

# Biokatalitička redukcija acetaldehida

---

**Bukarica, Ivana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:288656>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-31**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Bukarica

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Bukarica

BIOKATALITIČKA REDUKCIJA ACETALDEHIDA

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar

dr. sc. Dajana Kučić Grgić, znanstveni suradnik

Zagreb, rujan 2018.

*Iskreno se i srdačno zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na beskrajnom strpljenju koje je imala i pomoći koju mi je ukazala prilikom izrade ovog rada, uvijek se vodeći željom da spektar mog znanja postane što širi i raznovrsniji.*

*Veliko hvala i mojim roditeljima koji su mi tijekom studija pružali podršku i pomoć, čak i onda kad je bilo najteže.*

## SAŽETAK

### BIOKATALITIČKA REDUKCIJA ACETALDEHIDA

U ovom radu ispitivana je kinetika reakcije redukcije acetaldehida uz biokatalizator ketoreduktazu koja za svoju aktivnost zahtijeva uporabu koenzima nikotinamid-adenin dinukleotid fosfata. Kinetika je mjerena metodom početnih brzina variranjem koncentracija supstrata (acetaldehida) i koenzima (NADPH) te su procijenjeni kinetički parametri Michaelis-Menteničine kinetike. Ispitivan je i utjecaj produkata na brzinu reakcije, te aktivnost enzima u povratnoj reakciji oksidacije etanola. Mjerenja su pokazala da produkt  $\text{NADP}^+$  inhibira reakciju, te da enzim ne pokazuje aktivnost u reakciji oksidacije etanola. Također je izmjerena stabilnost biokatalizatora pri različitim koncentracijama acetaldehida, te se pokazalo da povećanje koncentracije acetaldehida ima negativan utjecaj na stabilnost enzima. Na osnovu kinetičkih mjerenja i mjerenja stabilnosti biokatalizatora postavljen je matematički model redukcije acetaldehida u kotlastom reaktoru, te su napravljene simulacije procesa.

**Ključne riječi:** matematičko modeliranje, oksidoreduktaze, kinetika enzima, kotlasti reaktor

## ABSTRACT

### BIOCATALYTICAL REDUCTION OF ACETALDEHYDE

In this paper the kinetics of acetaldehyde reduction catalysed by an ketoreductase was investigated. For its activity, ketoreductase demands the use of coenzyme nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate. The kinetics was measured by determining the initial reaction rate by changing the concentrations of substrate (acetaldehyde) and coenzyme (NADPH). These data were used for the estimation of the kinetic parameters of Michaelis-Menten equation. The influence of products on the reaction rate, and the activity of enzyme in the reverse reaction, oxidation of ethanol, was also examined. Measurements have shown that the product  $\text{NADP}^+$  inhibits the reaction, and that the enzyme doesn't show activity in the reaction of ethanol oxidation. Stability of enzyme was measured in the presence of different concentrations of acetaldehyde, and it was shown that increase of acetaldehyde concentration have negative effect on the stability of the enzyme. Based on experimental data and the enzyme stability measurements, mathematical model was set for the reaction of reduction of acetaldehyde in the batch reactor, and simulations of the process have been done.

**Keywords:** matematical modelling, oxidoreductase, enzyme kinetics, batch reactor

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.1. BOKATALIZATORI .....	2
2.1.1. Podjela i djelovanje biokatalizatora.....	2
2.1.2. Prednosti i nedostaci biokatalizatora .....	3
2.1.3. Stabilnost biokatalizatora .....	4
2.1.3.1. Operacijska stabilnost biokatalizatora .....	5
2.2. OKSIRODOREDUKTAZE .....	6
2.3. KOENZIMI .....	6
2.3.1. Nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD <sup>+</sup> ).....	7
2.4. PROCESI REGENERACIJE KOENZIMA.....	8
2.4.1. Enzimatska regeneracija.....	9
2.5. MODELIRANJE BIOTRANSFORMACIJA.....	9
2.5.1. Kinetički modeli enzimatskih reakcija .....	10
2.5.2. Reaktorski modeli.....	13
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	14
3.1. APARATURA.....	14
3.1.1. Analitička vaga.....	14
3.1.3. Spektrofotometar .....	14
3.1.4. Homogenizator .....	15
3.1.5. pH metar .....	15
3.2. ANALITIČKE METODE.....	16
3.2.1. Određivanje kinetike enzima oksidoreduktaze u reakciji redukcije acetaldehida .....	16
3.2.2. Određivanje kinetike enzima oksidoreduktaze u reakciji oksidacije etanola .....	17
3.2.3. Utjecaj acetaldehida na aktivnost enzima oksidoreduktaze.....	18
3.3. OBRADA PODATAKA .....	18
4. MATEMATIČKI MODEL .....	19
4.1. KINETIČKI MODEL .....	19
4.2. REKTORSKI MODEL.....	19
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	20
5.1. Kinetika enzima oksidoreduktaze u reakciji redukcije acetaldehida.....	20
5.2. Kinetika enzima oksidoreduktaze u reakciji redukcije etanola .....	22
5.3. Utjecaj acetaldehida na aktivost enzima oksidoreduktaze .....	22
6. ZAKLJUČAK .....	27
7. LITERATURA .....	28

8. PRILOZI.....	29
9. SIMBOLI I SKRAĆENICE .....	30
ŽIVOTOPIS .....	32



## 1. UVOD

Biokatalizatori su molekule koje ubrzavaju reakcije koje se normalno ne bi dogodile, ili bi se odvijale vrlo sporo, tako da snižavaju energiju aktivacije potrebnu za odvijanje reakcije, a iz reakcije izlaze nepromijenjeni i spremni za kataliziranje iduće reakcije. Po svojoj strukturi su proteini, a nerijetko zahtijevaju prisutnost koenzima, neproteinske molekule bez koje ubrzavanje reakcije ne bi bilo moguće ili bi bilo nepotpuno. (*Karlson, 1984*) U zadnje vrijeme sve češće zamjenjuju klasične kemijske katalizatore zato što su sposobni za rad u blagim uvjetima pri različitim temperaturama, tlakovima i pH vrijednostima. (*Findrik, 2017*)

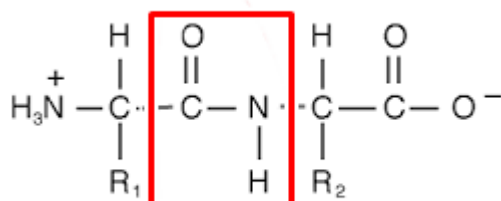
Za razliku od biokatalizatora koji iz reakcije izlaze nepromijenjeni, koenzimi reagiraju i prelaze iz svog trenutnog stanja u odgovarajući oksidirani ili reducirani oblik. Međutim, koenzimi su vrlo skupe molekule i stoga ih nije ekonomično koristiti u stehiometrijskim odnosima bez odgovarajućih metoda regeneracije. (*May, 1983*)

Modeliranje procesa ima sve važniju ulogu u razvoju biokatalitičkih procesa, te njegova primjena sve više raste kako se povećava uporaba biokatalizatora. Model predstavlja bitan alat za predviđanje brzina pri različitim koncentracijama supstrata, te proračun vremena reakcije i ukupnog iskorištenja. (*Findrik, 2017*)

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BIOKATALIZATORI

Biokatalizatori ili enzimi su proteini koji nastaju kondenzacijom aminokiselina pri čemu nastaje peptidna veza (Slika 2.1) koja se formira između ugljikovog atoma karboksilne skupine jedne aminokiseline i dušikovog atoma  $\alpha$ -amino skupine druge. Prema prirodi R skupine, aminokiseline mogu biti polarne ili nepolarne, te njihov razmještaj unutar molekule proteina definira njezino ponašanje. (Illanes, 2008) Ukoliko promijenimo niz aminokiselina, mijenjamo kompletnu strukturu i funkciju enzima. (Findrik, 2017)



Slika 2.1 Prikaz peptidne veze između dvije  $\alpha$ -aminokiseline

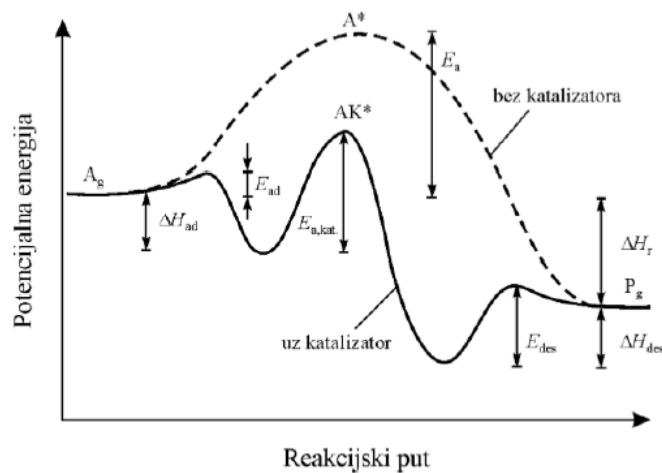
#### 2.1.1. Podjela i djelovanje biokatalizatora

Enzimi se razvrstavaju prema uputama Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) u šest skupina prema vrsti reakcije koju kataliziraju (Illanes, 2008):

1. Oksidoreduktaze - enzimi koji kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije u kojima dolazi do prijenosa elektrona, kisikovih ili vodikovih atoma.
2. Transferaze - enzimi koji kataliziraju reakcije u kojima dolazi do prijenosa funkcionalne skupine od molekule donora do molekule akceptora.
3. Hidrolaze - enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize, odnosno sudjeluju u reakcijama cijepanja veze dodavanjem molekula vode.
4. Liaze - enzimi koji sudjeluju u reakcijama u kojima se dodaju i oduzimaju skupine u svhu stvaranja dvostrukih veza.

5. Izomeraze - enzimi koji kataliziraju reakcije promjene supstrata u njegov izomer.
6. Ligaze - enzimi koji kataliziraju reakcije vezanja dva supstrata na teret hidrolize ATP-a.

Enzimi, poput ostalih katalizatora, ubrzavaju kemijske reakcije tako što snižavaju energiju aktivacije pružajući pritom drukčiji mehanizam reakcije (Slika 2.2). (Duraković, 1996)



Slika 2.2 Promjena energije aktivacije za katalitičku i nekatalitičku reakciju

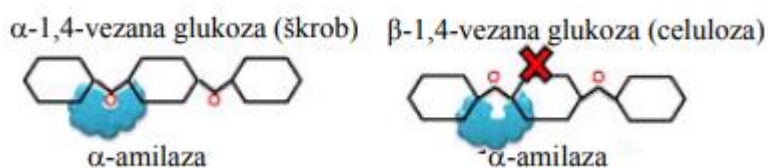
Tijekom katalizirane reakcije dolazi do stvaranja aktiviranog kompleksa između supstrata i katalizatora, koji se razgrađuje i nastaju produkt i nepromijenjeni enzim. Iako ubrzavaju kemijske reakcije, katalizatori nemaju utjecaja na promjenu entalpije i konstante kemijske ravnoteže sustava.

### 2.1.2. Prednosti i nedostaci biokatalizatora

Enzimi imaju čitav niz prednosti u odnosu na klasične kemijske katalizatore i sve češće ih zamjenjuju zato što su biorazgradivi i samim time prihvatljiviji za okoliš. Procesi koje kataliziraju se provode u blagim reakcijskim uvjetima, a stvaraju malo otpada, troše manje sirovina i obično imaju manji broj procesnih stupnjeva. Ubrzavaju reakciju i do  $10^{20}$  puta i mogu imati više aktivnih centara, a važno je naglasiti da ne djeluju na reakcijsku ravnotežu. Vrlo su selektivni s obzirom da omogućavaju specifično djelovanje samo na jednoj funkcionalnoj skupini u prisustvu drugih, što je vrlo korisno u slučajevima kada funkcionalne

skupine koje se ne bi trebale transformirati moraju biti zaštićene. Važno svojstvo biokatalizatora je i njihova enantioselektivnost koja je posebice važna u farmaceutskoj industriji, gdje je enantiomerna čistoća produkata uvjet bez kojeg se više ne može.

Za razliku od klasičnih kemijskih katalizatora, biokatalizatori su stereospecifični, što je ilustrirano primjerom (Slika 2.3).  $\alpha$ -Amilaza je enzim koji može razgraditi škrob djelujući na  $\alpha$ -1,4-glikozidne veze, dok ne može razgraditi celulozu koja sadrži  $\beta$ -1,4-glikozidne veze.



Slika 2.3 Primjer stereoselektivnosti enzima

Uz navedene prednosti, enzimi imaju sljedeće nedostatke: visoka cijena izolacije i pročišćavanja, potreba za kofaktorom, nestabilni su izvan prirodnog okruženja, aktivnost im pada s porastom temperature, a često dolazi i do inhibicije reaktantima ili produktima reakcije. S obzirom da se biokatalitički procesi razlikuju od konvencionalnih kemijskih procesa potrebno je uzeti u obzir enzimatsku kinetiku i stabilnost enzima. (*Findrik, 2017*)

S obzirom na navedene nedostatke možemo zaključiti da enzimi nikako nisu idealni katalizatori, ali njihova iznimna specifičnost i aktivnost pri blagim uvjetima predstavljaju istaknute karakteristike koje se sve više cijene od strane različitih proizvodnih sektora, među kojima su kemijska i farmaceutska industrija. (*Illanes, 2008*)

### 2.1.3. Stabilnost biokatalizatora

Stabilnost biokatalizatora i njihova stabilizacija su vrlo važni pojmovi za njihovu primjenu, budući da je pojava inaktivacije biokatalizatora neizbježna i događa se uvijek; brže ili sporije. Definirana je kao ostatak enzimске aktivnosti nakon određenog vremena.

Razlikujemo operacijsku stabilnost (eng. *operational stability*) biokatalizatora i stabilnost biokatalizatora u uvjetima skladištenja (eng. *storage stability*). Stabilnost enzimske aktivnosti ovisi o očuvanju aktivne enzimske konformacije, koja ovisi o kovalentnim vezama, ionskim i dipolnim silama te hidrofiličnim i hidrofobnim interakcijama. Bilo kakva promjena tih sila može uzrokovati promjene enzimske aktivnosti i stabilnosti, dok vanjske promjene ne moraju bitno utjecati na funkciju aktivnog mjesta.

Stabilnost u uvjetima skladištenja ovisi o fizikalnom stanju biokatalizatora (liofilizat, suspenzija, otopina), o sredini u kojoj se čuva, o dodatku supstrata, efektora, inhibitora ili stabilizatora, te o temperaturi na kojoj se čuva. (Findrik, 2017)

#### 2.1.3.1. Operacijska stabilnost biokatalizatora

Operacijska stabilnost biokatalizatora je značajna u uvjetima provedbe procesa i važan parametar koji utječe na volumnu produktivnost u reaktoru. Definirana je kao stabilnost biokatalizatora tijekom kontinuirane uporabe koja se obično izražava kao vrijeme poluživota biokatalizatora,  $t_{1/2}$  (vrijeme potrebno da se njegova aktivnost snizi na polovinu početne vrijednosti). Osim ovog načina izražavanja stabilnosti biokatalizatora, često se procjenjuje vrijednost konstanta deaktivacije,  $k_d$ , koja je povezana s vremenom poluraspada enzima (jedn. 2.1), uz pretpostavku da se kinetika reakcije inaktivacije biokatalizatora može opisati modelom prvog reda.

$$t_{1/2} = - \frac{\ln 0,5}{k_d} \quad (2.1)$$

Operacijska stabilnost biokatalizatora ovisi o:

1. tipu procesa,
2. postupku pripreme biokatalizatora,
3. početnoj koncentraciji supstrata, koncentraciji produkta, konverziji i akumulaciji supstrata,
4. mediju u kojem se provodi reakcija,
5. temperaturi,
6. vremenu rada.

## 2.2. OKSIRODOREDUKTAZE

Kao što je navedeno, oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije prijenosom vodikovog ili kisikovog atoma ili elektrona od jednog supstrata do drugog u bioprocesima. Dijelimo ih na dehidrogenaze, oksigenaze i oksidaze. Za katalitičku aktivnost ovih enzima nužna je prisutnost koenzima. (*Hummel, 1999*)

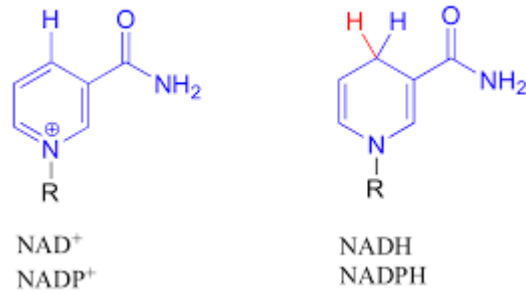
Najvažniji oksidoreduktivni koenzim je nikotinamid-adenin dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) koji primanjem hidrida prelazi u NADH dehidrogenirajući supstrat. Supstrat tek tada može stupiti u kompleks sa enzimom koji zatim prelazi u produkt oslobađajući enzim za novu molekulu supstrata. Oksidoreduktaze imaju veliku važnost u organskim sintezama zbog velikog broja supstrata s kojima reagiraju kao i zbog posjedovanja enantio-, regio- i stereoselektivnih svojstava. Oksidoreduktaze se primjenjuju za sintezu lijekova, steroida, polimera, oksidativnu razgradnju zagađivača, te za konstrukciju biosenzora za različite analitičke i kliničke primjene. (*May, 1983*)

Oksidoreduktaze su najveća skupina enzima i imaju najširu primjenu u biotehnologiji upravo zato što najveći broj biokonverzija uključuje procese oksidacije ili redukcije.

## 2.3. KOENZIMI

Koenzim je organski neproteinski spoj koji se spaja s enzimom kako bi katalizirao reakciju. Bez koenzima, enzimi ne mogu efektivno ubrzavati kemijske reakcije ili ih ne mogu uopće ubrzavati.

Koenzime se može podijeliti prema reakcijama u kojima sudjeluju pri katalizi. Na prvom mjestu nalaze se koenzimi prenosioci vodika od kojih su glavni predstavnici nikotinamid-adenin-dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) i nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat ( $\text{NADP}^+$ ) (Slika 2.4). Druga skupina je vrlo velika i obuhvaća koenzime koji sudjeluju pri prijenosu grupa, te se u posebnu skupinu mogu staviti koenzimi koji sudjeluju kod reakcija izomeraza, liaza i ligaza. (*Karlson, 1984*)

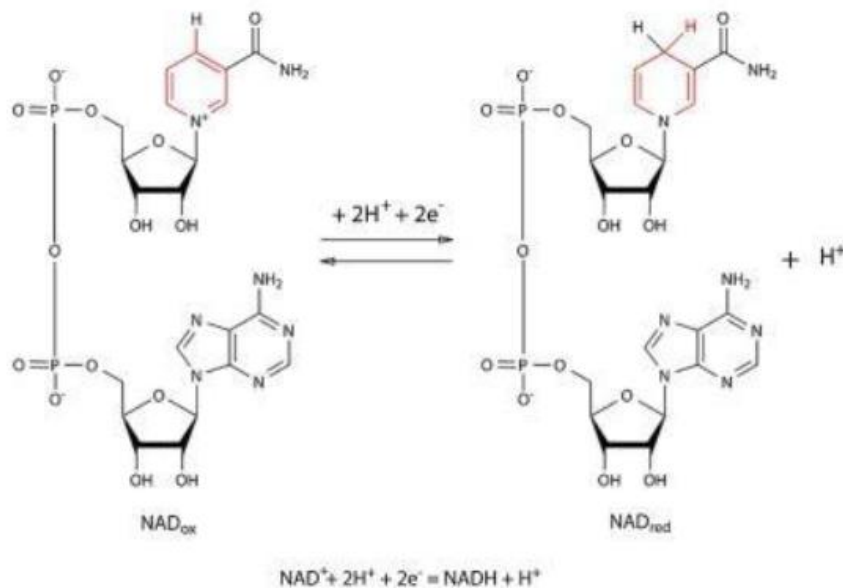


Slika 2.4 Prikaz strukture  $\text{NAD(P)}^+$  i  $\text{NAD(P)H}$  koenzima

Koenzimi, za razliku od enzima, podliježu kemijskim reakcijama i pretvaraju se u odgovarajući oksidirani ili reducirani oblik. Upravo su iz tog razloga preskupi za korištenje u stehiometrijskim količinama, te je nužno pronaći odgovarajuću metodu regeneracije.

### 2.3.1. Nikotinamid-adenin-dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ )

Nikotinamid nukleotidi  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  su koenzimi mnogih dehidrogenaza, prije svega onih koje kataliziraju dehidrogeniranje primarnih ili sekundarnih alkoholnih grupa. Reakcija je uglavnom reverzibilna. Funkcija  $\text{NAD}^+$  koenzima je reverzibilno primanje vodika. Pri tome se reducira piridinski prsten jer prima dodatni vodikov atom, a dušik gubi svoj pozitivni naboj (Slika 2.5).  $\text{NAD}^+$  koenzimi najčešće sudjeluju u reakcijama mnogih dehidrogenaza. (Karlson, 1984)

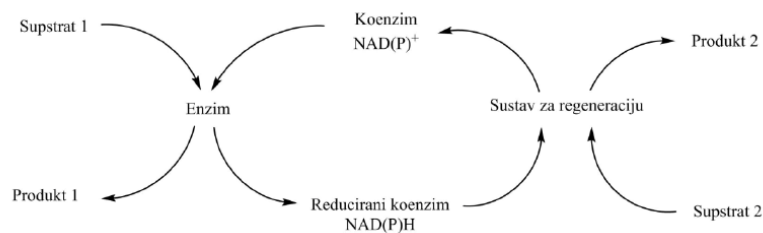


Slika 2.5 Prikaz redukcije  $\text{NAD}^+$  koenzima

## 2.4. PROCESI REGENERACIJE KOENZIMA

Od otprilike 3196 enzima, više od jedne trećine zahtijeva primjenu jednog od navedenih koenzima: NAD, NAD(P), FAD, ATP, ili koenzima A za postizanje visoke katalitičke reaktivnosti. U slučaju redoks reakcija kataliziranih oksidoreduktazama, koje često zahtijevaju stehiometrijsku redukciju ili oksidaciju skupih koenzima poput NAD(P) i FAD, mora biti postignuta efikasna regeneracija koenzima da bi proces bio kompetitivan s kemijskom sintezom. (*Hummel, 1999*)

Regeneracija koenzima (Slika 2.6) omogućava manju potrošnju koenzima i pomicanje ravnoteže u željenom smjeru jer u reakciji uklanja nastali nepoželjni oblik koenzima i konvertira ga u oblik pogodan za glavnu reakciju. Ukoliko je u sustav uvedena regeneracija koenzima, nije potrebno dodati stehiometrijsku količinu na početku reakcije jer regeneracijom dolazi do konverzije u početni oblik koji je ujedno i jedan od supstrata glavne reakcije. (*Chenaunlt, 1988*)



Slika 2.6 Shematski prikaz regeneracije koenzima

Regeneracija koenzima uključuje enzimatske, kemijske, elektrokemijske ili fotokemijske metode regeneracije oksidiranog ili reduciranog koenzima potrošenog u enzimatskoj reakciji. Metoda korištena u regeneraciji koenzima na industrijskoj skali mora biti efikasna, jednostavna i ekonomična.

Najjednostavnija i najkorisnija metoda regeneracije nikotinamid koenzima je enzimatska metoda.



#### 2.4.1. Enzimatska regeneracija

Regeneracija koenzima korištenjem enzima smatra se favoriziranom metodom i predstavlja jedinu metodu koja je pronašla primjenu na industrijskoj razini. Jedan od najranijih primjera pripreme NAD(P)H iz NAD(P)<sup>+</sup> korištenjem etanola i alkoholne dehidrogenaze objavljen je 1957. godine (Rafter i Colowick).

Prilikom oksidacije etanola do acetaldehida dolazi do regeneracije koenzima na istom aktivnom mjestu na kojem je došlo do reduktivne konverzije supstrata. Supstrat povezani reakcijski sustav ograničen je termodinamički kontroliranom ravnotežom između supstrata i produkta, kao i potrebom za korištenjem enzima alkohol dehidrogenaze. Kako bi se postigla visoka konverzija potrebno je povisiti koncentraciju etanola, koja može utjecati na topivost supstrata, ali često ima nepovoljan utjecaj na stabilnost biokatalizatora. Kontinuiranim uklanjanjem oksidiranog regeneriranog produkta može se utjecati na ravnotežu. (Eckstein, 2004)

### 2.5. MODELIRANJE BIOTRANSFORMACIJA

Biokatalitički procesi su vrlo slični kemijskim procesima. Najznačajnija razlika je u tome što biokatalitički procesi moraju uzeti u obzir enzimsku kinetiku i stabilnost enzima. Modeliranje procesa ima sve značajniju ulogu u razvoju biokatalitičkih procesa, te njegova primjena sve više raste kako se povećava uporaba enzima u industriji.

Matematički model procesa uključuje kinetički i reaktorski model, odnosno bilance tvari komponenata, koje ovise o tipu reaktora. Za razvoj modela potrebno je odrediti kinetiku reakcije. Poznavanjem kinetike reakcije moguće je odrediti uvjete koncentracija supstrata i njegovog protoka kako bi dobili maksimalnu koncentraciju produkta u reaktoru. Također, poznavanje kinetike reakcije omogućava brojne proračune, procjene konverzije volumne produktivnosti, produktivnosti biokatalizatora te pronalaženje optimalnih reakcijskih uvjeta za provođenje procesa u reaktoru. (Findrik, 2017)

Matematičko modeliranje je vrlo korisno u razvoju procesnog modela biokatalitičke reakcije koji omogućava predviđanje stabilnosti enzima i karakteristike reaktora. Upotrebom modela, moguće je optimiranje procesa, odnosno optimiranje konverzije supstrata, produktivnosti procesa i potrošnje biokatalizatora. Iako se modeliranje biokatalitičkih procesa ne koristi često, dobar je alat za smanjenje troškova proizvodnje. (*Vasić-Rački, 2011*)

### 2.5.1. Kinetički modeli enzimatskih reakcija

Pretpostavlja se da je enzimaska aktivnost proporcionalna koncentraciji enzima i to je osnovni princip enzimске katalize. Ključna varijabla kinetike enzima je koncentracija supstrata, a njezin učinak čini osnovu hipoteze kinetike enzima. (*Illanes, 2008*)

Michaelis-Menteničina kinetika (jedn. 2.2) opisuje ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata i enzima, te vrijedi za jednosupstratnu reakciju.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s} \quad (2.2)$$

U navedenom izrazu  $r_s$  je brzina potrošnje supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ mol}^{-1}$ ],  $c_s$  je koncentracija supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ],  $V_m$  je maksimalna brzina reakcije, a  $K_m^s$  predstavlja Michaelisovu konstantu.

Učinak koncentracije supstrata na enzimsku katalizu prvi je predložio Henri, koji je pretpostavio da konverzija supstrata (S) u produkt (P) uključuje reverzibilnu reakciju između enzima (E) i supstrata koji formiraju aktivirani intermedijar (ES) koji se zatim raspada na produkt i enzim (jedn. 2.3). Nekoliko godina kasnije, Michaelis i Menten predlažu prvu formalnu hipotezu enzimске katalize koja se zasniva na dva koraka, baš kao što je Henri predložio. U prvom koraku dolazi do vezanja supstrata na aktivno mjesto enzima, dok u drugom koraku kompleks može disocirati na enzim i supstrat ili se kemijski promijeniti što rezultira nastajanjem produkta (P) i njegovim odvajanjem od enzima (jedn. 2.4). Enzim izlazi iz reakcije nepromijenjen i dostupan za sljedeću katalitičku reakciju. (*Illanes, 2008*)

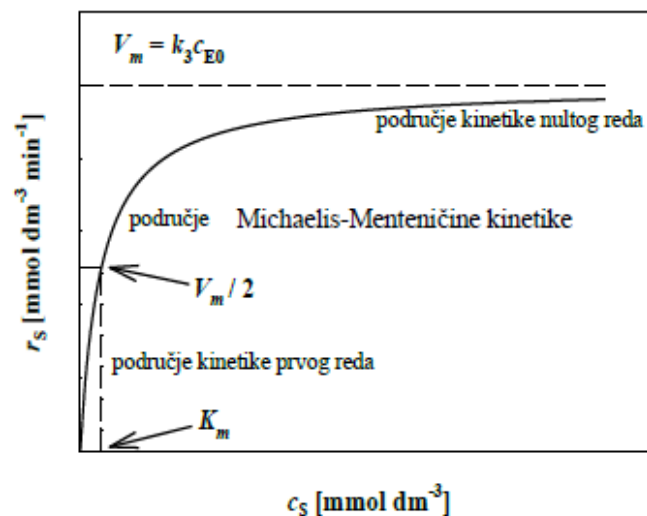


Ključni parametri Michaelis-Menteničine kinetike su  $V_m$ , odnosno maksimalna brzina reakcije koja se ostvaruje kada su sve molekule enzima u obliku ES kompleksa i ovisi o koncentraciji enzima  $E_0$  (jedn. 2.5) i  $K_m^s$ , Michaelisova konstanta, koji ovisi o konstantama brzina prethodno prikazanih reakcija (jedn. 2.6). Ako je Michaelisova konstanta jako velika to znači da enzim nema dobar afinitet prema supstratu. (Findrik, 2017)

$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.5)$$

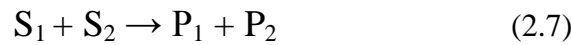
$$K_m^s = \frac{k_1 + k_2}{k_2} \quad (2.6)$$

Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis-Menteničinu kinetiku se može prikazati hiperbolom (Slika 2.7). Na slici je vidljivo da se krivulja može podijeliti u tri dijela: područje kinetike prvog reda, područje kinetike nultog te Michaelis-Menteničino područje između toga. Pri vrlo niskim, te visokim koncentracijama supstrata, vidljiva je linearna ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata. Područje niske koncentracije supstrata  $c_s \ll K_m$ , pri stalnoj koncentraciji enzima opisano je kinetikom prvog reda, dok je područje visoke koncentracije,  $c_s \gg K_m$ , opisano kinetikom nultog reda. U području kinetike nultog reda, brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata i konstantna je. Područje koje se nalazi između kinetike prvog reda i kinetike nultog reda, je Michaelis-Menteničino područje. (Dunn, 2003) Također se može vidjeti da Michaelisova konstanta predstavlja koncentraciju supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne.



Slika 2.7 Grafički prikaz ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis-Menteničinu kinetiku

Dvosupstratna enzimatska kinetika opisuje se izrazom koji slijedi Michaelis-Menteničinu kinetiku (jedm. 2.7-2.8). Drugi supstrat najčešće je koenzim.



$$r = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) \cdot (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (2.8)$$

Kod većine enzimatskih reakcija industrijske važnosti dolazi do inhibicije produktom i / ili supstratom. Inhibitor je kemijski spoj se veže na aktivno mjesto enzima te mu smanjuje katalitički potencijal, tj. smanjuje brzinu reakcije. (Illanes, 2008) Razlikujemo nekoliko tipova inhibicije: kompetitivnu, nekompetitivnu i antikompetitivnu. Kompetitivna inhibicija (jedm 2.9) odnosi se na slučaj kada se molekula inhibitora veže na aktivno mjesto enzima i pritom se sa supstratom natječe za to mjesto. Inhibitor konkurira za aktivno mjesto i smanjuje koncentraciju supstrata na njemu, što dovodi do smanjenja brzine reakcije. Nekompetitivna inhibicija (jedm 2.10) podrazumijeva ireverzibilno vezanje inhibitora na aktivno mjesto enzima ili njegovo vezanje na mjesto različito od aktivnog mjesta čime se mijenja oblik enzima te se na taj način ometa vezanje supstrata. Antikompetitivna inhibicija (jedm 2.11) je kombinacija kompetitivne i nekompetitivne inhibicije. (Karlson, 1984)

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s} \quad (2.9)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(K_m^s + c_s) \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.10)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.11)$$

U navedenim izrazima (2.8 – 2.10)  $c_i$  predstavlja koncentraciju inhibitora [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ], a  $K_i$  konstantu inhibicije [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ].

## 2.5.2. Reaktorski modeli

Kotlasti reaktor ili šaržni reaktor, eng. *batch reactor* je zatvoreni sustav, što znači da se za vrijeme reakcije sa okolinom ne izmjenjuje reakcijska masa. U reaktoru se ostvaruje približno idealno miješanje, što znači da su vrijednosti svih parametara približno iste u bilo kojoj točki reaktorskog prostora. Na početku procesa reakcijska se smjesa dodaje u reaktor, te se dodaje biokatalizator kako bi reakcija započela. Prema tome, supstrat se troši s vremenom, a koncentracija produkta se s vremenom povećava, baš kao i koncentracija biomase što znači da ovaj tip reaktora radi u nestacionarnom stanju. (Kosar, 2017) Često se koristi u industriji, uglavnom za reakcije u kapljevitoj fazi, za proizvodnju manjih količina produkata na umjerenim tlakovima i temperaturama.

Reaktorski model kotlastog reaktora uz navedene pretpostavke čine bilance množine tvari i topline.

Opća bilanca za množinu tvari je (jedn. 2.12):

$$r_A \cdot V = -\frac{dn_A}{dt} \quad (2.12)$$

Uz pretpostavku da je volumen reakcijske smjese stalan, slijedi (jedn. 2.13):

$$r_A = -\frac{dc_A}{dt} \quad (2.13)$$

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. APARATURA

##### 3.1.1. Analitička vaga

Sve potrebne mase tvari koje su u čvrstom agregatnom stanju i koje su bile potrebne za provođenje eksperimenata, vagane su na analitičkoj vagi *Shimadzu* (Slika 3.1).



Slika 3.1 Analitička vaga *Shimadzu*

##### 3.1.3. Spektrofotometar

Određene tvari mogu apsorbirati elektromagnetsko zračenje, stoga je intenzitet izlazne svjetlosti manji od intenziteta ulazne svjetlosti. Apsorpcija se matematički opisuje Lambert – Beerovim zakonom (jedn 3.1).

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (3.1)$$

Intenzitet ulazne svjetlosti  $I_0$  smanjuje se prolaskom kroz otopinu određene koncentracije tvari  $c$  koja apsorbira elektromagnetsko zračenje. Apsorpcija zračenja ovisi o koncentraciji otopine,  $c$ , duljini puta prolaska svjetlosti,  $b$  i molarnom apsorpcijskom koeficijentu,  $\varepsilon$ , koji je specifičan za svaku tvar i mijenja se s valnom duljinom.

U svrhu eksperimenta korišten je UV-VIS spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* (Slika 3.2).



Slika 3.2 Spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

#### 3.1.4. Homogenizator

Uzorci su homogenizirani na homogenizatoru MS2 *Minishaker* IKA



Slika 3.3 Homogenizator MS2 *Minishaker* IKA

#### 3.1.5. pH metar

Za pripremu otopine pufera korišten je pH metar *Handylab Ph11*.

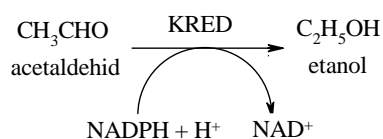


Slika 3.4 pH metar *Handylab Ph11*

## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. Određivanje kinetike enzima oksidoreduktaze u reakciji redukcije acetaldehida

Reakcija redukcije acetaldehida je ravnotežna reakcija. Supstrati u navedenoj reakciji su acetaldehid i koenzim NADPH, a produkti su etanol i  $\text{NADP}^+$ . U ovom radu kinetika enzima oksidoreduktaze određena je u naprednoj reakciji redukcije acetaldehida.



Slika 3.5 Shema reakcije redukcije acetaldehida

Kinetika enzima u reakciji redukcije acetaldehida ispitana je spektrofotometrijski mjerenjem ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, acetaldehida i NADPH. Sva mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi u fosfatnom puferu koncentracije  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1 \text{ M}$  i pH vrijednosti 8. Ukupan volumen komponenti u kivetu je iznosio 1 mL.

Za određivanje kinetike reakcije redukcije acetaldehida bilo je potrebno ispitati utjecaj koncentracije oba supstrata. Utjecaj acetaldehida ispitali smo variranjem koncentracije acetaldehida, dok su koncentracije enzima i NADPH bile konstantne (Tablica 3.1).

Na isti način ispitan je i utjecaj NADPH, variranjem koncentracija NADPH, dok su koncentracije enzima i acetaldehida bile konstantne (Tablica 3.1).

Provedena su i mjerenja kako bi se ispitaio utjecaj oba produkta, etanola i  $\text{NADP}^+$ , na inhibiciju enzima. Utjecaj inhibicije etanolom ispitan je variranjem koncentracije etanola, dok su koncentracije oba supstrata, acetaldehida i NADPH, bile konstantne, kao i koncentracija enzima (Tablica 3.1).

Utjecaj produkta  $\text{NADP}^+$  na inhibiciju enzima ispitan je variranjem koncentracije  $\text{NADP}^+$ , dok su koncentracije oba supstrata, acetaldehida i NADPH, bile konstantne, kao i koncentracija enzima (Tablica 3.1).



Tablica 3.1 Koncentracije reaktanata i produkata u pokusima ispitivanja kinetike enzima oksidoreduktaze u reakciji redukcije acetaldehida

<b>Reakcija redukcije acetaldehida</b>	$C_{\text{acetaldehid}}$ [mM]	$C_{\text{NADPH}}$ [mM]	$C_{\text{etanol}}$ [mM]	$C_{\text{NADP}^+}$ [mM]	$\gamma_{\text{enzim}}$ [mg/mL]
Utjecaj acetaldehida	17,6 – 880,9	0,1	-	-	1,0
Utjecaj NADPH	600	0,02 – 0,24	-	-	1,0
Utjecaj etanola	600	0,12	0 - 855	-	1,0
Utjecaj $\text{NADP}^+$	600	0,12	-	0 – 19,71	1,0

Na temelju mjernih podataka, apsorbancije u vremenu, izračunata je specifična aktivnost za svako mjerenje prema izrazima za volumnu i specifičnu aktivnost.

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

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

U jednadžbama (3.2 – 3.3)  $V_r$  predstavlja ukupni volumen u kvarcnoj kiveti [mL],  $\epsilon_{340}$  ekstinkcijski koeficijent pri  $\lambda=340$  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],  $\gamma_E$  je koncentracija dodanog enzima [mg/mL], a  $\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$  je promjena apsorbancije u vremenu [ $\text{min}^{-1}$ ].

### 3.2.2. Određivanje kinetike enzima oksidoreduktaze u reakciji oksidacije etanola

Osim napredne reakcije, redukcije acetaldehida, ispitana je i kinetika povratne reakcije oksidacije etanola. Mjerenja su provedena na spektrofotometru metodom početnih brzina pri sobnoj temperaturi u puferu koncentracije  $C_{\text{FOSFATNI PUFER}} = 0,1 \text{ M}$  i pH vrijednosti 8. Ukupni volumen otopine iznosio je 1 mL.

Ispitan je utjecaj etanola na brzinu reakcije pri konstantnim koncentracijama  $\text{NADP}^+$  ( $C_{\text{NADP}^+} = 4,9 \text{ mM}$ ) i enzima ( $\gamma_{\text{enzim}} = 1 \text{ mg/mL}$ ). Obzirom da mjerenjem ove kinetike nije uočena nikakva aktivnost enzima, daljnja mjerenja kinetike u ovoj reakciji nisu rađena.

### 3.2.3. Utjecaj acetaldehida na aktivnost enzima oksidoreduktaze

S obzirom da prisutnost acetaldehida u otopini utječe na brzinu deaktivacije enzima oksidoreduktaze ispitan je utjecaj različitih koncentracija acetaldehida na deaktivaciju enzima. Ispitivanja su provedena u reaktorima volumena 1 mL s različitim koncentracijama acetaldehida, 0-500,37 mM i konstantnom koncentracijom enzima,  $\gamma_{enzima} = 20 \text{ mg/mL}$ . Iz reaktora su u pravilnim vremenskim intervalima uzimani uzorci u kojima je određivana aktivnost enzima oksidoreduktaze. Aktivnost enzima se određivala spektrofotometrijski mjerenjem promjene koncentracije NADPH u reakciji redukcije acetaldehida. Test za mjerenje aktivnosti prikazan je u tablici 3.2.

Tablica 3.2 Sastav testa za praćenje aktivnosti oksidoreduktaze

Komponenta	Volumen [cm <sup>3</sup> ]
Pufer	0,788
NADPH	0,012
Acetaldehid	0,17
Uzorak	0,03

### 3.3. OBRADA PODATAKA

Eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu *Scientist* u kojemu je provedena simulacija na temelju napisanog modela i eksperimentalnih podataka. Parametri su procijenjeni nelinearnom regresijom pomoću metode najmanjih kvadrata i simpleks metode. Metode procjene parametara imaju za cilj pronaći minimalni zbroj kvadrata greške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela.

Na temelju eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri matematičkog modela: maksimalna brzina reakcije, Michaelis-Menteničine konstante te konstante inhibicije. Navedeni parametri su korišteni za simulacije pomoću modela, odnosno za predviđanje promjena koncentracija reaktanata i produkata s vremenom. Numeričke metode za rješavanje seta diferencijalnih jednažbi koje koristi *Scientist* su: Euler-ova metoda, metoda Runge Kutta IV, Bulirsch – Stoer metoda i Episode algoritam.

## 4. MATEMATIČKI MODEL

Simulacija reakcije redukcije acetaldehida provedena je u kotlastom reaktoru. Za navedenu reakciju postavljen je matematički model koji se sastoji od kinetičkog i reaktorskog modela. Postavljen je na temelju sheme reakcije (slika 3.5) i kinetičkih mjerenja, te pretpostavki da je reakcijski volumen konstantan, miješanje u reaktoru idealno, a temperatura konstantna.

### 4.1. KINETIČKI MODEL

Kinetički model razvijen je na temelju sheme reakcije, eksperimentalnih rezultata i procijenjenih parametara. Kinetika reakcije redukcije acetaldehida katalizirane oksidoreduktazom je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s uključenom kompetitivnom inhibicijom produktom, NADP<sup>+</sup> (jedn. 4.1).

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot \gamma_{enzim} \cdot c_{acetaldehid} \cdot c_{NADPH}}{(K_m^{acetaldehid} + c_{acetaldehid}) \cdot \left( c_{NADPH} + K_m^{NADPH} \cdot \left( 1 + \frac{c_{NADP^+}}{K_i^{NADP^+}} \right) \right)} \quad (4.1)$$

### 4.2. REAKTORSKI MODEL

Reaktorski model ravnotežne reakcije redukcije acetaldehida se sastoji od bilancnih jednadžbi promjene koncentracija reaktanata i produkata s vremenom za kotlasti reaktor (jedn. 4.2, 4.3, 4.4 i 4.5).

$$\frac{dc_{acetaldehid}}{dt} = -r_1 \quad (4.2)$$

$$\frac{dc_{etanol}}{dt} = r_1 \quad (4.3)$$

$$\frac{dc_{NADPH}}{dt} = -r_1 \quad (4.4)$$

$$\frac{dc_{NADP^+}}{dt} = r_1 \quad (4.5)$$

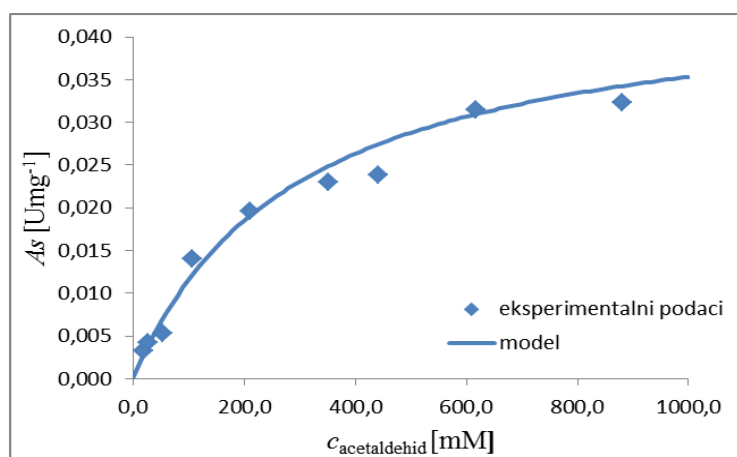
Deaktivacija enzima je opisana modelom drugog reda (jedn. 4.6.)

$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A^2 \quad (4.6)$$

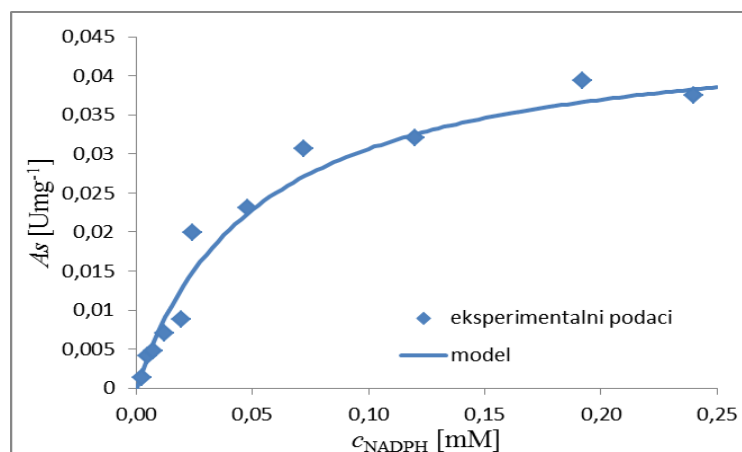
## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. Kinetika enzima oksidoreduktaze u reakciji redukcije acetaldehida

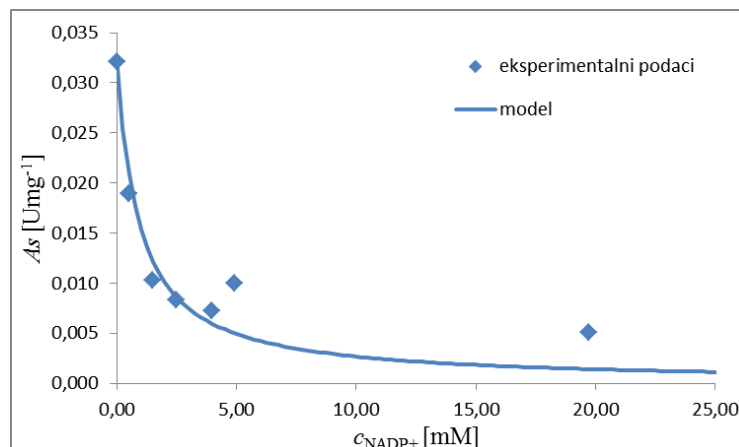
U reakciji redukcije acetaldehida supstrati su acetaldehid i koenzim NADPH, a produkti reakcije su etanol i  $\text{NADP}^+$ . Kinetika reakcije ispitana je metodom početnih brzina i opisana kao ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, acetaldehida (Slika 5.1) i NADPH (Slika 5.2), te produkata, etanola i  $\text{NADP}^+$  (Slika 5.3).



Slika 5.1 Ovisnost početne brzine reakcije redukcije acetaldehida pomoću oksidoreduktaze o koncentraciji acetaldehida ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 1,0 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 0,1 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{acetaldehid}} = 17,6 - 880,9 \text{ mM}$ )



Slika 5.2 Ovisnost početne brzine reakcije redukcije acetaldehida poću oksidoreduktaze o koncentraciji NADPH ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 1,0 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 0,02 - 0,24 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{acetaldehid}} = 600 \text{ mM}$ )



Slika 5.3 Ovisnost početne brzine reakcije redukcije acetaldehida počinu oksidoreduktaze o koncentraciji  $\text{NADP}^+$  ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 1,0 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 0,12 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{acetaldehid}} = 600 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 0 - 19,71 \text{ mM}$ )

Ispitivanjem utjecaja koncentracije acetaldehida na početnu brzinu reakcije redukcije acetaldehida uz prisutstvo oksidoreduktaze iz grafova (Slike 5.1 – 5.3) je vidljivo da reakcija nije inhibirana supstratima, acetaldehidom i NADPH. Također je ispitivanjem utjecaja koncentracije etanola i  $\text{NADP}^+$  na kinetiku reakcije redukcije acetaldehida utvrđena inhibicija produktom,  $\text{NADP}^+$ . Utvrđeno je da ne dolazi do inhibicije produktom etanolom.

Kinetika reakcije redukcije acetaldehida pomoću oksidoreduktaze opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom sa uključenom kompetitivnom inhibicijom produktom,  $\text{NADP}^+$  (jedn. 4.1). Vrijednosti parametara modela, maksimalne brzine reakcije ( $V_{m1}$ ), Michaelis-Menteničine konstante za acetaldehid ( $K_m^{\text{acetaldehid}}$ ) i NADPH ( $K_m^{\text{NADPH}}$ ), konstante inhibicije za  $\text{NADP}^+$  ( $K_i^{\text{NADP}^+}$ ) procijenjeni su iz eksperimentalnih podataka (Tablica 5.1). Iz procijenjenih parametara može se zaključiti da je NADPH specifičniji supstrat od acetaldehida. Također obzirom da je Michaelis Menteničina konstanta za NADPH znatno niža od konstante inhibicije od produkta  $\text{NADP}^+$  enzim nije značajno inhibiran navedenim produktom.

Tablica 5.1 Kinetički parametri u reakciji redukcije acetaldehida uz enzim oksidoreduktazu

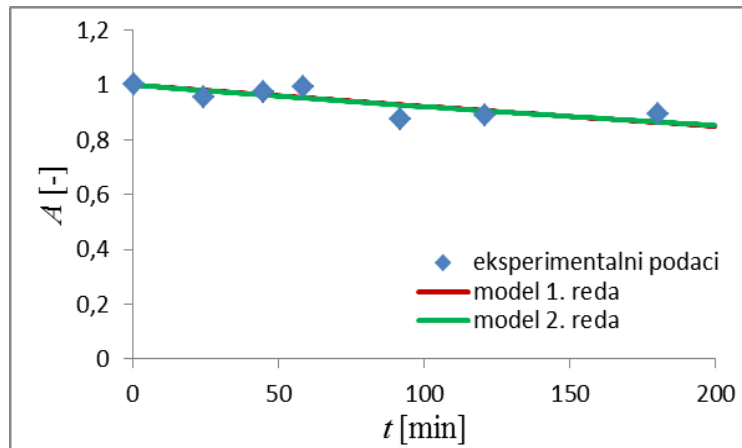
Parametar	Vrijednost
$V_{m1}$ [U mg <sup>-1</sup> ]	$0,069 \pm 0,008$
$K_m^{\text{acetaldehid}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$293,728 \pm 76,135$
$K_m^{\text{NADPH}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$0,052 \pm 0,009$
$K_i^{\text{NADP}^+}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$0,269 \pm 0,054$

## 5.2. Kinetika enzima oksidoreduktaze u reakciji redukcije etanola

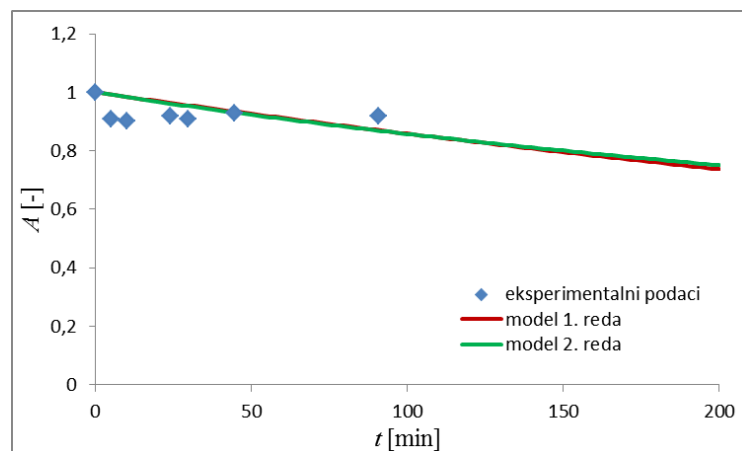
Provođenjem eksperimenata zaključeno je da enzim oksidoreduktaza ne pokazuje aktivnost u povratnoj reakciji oksidacije etanola.

## 5.3. Utjecaj acetaldehida na aktivnost enzima oksidoreduktaze

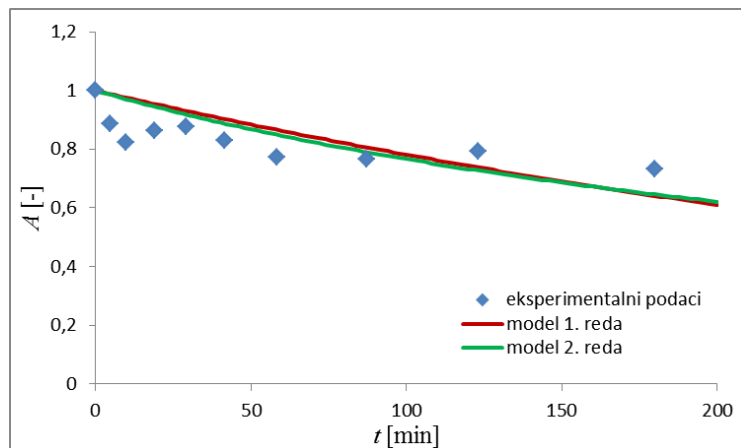
S obzirom na to da brzina deaktivacije oksidoreduktaze ovisi o koncentraciji acetaldehida u otopini, ispitan je utjecaj različitih koncentracija acetaldehida na aktivnost enzima u reaktorskim uvjetima. Rezultati su prikazani kao ovisnost relativne aktivnosti enzima ( $A$ ) u vremenu pri različitim koncentracijama acetaldehida (Slike 5.4 – 5.8).



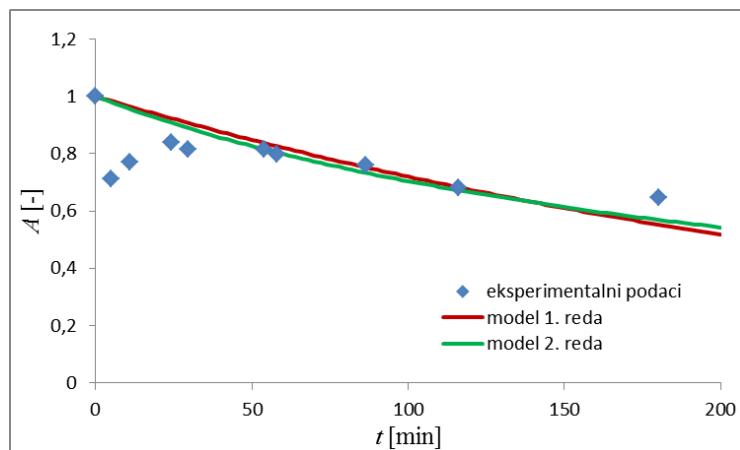
Slika 5.4 Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji acetaldehida od 0 mM



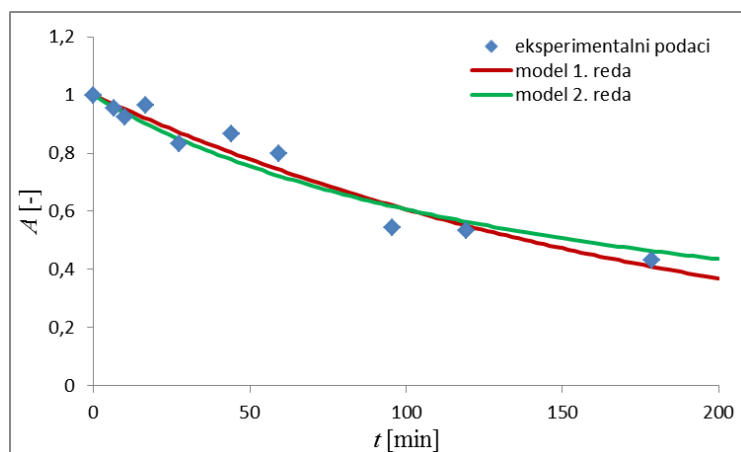
Slika 5.5 Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji acetaldehida od 9,87 mM



Slika 5.6 Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji acetaldehida od 49,33 mM



Slika 5.7 Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji acetaldehida od 204,38 mM



Slika 5.8 Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji acetaldehida od 500,37 mM

Iz slike 5.4 može se vidjeti da enzim u gubi aktivnost u radnim uvjetima i bez prisustva acetaldehida. Iz prikazanih slika (5.4 – 5.9) može se vidjeti da s porastom koncentracije acetaldehida u reaktoru brzina deaktivacije raste.

Deaktivacija enzima oksidoreduktaze opisana je modelom 1. i 2. reda, a parametri navedenih modela procijenjeni su iz eksperimentalnih podataka te su prikazani Tablicom 5.2.

Tablica 5.2 Parametri modela deaktivacije opisani kinetikom 1. i 2. reda za enzim oksidoreduktazu procijenjeni u programskom paketu *Scientist*, te  $R^2$  za svaki model

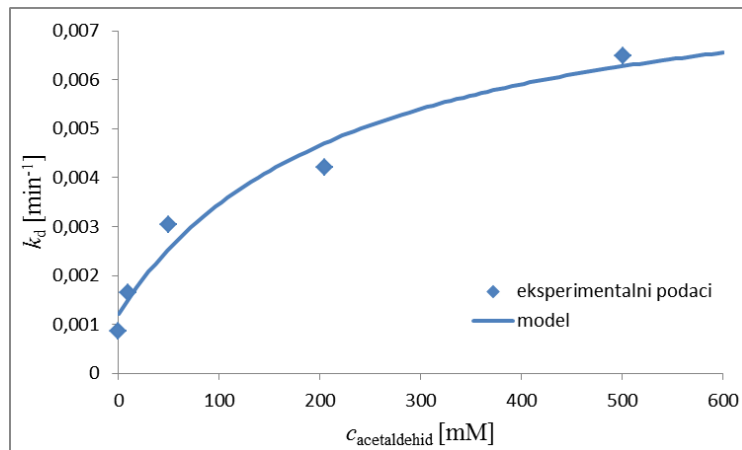
c [mM]	$k_{d1}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$k_{d2}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$R_1^2$	$R_2^2$
0	$0,0008 \pm 0,0001$	$0,000865 \pm 0,000162$	0,998992	0,999019
9,87	$0,0015 \pm 0,0006$	$0,001659 \pm 0,000678$	0,996491	0,996595
49,33	$0,0025 \pm 0,0005$	$0,003047 \pm 0,000664$	0,989842	0,991284
204,38	$0,0033 \pm 0,0007$	$0,0042 \pm 0,0011$	0,977866	0,980124
500,37	$0,0050 \pm 0,0004$	$0,0065 \pm 0,0006$	0,997288	0,996171

Iz danih vrijednosti vidljivo je da se konstanta deaktivacije povećava s koncentracijom acetaldehida. Oba modela dobro opisuju pad aktivnosti enzima, no obzirom da su za model 2. reda, odstupanja modela od eksperimentalnih podataka nešto manja nego što je to u slučaju kinetike 1. reda, istim se opisivala deaktivacija enzima u ovom radu.

Ovisnost konstante deaktivacije o koncentracije acetaldehida je prikazana na slici 5.9. Vidljiva je hiperbolična ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji supstrata te je ista opisana jednadžbom 5.1.

$$k_d = \frac{a \cdot c_{\text{acetaldehid}}}{b + c_{\text{acetaldehid}}} + d \quad (5.1)$$





Slika 5.9 Prikaz ovisnosti konstante deaktivacije o koncentraciji acetaldehida

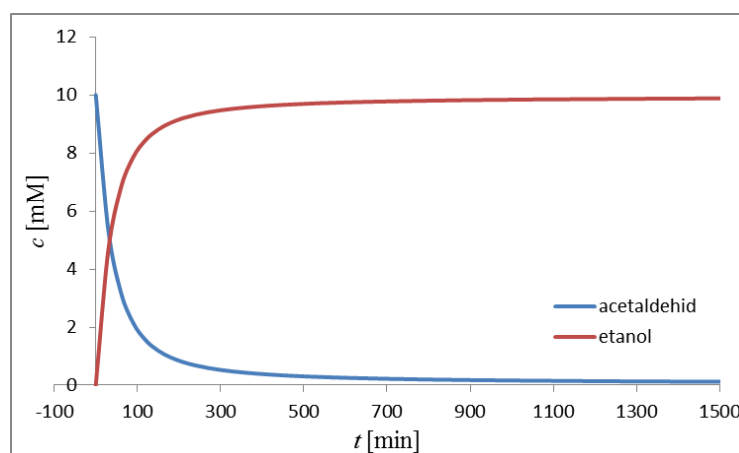
Vrijednosti parametara jednadžbe 5.1. dani su u tablici 5.3.

Tablica 5.3 Vrijednosti parametara

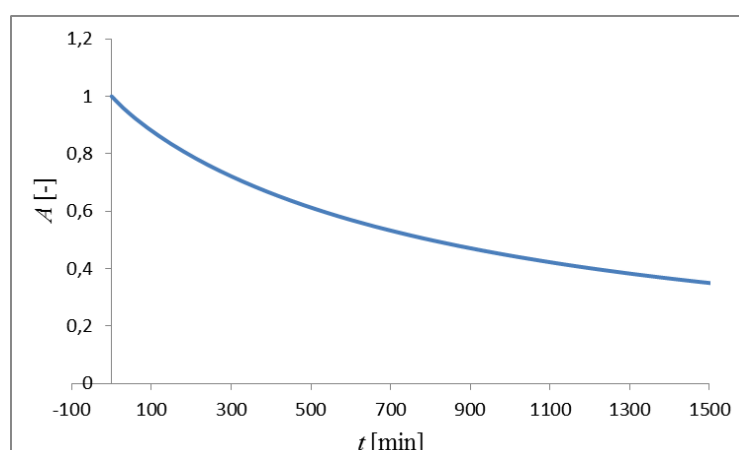
Parametar	Vrijednost
$a [\text{min}^{-1}]$	0,0074
$b [\text{mmol dm}^{-3}]$	226,9
$c [\text{min}^{-1}]$	0,0012

### 5.3. Simulacija reakcije redukcije acetaldehida

Simulacija reakcije redukcije acetaldehida katalizirane oksidoreduktazom uz regeneraciju koenzima NADPH za kotlasti reaktor provedena je u programskom paketu *Scientist* na temelju napisanog matematičkog modela (Prilog 1) i procijenjenih kinetičkih parametara (poglavlje 4 i tablica 5.1). Na Slici 5.10 prikazana je simulacija promjene koncentracije acetaldehida i etanola u reakciji redukcije acetaldehida. Potpuna konverzija acetaldehida postiže se nakon 1500 min (cca 24 h). Zbog deaktivacije enzima uzrokovane prisutnošću acetaldehida aktivnost enzima pada (Slika 5.11) te je u vremenu potpune konverzije (cca 24 h) aktivnost iznosila 35,02 % početne aktivnosti.



Slika 5.10 Simulacija reakcije redukcije acetaldehida katalizirane oksidoreduktazom u kotlastom reaktoru ( $c_{\text{acetaldehid}} = 10 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 10 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{KRED}} = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ )



Slika 5.11 Simulacija promjene relativne aktivnosti enzima s vremenom tijekom reakcije redukcije acetaldehida katalizirane oksidoreduktazom u kotlastom reaktoru ( $c_{\text{acetaldehid}} = 10 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 10 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{KRED}} = 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ )

## 6. ZAKLJUČAK

Kinetika enzima oksidoreduktaze u naprednoj reakciji opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom,  $\text{NADP}^+$ . Zaključeno je da ne dolazi do inhibicije produktom, etanolom.

Ispitivanjem kinetike enzima oksidoreduktaze u povratnoj reakciji oksidacije etanola utvrđeno je da enzim ne pokazuje aktivnost.

Stabilnost enzima oksidoreduktaze mijenja se ovisno o koncentraciji acetaldehida. Utvrđeno je da konstanta deaktivacije raste kako se povećava koncentracija acetaldehida te da model 2. reda točnije opisuje deaktivaciju.

Postavljen je matematički model procesa redukcije acetaldehida uz oksidoreduktazu, te je prema njemu pokazano kako je za potpunu konverziju 10 mM acetaldehida bilo potrebno 1500 minta pri koncentraciji enzima od  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

## 7. LITERATURA

1. Chenault H. K., Simon E. S., Whitesides G. M., Cofactor regeneration for Enzyme-Catalysed Synthesis, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 6 (1988), 221-270.
2. 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), 67-115
3. Duraković S., *Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering*, Zagreb (1996), 301-310
4. Findrik Z., *Bioreaktori (nastavni tekstovi)*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017).
5. Hummel W., Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments, *Trends in Biotechnology* 17(1999), 487-492.
6. Illanes, A., *Enzyme Biocatalysis: principles and applications*, Springer (2008) 1-31.
7. Karlson P., *Biokemija; Školska knjiga*, Zagreb (1984)
8. Kosar V., *Reaktori i bioreaktori (nastavni tekstovi)*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017).
9. Marrit E., Daubmann T, Kragl U., Recent Developments in NAD(P)H Regeneration for Enzymatic Reductions in One- and Two-Phase Systems, *Biocatalysis and Biotransformation* 22 (2004), 89-96.
10. May S.W., Padgett S..R., Oxidoreductase Enzymes in Biotechnology: current status and future potential, *Bio/Technology* 1 (1983) 677-686.
11. Murphy E. F., Gilmour S. G., Crabbe M. J., Effective experimental design: enzyme kinetics in the bioinformatics era; *Drug Discovery Today* 7 (2002) 187-191.
12. Vasić-Rački, Đ., Findrik, Z., Vrsalović Presečki, A., Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (2011) 845-856.
13. 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.
14. Wu H., Tian C., Song X., Liu C., Yang D., Jiang Z., Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes, *Green Chemistry* 15 (2013) 1773–1789.

## 8. PRILOZI

Prilog 1

// Simulacija reakcije redukcije acetaldehida

IndVars:t

DepVars:Ac,Et,NADPH,NADP,A1,kd

Params: Vm,Kmac,KmNADPH,KiNADP,A,B,D

$r1 = Vm * ckat * A1 * Ac * NADPH / ((Kmac + Ac) * (NADPH + KmNADPH * (1 + NADP / KiNADP)))$

$kd = A * Ac / (B + Ac) + D$

Ac'=-r1

Et'=r1

NADPH'=-r1

NADP'=r1

A1'=-kd\*A1\*A1

Vm=0.069280358

Kmac=293.728415

KmNADPH=0.051628816

KiNADP=0.26863349

A=0.007356

B=226.9108

D=0.001218

t=0

ckat=100

Ac=10

Et=0

NADPH=10

NADP=0

A1=1

\*\*\*

## 9. SIMBOLI I SKRAĆENICE

### Grčki simboli

$\gamma$  – masena koncentracija enzima [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]

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

$\lambda$  – valna duljina [nm]

### Simboli

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

$A_v$  – aktivnost biokatalizatora po volumenu [ $\text{U mL}^{-1}$ ]

$b$  – duljina puta elektromagnetskog zračenja kroz uzorak [cm]

$c$  – koncentracija [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]

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

$d$  – promjer kvarcne kivete [cm]

$E_a$  – energija aktivacije

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

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

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

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

pH – negativni logaritam koncentracije  $\text{H}^+$  iona u otopini

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

$T$  – temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]

$t$  – vrijeme [min]

$t_{1/2}$  – vrijeme poluživota enzima [min]

$V$  – volumen [ $\text{cm}^3$ ]

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

$V_r$  – ukupni volumen u kvarcnoj kiveti [ $\text{cm}^3$ ]

## Skraćenice

ABS – apsorbancija

ATP – adenzin trifosfat

E – enzim

ES – enzim-supstrat kompleks

FAD – flavin mononukleotid

NAD<sup>+</sup> - nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH – reducirani oblik NAD<sup>+</sup>

NADP<sup>+</sup> - nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

NADPH – reducirani oblik NADP<sup>+</sup>

P – produkt

S – supstrat

UV-VIS – ultraljubičasti-vidljivi spektar elektromagnetskog zračenja

## ŽIVOTOPIS

Ivana Bukarica [REDACTED] Osnovnu školu pohađala je u Drišu. Nakon završetka osnovne škole srednjoškolsko obrazovanje stiče u Medicinskoj školi u Šibeniku, gdje dobiva zvanje farmaceuskog tehničara. 2015.g. se upisuje na studij Ekoinženjerstva na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu.