*cO/((KmNADH3*(1+cNAD/KiNAD3+cR/KiR3+cRK/KiRK3)+cNADH)*(KmO+c
O))
//reaktorski model
cR'=-r1+r2
cRK'=r1-r2
cNAD'=-r1+r2+r3
cNADH'=r1-r2-r3
co'=kla*(coz-co)-r3/2
//pocetni uvjeti
t=0
ADH=1
NOX=1
cR=40
cRK=0
cNAD=0.5
cNADH=0
cO=0.233513
//parametri
Vm1=0.049072234651612035
KmNAD=0.064528772829863093
KmR=0.161703034533100753
KisNAD=1.52980419701718384
KiRK=0.017815967545815999
Vm2=0.021665384343486038
KmNADH=0.072484038505734996
KmRK=0.069221346252613752
KisRK=18.988341863682578
KiR=0.881797608
KiNAD=4.01679482595541426
kla=0.207540525
Vm3=0.0398361806
KmNADH3=0.0584203012
KmO=0.0133828341
KiR3=2.94222541
KiNAD3=9.12004228
KiRK3=4.31293764
cOz=0.233513
***
```

Prilog 13 – simulacija oksidacije alkohola u kotlastom reaktoru s regeneracijom koenzima, ovisnost konverzije o koncentraciji koenzima NAD⁺

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t,NAD
DepVars: cR,cRK,cNAD,cNADH,cO
Params: Vm1, KmNAD,KmR,KiRK,Vm2,KmNADH, KmRK,
KisRK,KiR,KiNAD,Vm3,KmNADH3,KmO,KiR3,KiNAD3,KiRK3
//kineticki model
r1=Vm1*ADH*cNAD*cR/((KmNAD+cNAD+(cNAD^2)/KisNAD)*(KmR*(1+cRK/KiRK)+cR))
r2=Vm2*ADH*cNADH*cRK/((KmNADH*(1+cNAD/KiNAD)+cNADH)*(KmRK*(1+cR/KiR)+cRK+(cRK^2)/KisRK))
r3=Vm3*NOX*cNADH*cO/((KmNADH3*(1+cNAD/KiNAD3+cR/KiR3+cRK/KiRK3)+cNADH)*(KmO+cO))
//reaktorski model
cR'=-r1+r2
cRK'=r1-r2
cNAD'=-r1+r2+r3
cNADH'=r1-r2-r3
co'=kla*(coz-co)-r3/2
//pocetni uvjeti
t=0
ADH=15
NOX=15
NAD=0.1
cR=40
cRK=0
cNAD=NAD
cNADH=0
cO=0.233513
//parametri
Vm1=0.049072234651612035
KmNAD=0.064528772829863093
KmR=0.161703034533100753
KisNAD=1.52980419701718384
KiRK=0.017815967545815999
Vm2=0.021665384343486038
KmNADH=0.072484038505734996
KmRK=0.069221346252613752
KisRK=18.988341863682578
KiR=0.881797608
KiNAD=4.01679482595541426
kla=0.207540525
Vm3=0.0398361806
KmNADH3=0.0584203012
KmO=0.0133828341
KiR3=2.94222541
KiNAD3=9.12004228
KiRK3=4.31293764
cOz=0.233513
***
```

Prilog 14 – simulacija oksidacije alkohola u kotlastom reaktoru s regeneracijom koenzima pri optimalnim početnim uvjetima

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t
DepVars: cR,cRK,cNAD,cNADH,cO
Params: Vm1, KmNAD,KmR,KiRK,Vm2,KmNADH, KmRK,
KisRK,KiR,KiNAD,Vm3,KmNADH3,KmO,KiR3,KiNAD3,KiRK3
//kineticki model
r1=Vm1*ADH*cNAD*cR/((KmNAD+cNAD+(cNAD^2)/KisNAD)*(KmR*(1+cRK/KiRK)+cR))
r2=Vm2*ADH*cNADH*cRK/((KmNADH*(1+cNAD/KiNAD)+cNADH)*(KmRK*(1+cR/KiR)+cRK+(cRK^2)/KisRK))
r3=Vm3*NOX*cNADH*cO/((KmNADH3*(1+cNAD/KiNAD3+cR/KiR3+cRK/KiRK3)+cNADH)*(KmO+cO))
//reaktorski model
cR'=-r1+r2
cRK'=r1-r2
cNAD'=-r1+r2+r3
cNADH'=r1-r2-r3
co'=kla*(coz-co)-r3/2
//pocetni uvjeti
t=0
ADH=15
NOX=15
cR=40
cRK=0
cNAD=0.4
cNADH=0
cO=0.233513
//parametri
Vm1=0.049072234651612035
KmNAD=0.064528772829863093
KmR=0.161703034533100753
KisNAD=1.52980419701718384
KiRK=0.017815967545815999
Vm2=0.021665384343486038
KmNADH=0.072484038505734996
KmRK=0.069221346252613752
KisRK=18.988341863682578
KiR=0.881797608
KiNAD=4.01679482595541426
kla=0.207540525
Vm3=0.0398361806
KmNADH3=0.0584203012
KmO=0.0133828341
KiR3=2.94222541
KiNAD3=9.12004228
KiRK3=4.31293764
cOz=0.233513
***
```