

Oksidacija glukoze katalizirana enzimom glukoza dehidrogenaza u kotlastom reaktoru

Čulo, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:149:623757>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-31**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Karla Čulo

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PRIJEDIPLOMSKI STUDIJ

Karla Čulo

OKSIDACIJA GLUKOZE KATALIZIRANA ENZIMOM GLUKOZA DEHIDROGENAZA
U KOTLASTOM REAKTORU

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: doc. dr. sc. Anita Šalić

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. doc. dr. sc. Anita Šalić
2. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
3. izv. prof. dr. sc. Ana Jurinjak Tušek

Zagreb, rujan 2024.



Istraživanje je provedeno u sklopu projekta Hrvatske zaklade za znanost Integrirani mikrosustav za enzimatsku proizvodnju biovodika (IP-2022-10-2175) voditelja prof. dr. sc. Brune Zelića

SAŽETAK

U današnje vrijeme sve je veći jaz između energetske potrebe i ograničenih izvora energije kao što su fosilna goriva. Zbog toga se sve više istražuju obnovljivi energenti kao što je to primjerice vodik. Vodik se smatra jednim od najperspektivnijih izvora energije budućnosti jer ima visok energetske prinos. Vodik proizveden iz bioloških izvora naziva se biovodik te danas predstavlja jedan od najzanimljivijih obnovljivih izvora energije. Jedan od načina proizvodnje biovodika je i enzimski konverzija glukoze u glukonsku kiselinu uz regeneraciju koenzima i paralelnu proizvodnju molekularnog vodika.

U okviru ovog istraživanja provedena je oksidacija glukoze katalizirana enzimom glukoza dehidrogenaza (GDH) iz *Pseudomonas* sp. uz koenzim NAD^+ u kotlastom reaktoru. U prvom dijelu istraživanja provedena je karakterizacija enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. na način da su određeni temperaturni i pH optimum za provedbu reakcije, te je odabran najbolji pufer. Rezultati su pokazali kako je optimalna temperatura za provedbu reakcije $40\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7 te pufer $0,1\text{ mol/L TRIS-HCl}$ pH 7. U drugom dijelu istraživanja ispitana je reakcijska kinetika oksidacije glukoze metodom početnih brzina te su procijenjeni kinetički parametri. Kinetika oksidacije glukoze katalizirane GDH iz *Pseudomonas* sp. opisana je dvosupstratnom Michaelis–Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom i kompetitivnom inhibicijom produktom. Za reakciju provedenu u kotlastom reaktoru postavljen je odgovarajući reaktorski model, koji se sastojao od kinetičkog modela i bilanci tvari za sve komponente reakcijske smjese. Ocjena valjanosti modela provedena na dva seta nezavisnih eksperimenata.

Ključne riječi: glukoza dehidrogenaza, glukoza, kinetički parametri, kotlasti reaktor

ABSTRACT

In today's world, there is a growing gap between energy demand and limited energy sources such as fossil fuels. As a result, renewable energy sources such as hydrogen are increasingly being researched. Hydrogen is considered one of the most promising energy sources of the future, as it has a high energy yield. Hydrogen produced from biological sources is known as biohydrogen and is one of the most interesting renewable energy sources today. One way of producing biohydrogen is the enzymatic conversion of glucose into gluconic acid with the regeneration of coenzymes and the parallel production of molecular hydrogen.

In this study, glucose oxidation, catalyzed by the enzyme glucose dehydrogenase (GDH) with the coenzyme NAD^+ was carried out in a batch reactor. In the first part of the study, the characterization of the enzyme GDH was performed by determining the optimal temperature and pH for the reaction and selecting the best buffer. The results showed that the optimal temperature for the reaction is 40°C , pH 7, and the buffer is 0.1 mol/L TRIS-HCl pH 7. In the second part of the study, the reaction kinetics of glucose oxidation was investigated using the initial rate method, and the kinetic parameters were estimated. The kinetics of glucose oxidation catalyzed by GDH is described by two-substrate Michaelis-Menten kinetics with substrate inhibition and competitive product inhibition. A suitable reactor model was developed for the reaction carried out in the batch reactor, consisting of a kinetic model and mass balances for all components of the reaction mixture. The validation of the model was evaluated using two sets of independent experiments.

Key words: glucose dehydrogenase, glucose, kinetic parameters, batch reactor

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 2 |
| 2.1. Vodik | 2 |
| 2.2. Glukoza | 3 |
| 2.3. Glukonska kiselina..... | 4 |
| 2.4. Enzimi..... | 6 |
| 2.4.1. Glukoza dehidrogenaza..... | 7 |
| 2.5. Matematički model procesa– reaktorski i kinetički modeli | 10 |
| 2.5.1. Kinetički model..... | 10 |
| 2.5.2. Reaktorski modeli..... | 12 |
| 2.5.2.1. Kotlasti reaktor..... | 13 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 14 |
| 3.1. Materijali..... | 14 |
| 3.1.1. Kemikalije..... | 14 |
| 3.1.2. Aparatura | 15 |
| 3.2. Metode | 15 |
| 3.2.1. Priprema reagensa i pufera..... | 15 |
| 3.2.2. Određivanje koncentracije proteina lineariziranim Bradfordovim testom..... | 16 |
| 3.2.3. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije glukoze | 16 |
| 3.2.4. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije NADH..... | 17 |
| 3.2.5. Mjerenje aktivnosti enzima glukoza dehidrogenaza iz <i>Pseudomonas</i> sp. | 18 |
| 3.2.6. Ispitivanje utjecaja pufera, pH i temperature na aktivnost enzima GDH iz <i>Pseudomonas</i> sp. | 19 |
| 3.2.7. Kinetička karakterizacija enzima glukoza dehidrogenaza..... | 20 |
| 3.3. Provedba reakcije oksidacije glukoze katalizirane enzimom GDH iz <i>Pseudomonas</i> sp. u kotlastom reaktoru | 21 |
| 3.4. Obrada podataka | 21 |
| 4. KINETIČKI I REAKTORSKI MODEL OKISIDACIJE GLUKOZE U KOTLASTOM REAKTORU | 23 |
| 5. REZULTATI I RASPRAVA..... | 25 |
| 5.1. Utjecaj pH na aktivnost enzima..... | 25 |
| 5.2. Utjecaj temperature na aktivnost enzima | 26 |
| 5.3. Kinetička karakterizacija enzima glukoza dehidrogenaza iz <i>Pseudomonas</i> sp. | 27 |

| | |
|---|----|
| 5.4. Provedba reakcije oksidacije glukoze katalizirane enzimom GDH iz <i>Pseudomonas</i> sp. u kotlastom reaktoru | 35 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 36 |
| 7. LITERATURA | 37 |
| 8. PRILOZI..... | 41 |
| 9. POPIS SIMBOLA I KRATICA | 44 |

1. UVOD

Razvojem industrije sve više raste i potreba za fosilnim gorivima kao primarnim izvorom energije. Međutim, fosilna goriva istovremeno pridonose značajnim emisijama stakleničkih plinova, koji su glavni uzročnici globalnog zatopljenja i klimatskih promjena. Kao odgovor na ove izazove, obnovljivi izvori energije postaju ključni u ublažavanju problema energetske sigurnosti i okolišne održivosti. Trenutna istraživanja uglavnom su usmjerena na obnovljive izvore energije, poput vodika, s obzirom na ograničenost fosilnih goriva.

Vodik se smatra izuzetno perspektivnim energetskim izvorom zbog svoje održivosti, visoke učinkovitost i potencijala za dugoročnu uporabu. Vodik proizveden iz bioloških izvora poznat je kao biovodik (BioH_2). Biovodik se ističe kao najperspektivnija opcija među obnovljivim gorivima, nudi značajne prednosti u smanjenju emisija stakleničkih plinova, te minimizira negativan utjecaj na okoliš. Osim toga, biovodik ima visoki energetski prinos, ubraja se u obnovljive izvore energije i ima veliki potencijal za transformaciju gospodarstva koje ovisi o fosilnim gorivima.

Ipak, jedan od najvećih izazova ostaje održivost industrijske proizvodnje biovodika, ponajviše zbog niske konverzije supstrata, što predstavlja ekonomski nepovoljan aspekt procesa. Trenutno se većina vodika proizvodi pretvorbom fosilnih goriva, no postoji potencijal za proizvodnju vodika iz glukoze, koja se može dobiti iz obnovljivih izvora poput škroba, celuloze i laktoza. [1] Reakcija uključuje enzimsku konverziju glukoze u glukono- δ -lakton, uz regeneraciju koenzima i paralelnu proizvodnju molekularnog vodika uvođenjem drugog enzima, hidrogenaze, u proces.

Cilj ovog rada je istražiti i optimizirati proces oksidacije glukoze kataliziran enzimom glukoza dehidrogenaza (GDH) iz *Pseudomonas* sp. uz koenzim nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) u kotlastom reaktoru [2]. U sklopu istraživanja, posebna pažnja posvećena je karakterizaciji enzima, odnosno određivanju optimalnih uvjeta reakcije (temperatura, pH i odabir pufera), te analizi reakcijske kinetike. Kroz procjenu kinetičkih parametara i razvoj reaktorskog modela, cilj je bio uspostaviti temelj za učinkovitiju proizvodnju biovodika.

2. OPĆI DIO

2.1. Vodik

Dihidrogen (H_2) ili jednostavnije vodik, predstavlja čist, obnovljiv i održiv nositelj energije s iznimnim potencijalom. Njegova upotreba obuhvaća motore s unutarnjim izgaranjem i gorive ćelije, pri čemu se ne stvaraju štetni ili toksični plinovi, što vodik pozicionira kao potencijalno gorivo budućnosti. Iako je vodik je jedan od najrasprostranjenijih elemenata u prirodi, njegova visoka reaktivnost uzrokuje da se rijetko nalazi u slobodnom stanju, već je prisutan uglavnom u spojevima. Kao plin, vodik je bezbojan, zapaljiv i bez mirisa, što stvara određene sigurnosne izazove, osobito u slučaju curenja. [3]

Pri standardnim uvjetima, vodik je najlakši element s gustoćom od $0,0899 \text{ g L}^{-1}$ dok u kapljevitom stanju pri -253 °C njegova gustoća iznosi $70,8 \text{ g L}^{-1}$. Njegova pohrana predstavlja značajan izazov zbog niske volumne gustoće, visokog uzgona i brzine difuzije, što pridonosi povećanoj zapaljivosti. Uz to, vodik je izuzetno osjetljiv na detonaciju, sa širokim rasponom volumnih udjela za zapaljenje (4-74%) i detonacije (18-59%). [4]

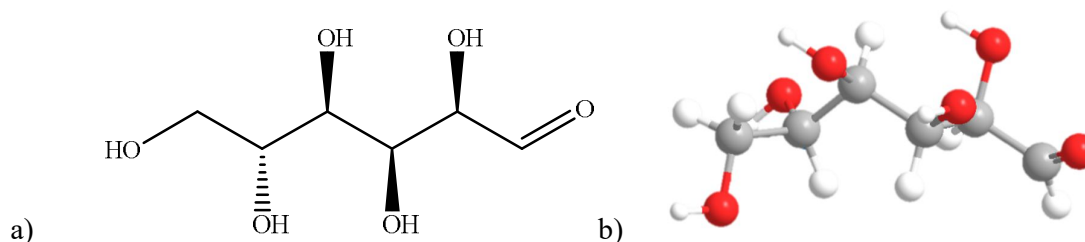
Unatoč tim izazovima, vodik nalazi široku primjenu u različitim dijelovima industrije, uključujući transport, proizvodnju amonijaka i ugljikovodika, metalurgiju i energetske sustave. U svemirskoj industriji koristi se kao gorivo, dok se u metalurgiji primjenjuje za uklanjanje O_2 u toplinskoj obradi metala [5]. Zbog svoje visoke učinkovitosti izgaranja, vodik se sve više istražuje kao gorivo u automobilske industriji. Troškovi proizvodnje vodika putem elektrolize, posebno u Europi, variraju od $4,18$ do $9,60 \text{ € kg}^{-1}$, što je usporedivo s troškovima proizvodnje vodika putem konvencionalnih metoda [6]. Zbog svega navedenog, vodik ima potencijal transformirati energetske sektor i postati ključnim za budućnost energetske održivosti.

Vodik se trenutno proizvodi pretežno iz fosilnih goriva, poput ugljena i prirodnog plina, no održivije metode, poput elektrolize vode, također su u razvoju. Iako elektroliza omogućuje 100% obnovljivu proizvodnju vodika, ona čini manje od 5% globalne proizvodnje [7].

Prednosti korištenja vodika uključuju njegovu netoksičnost, visoku specifičnu energiju i činjenicu da ne emitira CO_2 nakon izgaranja. Međutim, najveći izazov ostaje pronalaženje učinkovitih metoda njegovog skladištenja, s obzirom na nisku volumetrijsku gustoću. Trenutačno istraživanje skladištenja obuhvaća kompresiju, ukapljivanje te upotrebu metalnih hidrida i kompleksnih spojeva.

2.2. Glukoza

Glukoza (Slika 1.), čiji naziv potječe od grčke riječi „gleukos“ koja znači „slatko vino“, je esencijalni monosaharid s kemijskom formulom $C_6H_{12}O_6$. [8] Sastavni je dio voća, meda i krvi, te pripada skupini ugljikohidrata, preciznije aldoheksoza, zbog svojih šest ugljikovih atoma i aldehidne skupine. [9]



Slika 1. a) Kemijska struktura i b) 3D prikaz molekule glukoze

Monosaharidi su najjednostavniji oblik ugljikohidrata koji se ne mogu hidrolitički razgraditi na manje molekule ugljikohidrata, zbog čega ih nazivamo jednostavnim šećerima. Glukoza, koja propada ovoj skupini, može u prirodi formirati šesnaest izomera zahvaljujući prisutnosti četiri asimetrična atoma ugljika. Strukturno, glukoza može postojati u acikličkom i cikličkom obliku, a ovisno o uvjetima, može kristalizirana iz vodene otopine u tri glavna oblika: α -glukopiranoza, β -glukopiranoza, i β -glukopiranoza hidrat. [10] Neka od fizikalnih svojstava glukoze poput topivosti, točke tališta i gustoće prikazana su u Tablici 1.

Tablica 1. Fizikalna i kemijska svojstva glukoze

| | |
|---------------------------|---|
| Izgled | Kristali bijele boje |
| Kemijska formula | $C_6H_{12}O_6$ |
| Relativna molekulska masa | $180,16 \text{ g mol}^{-1}$ |
| Točka tališta | $150 \text{ }^\circ\text{C}$ |
| Gustoća | $1,5620 \text{ g mL}^{-1}$ (pri $18 \text{ }^\circ\text{C}$) |
| Topljivost u vodi | Vrlo dobra |
| pKa | 12,16 (na $77 \text{ }^\circ\text{C}$ u vodi) |

Jedno od najvažnijih fizikalnih svojstava glukoze je njezina visoka topljivost u vodenim otopinama. Svi oblici glukoze su bezbojni i lako topljivi ne samo u vodi, već i u octenoj kiselini te mnogim drugim otapalima. Glukoza je ključni produkt fotosinteze i ima ključnu ulogu u staničnom disanju, gdje doprinosi sintezi ATP-a i nikotinamid adenin dinukleotid hidrid (NADH) molekula. [2] U jetri, glukoza se koristi za sintezu ugljikohidrata koji služe kao glavni izvor energije za tjelesna tkiva. Također, glukoza se može pretvoriti u druge specijalizirane metabolite kao što je glikogen, koji služi kao skladišni oblik glukoze u životinjama, dok biljke skladište glukozu u obliku škroba. [2]

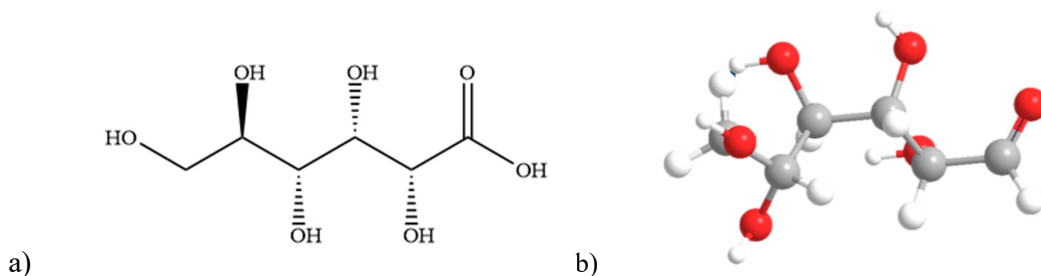
Industrijska proizvodnja glukoze uglavnom se ostvaruje kiselom hidrolizom škroba i celuloze, pri čemu se ti složeni ugljikohidrati razgrađuju u glukozu primjenom kiseline na visokim temperaturama, obično između 150°C i 250°C. Ova metoda je posebno učinkovita kada se koriste neprehrambeni izvori biomase poput celuloze. Trošak proizvodnje glukoze varira ovisno o korištenim sirovinama i učinkovitosti procesa hidrolize s cijenama koje se kreću između 0,19 i 0,41 € kg⁻¹. [11,12]

Glukoza ima široku primjenu u industrijski. U prehrambenoj industriji koristi se kao osnovna sirovina za proizvodnju zaslađivača i drugih proizvoda, dok u farmaceutskoj industriji služi kao ključni izvor energije u intravenoznim otopinama, osiguravajući vitalnu prehranu pacijentima. Također, glukoza je važan supstrat u fermentacijama za proizvodnju biogoriva poput etanola, što naglašava njezinu njenu važnost u energetskom sektoru. Osim toga, glukoza ima potencijalnu primjenu kao goriva u niskotemperaturnim gorivnim ćelijama, koje omogućuju izravno generiranje elektrona bez karbonizacije, čineći ju održivim kandidatom za čistu i održivu proizvodnju energije. [11,12]

2.3. Glukonska kiselina

Glukonska kiselina (C₆H₁₂O₇) (Slika 2.) je prirodna, nekorozivna, blaga i biorazgradiva organska kiselina koja se dobiva oksidacijom glukoze, pri čemu se aldehidne skupine oksidira u karboksilnu skupinu. Ovaj proces pospješuju enzimi poput glukoza dehidrogenaza i glukoza oksidaza. Poznata i pod nazivom polihidroksikarboksilna kiselina ili pentahidroksikapronska kiselina, glukonska kiselina nastaje hidrolizom glukono- δ -laktona. Nusprodukt ovog procesa, vodikov peroksid, razlaže se na vodu i kisik pomoću enzimske katalize. [13] Glukonsku kiselinu moguće je proizvesti i biotehnološkim procesima koji uključuju upotrebu mikroorganizama kao

što su bakterije poput *Pseudomonas ovalis*, *Acetobacter methanolicus*, *Zymomonas mobilis*, te plijesni poput *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum* i *Penicillium variable*. [14, 15] Proizvodnja glukonske kiseline putem fermentacije s plijesni *Aspergillus niger* danas se smatra ekonomičnijom i održivijom opcijom u industriji, za razliku od tradicionalnih šaržnih procesa kemijske sinteze zbog niske selektivnosti potonjih. [15]



Slika 2. a) Kemijska struktura i b) 3D prikaz molekule glukonske kiseline

Bezvodna glukonska kiselina pojavljuje se kao bijeli kristal bez mirisa s kiselkastim okusom. Na tržištu, 50%-tna vodena otopina glukonske kiseline prodaje se po cijeni od 275 do 730 € tona⁻¹. Globalno tržište glukonske kiseline vrijedilo je preko 46 milijuna eura 2017. godine, a predviđa se da će do 2024. godine premašiti 74 milijuna eura, uz potrošnju preko 120 kt. Istraživanje nekonvencionalnih izvora ugljikohidrata moglo bi dodatno smanjiti troškove proizvodnje glukonske kiseline. [16] U Tablici 2. prikazana su neka od fizikalnih i kemijskih svojstava glukonske kiseline.

Tablica 2. Fizikalna i kemijska svojstva glukonske kiseline

| | |
|---------------------------|---|
| Izgled | Kristali bijele boje (kruto agregatno stanje), bezbojne do smeđe boje (otopine) |
| Kemijska formula | C ₆ H ₁₂ O ₇ |
| Relativna molekulska masa | 196,16 g mol ⁻¹ |
| Točka tališta | 120 – 131°C |
| Gustoća | 1,49 g mL ⁻¹ |
| Topljivost u vodi | Dobro topiva u vodi |
| pKa | 3,72 |

Glukonska kiselina prisutna je u mnogim prirodnim proizvodima poput meda, octa, riže, mesa, vina, voća i raznog bilja. [14] Prva proizvodnja datira iz 1870. godine kad su je Hlasiwetz i Habermann otkrili tijekom oksidacije glukoze klorom. Kasnija istraživanja su pokazala da se glukonska kiselina može dobiti obradom raznih polisaharida, monosaharida i disaharida koristeći različite oksidanse, uključujući elementarne halogene i živin(II) oksid. [17] Jedno od ključnih svojstava glukonske kiseline je njezina mogućnost keliranja, odnosno stvaranja prstenaste strukture s metalnim ionima poput kalcij, bakar i željezo. Zbog ove sposobnosti, glukonska kiselina je iznimno korisna u različitim industrijama, uključujući mliječnu industriju za uklanjanje metala, deterdžente za čišćenje, metalurgiju, tekstil, prehrambenu industriju i ekstrakciji metalnih iona poput bakra. [18] Također, u cementnoj industriji koristi se za poboljšanje otpornosti cementa u ekstremnim klimatskim uvjetima.

2.4. Enzimi

Njemački psiholog i znanstvenik Wilhelm Friedrich Kühne 1878. godine uveo je pojam „enzim“ kako bi opisao proces fermentacije alkohola iz šećera pomoću kvasca, čime je jasno razgraničio enzime od bakterija. [16] Enzimi su ključni molekularni katalizatori u biološkim sustavima koji precizno usmjeravaju kemijske reakcije te posreduju u pretvorbi energije između različitih oblika. Njihove dvije najvažnije osobine su katalitička aktivnost i specifičnost. Katalitička aktivnost mnogih enzima ovisi o prisutnosti kofaktora. Ako enzim sadrži kofaktor, njegov polipeptidni dio naziva se apoenzimom. Prema tomu, neaktivni apoenzim i kofaktor čine potpuni, aktivni enzim (holoenzim). [19]

Katalitička aktivnost enzima odvija se na specifičnom dijelu enzima, poznatom kao aktivno mjesto, gdje se stabiliziraju prijelazna stanja reakcija. Većina enzima katalizira samo jednu ili nekoliko srodnih reakcija.

Iako su gotovo svi enzimi proteini, oni se dijele u šest glavnih skupina: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. [19, 20] Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije, dok transferaze posreduju u prijenosu funkcionalnih skupina između molekula donora i akceptora. Hidrolaze kataliziraju hidrolitičko cijepanje veza dok liaze cijepaju veze eliminacijskim reakcijama, stvaranjem dvostrukih veza ili njihovim dodatkom. Izomeraze kataliziraju geometrijske ili strukturne promjene unutar molekule dok ligaze kataliziraju spajanje dviju molekula uz hidrolizu ATP-a ili sličnim trifosfatima. [20] Enzimi svojim djelovanjem orijentiraju supstrate u optimalnu konfiguraciju za kemijsku reakciju, stabilizirajući prijelazno

stanje reakcije, što smanjuje energiju aktivacije i ubrzava reakciju i do 10^6 puta. Važno je napomenuti da enzimi ne mijenjaju termodinamičke zakone, stoga ne utječu na ravnotežu kemijske reakcije, već samo na brzinu kojom se ta ravnoteža postiže. [19, 21]

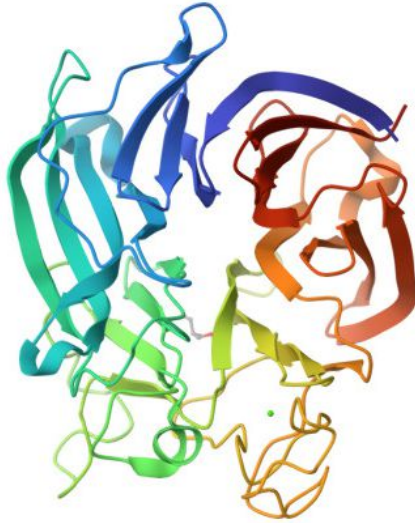
Enzimi najbolje djeluju pri fiziološkim uvjetima, s optimalnim pH od 7,2 i temperaturom od 40 °C. Izloženost temperaturama iznad 40 °C, ekstremnim vrijednosti pH, teškim metalima ili visokim koncentracijama soli može dovesti do denaturacije enzima. Njihova aktivnost može biti inhibirana vezivanjem malih molekula ili iona [22] što predstavlja ključni kontrolni mehanizam u biološkim sustavima. Inhibicija može biti reverzibilna ili ireverzibilna.

Unatoč brojnim prednostima, enzimi imaju i određene nedostatke. Nestabilni su pri visokim temperaturama i ekstremnim pH vrijednostima, a enzimske otopine gube aktivnost na sobnoj temperaturi, zbog čega se moraju čuvati na hladnom i brzo upotrijebiti. Također, enzime je često teško odvojiti iz reakcijskih smjesa, a njihova proizvodnja je skupa. [21]

2.4.1. Glukoza dehidrogenaza

Glukoza dehidrogenaza (GDH, Slika 3.) je enzim od ključnog značaja u pentoza-fosfatnom puta, gdje katalizira oksidaciju β -D-glukoze u β -D-glukono-1,5-lakton uz istovremenu redukciju koenzima NAD(P)^+ u NAD(P)H . [23]

Ovaj enzim, otkriven 1950-ih godina, prisutan je u raznim organizmima poput *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Gluconobacter suboxydans*, *Halobacterium mediterranei*, *Thermoplasma acidophilum* i *Sulfolobus solfataricus*. [24]

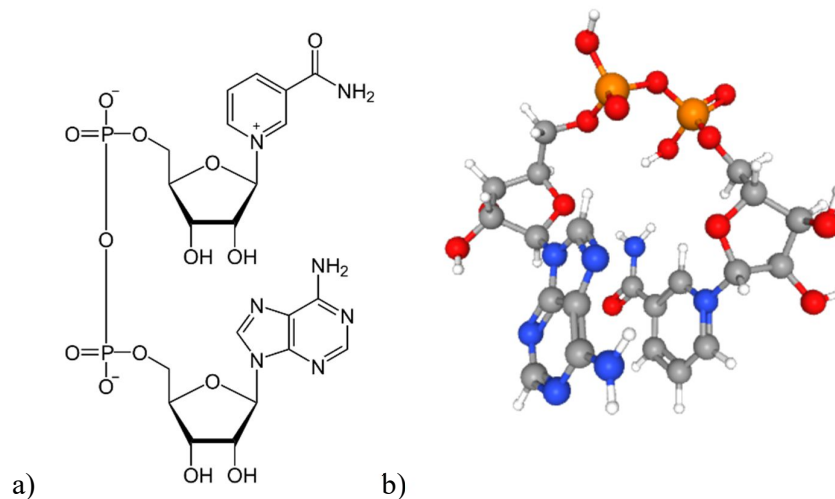


Slika 3. Molekulski model enzima glukoza dehidrogenaza određen rendgenskom kristalografijom [25]

GDH igra ključnu ulogu u održavanju metaboličke ravnoteže organizama i ima široku primjenu u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji kao katalizator u razgradnji šećera, čime omogućava proizvodnju različitih proizvoda. Osim toga, GDH je važna u sintezi acetona, proizvodnji biogoriva te je predmet istraživanja u biokemiji, enzimologiji i medicini, pridonoseći razvoju novih tehnologija.

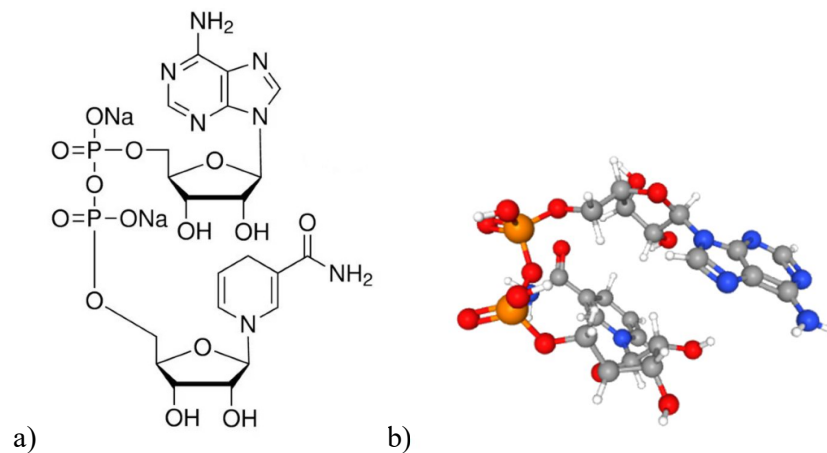
Enzimsko aktivnost GDH obično iznosi između 20.000 i 50.000 U g⁻¹, pri čemu U g⁻¹ označava broj aktivnih jedinica GDH po gramu katalizatora. GDH se na tržištu može kupiti u obliku bijelog praha topljivog u vodi. Ovaj enzim spada u oksidoreduktaze, enzime koji prenose elektrone na različite prirodne i sintetske akceptora. [26]

Strukturno, GDH je globularni protein s tercijskom strukturom koja obuhvaća beta-listove i alfa-helikse, tvoreći kompaktan sferični oblik. Aktivno mjesto enzima, gdje se veže glukoza i odvija katalitička reakcija, smješteno je se unutar pukotine ili džepa unutar proteina, prilagođenog za vezivanje glukoze i olakšavanje njezine oksidacije. [27,28] Za pravilno funkcioniranje enzima potrebna je prisutnost koenzima NAD⁺ (Slika 4.) koji se reducira u NADH tijekom katalizirane reakcije oksidacije glukoze.[29]



Slika 4. a) Kemijska struktura [30] i b) 3D prikaz molekule NAD⁺ [31]

NADH (Slika 5.), prvi puta otkriven 1903. godine, ključan je koenzim u enzimskim reakcijama, često se koristi u laboratorijima za određivanje razine glukoze, kolesterola i mokraćne kiseline u krvi. . [32]



Slika 5. a) Kemijska struktura i b) 3D prikaz molekule NADH [33]

Koenzimi poput NADH imaju ključnu ulogu u katalitičkim reakcijama, [34] djelujući kao prijenosnici elektrona. Povećana koncentracija NADH u stanicama omogućava veću

proizvodnju energije, poboljšava stanične funkcije i može potencijalno produžiti životni vijek stanica[35,36]. Zbog svoje ključne uloge u metabolizmu, NADH je poznat kao "koenzim-1". [32,37,38]

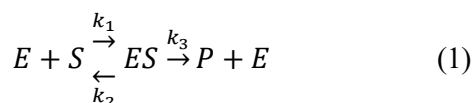
2.5. Matematički model procesa– reaktorski i kinetički modeli

U svrhu ubrzavanja dizajna procesa i njegovog jednostavnijeg vođenja sve se češće koristi matematičko modeliranje procesa. Pravilnim odabirom i postavljanjem matematičkog modela, te procjenom kinetičkih parametara moguće je predvidjeti ponašanje sustava, odrediti početne reakcijske uvjete kao i najbolji tip reaktora. Sve to značajno smanjuje rad u laboratoriju i ubrzava traženje optimalnih radnih uvjeta s ciljem povećanja produktivnosti i učinkovitosti procesa. [19,39 – 41]

Matematički modeli procesa koji se odvijaju u bioreaktorima sastoje se od kinetičkog i reaktorskog modela, odnosno bilance tvari za svaku komponentu koje ovise o tipu reaktora.

2.5.1. Kinetički model

Brzina reakcije katalizirana enzimom obično se opisuje Michaelis-Menteničinim kinetičkim izrazom [38, 39] koji se izvodi iz mehanizma reakcije prikazane Jednadžbom (1).



gdje je E enzim, S supstrat, P produkt, a ES predstavlja kompleks između enzima i supstrata, koji se u nepovratnoj reakciji raspada na konačni produkt i nepromjenjivi biokatalizator. U navedenoj jednadžbi k_1 predstavlja konstantu brzine unaprijedne reakcije nastajanja kompleksa, k_2 je konstanta brzine povratne reakcije raspada kompleksa dok k_3 predstavlja konstantu brzine reakcije nastajanja produkta.

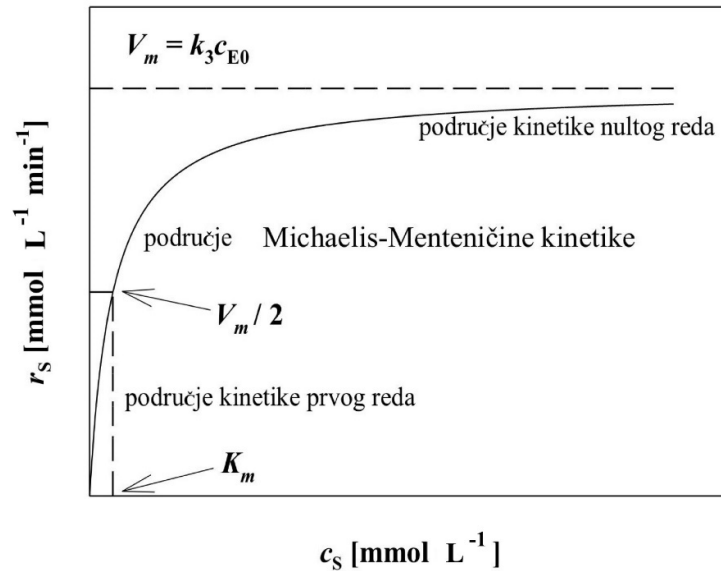
Michaelis-Menteničin kinetički izraz (Jednadžba (2)) temelji se na pretpostavci da je koncentracija enzima značajno manja u usporedbi s koncentracijom supstrata.

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m + c_S} \quad (2)$$

gdje je V_m maksimalna brzina reakcije ($\text{mmol L}^{-1} \text{min}^{-1}$), K_m je Michaelis-Menteničina konstanta (mmol L^{-1}), c_s je koncentracija supstrata (mmol L^{-1}) dok r_s predstavlja brzinu potrošnje supstrata. Parametar V_m pokazuje ovisnost o koncentraciji enzima dok parametar K_m predstavlja afinitet prema supstratu tj. što je K_m veći, manji je afinitet prema supstratu.

Michaelis-Menteničin kinetički izraz predstavlja tri različita područja brzine reakcije (Slika 6.):

1. područje kinetike prvog reda kod niskih koncentracija supstrata
2. područje Michaelis-Menteničine kinetike
3. područje kinetike nultog reda kod visokih koncentracija supstrata



Slika 6. Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis-Menteničinu kinetiku

U biokatalitičkim reakcijama može doći i do inhibicije supstratom i produktom što nije opisano u prethodnom izrazu (Jednadžba (2)). Do inhibicije dolazi kada pojedine molekule svojom prisutnošću smanjuju brzinu enzimski katalizirane reakcije. Do smanjenja brzine dolazi najčešće tako da se inhibitor veže za aktivno mjesto na enzimu. [42, 43]

Razlikujemo tri tipa inhibicije i to:

- *Kompetitivna inhibicija* (Jednadžba (3)) – molekula supstrata i inhibitor natječu se za aktivno mjesto na enzimu. Ukoliko se supstrat ne može vezati dolazi do smanjenja reakcijske brzine

$$r_S = \frac{V_m * c_S}{K_m * \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_S} \quad (3)$$

gdje je c_i [mmol L⁻¹] koncentraciju inhibitora, a K_i [mmol L⁻¹] konstanta inhibicije.

- *Nekompetitivna inhibicija* (Jednadžba (4)) – inhibitor i supstrat se mogu istovremeno vezati na različita mjesta na enzimu odnosno na nekom drugom mjestu (alosteričko mjesto) koje nije aktivno mjesto. Vezanjem dolazi do promjene konformacije enzima što negativno utječe na reakcijsku brzinu

$$r_S = \frac{V_m * c_S}{K_m + c_S * \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (4)$$

- *Antikompetitivna inhibicija* (Jednadžba (5)) – inhibitor se veže na kopleks enzim-supstrat formirajući ternarni kompleks (enzim-supstrat-inhibitor), čime inhibira enzimsku aktivnost.

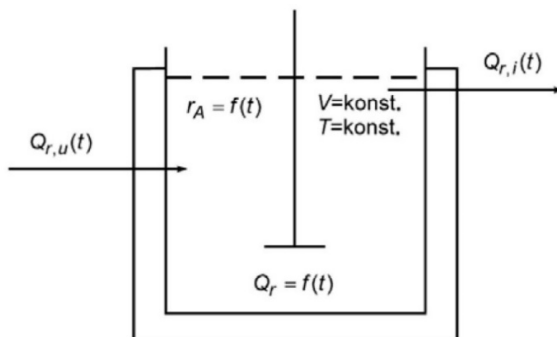
$$r_S = \frac{V_m * c_S}{K_m + c_S + \frac{c_S^2}{K_i}} \quad (5)$$

2.5.2. Reaktorski modeli

Bioreaktori su procesni uređaji u kojima se provode bioprocesi, a koriste se za proizvodnju biomase i bioprodukta pomoću mikroorganizama ili životinjskih stanica kao i za biotransformacije pomoću enzima. Postoje različiti tipovi bioreaktora, ali tri najčešća tipa su: kotlasti ili šaržni, protočno kotlasti i cijevni reaktor. Kriteriji prilikom odabira bioreaktora su: tip reakcijskog medija, tip kinetike i oblik biokatalizatora. [44]

2.5.2.1. Kotlasti reaktor

Kotlasti (šaržni) reaktor (Slika 7.) dominantno je prisutan u industriji za provedbu velikog broja reakcija koje su uglavnom u kapljevitom stanju. Ovaj tip reaktora radi u nestacionarnom stanju što znači da kemijske i toplinske promjene veličine stanja ovise o vremenu. [45]



Slika 7. Kotlasti reaktor [45]

Kada se reakcija provodi u kotlastom reaktoru, sve komponente reakcijske smjese se dodaju u reaktor zajedno na početku procesa uključujući i biokatalizator. Za vrijeme provedbe reakcije nema izmjene tvari s okolinom. Nakon završetka reakcije bioreaktor se otvara, a reakcijska smjesa se uklanja.

Uz pretpostavku idealnog miješanja, konstantnog volumena i konstantne gustoće, za kotlasti reaktor može se postaviti sljedeća bilanca tvari (Jednadžba (6)). [43, 45]

$$\frac{dc_S}{dt} = r_S \quad (6)$$

gdje je t vrijeme [min], a c_S koncentracija komponente S [mmol L⁻¹].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

U ovom radu provedena oksidacije glukoze kataliziran enzimom glukoza dehidrogenaza (GDH) iz *Pseudomonas* sp. uz koenzim NAD⁺ u kotlastom reaktoru. U sklopu istraživanja, posebna pažnja posvećena je karakterizaciji enzima, odnosno određivanju optimalnih uvjeta reakcije (temperatura, pH i odabir pufera), te analizi reakcijske kinetike.

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Za provedbu eksperimenta korištene su sljedeće kemikalije:

- coomassie brillilant blue G-250, Fluka, Švicarska
- enzim glukoza dehidrogenaza iz *Pseudomonas* sp. (S.A. = 200 U mg⁻¹), Sigma-Aldrich, Austrija
- etanol, Gram-Mol, Hrvatska
- glukono- δ -lakton, Sigma-Aldrich, Austrija
- glukonska kiselina, Sigma-Aldrich, Austrija
- glukoza PAP test, Dijagnostika, Hrvatska
- glukoza, Fischer Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo
- goveđi serum albumin (BSA), Sigma-Aldrich, Austrija
- klorovodična kiselina, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- magnezijev klorid, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- NAD⁺, Sigma-Aldrich, Austrija
- NADH, Sigma-Aldrich, Austrija
- natrijev fosfat monohidrat, Kemika, Hrvatska
- natrijev fosfat pentahidrat, Kemika, Hrvatska
- natrijev hidroksid, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- natrijev klorid, Gram-Mol d.o.o., Hrvatska
- ortofosforna kiselina, VWR Chemicals, SAD
- TRIS(hidroksimetil)aminometan (TRIS), Sigma-Aldrich, Austrija

3.1.2. Aparatura

Za provedbu eksperimenata korištena je sljedeća aparatura:

- analitička vaga, Uni Bloc, max. 120 g, min. 10 mg, Shimadzu, Filipini
- homogenizator, RS-VA10, Phoenix Instrument, SAD
- magnetska mješalica, Rotamix S-10, Tehnica, Slovenija
- pH metar, Lab 860, Schott Instruments, Njemačka
- spektrofotometar, UV-1601, Shimadzu, Japan
- termoblok Dri-Block DB100/2, Techne, Ujedinjeno Kraljevstvo
- vaga, Kern EW, max. 1500 g, min. 0,5 g, Kern, Njemačka
- vodena kupelj, Thermomix 1420, Braun, Njemačka

3.2. Metode

3.2.1. Priprema reagensa i pufera

- **Bradfordov reagens**

Bradfordov reagens pripremljen je otapanjem 100 mg bojila coomassie brilliant blue G-250 u smjesi 50 mL etanola i 100 mL ortofosforne kiseline te dopunjen ultračistom vodom do volumena od 1 L. Tako dobivena otopina zatim je filtrirana, a reagens je čuvan pri temperaturi od $T = 4^{\circ}\text{C}$ u tamnoj boci.

- **Priprema pufera**

20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7 i pH 8,84 pripremljen je otapanjem 0,6057 g TRIS-a u 250 mL ultračiste vode. Željena pH-vrijednost podešena je dodatkom otopine klorovodične kiseline koncentracije 1 mol L⁻¹.

20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7 s NaCl i MgCl₂ pripremljen je otapanjem 0,0012 g NaCl i 0,024 g MgCl₂ u 10 mL 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl puferu pH 7.

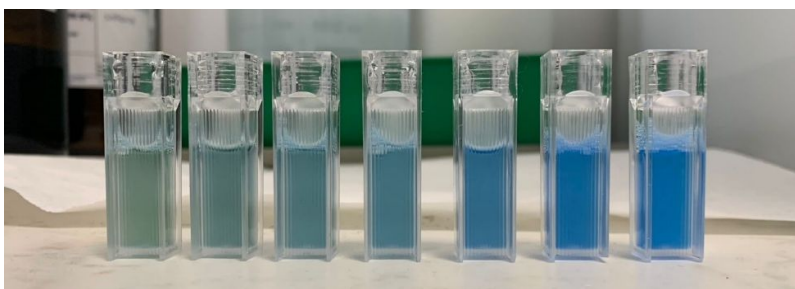
50 mmol L⁻¹ Natrij-fosfatni pufer pH 7 pripremljen je otapanjem 0,63 g natrij-fosfata pentahidrata (Na₃PO₄ · 5H₂O) i 0,25 g natrij-fosfata monohidrata (NaH₂PO₄ · H₂O) u 100 mL ultračiste vode.

50 mmol L⁻¹ Natrij-fosfatni pufer pH 7 s NaCl i MgCl₂ pripremljen je otapanjem 0,0012 g NaCl i 0,024 g MgCl₂ u 10 mL 50 mmol L⁻¹ Natrij-fosfatnom puferu pH 7.

3.2.2. Određivanje koncentracije proteina lineariziranim Bradfordovim testom

Koncentracija enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. određena je korištenjem lineariziranog Bradfordovog testa.[42] Test se temelji na vezanju boje coomassie brilliant blue G-250 sadržane u reagensu, a zbog svoje jednostavnosti i brzine često se koristi pri određivanju koncentracije proteina.

Na početku, pripremljena je otopina goveđeg serumskog albumina (BSA) koncentracije $\gamma = 1 \text{ mg L}^{-1}$, što odgovara apsorbanciji od 0,66 pri $\lambda = 280 \text{ nm}$ u kvarcnoj kiveti. Tako dobivena otopina razrijeđena je u rasponu koncentracija 0 – 100 mg L⁻¹. U plastičnu kivetu dodano je 500 μL Bradfordova reagensa i 500 μL uzorka (Slika 8.). Tako dobivena otopina kratko je homogenizirana. Nakon 5 min spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija dobivenog uzoraka na UV-VIS spektrofotometru pri valnim duljinama od $\lambda = 595 \text{ nm}$ i $\lambda = 450 \text{ nm}$. Na temelju izmjerenih vrijednosti i poznatih koncentracija izrađen je baždarni dijagram (Prilog 1). Linearno područje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina u baždarnom dijagramu postignuto je za koncentracije 0 – 50 mg L⁻¹. Baždarni dijagram korišten je za određivanje nepoznate koncentracije GDH u uzorcima.



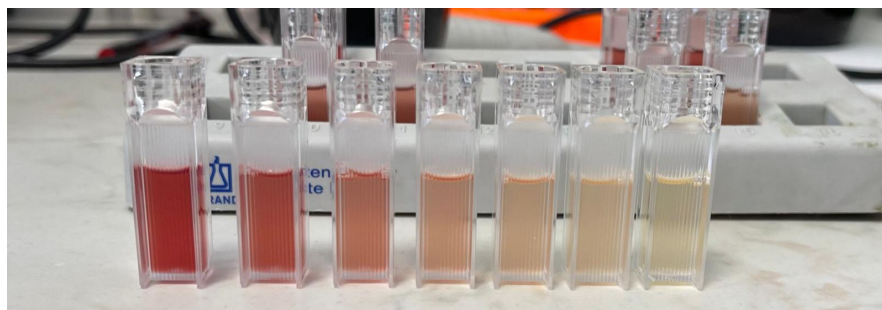
Slika 8. Kivete s uzorcima neposredno pred mjerenje apsorbancije tijekom izrade baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije proteina

3.2.3. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije glukoze

Koncentracija glukoze u uzorcima određena je pomoću enzimske GOD-PAP metode u kojoj enzim glukoza oksidaza katalizira oksidaciju glukoze i pritom oslobađa vodikov peroksid. U

sljedećem koraku enzim reagira s 4-hidroksibenzoatom i 4-amino-fenazonom u prisutnosti peroksidaze stvarajući crveni kinonimin čiji je intenzitet obojenja proporcionalan količini glukoze prisutne u samom uzorku (Slika 9.). Nepoznata koncentracija glukoze u uzorku određivana je spektrofotometrijski pri valnoj duljini od $\lambda = 500$ nm uz pomoć baždarnog dijagrama.

Za izradu baždarnog dijagrama korištena je standardna otopina glukoze koncentracije 5,55 mmol/L koja je razrijeđena na šest otopina koncentracija u rasponu 0,17 – 5,55 mmol/L. Mjerenje se provodilo na način da se u prazne Eppendorf vijalice dodalo 10 μ L uzorka i 1 mL radnog reagensa (smjesa R1: 4-aminoantipirina, glukoze oksidaze, peroksidaze i R2: fosfatnog pufera pH 7,5, fenola, detergenta i stabilizatora). Smjesa je potom homogenizirana te ostavljena na $T = 25$ °C tijekom 20 min. Nakon točno 20 min, spektrofotometrijski je izmjerena apsorbancija na valnoj duljini od $\lambda = 500$ nm. Svako mjerenje provedeno je u tri paralelne probe. Slijepa proba pripremljena je na isti način, pri čemu je umjesto 10 μ L uzorka dodana ista količina ultračiste vode. Dobiveni baždarni dijagram predstavlja ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji glukoze (Prilog 2).



Slika 9. Kivete s uzorcima neposredno pred mjerenje apsorbancije tijekom izrade baždarnog dijagrama za određivanje koncentracije glukoze

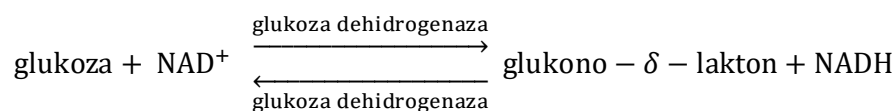
3.2.4. Spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije NADH

Koncentracija NADH u uzorcima određena mjerenjem apsorbancije na $\lambda = 340$ nm. Prvo su pripremljene otopine različitih koncentracija NADH u rasponu od 0,018 do 0,3 mol L⁻¹. Pri valnoj duljini $\lambda = 340$ nm, što je apsorpcijski maksimum NADH, uzorcima je izmjerena apsorbancija u kvarcnim kivetama. Na temelju dobivenih rezultata apsorbancije i poznatih

koncentracija izrađen je baždarni dijagram (Prilog 3). Nepoznate koncentracije NADH u uzorcima određene su korištenjem dobivenog baždarnog dijagrama.

3.2.5. Mjerenje aktivnosti enzima glukoza dehidrogenaza iz *Pseudomonas* sp.

Aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. mjerena je spektrofotometrijski [43], na temelju reakcije prikazane na Slici 10.



Slika 10. Jednadžba kemijske reakcije oksidacije glukoze katalizirano enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp.

U reakciji oksidacije glukoze katalizirane enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. nastaju NADH i glukono- δ -lakton. Koncentracija nastalog NADH u testu proporcionalna je koncentraciji glukoze, pa se mjerenjem brzine nastanka NADH mjeri brzina reakcije, odnosno aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. U Tablici 3. navedene su otopine kako i sastav testa za provedbu mjerenja aktivnosti enzima GDH iz *Pseudomonas* sp.

Tablica 3. Sastav testa za određivanje aktivnosti enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. u reakciji oksidacije glukoze

| Otopina | V [μL] |
|--|--------|
| 20 mmol L ⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7 | 700 μL |
| Glukoza (c = 0,2 mol L ⁻¹) | 100 μL |
| NAD ⁺ (c = 0,022 mmol L ⁻¹) | 100 μL |
| Enzim GDH iz <i>Pseudomonas</i> sp. (γ _{GDH} = 0,001mg mL ⁻¹) | 100 μL |

Za test je potrebno u kvarcnu kivetu otpipetirati 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufera pH 7, otopinu glukozu i NAD⁺ u volumenima prikazanim u Tablici 3. Kivete su potom termostatirane u vodenoj kupelji na $T = 40$ °C tijekom 10 min. U smjesu je tada dodan enzim GDH iz *Pseudomonas* sp., a promjena apsorbancije u vremenskom razdoblju od 60 s praćena je spektrofotometrijski pri valnoj duljini $\lambda = 340$ nm. Iz promjene apsorbancije u vremenu izračunate su volumna (Jednadžba (8)) i specifična (Jednadžba (9)) aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp..

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon_{340} \cdot d \cdot V_{GDH}} \cdot \frac{dA}{dt} \quad (8)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_{GDH}} \quad (9)$$

gdje je V.A. volumna aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. [U mL⁻¹], V_r ukupni volumen uzorka [mL], V_E volumen enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. dodanog u uzorak [mL], d je promjer kivete [cm], ε_{340} je molarni ekstinkcijski koeficijent NADH [6,22 mL $\mu\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$], dA/dt je promjena apsorbancije u vremenu [min^{-1}], S.A. specifična aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. [U mg⁻¹], a γ_{GDH} koncentracija enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. [mg mL⁻¹].

Volumna aktivnost je izražena u međunarodnoj jedinici enzimatske aktivnosti U po jedinici volumena pri čemu je 1 U = 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$, odnosno 1 U enzima će oksidirati 1 μmol glukoze u glukono- δ -lakton po minuti pri pH 7 i $T = 40$ °C u prisutnosti NAD⁺.

3.2.6. Ispitivanje utjecaja pufera, pH i temperature na aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp.

S obzirom da aktivnost enzima ovisi o temperaturi te pH, ispitana je aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. pri temperaturama 25 °C do 60 °C u temperaturnom intervalu 5°C. Utjecaj pH na aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. ispitan je u rasponu od 1,44 do 10,5. S obzirom da se radi o širokom intervalu pH-vrijednosti pripremljena su dva različita pufera 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer i 50 mmol L⁻¹ natrij-fosfatni pufer. Željene pH vrijednosti podešene su dodatkom 1 mol L⁻¹ HCl. Isto tako, sastav pufera može utjecati na aktivnost enzima te je ispitan

i utjecaj različitih pufera na aktivnost enzima. Ispitani su sljedeći puferi: 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7 i pH 8,84, 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7 s NaCl i MgCl₂, 50 mmol L⁻¹ Natrij-fosfatni pufer pH 7 i 50 mmol L⁻¹ Natrij-fosfatni pufer pH 7 s NaCl i MgCl₂.

3.2.7. Kinetička karakterizacija enzima glukoza dehidrogenaza

Kinetika GDH iz *Pseudomonas* sp. ispitana je u reakciji oksidacije glukoze (Slika 10.), a kako je reakcija povratna ispitana je i redukcija glukono- δ -laktona. Ispitivanje kinetike provedeno je na $T = 40$ °C spektrofotometrijskim praćenjem promjene koncentracije NADH pri valnoj duljini $\lambda = 340$ nm. Otopine potrebne za mjerenje kinetike GDH iz *Pseudomonas* sp. bile su: 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7, $c_{\text{glukoza}} = 100$ mmol L⁻¹, $c_{\text{NAD}^+} = 0,022$ mmol L⁻¹, $c_{\text{glukono-}\delta\text{-laktone}} = 100$ mmol L⁻¹, $c_{\text{NADH}} = 0,025$ mmol L⁻¹ te otopina enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. $\gamma_{\text{GDH}} = 0,001$ mg mL⁻¹. Uz mjerenje utjecaja koncentracije supstrata, izmjerena je i inhibicija produktom. Sastav testa za određivanje kinetike prikazan je u Tablici 4.

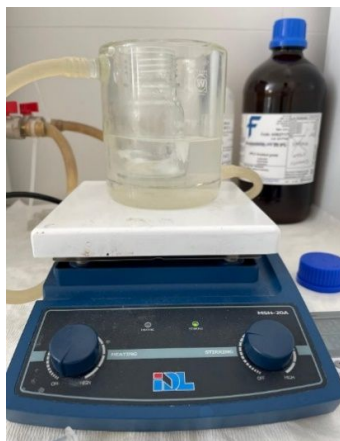
Tablica 4. Sastav testa za mjerenje kinetike enzima GDH iz *Pseudomonas* sp.

| otopina | Kinetika oksidacije glukoze | | | Kinetika redukcije glukono- δ -laktona | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|--|---|------------------------|--|
| | Ovisnost aktivnosti o konc. supstrat | | Ispitivanje inhibicije V [μ L] | Ovisnost aktivnosti o konc. supstrat | | Ispitivanje inhibicije V [μ L] |
| | Glukoza V [μ L] | NAD ⁺ V [μ L] | | glukono- δ -laktone V [μ L] | NADH V [μ L] | |
| pufer | 700-x | 700-x | 600-x | 700-x | 700-x | 600-x |
| glukoza | x | 100 | 100 | - | - | - |
| glukono- δ -laktone | - | - | - | x | 100 | 100 |
| NAD ⁺ | 100 | x | 100 | - | - | - |
| NADH | - | - | - | 100 | x | 100 |
| Komponenta (ispitivanje inhibicije) | - | - | x | - | - | x |
| enzim GDH | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Na temelju dobivenih nagiba pravaca, izračunata je volumna odnosno specifična aktivnost enzima prema Jednadžbama (8) i (9).

3.3. Provedba reakcije oksidacije glukoze katalizirane enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. u kotlastom reaktoru

Oksidacija glukoze katalizirana enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. provedena je u kotlastom reaktoru (Slika 11., $V = 100$ mL) pri 40 °C, pH 7 i 600 min^{-1} u 20 mmol L^{-1} TRIS-HCl puferu. Ispitane su dvije početne koncentracije supstrata i to $c_{\text{glukoza}} = 5$ mmol L^{-1} i $c_{\text{NAD}^+} = 1,1$ mmol L^{-1} te $c_{\text{glukoza}} = 0,5$ mmol L^{-1} i $c_{\text{NAD}^+} = 1,1$ mmol L^{-1} . U oba eksperimenta koncentracija enzim GDH iz *Pseudomonas* sp. bila je $\gamma_{\text{GDH}} = 0,001$ mg mL^{-1} . Reakcija je trajala 90 min, a u definiranim vremenskim intervalima iz reaktora su uzimani uzorci. Svaki uzorak odmah je filtriran koristeći membranski filter (Filter Chromafil Xtra PA-20/25; $0,2$ μm , 25 mm, Macherey-Nagel GmbH CoKG, Njemačka) kako bi se zaustavila reakcija. U svakom uzorku analizirana je koncentracija glukoze i NADH. Sva mjerenja rađena su u tri paralele.



Slika 11. Provedba reakcije oksidacije glukoze katalizirane enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. u kotlastom reaktoru

3.4. Obrada podataka

Eksperimentalno dobiveni podaci obrađeni su u programskom jeziku SCIENTIST (SCIENTIST handbook). Parametri su procijenjeni nelinearnom regresijom pomoću metode najmanjih kvadrata. Cilj ove metode je pronaći minimalni zbroj kvadrata pogreške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih korištenjem modela. Temeljem izračunate sume kvadrata pogreške, parametri se proračunavaju do postignuća minimalne pogreške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih vrijednosti korištenjem SCIENTIST-a. Korištenjem napisanog modela i procijenjenih parametara provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi modela. Za rješavanje diferencijalnih jednadžbi SCIENTIST koristi

numeričke metode. Maksimalna brzina reakcije, Michaelis-Menteničina konstanta i konstanta inhibicije procijenjeni su iz ovisnosti početne brzine o koncentraciji odnosno kinetičkim mjerenjem. Ovi parametri nadalje su korišteni za izradu simulacije pomoću modela, to jest predviđanje koncentracija reaktanata i produkata.

4. KINETIČKI I REAKTORSKI MODEL OKSIDACIJE GLUKOZE U KOTLASTOM REAKTORU

Oksidacija glukoze pomoću enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. provedena je u kotlastom reaktoru te je za taj proces postavljen matematički model koji se sastoji od kinetičkih i reaktorskih modela. Kinetički model razvijen je na temelju reakcije (Slika 10.) uzimajući u obzir s spontanu hidrolizu glukono- δ -laktona u glukonsku kiselinu, eksperimentalnih podataka i procijenjenih kinetičkih parametara. Kinetika oksidacije glukoze katalizirane GDH iz *Pseudomonas* sp. opisana je dvosupstratnom Michaelis–Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom i kompetitivnom inhibicijom produktom (Jednadžba (10) i Jednadžba (11)).

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_{\text{glukoza}} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left(K_m^{\text{NAD}^+} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i^{\text{NADH}}} \right) + c_{\text{NAD}^+} \right) \cdot \left(K_m^{\text{Glukoza}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}}{K_{i1}^{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{Glukonska kiselina}}}{K_{i1}^{\text{Glukonska kiselina}}} \right) + \frac{c_{\text{Glukoza}}^2}{K_{i1}^{\text{Glukoza}}} + c_{\text{Glukoza}} \right)}$$

(10)

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot c_{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{NADH}}}{K_m^{\text{NADH}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NAD}^+}}{K_i^{\text{NAD}^+}} \right) + c_{\text{NADH}} \cdot \left(K_m^{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{Glukoza}}}{K_{i2}^{\text{Glukoza}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{Glukonska kiselina}}}{K_{i2}^{\text{Glukonska kiselina}}} \right) + \left(\frac{c_{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}^2}{K_{i2}^{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}} + c_{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}} \right)}$$

(11)

Reaktorski model za kotlasti reaktor sastoji se od bilanci za glukozu (Jednadžba (12)), glukono- δ -laktan (Jednadžba (13)), NAD^+ (Jednadžba (14)), NADH (Jednadžba (15)) i glukonsku kiselinu (Jednadžba (16)). U Jednadžbama (13) i (15) k predstavlja konstantu brzine hidrolize glukono- δ -laktana u glukonsku kiselinu, a n red reakcije. Oba parametra preuzeta su iz literature. [46]

$$\frac{dc_{\text{Glukoza}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (12)$$

$$\frac{dc_{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}}{dt} = r_1 - r_2 - k \cdot c_{\text{glukono-}\delta\text{-laktan}}^n \quad (13)$$

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (14)$$

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (15)$$

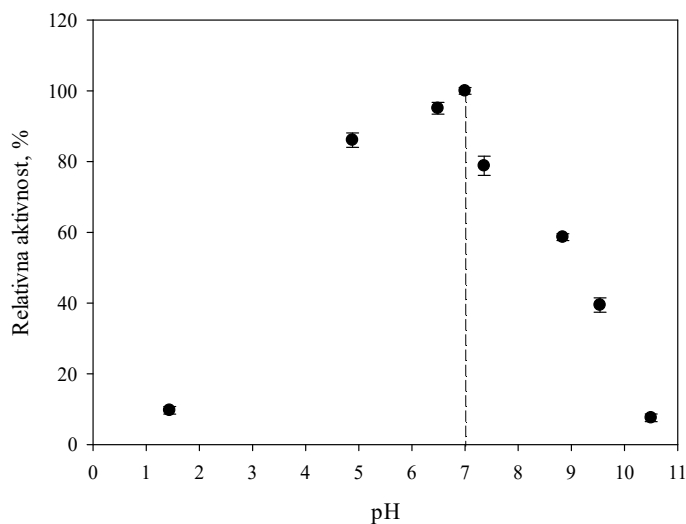
$$\frac{dc_{\text{glukonska kiselina}}}{dt} = k \cdot c_{\text{glukono-}\delta\text{-lakton}}^n \quad (16)$$

5. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je istražiti proces oksidacije glukoze kataliziran enzimom glukoza dehidrogenaza (GDH) iz *Pseudomonas* sp. uz koenzim NAD⁺ u kotlastom reaktoru. U sklopu istraživanja, posebna pažnja posvećena je karakterizaciji enzima, odnosno određivanju optimalnih uvjeta reakcije (temperatura, pH i odabir pufera), te analizi reakcijske kinetike. Kroz procjenu kinetičkih parametara i razvoj reaktorskog modela, cilj je bio uspostaviti temelj za učinkovitiju proizvodnju biovodika.

5.1. Utjecaj pH na aktivnost enzima

Kako bi se osigurali najbolji reakcijski uvjeti za provedbu procesa, određena je optimalan pH. Za određivanje optimalne vrijednosti pH za reakciju oksidacije glukoze katalizirane enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. provedeno je ispitivanje utjecaja pH u području od 1,44 do 10,5. korištenjem 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl i 50 mmol L⁻¹ natrij-fosfatnog pufera. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 12.

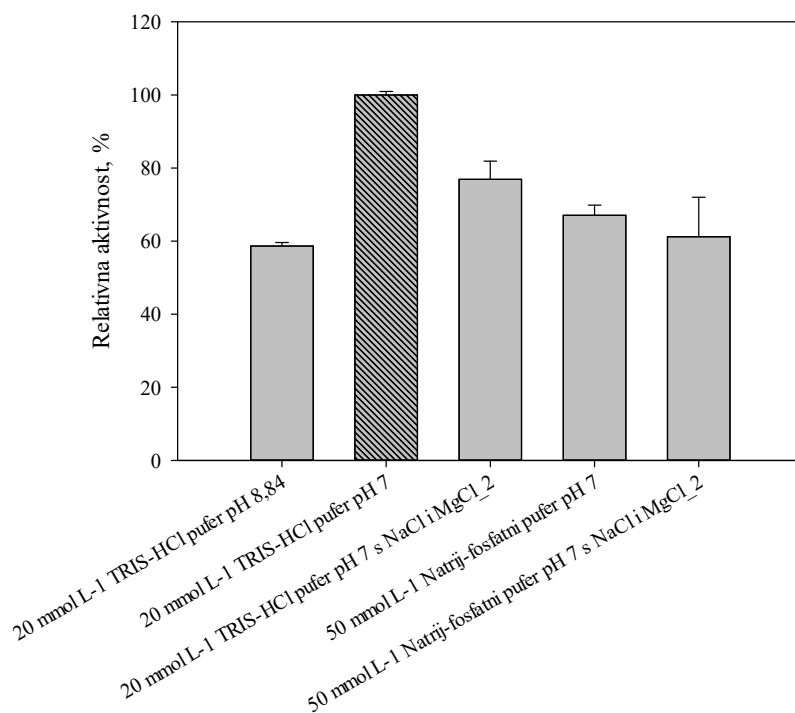


Slika 12. Ovisnost aktivnosti enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. o pH

Kao što je vidljivo, najveća aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. postignuta je pri pH 7. Dobiveni rezultati sukladni su rezultatima dobivenima u istraživanju Woodward i sur.

[47]. S obzirom da je kod pH 7 postignuta maksimalna aktivnost enzima u daljnjem tijeku istraživanja mjerenja su provođena kod pH vrijednosti 7.

Osim pH optimuma, u literaturi [48]. se navodi kako sastav pufera može različito djelovati na aktivnost aktivnosti enzima GDH. Zbog toga su u ovom istraživanju ispitana četiri različita pufera, uključujući 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7 i pH 8,84, 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7 s NaCl i MgCl₂, 50 mmol L⁻¹ Natrij-fosfatni pufer pH 7 i 50 mmol L⁻¹ Natrij-fosfatni pufer pH 7 s NaCl i MgCl₂. Obradom eksperimentalnih rezultata utvrđena je najpovoljniji pufer 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7 (Slika 13.).

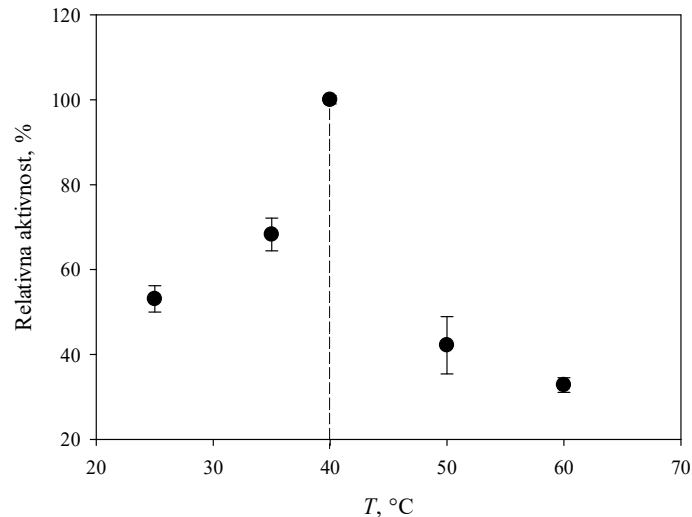


Slika 13. Utjecaj sastava pufera na aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp.

5.2. Utjecaj temperature na aktivnost enzima

Na temelju eksperimentalnih podataka promjene apsorbancije s vremenom pri različitim temperaturama u rasponu od 25 do 60 °C [49, 50] određena je aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. (Slika 14). Kao što je vidljivo, pri temperaturi od $T = 40$ °C postignuta je

maksimalna aktivnost enzima, te je ta temperatura uzima kao optimalna i sva daljnja mjerenja provedena su na toj temperaturi.



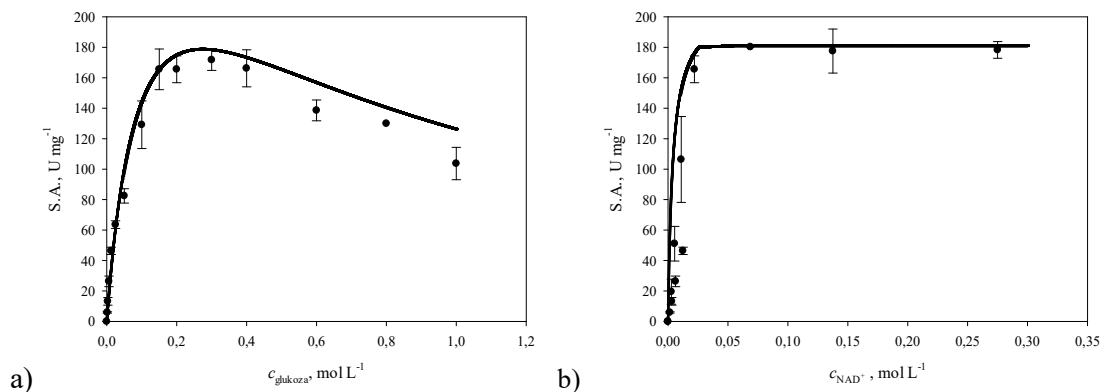
Slika 14. Utjecaj temperature na aktivnost enzima GDH iz *Pseudomonas* sp.

5.3. Kinetička karakterizacija enzima glukoza dehidrogenaza iz *Pseudomonas* sp.

Nakon što su provedena ispitivanja utjecaja temperature i pH-vrijednosti na aktivnost enzima te nakon što je odabran najbolji pufer, provedena je kinetička karakterizacija enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. tj. ispitan je utjecaj koncentracije reaktanata i produkata na brzinu reakcije. Kinetika GDH iz *Pseudomonas* sp. u reakciji oksidacije glukoze mjerena je metodom početnih reakcijskih brzina.

U povratnoj reakciji, kao što je biokatalitička oksidacija glukoze, izmjerena je kinetika unaprijedne (oksidacija glukoze) i povratne reakcije (redukcija glukono- δ -laktona).

Na Slici 15. prikazana je ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, glukoze i NAD^+ . Uvjeti pri kojima je provedena kinetička karakterizacija enzima GDH iz *Pseudomonas* sp. opisani su u poglavlju 3.2.6.

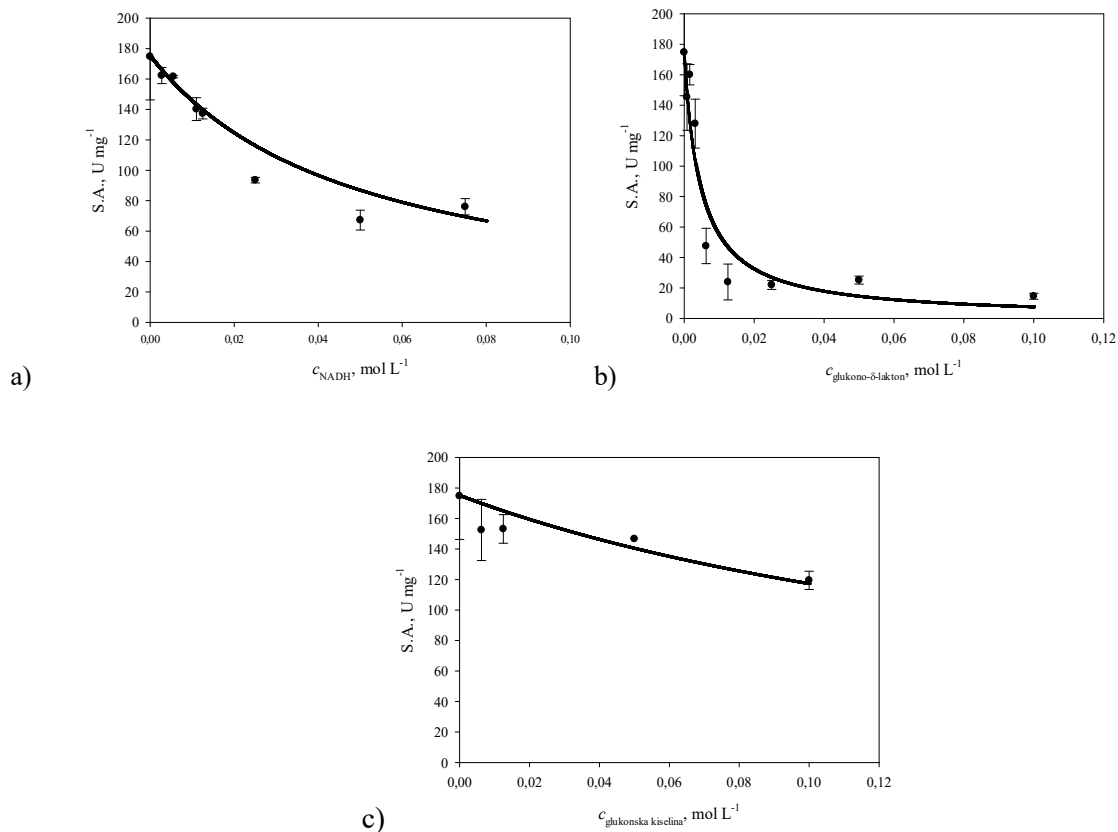


Slika 15. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije glukoze enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. o koncentraciji a) glukoze i b) NAD⁺

Ispitivanjem utjecaja koncentracije glukoze na početnu brzinu reakcije oksidacije glukoze uz GDH iz *Pseudomonas* sp. (Slika 15a.) vidljivo je da je reakcija inhibirana supstratom.

Ispitan je također i utjecaj produkata glukono- δ -laktona i NADH, kao i utjecaj glukonske kiseline na početnu brzinu reakcije. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 16.

Kao što je vidljivo, oba produkta NADH (Slika 16a.) i glukono- δ -laktan (Slika 16b.) inhibiraju ovu reakciju. U literaturi je također opisano da glukono- δ -laktan spontano hidrolizira u glukonsku kiselinu te je ispitan i njezin utjecaj na početnu reakcijsku brzinu. [51] Utvrđeno je da i povećanje koncentracije glukonske kiseline (Slika 16c.) negativno djeluje na početnu reakcijsku brzinu oksidacije glukoze. [18]



Slika 16. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije glukoze enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. o koncentraciji a) NADH, b) glukono- δ -laktone i c) glukonske kiseline

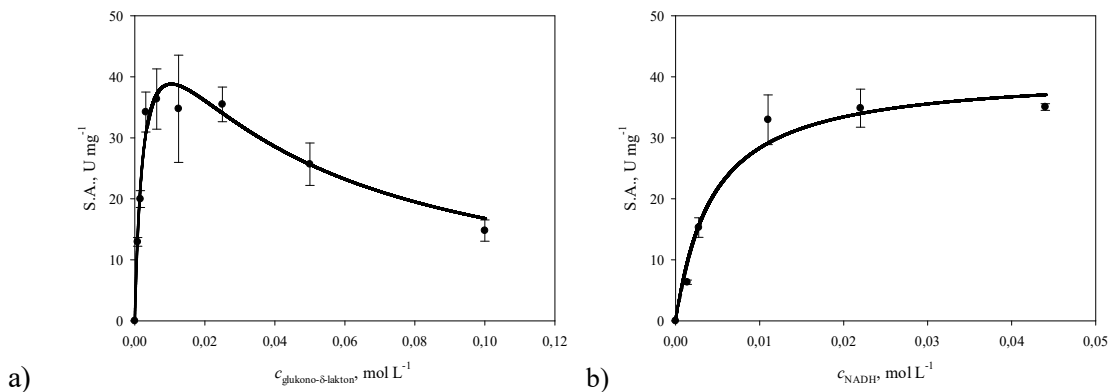
Na temelju dobivenih rezultata, kinetika oksidacije glukoze katalizirane GDH iz *Pseudomonas* sp. opisana je dvosupstratnom Michaelis–Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom i kompetitivnom inhibicijom produktom.

Pomoću računalnog programa SCIENTIST procijenjeni su parametri Michaelis–Menteničinog kinetičkog modela, kao i konstante inhibicije. Procijenjeni parametri prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Procijenjeni kinetički parametri u reakciji oksidacije glukoze katalizirane enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp.

| Parametar | Vrijednost |
|--|-----------------|
| V_{m1} [U mg ⁻¹] | 373,64 ± 95,41 |
| K_m^{Glukoza} [mmol L ⁻¹] | 103,14 ± 54,62 |
| $K_m^{\text{NAD}^+}$ [mmol L ⁻¹] | 0,0042 ± 0,0012 |
| K_{i1}^{Glukoza} [mmol L ⁻¹] | 723,97 ± 423,21 |
| $K_{i1}^{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}$ [mmol L ⁻¹] | 1,31 ± 0,29 |
| K_i^{NADH} [mmol L ⁻¹] | 0,0078 ± 0,0011 |
| $K_{i1}^{\text{Glukonska kiselina}}$ [mmol L ⁻¹] | 58,40 ± 22,27 |

Prilikom ispitivanja povratne reakcije (redukcija glukono- δ -laktana) provedeno je mjerenje ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentraciji glukono- δ -laktana (Slika 17a.) i NADH (Slika 17b.).

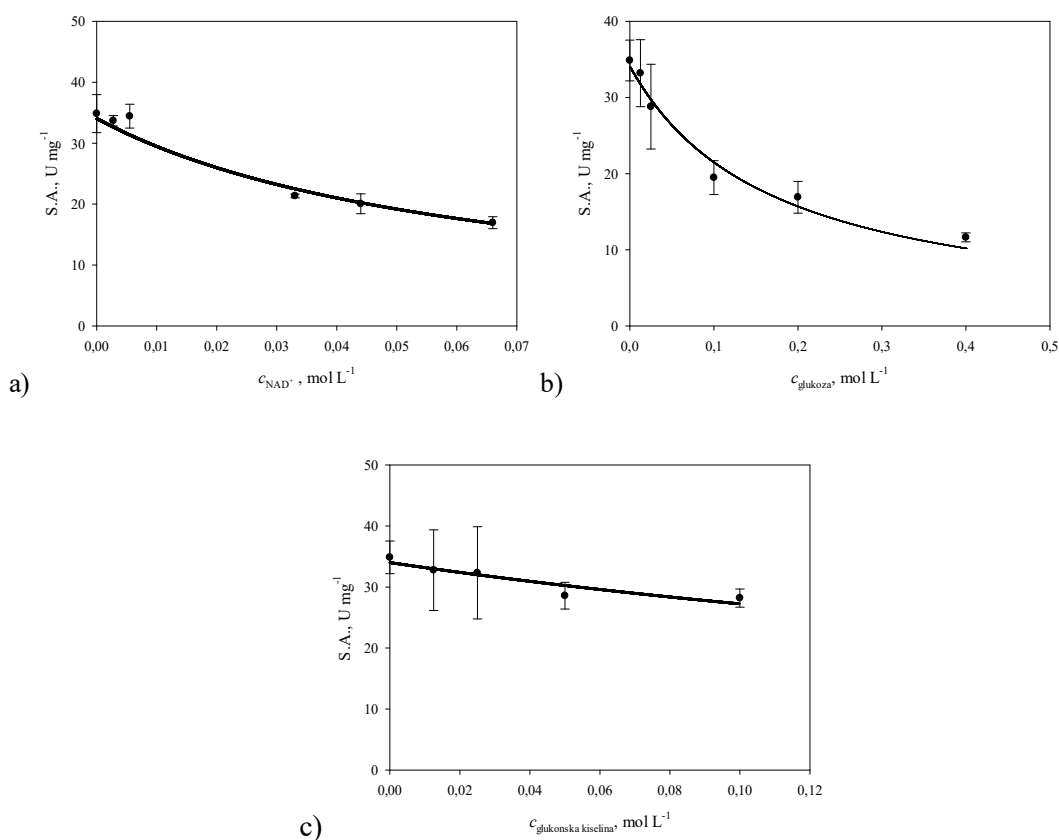


Slika 17. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji redukcije glukono- δ -laktana enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. o koncentraciji a) glukono- δ -laktana i b) NADH

Ispitivanjem utjecaja koncentracije glukono- δ -laktana na početnu brzinu reakcije redukcije glukono- δ -laktana uz GDH iz *Pseudomonas* sp. (Slika 17a.) vidljivo da je reakcija inhibirana supstratom. Isto tako može se vidjeti da je maksimalna aktivnost za reakciju redukcije glukono- δ -laktana oko četiri puta manja od iste za oksidaciju glukoze (Slika 15a.).

Ispitan je također i utjecaj produkata glukoze i NAD^+ , kao i utjecaj glukonske kiseline na početnu brzinu reakcije. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 18.

Kao što je vidljivo, oba produkta NAD^+ (Slika 18a.) i glukoza (Slika 18b.) inhibiraju ovu reakciju. Utvrđeno je da i povećanje koncentracije glukonske kiseline (Slika 18c.) negativno djeluje na početnu reakcijsku brzinu redukcije glukono- δ -laktona.



Slika 18. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji redukcije glukono- δ -laktona enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. o koncentraciji a) NAD^+ , b) glukoze i c) glukonske kiseline

Na temelju dobivenih rezultata, kinetika redukcije glukono- δ -laktona katalizirane GDH iz *Pseudomonas* sp. opisana je dvosupstratnom Michaelis–Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom i kompetitivnom inhibicijom produktom.

Pomoću računalnog programa SCIENTIST procijenjeni su parametri Michaelis–Menteničinog kinetičkog modela, kao i konstante inhibicije. Procijenjeni parametri prikazani su u Tablici 6.

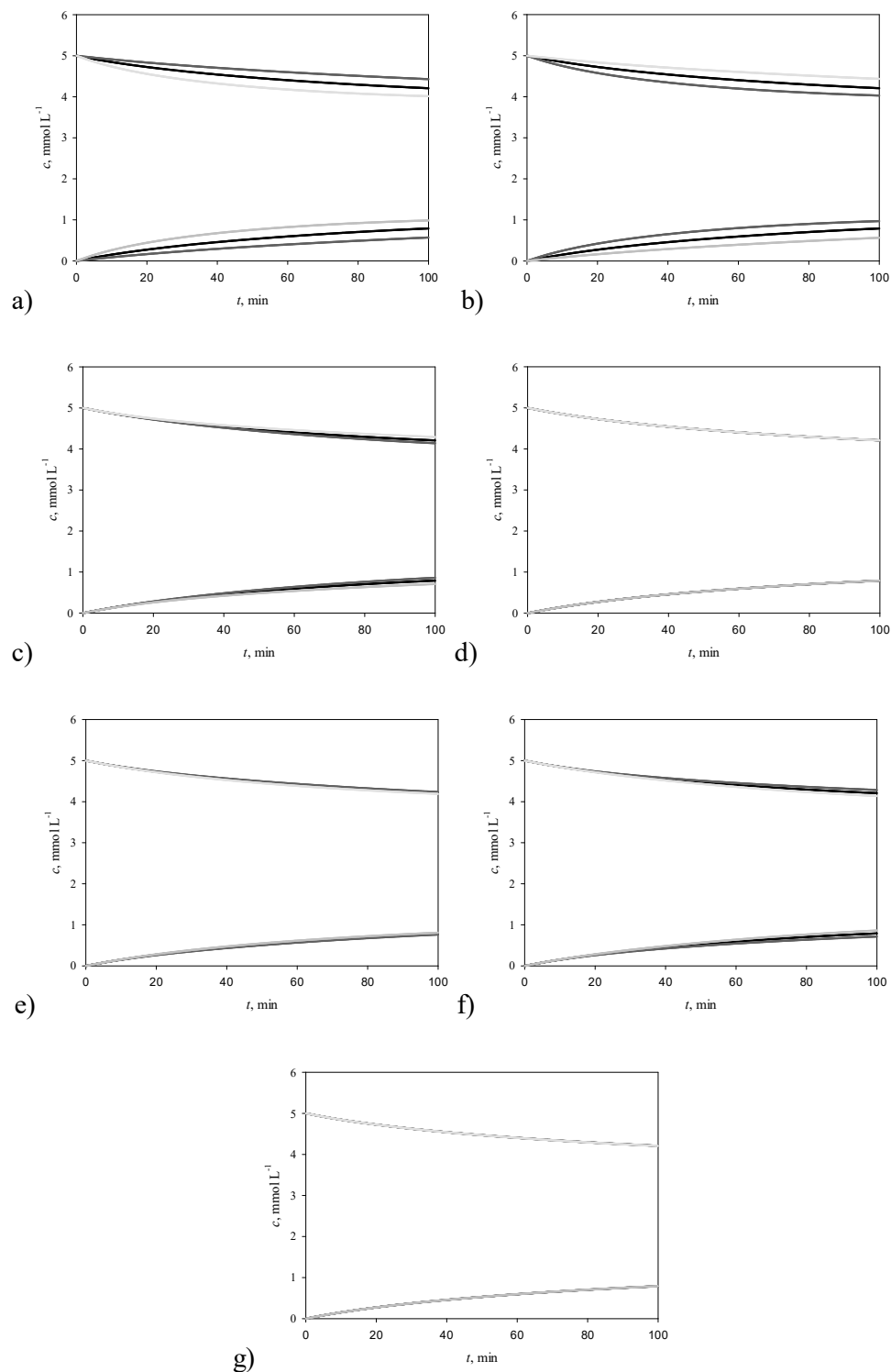
Tablica 6. Procijenjeni kinetički parametri u reakciji redukcije glukono- δ -laktona katalizirane enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp.

| Parametar | Vrijednost |
|--|-----------------|
| V_{m2} [U mg ⁻¹] | 70,02 ± 9,76 |
| $K_m^{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}$ [mmol L ⁻¹] | 2,60 ± 0,75 |
| K_m^{NADH} [mmol L ⁻¹] | 0,0044 ± 0,0012 |
| $K_{i2}^{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}$ [mmol L ⁻¹] | 40,65 ± 12,50 |
| K_{i2}^{Glukoza} [mmol L ⁻¹] | 10,35 ± 3,06 |
| $K_i^{\text{NAD}^+}$ [mmol L ⁻¹] | 0,0107 ± 0,0013 |
| $K_{i2}^{\text{Glukonska kiselina}}$ [mmol L ⁻¹] | 24,37 ± 3,89 |

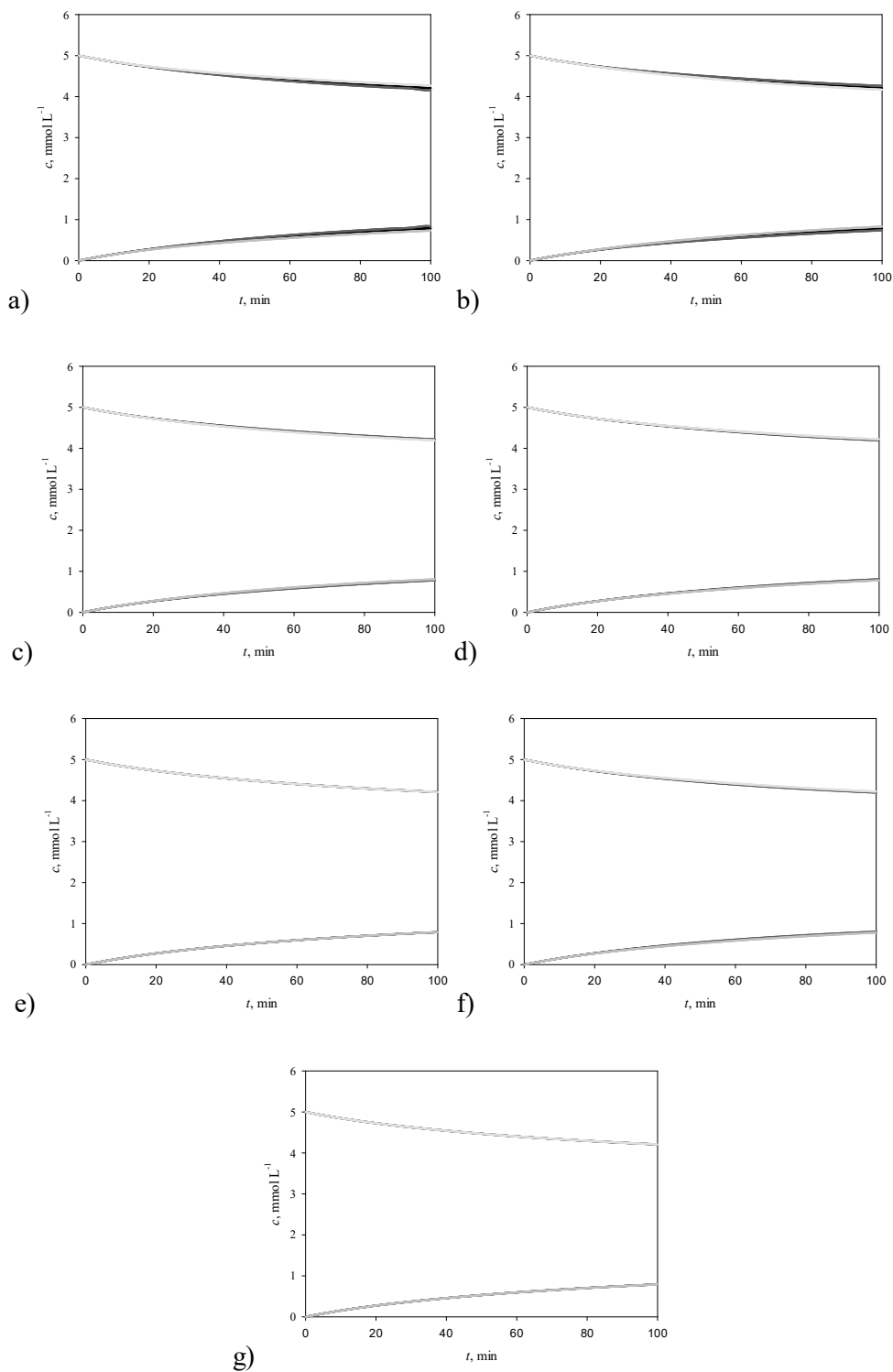
Rezultati su pokazali da je enzim GDH iz *Pseudomonas* sp. specifičan za reakciju oksidacije glukoze i NAD⁺ (niska vrijednost K_m parametra) (Tablica 5), a visoke vrijednosti V_m ukazuju da je enzim vrlo učinkovit u pretvorbi reaktanata u produkte u kratkom vremenskom periodu. [52]

Niske vrijednosti konstante inhibicije (K_i) za NADH i glukono- δ -laktan pokazuju njihov veliki afinitet prema enzimu, odnosno visoku mogućnost inhibicije enzima čak i pri malim koncentracijama.

Nakon procjene kinetičkih parametara provedena je lokalna parametarska analiza odnosno analiza osjetljivosti. Lokalna parametarska analiza je metoda koja se koristi za proučavanje utjecaja malih promjena parametara unutar određenog modela ili sustava na njegove izlazne rezultate. Ova vrsta analize može biti vrlo korisna u optimizaciji, modeliranju i dizajnu sustava, jer pomaže u razumijevanju koji su parametri kritični za performanse sustava i kako bi promjene u tim parametrima mogle utjecati na ishod. Također, lokalna parametarska analiza može otkriti stabilnost sustava, ukazujući na područja u kojima su izlazne vrijednosti posebno osjetljive na promjene parametara. U ovoj analizi ispitani su utjecaju kinetičkih parametara na promjenu koncentracije glukoze i NADH. Rezultati simulacije prikazani su na Slikama 19. i 20.



Slika 19. Lokalna parametarska analiza utjecaja procijenjenih kinetičkih parametara a) V_{m1} , b) K_m^{Glukoza} , c) $K_m^{\text{NAD}^+}$, d) K_{i1}^{Glukoza} , e) $K_{i1}^{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}$, f) K_i^{NADH} i g) $K_{i1}^{\text{Glukonska kiselina}}$ na koncentraciju NADH i glukoze (— procijenjeni kinetički parametri, — kinetički parametri 55% manji od procijenjenih, — kinetički parametri 188% veći od procijenjenih)

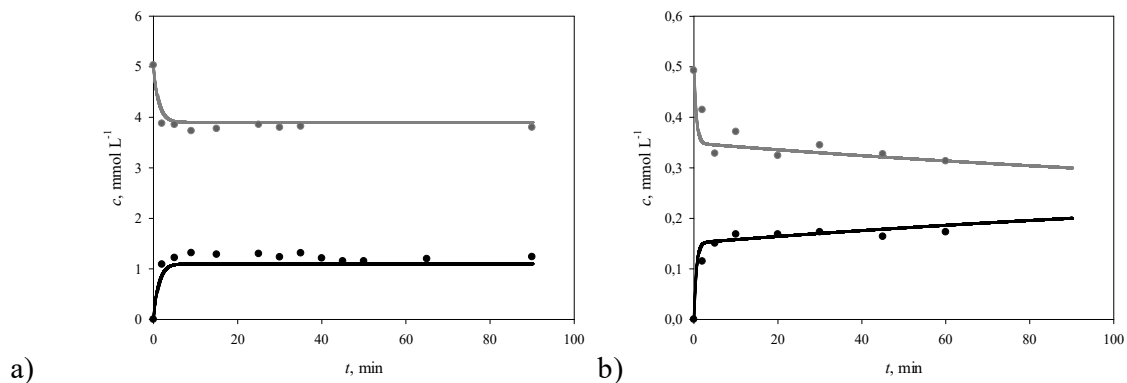


Slika 20. Lokalna parametarska analiza utjecaja procijenjenih kinetičkih parametara a) V_{m2} , b) $K_m^{\text{Glukono-}\delta\text{-lakton}}$, c) K_m^{NADH} , d) K_{i2}^{Glukoza} , e) $K_{i2}^{\text{Glukono-}\delta\text{-lakton}}$, f) $K_i^{\text{NAD}^+}$; i g) $K_{i2}^{\text{Glukonska kiselina}}$ na koncentraciju NADH i glukoze (— procijenjeni kinetički parametri, - - - kinetički parametri 55% manji od procijenjenih, ····· kinetički parametri 188% veći od procijenjenih)

Provedbom ispitivanja utjecaja kinetičkih parametara na proces može se uočiti kako pojedini parametri imaju veći utjecaj u odnosu na druge. Najveći utjecaj na reakciju imaju V_{m1} i V_{m2} . Nakon V_m najveći utjecaj ima K_m^{Glukoza} , zatim redom slijede $K_m^{\text{NAD}^+}$, $K_i^{\text{NAD}^+}$, $K_{i1}^{\text{Glukono-}\delta\text{-laktan}}$, dok preostali parametri nemaju utjecaja na reakciju.

5.4. Provedba reakcije oksidacije glukoze katalizirane enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. u kotlastom reaktoru

Oksidacija glukoze katalizirana enzimom GDH iz *Pseudomonas* sp. provedena je u kotlastom reaktoru (Slika 11., $V = 100$ mL) pri 40 °C, pH 7 i 600 min⁻¹ u 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl puferu. Ispitane su dvije početne koncentracije supstrata i to $c_{\text{glukoza}} = 4,7$ mmol L⁻¹ i $c_{\text{NAD}^+} = 1,1$ mmol L⁻¹ te $c_{\text{glukoza}} = 0,5$ mmol L⁻¹ i $c_{\text{NAD}^+} = 1,1$ mmol L⁻¹ kako bi se provela ocjena valjanosti modela. Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 21.



Slika 21. Biokatalitička oksidacija glukoze katalizirana enzimom GDH u kotlastom reaktoru ($\gamma_{\text{GDH}} = 0,002$ mg mL⁻¹; 20 mmol mL⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7; $T = 40$ °C; $V_{\text{reaktor}} = 100$ mL) pri različitim početnim koncentracijama supstrata: a) $c_{\text{glukoza}} = 4,7$ mmol L⁻¹ i $c_{\text{NAD}^+} = 1,1$ mmol L⁻¹ i b) $c_{\text{glukoza}} = 0,5$ mmol L⁻¹ i $c_{\text{NAD}^+} = 1,1$ mmol L⁻¹ (○) glukoza, (●) NADH, (—) matematički model

Brza inicijalna promjena koncentracije, popraćena platoom, upućuje na tipičan primjer reakcije u kojoj se reaktant u kratkom vremenu pretvara u produkt, postizujući stanje ravnoteže. Isto tako može se vidjeti da razvijeni matematički model uz procijenjene parametre dobro opisuje eksperimentalne rezultate u oba eksperimenta. Zbog toga, u budućim istraživanjima, matematički model može se koristiti u optimizaciji procesa.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih pokusa može se zaključiti sljedeće:

- Ispitivanjem ovisnosti aktivnosti GDH iz *Pseudomonas* sp. o pH i temperaturi određena je optimalna temperatura od 40 °C i pH 7.
- Najpovoljniji pufer za provođenje reakcije oksidacije glukoze s GDH iz *Pseudomonas* sp. je 20 mmol L⁻¹ TRIS-HCl pufer pH 7
- Kinetika oksidacije glukoze katalizirane GDH iz *Pseudomonas* sp. opisana je dvosupstratnom Michaelis–Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom i kompetitivnom inhibicijom produktom.
- Analiza procijenjenih kinetičkih parametara pokazala je kako najveći utjecaj na reakciju ima maksimalna brzina reakcije enzima dok ostali parametri imaju mali ili zanemariv utjecaj.
- Provedeni su eksperimenti oksidacije glukoze u kotlastom reaktoru te se pokazalo da postavljeni matematički model dobro opisuje eksperimentalne podatke.

7. LITERATURA

1. Morya, R., Raj, T., Lee, Y., Pandey, A. K., Kumar, D., Singhania, R. R., Singh, S., Verma, P. J., Kim, S. H. Recent updates in biohydrogen production strategies and life-cycle assessment for sustainable future, *Bioresource Technology*, 366 (2022) 128159.
2. Zoidis, E., Papamikos, V. Glucose: Metabolism and Regulation, u: Caballero, B., Finglas, P. M., Toldra, F., *Encyclopedia of Food and Health*, Atena, Academic Press, (2016) 233-238.
3. Li, Y., Liu, W., Zhang, Z., Du, X., Yu, L., Deng, Y. A self-powered electrolytic process for glucose to hydrogen conversion. *Communications Chemistry*, 2 (2019) 67.
4. Rambhujun, N., Salman, M. S., Wang, T., Prathana, C., Sapkota, P., Costalin, M., Lai, Q., Aguey-Zinsou, K. F., *Renewable hydrogen for the chemical industry*, *MRS Energy & Sustainability*, 7 (2020) 33.
5. Ramachandran, R., Menon, R. K., An overview of industrial uses of hydrogen, *International Journal of Hydrogen Energy*, 23 (1998) 593-598.
6. European Hydrogen Observatory, *The European Hydrogen Market Landscape*, *Clean Hydrogen Partnership* 1 (2023)
7. Osman, A. I., Mehta, N., Elgarahy, A. M., Hefny, M., Al-Hinai, A., Al-Muhtaseb, A. H., Rooney, D. W., *Hydrogen production, storage, utilisation and environmental impacts: a review*, *Environmental Chemistry Letters*, 20 (2022) 153–188.
8. Sreeranit, C. V. K., Lal, J. J., *Glucose Properties and Analysis*, u: Caballero, B., Trugo, L., Finglas, P. M., *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*, Oxford, Academic Press, 2 (2003) 2898-2903.
9. Dzoyem, P. J., Kuete, V., Eloff, N. J., *Biochemical Parameters in Toxicological Studies in Africa: Significance, Principle of Methods, Data Interpretation, and Use in Plant Screening*, Kuete, V., *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*, Pretoria, Elsevier, (2014) 659-715.
10. Galant, A. L., Kaufman, R. C., Wilson, J.D., *Glucose: Detection and analysis*, *Food Chemistry*, 188 (2015) 149-160.
11. Spets, J. P., Kuosa, M., Granstrom, T., Kiros, Y., Rantanen, J., Lampinen, M., Saari, K., *Production of Glucose by Starch and Cellulose Acid Hydrolysis and its Use as a Fuel in Low-Temperature Direct-Mode Fuel Cells*, *Materials Science Forum*, 638-642 (2010) 1164.
12. Cheng, M.-H., Huang, H., Dien, B. S., Singh, V., *The Costs of Sugar Production from Different Feedstocks and Processing Technologies*, U.S. Department of Energy, (2018)

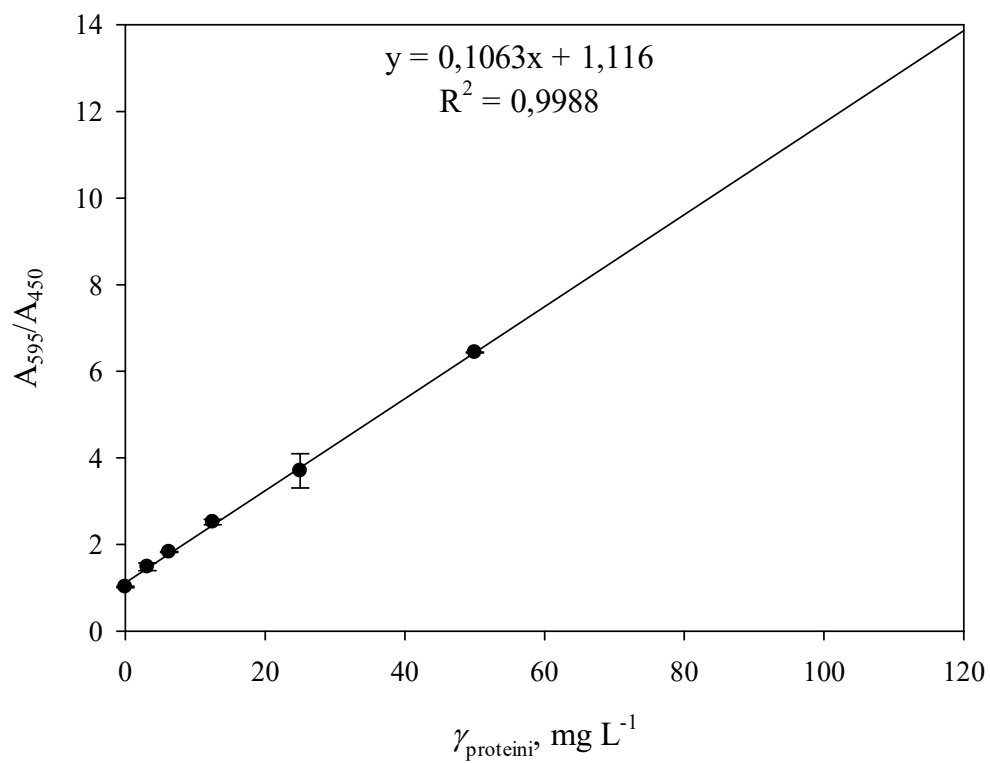
13. Karaffa, L., Kubicek, C. P., Production of Organic Acids by Fungi, u: Zaragoza, O., Casadevall, A., Encyclopedia of Mycology, Vienna, Elsevier, 2 (2021) 406-419.
14. Anastassiadis, S., Morgunov, G. I., Recent Patents on Biotechnology, Bentham Science Publishers,, Pushchino Moscow Region, 1 (2007) 167-180.
15. Singh, O. V., Kumar, R., Biotechnological production of gluconic acid: future implications, Applied Microbiology and Biotechnology, 75 (2007) 713–722.
16. Lim, H. Y., Dolzhenko, A. V., Gluconic acid aqueous solution: A bio-based catalytic medium for organic synthesis, Sustainable Chemistry and Pharmacy, 21 (2021) 2352-5541.
17. Ramachandran, S., Nair, S., Larroche, C. Pandey, A., 26 – Gluconic Acid, u: Negi, S., Soccol, C. R., Pandey, A., Current Developments in Biotechnology and Bioengineering Dubai, Elsevier, (2017) 577-599.
18. Ramachandran, S., Fontanille, P., Pandey, A., Larroche, C., Gluconic Acid: Properties, Applications and Microbial Production, Food Technology and Biotechnology, 44 (2006) 185–195.
19. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Biokemija, prvo izdanje, školska knjiga, Zagreb, (2013) 205-240.
20. Spector, L. B., Covalent Catalysis by Enzymes, Springer-Verlag, New York, (1982) 155-185.
21. Khade, S. M., Srivastava, S. K., Kamble, L. H., Srivastava, J., Food Enzymes: General Properties and Kinetics, u: Dutt Tripathi, A., Darani, Khosravi K., Srivastava, S.K., Novel Food Grade Enzymes, Singapore, Springer Nature Singapore, 1 (2022) 1-15.
22. <https://biologyreader.com/general-properties-of-enzyme.html> (pristup 10. srpnja 2024.)
23. Ferri, S., Kojima, K., Sode, K., Review of Glucose Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A Bird's Eye View of Glucose Sensing Enzymes, Journal of Diabetes Science and Technology, 5 (2011.) 1068-1076.
24. Pongtharangkul, T., Chuekitkumchorn, P., Suwanampa, N., Kinetic properties and stability of glucose dehydrogenase from *Bacillus amyloliquefaciens* SB5 and its potential for cofactor regeneration, AMB Express, 5 (2015) 68.
25. <https://www.rcsb.org/structure/7CDY> (pristup 12. srpnja 2024.)
26. <https://ba.oasiernutri.com/other-products/biological-enzyme-preparations/glucose-dehydrogenase-catalyst.html> (pristup 13. srpnja 2024.)
27. Ying, W., NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death, Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 11 (2006) 3129-3148.

28. Liao, L., Zhang, Y., Wang, Y., Construction and characterization of a novel glucose dehydrogenase-leucine dehydrogenase fusion enzyme for the biosynthesis of L-tert-leucine, *Microbial Cell Factories*, 20 (2021) 3.
29. Hua, L., Qianqian, B., Jianfeng, Z., Yinbiao, X., Shengyu, Y., Weishi, X., Yang, S., Yupeng, L., Directed evolution engineering to improve activity of glucose dehydrogenase by increasing pocket hydrophobicity, *Frontiers in Microbiology*, 13 (2022) 1044226.
30. https://hr.wikipedia.org/wiki/Nikotinamid_adenin_dinukleotid (pristup 10. srpnja 2024.)
31. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5893> (pristup 10. srpnja 2024.)
32. Birkmayer G. D., NADH, the Biological Hydrogen: The Secret of Our Life Energy, Basic Health Publications, Inc., Laguna Beach, (2009) 1-21.
33. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_4-Dihydronicotinamide-adenine-dinucleotide (pristup 10. srpnja 2024.)
34. Pollak, N., Dölle, C., Ziegler, M., The power to reduce: pyridine nucleotides - small molecules with a multitude of functions, *Biochemical Journal*, 402 (2007) 205-218.
35. Bogan, K. L., Brenner, C., *Biochemistry: Niacin/NAD(P)*, u: Lane, D. M., Lennarez, W. J., *Encyclopedia of Biological Chemistry II*, Elsevier Inc., Iowa City, (2013) 172-178.
36. Chini, C. C. S., Zeidler, J. D., Kashyap, S., Warner, G., Chini, E. N., Evolving concepts in NAD⁺ metabolism, *Cell Metabolism*, 33 (2021) 1076-1087.
37. Lin, S., Guarente, L., Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease, *Current Opinion in Cell Biology*, Massachusetts, 15 (2003) 241-246.
38. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_4-Dihydronicotinamide-adenine-dinucleotide#section=KEGG-ID (pristup 8. srpnja 2024.)
39. Mulholland, A. J. Modelling enzyme reaction mechanisms, specificity and catalysis, *Drug Discov Today*, 10 (2005) 1393-1402.
40. Straathof, A. J. J., Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11 (2001) 991-998.
41. Palmer, T., Bonner, P. L., *The chemical nature of enzyme catalysis*, u: Palmer, T., Bonner, P. L., *Enzymes*, Nottingham, Woodhead Publishing, 2 (2011) 189-221.
42. Pelley, J. W., *Enzymes and Energetics*, u: Pelley, J. W., Elsevier's Integrated Biochemistry, Lubbock, Mosby, (2007) 29-36.
43. Fridrik Blažević, Z., *Bioreaktori, Interna skripta za dio kolegija Reaktori i bioreaktori*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, (2023)

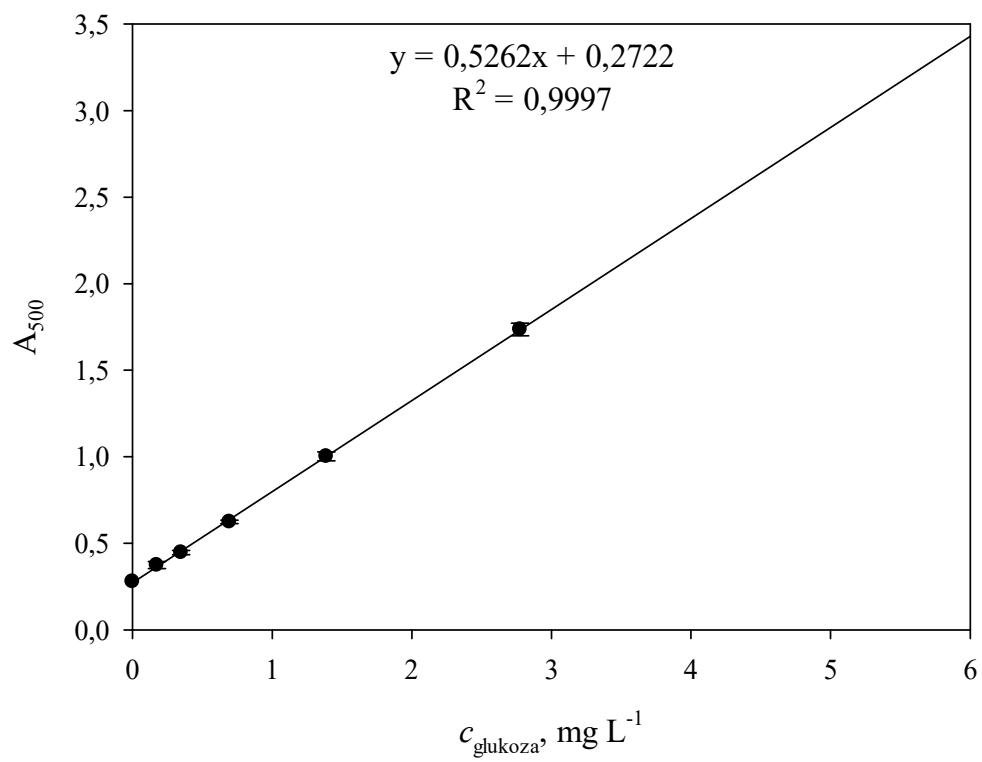
44. Kosar V., Reaktori i bioreaktori, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, (2017)
45. Gomzi Z., Kemijski reaktori, HINUS, Zagreb, (1998) 48-52., 96., 347-1.
46. Findrik, Z., Studij reakcija kataliziranih oksidazama, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2006)
47. Woodward, J., Mattingly, S., Danson, M., Hough, D., Ward, N., Adams, M. In vitro hydrogen production by glucose dehydrogenase and hydrogenase, *Nature Biotechnology*, 14 (1996) 872–874
48. Pire, C., Camacho, M. L., Ferrer, J., Hough, D. W., Bonete, M. J., NAD(P)⁺-glucose dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*: kinetic mechanism and metal content, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 10 (2000) 409-417
49. Sakuno, E., Kameyama, M., Nakajima, H., Yabe, K., Purification and Gene Cloning of a Dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* That Catalyzes a Reaction Involved in Aflatoxin Biosynthesis, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72 (2008) 724–734
50. Eur. Pat., WO2008/119749 (Aug.18, 2010), Kalum, L., Hendriksen, H. V. (Process for treating vegetable material with an enzyme)
51. Braga, A. L. M., Menossi, M., Cunha, R. L., The effect of the glucono- δ -lactone/caseinate ratio on sodium caseinate gelation, *International Dairy Journal*, 16 (2006) 389-398
52. Walker, J. M., *The Protein Protocols Handbook*, Hatfield, Humana Press, 2 (1996)

8. PRILOZI

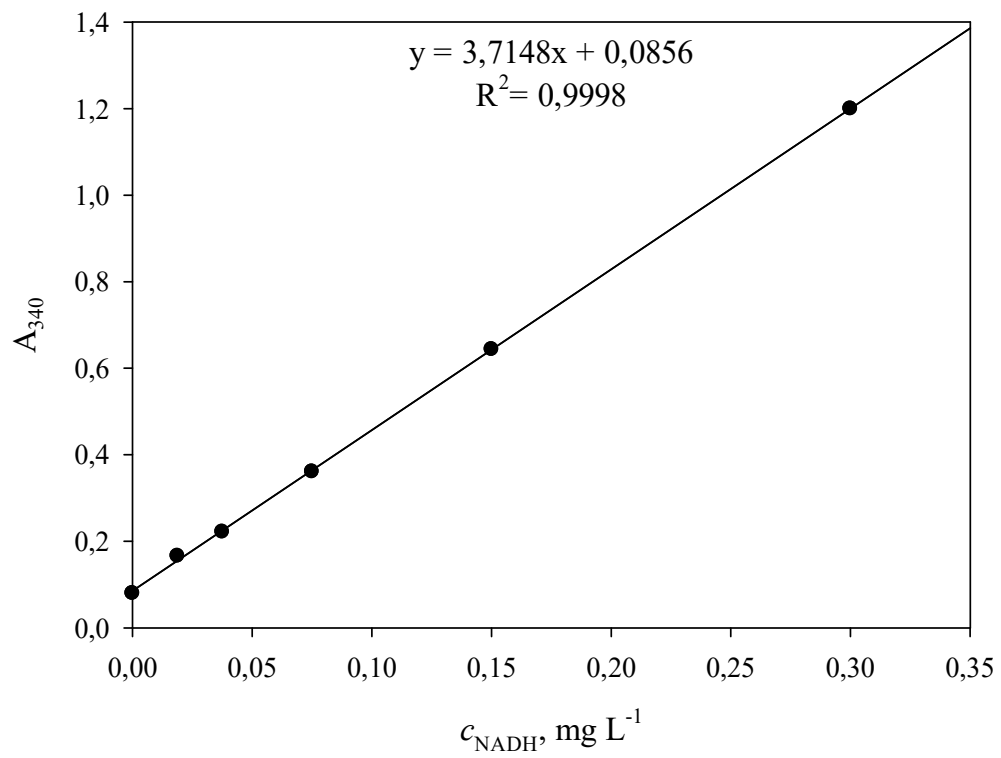
Prilog 1. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina GDH iz *Pseudomonas* sp.



Prilog 2. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze



Prilog 3. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije NADH



9. POPIS SIMBOLA I KRATICA

SIMBOLI

| | |
|--|--|
| c | molarna koncentracija [mmol L^{-1}] |
| $c_{\text{glukonska kiselina}}$ | molarna koncentracija glukonske kiseline [mol L^{-1}] |
| c_{glukoza} | molarna koncentracija glukoze [mol L^{-1}] |
| c_i | molarna koncentracija inhibitora [mmol L^{-1}] |
| $c_{\text{glukono-}\delta\text{-lakton}}$ | molarna koncentracija glukono- δ -laktona [mol L^{-1}] |
| c_{NAD^+} | molarna koncentracija NAD^+ [mol L^{-1}] |
| c_{NADH} | molarna koncentracija NADH [mol L^{-1}] |
| d | promjer kivete [m] |
| k | konstanta brzine reakcije [$\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$] |
| K_i | konstanta inhibicije [mmol L^{-1}] |
| $K_{i1}^{\text{Glukono-}\delta\text{-lakton}}$ | konstanta inhibicije glukono- δ -laktona u reakciji oksidacije [mmol L^{-1}] |
| $K_{i2}^{\text{Glukono-}\delta\text{-lakton}}$ | konstanta inhibicije glukono- δ -laktona u reakciji redukcije [mmol L^{-1}] |
| $K_{i1}^{\text{Glukonska kiselina}}$ | konstanta inhibicije glukonske kiseline u reakciji oksidacije [mmol L^{-1}] |
| $K_{i2}^{\text{Glukonska kiselina}}$ | konstanta inhibicije glukonske kiseline u reakciji redukcije [mmol L^{-1}] |
| K_{i1}^{Glukoza} | konstanta inhibicije glukoze u reakciji oksidacije [mmol L^{-1}] |
| K_{i2}^{Glukoza} | konstanta inhibicije glukoze u reakciji redukcije [mmol L^{-1}] |
| $K_i^{\text{NAD}^+}$ | konstanta inhibicije NAD^+ u reakciji oksidacije [mmol L^{-1}] |
| K_i^{NADH} | konstanta inhibicije NADH u reakciji oksidacije [mmol L^{-1}] |
| K_m | Michaelis-Menteničina konstanta [mmol L^{-1}] |
| $K_m^{\text{Glukono-}\delta\text{-lakton}}$ | Michaelis-Menteničina konstanta za glukono- δ -lakton [mmol L^{-1}] |
| K_m^{Glukoza} | Michaelis-Menteničina konstanta za glukoze [mmol L^{-1}] |
| $K_m^{\text{NAD}^+}$ | Michaelis-Menteničina konstanta za NAD^+ [mmol L^{-1}] |
| K_m^{NADH} | Michaelis-Menteničina konstanta za NADH [mmol L^{-1}] |

| | |
|------------------|--|
| r | reakcijska brzina [$\text{mol L}^{-1}\text{min}^{-1}$] |
| S.A. | specifična aktivnost enzima glukoza dehidrogenaza [U mg^{-1}] |
| t | vrijeme [min] |
| T | temperatura, [$^{\circ}\text{C}$] |
| V | volumen [L] |
| V.A. | volumna aktivnost enzima glukoza dehidrogenaza [U mL^{-1}] |
| V_{GDH} | volumen enzima glukoza dehidrogenaza dodanog u uzorak [mL] |
| V_m | maksimalnu brzinu reakcije [U mg^{-1}] |
| V_{m1} | maksimalnu brzinu reakcije oksidacije [U mg^{-1}] |
| V_{m2} | maksimalnu brzinu povratne reakcije [U mg^{-1}] |
| V_r | ukupni volumen uzorka [U mg^{-1}] |

GRČKI SIMBOLI

| | |
|-----------------------|--|
| ε | molarni ekstinkcijski koeficijent [$\text{mL } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$] |
| γ | masena koncentracija [mg mL^{-3}] |
| γ_{GDH} | masena koncentracija enzima glukoza dehidrogenaza [mg mL^{-1}] |
| λ | valna duljina [nm] |

SKRAĆENICE

| | |
|----------------|---------------------------------------|
| GDH | glukoza dehidrogenaza |
| NAD^+ | nikotinamid adenin dinukleotid |
| NADH | nikotinamid adenin dinukleotid hidrid |