

Matematičko modeliranje biokatalitičkih reakcija

Vojtkuf, Karlo

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:499356>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Karlo Vojtkuf

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

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

Kandidat Karlo Vojtkuf Predao je izrađen završni rad

dana: 11. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

doc. dr. sc. Martina Sudar, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Monika Šabić Runjavec, znanstvena suradnica,
Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i
tehnologije

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

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

Završni ispit održat će se dana: 14. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Karlo Vojtkuf

Matematičko modeliranje biokatalitičkih reakcija

ZAVRŠNI RAD

Mentorica: doc. dr. sc. Martina Sudar

Članovi ispitnog povjerenstva: doc. dr. sc. Martina Sudar

doc. dr. sc. Anita Šalić

dr. sc. Monika Šabić Runjavec

Zagreb, rujan 2023.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. sc. Martini Sudar na pomoći, strpljenju i razumijevanju prilikom izrade završnog rada.

Želim se zahvaliti svojoj obitelji i prijateljima koji su bili uz mene tijekom studiranja.

Sadržaj

SAŽETAK.....	VI
ABSTRACT	VII
1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Biokataliza	2
2.1.1. Prednosti biokatalize.....	2
2.1.2. Primjena biokatalize u farmaceutskoj industriji	3
2.1.3. Mediji za provođenje biokatalize.....	3
2.2 Enzimi	4
2.2.1. Svojstva enzima.....	5
2.2.2. Podjela enzima.....	5
2.2.3. Imobilizacija enzima	6
2.2.4. Primjena enzima	7
2.3. Matematičko modeliranje.....	8
2.3.1. Michaelis-Menteničina kinetika.....	8
2.3.2. Linearizacija Lineweaver-Burk dijagrama	10
2.3.3. Metoda početnih brzina	11
2.4. Bilancne jednadžbe i reaktori	12
2.4.1. Kotlasti reaktor	12
2.4.2. Protočno kotlasti reaktor	14
2.4.3. Cijevni reaktor	16
3. PREGLEDNI DIO	19
3.1. Primjeri matematičkih modela za biokatalitičke reakcije.....	19
3.1.1. Kinetički model alkoholize 1,3-specifičnih triacilglicerola katalizirane lipazama.....	19
3.1.2. Modeliranje unutarnje kinetike enzimске hidrolize	21
3.1.3. Matematički model 1,4- adicije α -ketoglutarne kiseline na akrilonitril uz MenD	24
3.1.4. Matematičko modeliranje hidrolize škroba katalizirane amilazom	26
3.1.5. Stabilizacija D-aminokiselinske oksidaze kovalentnom imobilizacijom i matematički model oksidativne deaminacije D-metionina katalizirane imobiliziranim enzimom	29
3.1.6. Biotransformacija D- metionina u L-metionin u enzimskoj kaskadi s četiri enzima.....	32
4. ZAKLJUČAK	36
5. LITERATURA.....	XXXVII
6. ŽIVOTOPIS.....	XLI

SAŽETAK

Kombinacijom prirodnih znanosti poput matematike i kemije omogućava se primjena metoda koje pristupaju znanosti na jedan novi, „zeleniji“ način. Društvo, kao i sama industrija nastoje težiti primjeni ekonomičnih, održivih i prirodnih tvari koje neće štetiti okolišu. Primjenom biokatalitičkih procesa to je moguće i ostvariti. U ovom radu opisani su enzimi, njihova klasifikacija, prednosti i mane kao katalizatora te njihova primjena. Također, dan je prikaz matematičkog modeliranja biokatalitičkih reakcija. Govori se o bilancnim jednadžbama i reaktorima u kojima se odvijaju biokatalitički procesi. Matematičkim modeliranjem povezuju se bilancne i kinetičke jednadžbe u kemijskim procesima. Primjena matematičkih modela olakšava odabir pogodnog reaktora za pojedinu reakciju, a također omogućava i ubrzava optimizaciju procesa.

Ključne riječi: biokataliza, kinetika, bilancne jednadžbe, matematičko modeliranje

ABSTRACT

The combination of natural sciences such as mathematics and chemistry enables the application of methods that approach science in a new, "greener" way. Society, as well as the industry itself, strives to use more economical, sustainable and natural substances that will not harm the environment. Such an approach can be achieved by using biocatalytic processes. This thesis describes enzymes, their classification, advantages and disadvantages as catalysts, and their application as well as mathematical modeling of biocatalytic reactions. Mass balance equations and reactors in which the biocatalytic processes take place are described. The application of mathematical modeling enables the selection of adequate reactors for a specific reaction and also aids and speeds up optimization of the process.

Keywords: biocatalysis, kinetics, balance equations, mathematical modeling

1. UVOD

Biokataliza ili biotransformacija obuhvaća korištenje bioloških sustava za kataliziranje pretvorbe jednog spoja u drugi. (1) Proučavanjem kemijskih reakcija uočava se kako brzina reakcije ima veliki utjecaj na nastavak biokatalitičkih procesa. Prilikom ubrzavanja kemijskih reakcija koriste se katalizatori. Prirodni biokatalizatori, odnosno enzimi koji ubrzavaju biokatalitičke reakcije imaju značajan utjecaj na farmaceutsku industriju i prehrambenu industriju. Svojstva biokatalizatora poput visoke specifičnosti, biorazgradivosti i blagih reakcijskih uvjeta nude biokatalitičkim reakcijama prednost u odnosu na tradicionalne kemijske procese. No, kako je potrebno shvatiti ponašanje enzima u biokatalitičkim reakcijama znanost se okreće primjeni matematičkih modela koji uvelike olakšavaju optimizaciju tih procesa. Pomoću kinetike enzima, bilance mase, bilance topline i reakcijskih parametara matematički modeli pomažu prilikom shvaćanja mehanizma reakcija, omogućavaju optimizaciju reakcijskih uvjeta te dizajn reaktora pogodnog za biokatalitičku reakciju. Cilj matematičkog modeliranja u biokatalizi je predviđanje ponašanja reakcijskog sustava pri različitim reakcijskim uvjetima.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. *Biokataliza*

Biokataliza koristi biološke procese za pretvaranje jedne molekule u drugu koristeći biološki sustav čiji katalitički dio sadrži cijelu stanicu, stanične ostatke ili izolirani enzim. (1) Međutim, biokataliza koristi enzime kao procesne katalizatore pod umjetnim uvjetima (in vitro), stoga je ključno pitanje u biokatalizi pretvoriti te fiziološke katalizatore u procesne katalizatore koji mogu raditi u reakcijskim uvjetima industrijskog procesa. (2) Kataliza se tradicionalno dijeli na primjenu (homo i heterogena kataliza) i na podrijetlo (kemo- i biokataliza). Biokataliza je, kao i kemokataliza, homogena ili heterogena. Heterogena biokataliza koristi cijele stanice, imobilizirane enzime ili imobilizirane stanice, dok homogena biokataliza koristi izolirane enzime (pročišćeni ili polupročišćeni sirovi ekstrakt). (3)

2.1.1. *Prednosti biokatalize*

Prednost biokatalize je primjena jedinstvenih enzimskih katalitičkih svojstava, što omogućuje kemo-, regio- i enantioselektivne kemijske reakcije. To nudi mogućnost preuređivanja cijelih sintetskih puteva za pripremu važnih molekula, kako bi ih dobili u većim količinama. (4) Za sintezu lijekova, materijala ili kemikalija moguće je provoditi tri pristupa s različitim stupnjevima složenosti. Prvi pristup je uz pomoć isključivo kemijske strategije. Drugi pristup je koristeći kemoenzimski put kombinirajući kemijske i biokatalitičke korake. U ovom slučaju, biokatalizator se koristi za ključnu reakciju zbog svoje selektivnosti i specifičnosti ili kako bi zamijenio korake koji mogu uzrokovati ekološka onečišćenja. Treći pristup je koristeći se potpunom biološkom sintezom uz pomoć fermentacije ili biotransformacijom koja se sastoji od više koraka. (1)

Primjena enzima bila je ograničena njihovom dostupnosti u prošlosti, no razvojem sekvencioniranja DNA dolazi do javnog objavljivanja 2000 bakterijskih i gljivičnih genoma što omogućuje smanjenje troškova i ubrza sintezu gena. (5)

U prošlosti, bilo je potrebno prilagoditi proces kako bi odgovarao dostupnom enzimu, uz pomoć direktne (in vitro) evolucije koja je služila za optimizaciju ciljanih parametara procesa poput aktivnosti, specifičnosti i stabilnosti. (6) Danas se enzim prilagođava unaprijed optimiziranom procesu. Stabilnost enzima tijekom skladištenja i rada može biti poboljšana učinkovitim

2. Teorijski dio

imobilizacijom, omogućavajući isplativost i ponovnu iskoristivost. Katalizator, odnosno enzim je proizveden iz lako dostupnih obnovljivih izvora, samim time je biorazgradiv, nije štetan niti toksičan. (7) Enzimi i biokatalizatori cijelih stanica imaju više privlačnih svojstava, koja ih čine primarnim katalizatorima za organsku sintezu. Imaju visoku kemoselektivnost, regioselektivnost i stereoselektivnost. Biokataliza nudi veliku vjerojatnost za uspješnu primjenu, također i u slučajevima kada produkt i reaktant mogu kemijski reagirati. (1) Enzimske reakcije provode se pri blagim uvjetima, uključujući sobnu temperaturu i atmosferski tlak te u vodi što omogućuje smanjenje otpada jer sintetski koraci ne zahtijevaju uklanjanje, aktivaciju ili zaštitu funkcionalnih skupina. Široka primjena biokatalize omogućena je rekombinantnom DNA koja je smanjila troškove procesa proizvodnje enzima i omogućila primjenu biokatalize u održivoj kemijskoj proizvodnji. (5)

2.1.2. Primjena biokatalize u farmaceutskoj industriji

Biokataliza je korisna tehnologija u farmaceutskoj industriji zbog svojih iznimnih regioselektivnih i stereoselektivnih svojstava. Farmaceutska industrija zahtjeva brzi razvoj procesa koji će biti popraćen s visokom optičkom čistoćom za kompleksne spojeve s više kiralnih centara. (8) Dva glavna faktora koja utječu na integraciju biokatalize u farmaceutskoj industriji su jednostavan pristup enzimu te mogućnosti obrade tih proteina pomoću proteinskog inženjerstva. (9) Industrija je napravila ogroman korak te su biokatalitičke procese katalizirane cijelim stanicama promijenili na procese katalizirane izoliranim enzimima. Za razliku od biokatalize katalizirane cijelim stanicama, reakcijski sustavi katalizirani izoliranim enzimima mogu se lakše kontrolirati i optimizirati. (3) Proteinsko inženjerstvo i usmjerena evolucija značajne su metode prilikom ispitivanja odnosa između funkcija proteina i proteinskih sekvenci. Metoda koja omogućava modificiranje proteina uz pomoć zamjene, umetanja ili uklanjanjem nukleotida naziva se proteinsko inženjerstvo. Cilj je dobiti protein koji je prikladniji za određenu svrhu. (10) Direktna evolucija omogućava oponašanje prirodnih evolucijskih procesa u laboratoriju koji pomažu pri optimizaciji proteina. (3)

2.1.3. Mediji za provođenje biokatalize

Biokataliza se u pravilu odvija u vodenom mediju. Voda reagira netoksično, ali pritom nastaje "kontaminirana" otpadna voda koja zahtijeva obradu prije ispuštanja ili ponovne uporabe.

2. Teorijski dio

Visoko vrelište vode, velika potrošnja energije za isparavanje i nastanak emulzije čine daljnju obradu skupom i zahtjevnom te voda postaje najmanje poželjnim otapalom u organskim sintezama. (11)

Biokatalitičke reakcije se mogu provoditi u različitim reakcijskim medijima. Koriste se industrijski monofazni i višefazni mediji. Uspostavljanje učinkovitog biokatalitičkog procesa u organskim medijima (organska otapala ili sustavi bez otapala) zahtijeva duboko razumijevanje i pažljivu procjenu nekoliko parametara sa strane otapala i enzima (slika 2.) i njihove interakcije kako bi se odredila učinkovitost enzima u različitim organskim otapalima. (3) Dvofazni sustav nastaje kada se dovoljna količina nepolarnog otapala pomiješa s vodom. (11) Upotreba nepolarnog organskog otapala bio je tipičan način za prevladavanje ograničenja biokatalize kao što je inhibicija enzima supstratom ili produktom i nepovoljne termodinamičke ravnoteže. (3)

Biokataliza u monofaznom mediju	
Otapalo	Enzim
Hidrofobnost	pH
Utjecaj vode	Fizikalno stanje
Molekulska struktura	Aditivi

Slika 1. Prikaz parametara sa strane enzima i otapala u monofaznom organskom mediju tijekom biokatalize (3)

2.2 Enzimi

Enzimi su biološki katalizatori (poznati i kao biokatalizatori) koji ubrzavaju biokemijske reakcije u živim organizmima. Također se mogu ekstrahirati iz stanica i zatim koristiti za kataliziranje širokog spektra komercijalno važnih procesa. Pronalaze svoju ulogu u proizvodnji zaslađivača i prilikom modifikacija antibiotika, kao i u sredstvima za čišćenje i prašcima za pranje. (12) Kada je specifičnost reakcije važna (kao u farmaceutskim proizvodima i proizvodnji finih kemikalija), kada katalizatori moraju biti aktivni u blagim uvjetima (zbog nestabilnosti supstrata i proizvoda ili kako bi se izbjegle neželjene reakcije, kao u nekim reakcijama organske sinteze) i prilikom strogih ekoloških ograničenja, enzimi su idealni katalizatori. (2) Tablica 1. nudi prikaz prednosti i mana enzima u ulozi katalizatora.

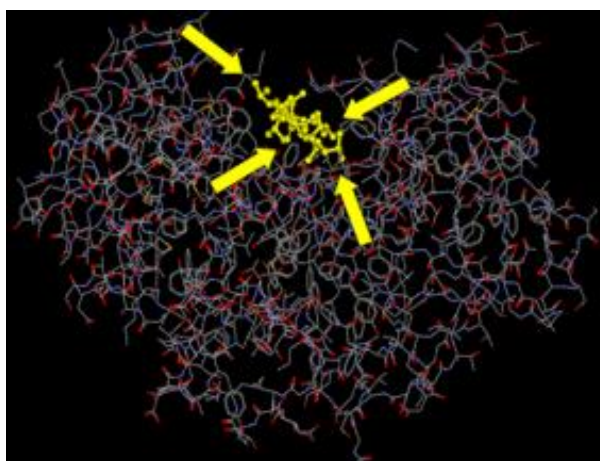
2. Teorijski dio

Tablica 1. Prednosti i nedostaci enzima kao katalizatora (2)

Prednosti	Nedostaci
Visoka specifičnost	Velika molekularna kompleksnost
Iznimna aktivnost u blagim medijima	Visoki troškovi proizvodnje
Biorazgradivost	Intrinzična osjetljivost
Prirodni proizvod	

2.2.1. Svojstva enzima

Peptidna veza između ugljikovog atoma karboksilne skupine jedne aminokiseline i dušikovog atoma α -amino skupine sljedeće kovalentno veže te aminokiseline. Aminokiseline mogu biti nepolarne (hidrofobne) ili polarne (nabijene ili nenabijene) ovisno o pomoćnoj skupini. (13) Njihova raspodjela duž proteinske molekule određuje njezino ponašanje. Farmaceutski proizvodi i drugi biološki aktivni spojevi sintetiziraju se pomoću enzima jer su regioselektivni i enantioselektivni. (14) Biokatalizatori imaju veliku trodimenzionalnu strukturu koja tvori više točaka dodira s određivanim supstratom, što omogućuje znatnu selektivnost, što je prikazano na slici 2.



Slika 2. Prikaz dodirnih točaka supstrata i biokatalizatora (9)

2.2.2. Podjela enzima

Odbor za nomenklaturu IUBMB-a klasificira enzime u šest skupina na temelju kemijske reakcije koju kataliziraju te dodjeljuje svakom enzimu četveroznamenasti broj: prvi označava razred, drugi podrazred i tip kemijske skupine na koju djeluje, treći podskupinu unutar

2. Teorijski dio

podrazreda i kemikaliju skupine uključene u reakciju, a četvrti označava broj identifikacije unutar podskupine. (15)

Enzimi se klasificiraju u 6 razreda ovisno o tipu veze koja nastaje:

1. Oksidoreduktaze – enzimi koji kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije koje uključuju prijenos elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma. Postoje 22 podrazreda oksidoreduktaze, primjerice dehidrogenaza koja oksidira supstrat te prenosi vodikov atom do koenzima koji je u tom slučaju akceptor.
2. Transferaze – enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalne skupine s donora na prihvatljivi akceptor. Postoji 9 podvrsta, ovisno o kemijskoj prirodi skupine koja se prenosi. Imaju važnu ulogu u reakcijama metabolizma.
3. Hidrolaze – enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize i kidaju kovalentnu vezu u prisustvu vode. Postoji 12 podskupina ovisno o vrsti veze te prilikom prihvatljivih uvjeta hidrolaze mogu katalizirati reakciju stvaranja veze s eliminacijom vode.
4. Liaze – enzimi koji kataliziraju reakcije nehidrolitičkog i neoksidativnog cijepanja kemijskih veza. Podijeljeni su u 7 grupa ovisno u tipu prihvatljive veze. Također su proučavane za sintezu optičkih aktivnih organskih spojeva.
5. Izomeraze – enzimi koji kataliziraju reakcije konverzije supstrata u izomer, spoj s istim brojem i tipom atoma. Postoji 6 podgrupa, ovisno o tipu izomera koji se proizvodi.
6. Ligaze – enzimi koji kataliziraju reakcije kovalentnog vezanja dvaju molekula. Razlikujemo 6 podgrupa ovisno o tipu nastale veze.

Među šest razreda enzima samo hidrolaze imaju tehnološku vrijednost. Budući da su izdržljivi, jednostavni proteini bez koenzima i mnogi od njih izvanstanični, ti su enzimi dobro prilagođeni biokatalizi. (2)

2.2.3. Imobilizacija enzima

Većina sintetske kemije provodi se u organskim otapalima, a imobilizacija enzima omogućuje upotrebu biokatalizatora u istima. (9) Potreba za imobilizacijom enzima uzrokovana je:

1. Povećanjem stabilnosti enzima
2. Jednostavnim odvajanjem enzima od reakcijskog medija
3. Ponovnim korištenjem enzima
4. Pokretanjem kontinuiranog procesa
5. Stvaranjem velikih multienzimskih kaskada (2)

Metode imobilizacije enzima mogu se podijeliti u dvije skupine: reverzibilne i ireverzibilne metode. U ireverzibilnoj imobilizaciji enzima, biokatalizator je vezan na nosač i ne može se odvojiti bez utjecaja na biološku aktivnost enzima. Najraširenije ireverzibilne metode su kovalentno vezanje, intermolekulsko povezivanje i kapsuliranje. Metode reverzibilne imobilizacije enzima su adsorpcija i vezanje pomoću sulfidnih veza. (16) Adsorpcija se smatra najstarijom i jednostavnom tehnikom imobilizacije, prilikom koje dolazi do veze između matriksa i enzima na površini. Zahvaljujući nabojima na površini matriksa i proteina nastaje jaka veza prilikom koje se formira enzim. (17) Imobilizacija enzima omogućuje znatno poboljšanje procesa, smanjenje troškova i pomaže pri smanjenju otpada.

2.2.4. *Primjena enzima*

U prvim industrijskim primjenama koristili su se sirovi enzimi ili biokatalizatori u cijelim stanicama, što je razumljivo s obzirom na drevne primjene enzima i znanstvenu povijest.

Mnoge različite vrste enzima koriste se u pečenju, a svaki od njih ima vrlo specifično molekularno djelovanje. Ipak, takvo djelovanje koje utječe samo na mikro skalu može doprinijeti makroskopskim učincima prepoznatljivim u svojstvima obrade, kao što je rukovanje tijestom i stabilnost tijesta, te u karakteristikama kvalitete proizvoda, kao što su volumen kruha, struktura mrvica, boja korice i okus. Gljivične α -amilaze se intenzivno koriste kao aditivi u pekarstvu. (18)

U mnogim je zemljama mliječna industrija ključna za prehrambeni lanac. Svake godine na tržište dolaze novi proizvodi na bazi mlijeka. Mlijeko i mliječni proizvodi osjetljivi su na kvarenje zbog neželjene oksidacije, lipolize ili proteolize, što može uzrokovati neugodne okuse tijekom zagrijavanja ili skladištenja. (19) Laktaze sa sporednim djelovanjem arilsulfataze oslobađaju p-krezol u mlijeko tijekom skladištenja, dajući mu neugodan miris. Kada se laktaza koristi za izradu zaslađenog jogurta, sporedna aktivnost invertaze, koja cijepa saharozu, može promijeniti percepciju slatkoće. Stoga treba biti svjestan sporednih aktivnosti enzima koje mogu utjecati na promjenu okusa. Proteaza u preradi sira hidrolizira kazein, točnije kapa kazein, koji stabilizira funkciju micela sprječavajući zgrušavanje mlijeka. (20) Iako je kapa kazein zastupljen u malom postotku on je glavni stabilizator micela. Krajnja amino grupa kapa kazeina je hidrofobna, a krajnji C segment bogat ugljikohidratima i polarnim aminokiselinama je jako hidrofilan. Vjerojatno je kapa kazein koncentriran na površini micela i sa svojim hidrofilnim dijelom izložen je okolnoj vodenoj sredini što osigurava stabilnost.(21)

2. Teorijski dio

Industrijski enzimi izdvajaju se iz životinjskih i biljnih stanica te stanica mikroorganizama. Ljudi često uzimaju enzime kako bi im olakšali probavu i smanjili neželjene posljedice. Primjerice, proteaze poput papaina ili bromelaina koje se mogu nalaziti u voću. Komercijalni probavni enzimi uključuju laktazu, α -galaktozidaze, dekstranazu i lakazu. Međutim, propisi o enzimima specifični za pojedine zemlje i status genetski modificiranih enzima dva su problema na tržištu zdravstvene skrbi (GM enzimi). Proteinsko inženjerstvo zamjenjuje aminokiseline u genetskim modificiranim (GM) enzimima kako bi se poboljšala njihova stabilnost i specifičnost.

Ta metoda povećava produktivnost i prirodna je. GM enzimi dopušteni su za preradu hrane, ali ne i kao dodaci prehrani. (22)

2.3. Matematičko modeliranje

Matematičko modeliranje je postupak opisivanja realnog sustava matematičkim jednadžbama s ciljem razvoja i uporabe matematičkog modela za kasnije analize, projektiranja i optimiranja sustava za koji je model izrađen. U modelu mogu postojati različiti tipovi varijabli, pa tako one mogu biti: ulazne i izlazne, zavisne i nezavisne, varijable stanja i slučajne varijable. Budući da može biti više varijabli unutar svakog od navedenih tipova, varijable uobičajeno predstavljamo vektorima. Modeli se sastoje od varijabli, koeficijenata i matematičkih operatora.

(23) Matematički modeli, posebno u kombinaciji s modernim računalnim tehnikama, pokazuju se vrlo učinkovitim u traženju optimalnih uvjeta rada i stvaranju optimalnog mikrookoliša za biokatalizator kako bi se osigurala značajna produktivnost. Stoga je proučavanje teorijskog modela enzimskog reakcijskog sustava značajno prilikom industrijske primjene biokatalizatora.

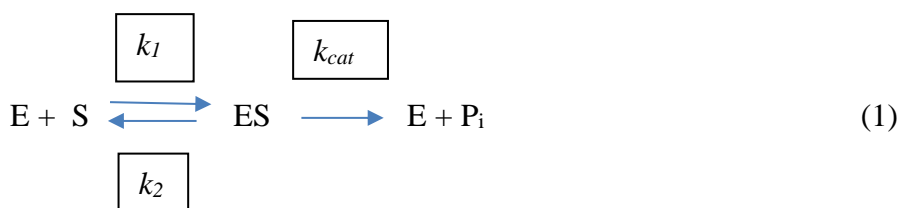
(24) U područjima kao što su razvoj lijekova, klinička dijagnoza i biotehnoška istraživanja prikupljanje podataka o kinetičkim parametrima enzima su ključna. (25)

2.3.1. Michaelis-Menteničina kinetika

Kinetika enzima važna je za znanost i tehnologiju jer omogućuje razvoj matematičkih modela za djelovanje enzima i kinetičkih modela za dizajn i izvedbu reaktora. Brzine enzimske kinetike reakcije uvijek se odnose na početne brzine reakcije, gdje je izražen maksimalni katalitički potencijal enzima i mnogi čimbenici koji na njega utječu (konverzija supstrata, nakupljanje inhibicijskih produkata, inaktivacija enzima, reverzna reakcija) nisu relevantni. To sve utječe na maksimalni katalitički potencijal. (2) Henri je početkom 20. stoljeća iznio teoriju da

2. Teorijski dio

koncentracija supstrata utječe na kinetiku enzima. Objasnio je da enzim i supstrat reverzibilno reagiraju i stvaraju aktivni međuprodukt koji se razgrađuje kako bi nastao proizvod. Nekoliko godina kasnije, Michaelis i Menten (1913.) predložili su prvu formalnu hipotezu za enzimsku katalizu temeljenu na Henrijeva dva uzastopna koraka: supstrat je zarobljen u aktivnom mjestu enzima, a ostaci aminokiselina na tom mjestu kemijski ga obrađuju kako bi ga transformirali u produkt, koji se zatim oslobađa kako bi enzim bio slobodan za sljedeću katalitičku reakciju. Prikaz reakcije pretvorbe supstrata S u produkt P_i (26) dan je jednadžbom (1).



Jednadžba (2) prikazuje promjenu početne brzine reakcije (v) s koncentracijom supstrata (s), gdje je K Michaelisova konstanta, dok je V maksimalna brzina reakcije:

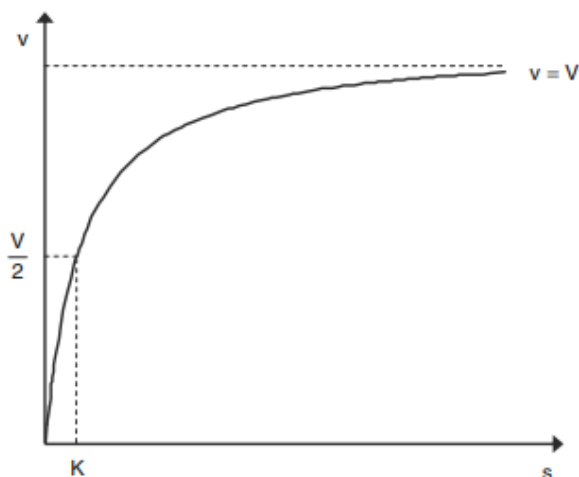
$$v = \frac{V \times s}{K + s} \quad (2)$$

Michaelisov i Menteničin prijedlog (pseudo) ravnoteže navodi da je korak vezanja supstrata brži od razgradnje kompleksa enzim-supstrat (ES) u produkt, tako da je reakcija stvaranja ES-a i njegove razgradnje u ravnoteži. K (Michaelisova konstanta) je konstanta disocijacije, a K_{eq} je konstanta ravnoteže. Katalitička konstanta enzima (k_{cat}) može se izraziti u različitim jedinicama ovisno o tome kako je koncentracija enzima izražena (mol L^{-1} ; g L^{-1} ; U L^{-1}).

Kinetičke parametre potrebno je eksperimentalno odrediti kako bi se dobili prihvatljivi izrazi brzine reakcije koji će se koristiti za dizajn ili procjenu učinkovitosti enzimskih reaktora. Postoji nekoliko metoda za određivanje kinetičkih parametara, a većina ih se temelji na početnim mjerenjima brzine pri različitim koncentracijama supstrata; alternativno se mogu odrediti iz vremenskog tijeka enzimske reakcije. Za određivanje brzine reakcije na temelju metode početnih brzina reakcije provodi se niz eksperimenata u kojima se početne brzine reakcije mjere pri različitim koncentracijama supstrata.

Michaelis–Menteničina jednadžba (2) je hiperbolična što se lako može zaključiti iz:

$$V \times K = (K + s) \times (V - v) \quad (3)$$

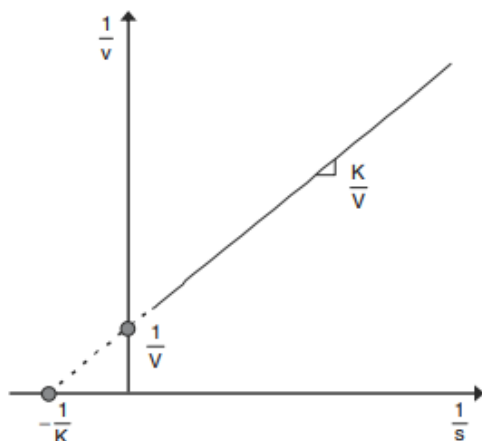


Slika 3. Grafički prikaz Michaelis-Menteničine jednadžbe za ireverzibilnu pretvorbu supstrata S u produkt P (2)

Kada je koncentracija supstrata jednaka njegovoj konstanti disocijacije, početna brzina reakcije jednaka je polovici njenog maksimalnog iznosa što se može uočiti na slici 3.

2.3.2. Linearizacija Lineweaver-Burk dijagrama

Većina metoda određivanja kinetičkih parametara koristi linearizaciju. Lineweaver-Burk dijagrami predlažu nekoliko linearnih korelacija.(2) Kao što je prikazano na slici 4., V i K se mogu lako odrediti iscrtavanjem recipročne vrijednosti početne brzine reakcije u odnosu na početnu koncentraciju supstrata. Odsječak na osi Y je recipročna vrijednost od V , a odsječak na osi X je negativna recipročna vrijednost od K . Ova popularna metoda je dosta kritizirana zbog svoje neravnomjerne distribucije pogreške. (19) Pri niskim vrijednostima v , mala pogreška u njihovom određivanju dovodi do velike pogreške vrijednosti $1/v$, dok je pri visokim vrijednostima v suprotno.



Slika 4. Lineweaver-Burke pravac za određivanje kinetičkih parametara (2)

2.3.3. Metoda početnih brzina

Ova metoda ovisi o mjerenju početnih brzina reakcije prije nego učinci nakupljenih produkata i učinci smanjenja koncentracije reaktanata otežavaju funkciju brzine. Metoda se zasniva na upotrebi osjetljivih analitičkih metoda za određivanje brzina pri malim stupnjevima reakcije. Ako je ukupna brzina dovoljno spora da tijekom mjerenja ne dođe do značajnih kemijskih promjena, početne količine svakog reaktanta mogu se mijenjati dok ostale održavaju konstantnima kako bi se pronašao odnos između početne brzine i početne koncentracije reaktanta. (27)

Svrhu ove metode najlakše je proučiti na primjeru stehiometrijske jednadžbe (3) koja glasi:



Potrebno je postaviti i jednadžbu (4) odgovarajućeg kinetičkog modela:

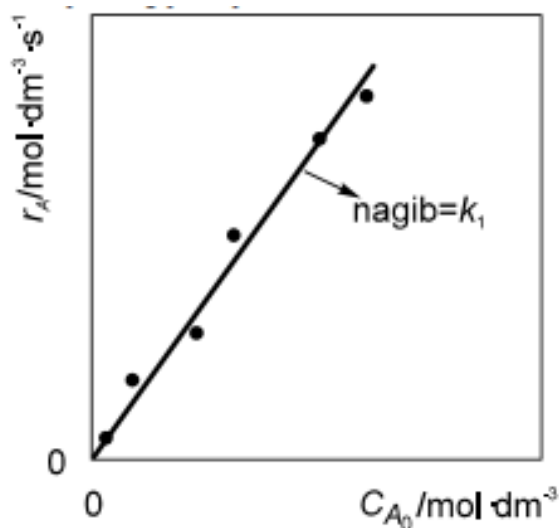
$$r_A = k_1 c_A - k_2 c_R^2 \quad (4)$$

Kako se mjerenje brzine reakcije u ovoj metodi provodi pri malim promjenama koncentracije, povratnu reakciju možemo zanemariti, stoga konstantna napredujuće reakcija ima izraz:

$$-\frac{dc_A}{dt} = -\frac{\Delta c_A}{\Delta t} = r_A = k_1 c_A \quad (5)$$

2. Teorijski dio

Kako bi dobili više mjernih točaka potrebno je provesti više serija pri različitim koncentracijama reaktanta A, no da se provjeri kinetički model potrebno je odrediti k_2 pomoću istovrsnih eksperimenata uz različite početne koncentracije reaktanta R. Također se konstanta k_1 u ovom primjeru može odrediti grafički kako je prikazano na slici 5.



Slika 5. Prikaz grafičkog određivanja k_1 pomoću nagiba pravca (28)

Jedna od glavnih prednosti ove metode je zapravo ušteda vremena, kojoj se pridaje malo značaja iako čak iznimno duge reakcije mogu bit proučavane u prihvatljivom vremenskom intervalu. (29) Glavna prepreka korištenja metode početnih brzina za određivanje reda reakcije je što se većina reakcija ionske izmjene i površinskog kompleksiranja odvijaju tako brzo da se početna brzina ne može točno odrediti prije nego obrnuta reakcija postane značajna. (27)

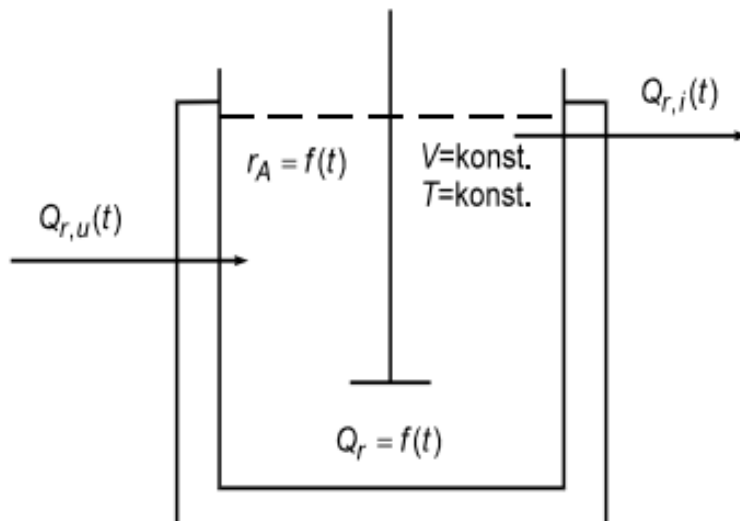
2.4. Bilancne jednadžbe i reaktori

2.4.1. Kotlasti reaktor

Prilikom provođenja reakcije u kotlastim reaktorima ne dolaze do izmjene reakcijske mase s okolinom, što znači da se radi o zatvorenom sustavu prikazanom na slici 6. Potrebno je ostvariti homogenost sustava što se postiže približno idealnim miješanjem. Rad se provodi u nestacionarnim uvjetima zbog toga što je kemijska reakcija koja se provodi promjenjiva s vremenom. (30) Parametri koji ovise o vremenu su: sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije i količina utrošene odnosno oslobođene topline prilikom kemijske reakcije. Temperatura ostaje nepromijenjena u vremenu. Sam reaktor je cilindar izrađen od stakla ili

2. Teorijski dio

plastike. (28) Treba odabrati najbolji materijal za smanjenje adsorpcije otopljene tvari na stijenke reaktora. Izbor materijala obično se temelji na otopljenoj tvari koja se proučava. Staklo je obično prikladnije za upotrebu s organskim otopljenim tvarima, a plastika je obično prikladnija za neke anorganske vrste. (27)



Slika 6. Prikaz idealnog kotlastog reaktora (28)

Matematički model kotlastog reaktora gdje se odvija samo jedna reakcija uz navedene pretpostavke čine bilanca množine tvari (komponenta A) i bilanca topline:

1. Bilanca tvari

Količina komponente A nestale kemijskom reakcijom u reaktorskom volumenu jednaka je akumulaciji komponente A u reaktorskom volumenu.

Matematički izraz za bilancu tvari koji čine članovi koji opisuju nastanak (nestanak) komponente A kemijskom reakcijom i član za akumulaciju:

$$r_A V = - \frac{dn_A}{dt} \quad (6)$$

Ako se množina tvari zamijeni s koncentracijom, dobije se sljedeća jednačba:

$$r_A V = - \frac{d(c_A V)}{dt} = -V \frac{dc_A}{dt} \quad (7)$$

$$r_A = - \frac{dc_A}{dt} \quad (8)$$

Nakon integriranja jednačbe (6), pod pretpostavkom da je volumen konstantan dobiju se jednačbe:

$$V \int_0^t dt = - \int_{n_{A0}}^{n_A} \frac{dn_A}{r_A} \quad (9)$$

$$t = - \frac{1}{V} \int_{n_{A0}}^{n_A} \frac{dn_A}{r_A} \quad (10)$$

2. Teorijski dio

Gore su prikazani matematički izrazi za bilance tvari komponente A u idealnom kotlastom reaktoru. Brzina reakcija, r_a , nalazi se pod znakom integrala zbog toga što je promjenjiva s vremenom.

2. Bilanca topline

Akumulacija topline u reaktorskom volumenu i jediničnom vremenu jednaka je sumi količini nastale (nestale) topline kemijskom reakcijom u reaktorskom volumenu i jediničnom vremenu i toplini koja se prenese u okolinu u jediničnom volumenu.

Matematički zapis za opću bilancu topline za cijeli volumen reaktora:

$$G_t c_p \frac{dT}{dt} = (-\Delta H_r) V r_A + U A_p (T - T_p) \quad (11)$$

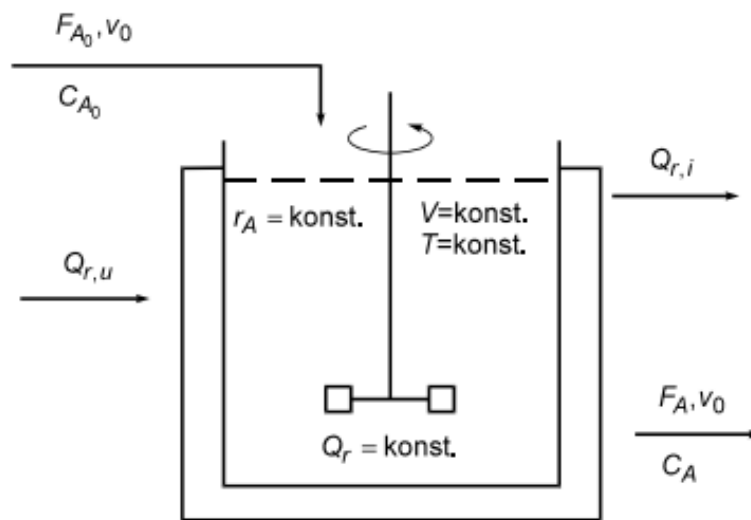
Prilikom izoternog rada, kada neće biti promjene temperature s vremenom, član za akumulaciju neće postojati:

$$(-\Delta H_r) V r_A = U A_p (T - T_p) \quad (12)$$

U jednadžbi (12) U označava ukupni koeficijent prijenosa topline, a A_s je ukupna površinu preko koje se izmjenjuje toplina. Temperaturni gradijent $T - T_p$ predstavlja razliku između temperature u reaktoru i temperature medija u plaštu za grijanje odnosno hlađenje reakcijske smjese u svrhu održavanja izoternih uvjeta. Član ΔH_r označava standardnu reakcijsku entalpiju definiranu stehiometrijskom jednadžbom po molu limitirajućeg reaktanta.

2.4.2. Protočno kotlasti reaktor

Tijekom provođenja reakcije u protočno kotlastom reaktoru dolazi do izmjene reakcijske smjese s okolinom, odnosno možemo reći da je on otvoreni sustav i njegov prikaz vidimo na slici 7. Reaktor radi stacionarno, odnosno ista količina mase ulazi i ista količina izlazi iz njega. Stacionarni rad nam govori da su veličine stanja unutar reaktora nezavisne o vremenu. Ostvaraju se dobra homogenost, unutar reaktora dolazi do miješanja sadržaja pa su vrijednosti veličine stanja nezavisne od položaja unutar njega. (28) Iako je način izrade sličan onom kotlastog reaktora, njega koristimo prilikom izvedbe reakcija u kapljevitoj i plinskoj fazi. Uvjetovana je izoternost zahvaljujući idealnom miješanju i stacionarnom radu, odnosno jednaka je temperature i po reaktorskom prostoru i po vremenu. (30) Tijekom rada reaktora neće doći do promjene gustoće unutar reakcijske smjese i samim time volumen reakcijske smjese ostaje stalan.



Slika 7. Prikaz idealnog protočnog kotlastog reaktora (28)

Matematički model za protočno kotlasti reaktor u sustavu gdje se provodi jedna nezavisna reakcija sadrži bilancu množine tvari i bilancu topline:

1. Bilanca tvari

Razlika množine komponente A unesene u reaktorski volumen u jediničnom vremenu i množine komponente A iznesene iz reaktorskog volumena u jediničnom vremenu jednaka je množini komponente A nestale kemijskom reakcijom u reaktorskom volumenu i jediničnom vremenu.

Matematički zapis komponente A glasi:

$$F_{A_0} - F_A = r_A V \quad (13)$$

Radi se o homogenom sustavu, stoga se bilanca može zapisati za čitav reaktor kao jednu cjelinu.

Također se gore navedena jednadžba može zapisati pomoću drugih jedinica:

$$F_A = F_{A_0}(1 - X_A) \quad (14)$$

Za množinu komponente A iznesene iz reaktorskog volumena u jediničnom vremenu vrijedi izraz (15):

$$F_A = c_A v_0 \quad (15)$$

Za koncentraciju komponente A iznesene iz reaktorskog volumenu u jediničnom vremenu vrijedi izraz (16):

$$c_A = c_{A_0}(1 - X_A) \quad (16)$$

2. Teorijski dio

Množina komponente A unesene u reaktorski volumen u jediničnom vremenu može se prikazati izrazom (17):

$$F_{A0} = c_{A0}v_0 \quad (17)$$

Uvrštavanjem navedenih izraza u jednadžbu (14), dobije se novi oblik jednadžbe:

$$\frac{V}{v_0} = \frac{c_{A0}X_A}{r_A} \quad (18)$$

Omjer $\frac{V}{v_0}$ naziva se prostornim vremenom zadržavanja, τ [s] i označava vrijeme u kojemu jedan reaktorski volumen (V) uđe i izađe iz reaktora

2. Bilanca topline

Zbroj toplina dovedenih u reaktor u jediničnom vremenu i topline oslobođene kemijskom reakcijom u jediničnom vremenu jednak je toplini odvedenoj iz reaktora u jediničnom vremenu i toplini prenijetoj u okolinu u jediničnom vremenu.

Matematički zapis za bilancu topline:

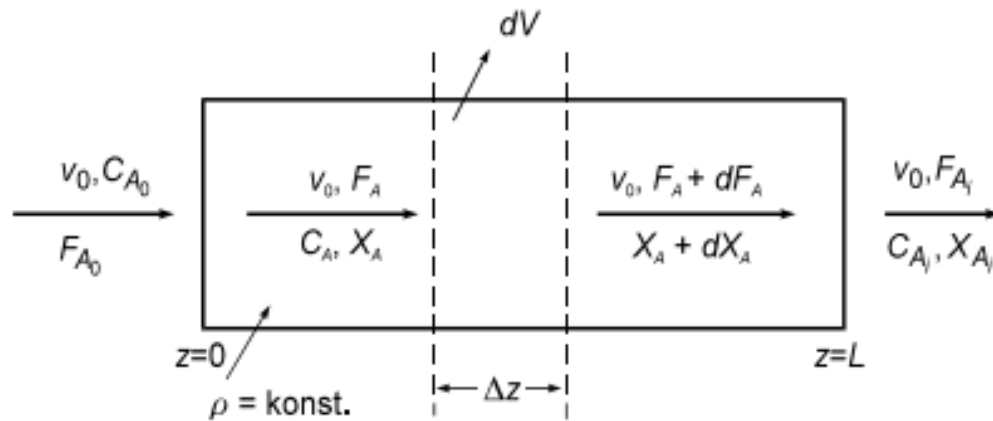
$$Q_{m,0}c_p(T_u - T) + \Delta H_r V r_A - U A_p (T - T_p) = 0 \quad (19)$$

Kako se reakcija provodi pri izotermnom radu, odnosno temperatura na ulazu je jednaka onoj na izlazi i nema promjena u entalpiji, dobivamo novi izraz:

$$\Delta H_r V r_A = U A_p (T - T_p) \quad (20)$$

2.4.3. Cijevni reaktor

Cijevni reaktor je, kao i protočno kotlasti reaktor, otvoreni sustav i prikazan je na slici 8. Kod njega je bitno naglasiti približno idealno strujanje, što nam govori da u pravcu protjecanja fluida (aksijalnom smjeru) ne postoji miješanje unutar reakcijske smjese. (28) U modeliranju cjevastog reaktora pretpostavljamo da koncentracija kontinuirano varira u aksijalnom smjeru kroz reaktor. Posljedično, brzina reakcije, koja je funkcija koncentracije za sve osim reakcija nultog reda, također će varirati aksijalno. Diferencijalni volumen putujući od ulaza do izlaza provede određeno vrijeme u kojem se promijeni sastav reakcijske smjese. (30) Cijevni reaktori se najčešće koriste za reakcije u plinskoj fazi. Zbog svoje jednostavne izvedbe u obliku cijevi i činjenice da ne trebaju dodatni uređaji za miješanje često se koristi u industriji. Obično se koristi u kemijskoj industriji za proizvodnju većih količina produkta stalnih svojstava primjerice za proizvodnju amonijaka, sumporne kiseline te u naftno petrokemijskoj industriji. (31)



Slika 8. Prikaz idealnog cijevnog reaktora (28)

Matematički model cijevnog reaktora čine bilanca tvari i bilanca topline:

1. Bilanca tvari

Razlike množine komponente A koja uđe u diferencijalni volumen u jediničnom vremenu i množine komponente A koja izađe iz diferencijalnog volumena u jediničnom vremenu jednaka je množini komponente A koja nestane kemijskom reakcijom u diferencijalnom volumenu u jediničnom vremenu.

Matematički zapis komponente A za diferencijalni volumen reaktora glasi:

$$F_A - (F_A + dF_A) - r_A dV = 0 \quad (21)$$

Odnosno

$$-dF_A - r_A dV = 0 \quad (22)$$

Gore navedena jednačba vrijedi za idealni cijevni reaktor, no može se prevesti i u druge oblike:

$$dF_A = F_{A0} dX_A \quad (23)$$

Izraz se uvrštava u jednačbu (22) te se dobije sljedeća jednačba:

$$\frac{dV}{F_{A0}} = \frac{dX_A}{r_A} \quad (24)$$

Množina komponente A prije ulaska u diferencijalni volumen u jediničnom vremenu u aksijalnom smjeru dana je jednačbom:

$$F_{A0} = c_{A0} v_0 \quad (25)$$

Diferencijalni volumen prikazan je jednačbom:

$$dV = A_s dz \quad (26)$$

Uvrštavanjem gore navedenih jednačbi u izraz (24) dobije se novi oblik jednačbe:

$$\frac{dX_A}{dz} = -\frac{A_s r_A}{F_{A0}} = -\frac{r_A}{c_{A0} u} \quad (27)$$

2. Teorijski dio

Dobijemo konačni izraz ovisnosti brzine reakcije o položaju po presjeku cijevnog reaktora:

$$r_A = -u \frac{dc_A}{dz} \quad (28)$$

Ako uzmemo u obzir da je prostorno vrijeme zadržavanja (τ):

$$\tau = \frac{V}{v_o} = \frac{Vc_{Ao}}{F_{Ao}} \quad (29)$$

Pomoću gore navedenih izraza dobivamo novi oblik jednadžbe za bilancu tvari:

$$r_A = \frac{dc_A}{d\tau} \quad (30)$$

$$\tau = \frac{V}{v_o} = c_{Ao} \int_0^X \frac{dX_A}{r_A} = - \int_{c_{Ao}}^{c_A} \frac{dc_A}{r_A} \quad (31)$$

2. Bilanca topline

Toplina nastala (nestala) kemijskom reakcijom u diferencijalnom volumenu i jediničnom vremenu jednaka je zbroju akumulacije topline u diferencijalnom volumenu i jediničnom vremenu i toplini prenijetoj kroz diferencijalnu površinu u okolinu u jediničnom vremenu.

Matematički zapis ukupne bilance topline za cijevni reaktor glasi:

$$Q_{m,0}c_p dT = \Delta H_r dV r_A + U dA_p (T - T_p) \quad (32)$$

Kako reaktor radi izotermno, neće doći do razlike u temperaturi na ulazu i izlazi pa se taj član iz jednadžbe uklanja:

$$\Delta H_r dV r_A = U dA_p (T - T_p) \quad (33)$$

oznaka dA_p označava diferencijalnu površinu prijenosa topline kroz stijenku reaktora, a ta površina jednaka je onoj valjka:

$$dV = A_s dz = r^2 \pi dz \quad (34)$$

$$dA_p = 2r\pi dz \quad (35)$$

Uvrštavanjem izraza (35) u jednadžbu (33), dobije se novi oblik jednadžbe:

$$\Delta H_r r_A = \frac{2}{r} U (T - T_p) \quad (36)$$

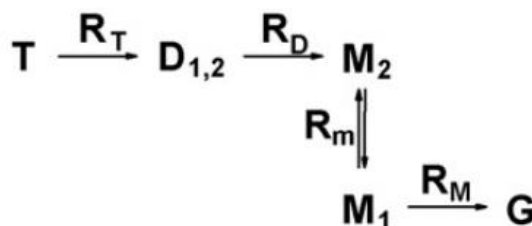
U stvarnosti je teško ostvariti izotermnost procesa jer dolazi do nastanka temperaturnog gradijenta između stijenki reaktora i okoline po dužini reaktora.

3. PREGLEDNI DIO

3.1. Primjeri matematičkih modela za biokatalitičke reakcije

3.1.1. *Kinetički model alkoholize 1,3-specifičnih triacilglicerola katalizirane lipazama*

Pilarek i suradnici (32) proučavali su reakciju 1,3-specifične alkoholize triacilglicerola čija je shema reakcije prikazana na slici 9. Pretpostavlja se nepovratnost cijepanja acilnih veza u gliceridima, reverzibilna izomerizacija monoglicerida i ireverzibilna deaktivacija enzima. Ping pong Bi Bi mehanizam s kompetitivnom inhibicijom alkohola primijenjen je za opisivanje brzine cijepanja acilnih veza. Ping pong reakcije su one u kojima produkti nastaju prije nego li su svi supstrati dodani.



Slika 9. Shema reakcije 1,3-specifične alkoholize triacilglicerida (32)

Shema reakcije na slici 9. prikazuje da 1,3 specifične lipaze kataliziraju cijepanje acilnih veza na mjestima 1 i 3 molekule triacilglicerola (T). Brzina cijepanja jedne acilne veze u trigliceridu jednaka je R_T . U triacilglicerolu, postoje dvije slobodne veze stoga je brzina pretvaranja triglicerida jednaka $2R_T$. Tijekom alkoholize nastaje jedna molekula diacilglicerola supstituirana na mjestima 1 i 2 ($D_{1,2}$). Brzina alkoholize diglicerida opisuje se kao R_D . Nastaje i jedna molekula monoglicerida, odnosno 2-monoacilglicerol (M_2). Dolazi do izomerizacije monoglicerida iz M_2 u 1-monoacilglicerol (M_1). Brzina izomerizacije monoglicerida opisana je brzinom reakcija R_m . r_{max} je maksimalna brzina cijepanja acilne veze i ovisna je o koncentraciji enzima. Kao krajnji produkt reakcije nastaje glicerol (G) dobiven alkoholizom 1-monoacilglicerola brzinom reakcije R_M .

3. Pregledni dio

Bilancne jednadžbe komponenti korištene u radu prikazane su jednadžbama 37-40:

$$\frac{d}{dt} C_T = -2R_T \quad (37)$$

$$\frac{d}{dt} C_{D_{1,2}} = 2R_T - R_D \quad (38)$$

$$\frac{d}{dt} C_{M_1} = R_m - R_M \quad (39)$$

$$\frac{d}{dt} C_{M_2} = R_D - R_m \quad (40)$$

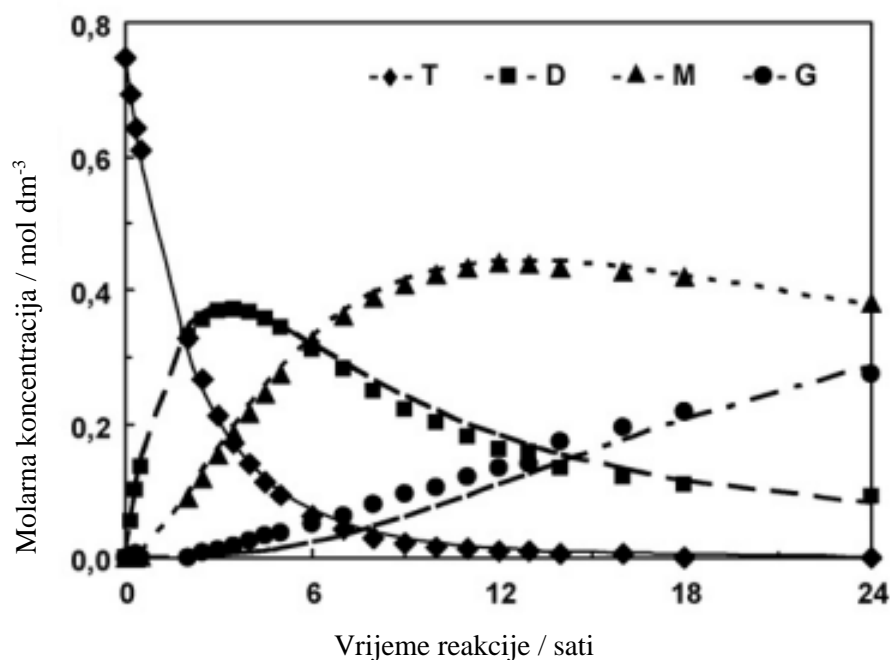
Kinetičke jednadžbe pojedinačnih ireverzibilnih reakcija razvijene su iz kinetike Ping Pong Bi Bi s kompetitivnom inhibicijom alkoholom i predstavljene su jednadžbama (41-43):

$$R_T = \frac{r_{max}}{1 + \left(\frac{K_T}{C_T}\right) + \left(\frac{K_A}{C_A}\right) + \left(\frac{k_i C_A}{C_T}\right)} \quad (41)$$

$$R_D = \frac{r_{max}}{1 + \left(\frac{K_T}{C_{D_{1,2}}}\right) + \left(\frac{K_A}{C_A}\right) + \left(\frac{k_i C_A}{C_{D_{1,2}}}\right)} \quad (42)$$

$$R_T = \frac{r_{max}}{1 + \left(\frac{K_T}{C_{M_1}}\right) + \left(\frac{K_A}{C_A}\right) + \left(\frac{k_i C_A}{C_{M_1}}\right)} \quad (43)$$

U enzimskoj alkoholizi dvaju triacilglicerola Pilarek i suradnici usredotočili su se na triacetin (glicerol triacetat) i trikaprilin (glicerol trikaprilat). U ovim trigliceridnim molekulama glicerol je zamijenjen različitim masnim kiselinskim ostacima, primjerice octenim ili kaprilnim .



Slika 10. Usporedba izopropanolize trikaprilina pri temperaturi od 50°C i prikaz simulacijskih i eksperimentalnih podataka

3. Pregledni dio

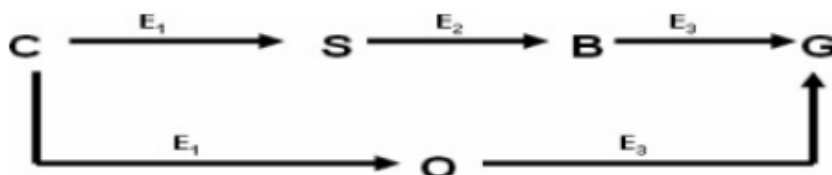
Slika 10. prikazuje primjer rezultata modela alkoholize 1,3-specifičnih triacilglicerola. Točke prikazuju eksperimentalne rezultate, dok linije predstavljaju simulacijski model. Ostvareno je podudaranje rezultata između modela i eksperimentalnih podataka. Koncentracija trikaprilina (T) tijekom reakcije pada na nulu što potvrđuje pretpostavku da je reakcija alkoholize ireverzibilna. Koncentracija monoglicerida se neće smanjiti na nulu, pretpostavljeno je da je to zbog deaktivacije enzima. Kako bi se to dokazalo dodane su određene količine triglicerida u smjesu nakon 5 sati i 24 sata. Rezultati su pokazali da se koncentracija trikaprilina dodanog nakon 5 sati reakcije smanjuje se sporije nego u prvoj reakciji, dok se koncentracija triglicerida dodana nakon 24 sata gotovo nije smanjila čime je dokazana deaktivacija enzima.

3.1.2. Modeliranje unutarnje kinetike enzimске hidrolize

Postoje dvije vrste pristupa modeliranju, matematičko i mehanističko modeliranje. Matematički modeli povezuju faktore pomoću empirijskih korelacija, bez ikakvog uvida u temeljne mehanizme. Lako ih je razviti i korisni su u karakterizaciji enzima i pripremi supstrata. Mehanistički modeli razvijeni su iz reakcijskih mehanizama, razmatranja prijenosa mase i drugih fizičkih parametara koji utječu na opseg hidrolize. (33)

Peri i suradnici (33) koristili su pristup u više koraka kako bi istražili intrinzičnu kinetiku mješavine enzima celuloze koju čine endoglukanaze (E_1), egzoglukanaze (E_2) i β -glukozidaze (E_3) tijekom hidrolize nekristalne celuloze (NCC). Reakcije uključene u enzimsku hidrolizu celuloze prikazane na slici 10. su:

1. celuloza (C) u celobiozu (B)
2. celobioza (B) u glukozu (G)
3. celuloza (C) u topljive celuloooligosaharide (O)
4. topljivi celuloooligosaharidi (O) u glukozu (G)



Slika 10. Shema reakcije enzimске hidrolize celuloze (33)

Kinetičke jednadžbe opisane Michaelis-Menteničinom kinetikom za komponente enzimске hidrolize celuloze prikazane su jednadžbama 44-47:

3. Pregledni dio

$$r_1 = \frac{k_1 CE}{(K_c + C) \left(1 + \frac{B}{K_{BI}} + \frac{O}{K_{OI}} + \frac{G^3}{K_{GI}^3}\right) (E + K_E)} \quad (44)$$

$$r_2 = \frac{k_2 BE}{(K_B \left(1 + \frac{G}{K_{GI}}\right) + B) (E + K_E)} \quad (45)$$

$$r_3 = \frac{k_3 CE}{(K_c + C) \left(1 + \frac{B}{K_{BI}} + \frac{O}{K_{OI}} + \frac{G^3}{K_{GI}^3}\right) (E + K_E)} \quad (46)$$

$$r_4 = \frac{k_2 OE}{(K_B \left(1 + \frac{G}{K_{GI}}\right) + B) (E + K_E)} \quad (47)$$

U ovim kinetičkim jednadžbama k_i su pojedinačne konstante brzine reakcije izražene u g/g*min. K_C , K_B , K_O i K_E su konstante zasićenja izražene u g/L. K_{BI} , K_{OI} i K_{GI} su konstante inhibicije izražene u g/L za celobiozu, topljive celuloooligosaharide i glukozu. K_E je konstanta ravnoteže desorpcije izražena u g/L za celulozu s površine NCC-a, dok su C , O , B i G koncentracije u g/L za NCC, topljive celuloooligosaharide, celobiozu te glukozu.

Bilancne jednadžbe svih komponenti uključenih u reakciju prikazane su izrazima 48-51 :

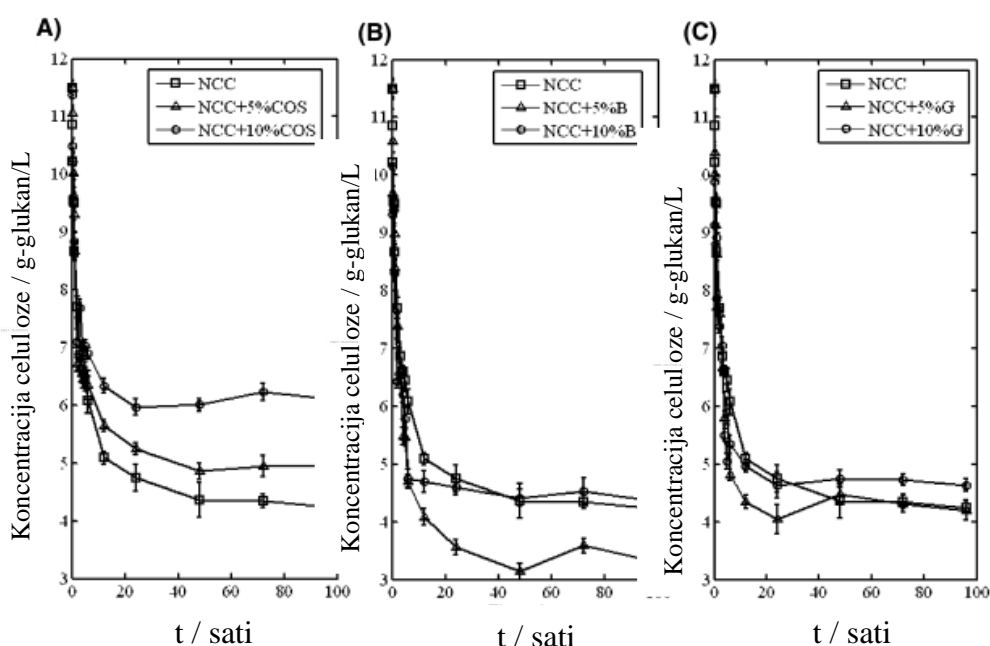
$$\frac{dC}{dt} = -r_1 - r_3 \quad (48)$$

$$\frac{dO}{dt} = r_3 - r_4 \quad (49)$$

$$\frac{dB}{dt} = r_1 - r_2 \quad (50)$$

$$\frac{dG}{dt} = r_2 + r_4 \quad (51)$$

Kinetički modeli predstavljeni jednadžbama 44-47 mogu objasniti reakciju enzimske hidrolize celuloze samo u početnim fazama dok kasnije faze ne opisuju dobro. Ovo istraživanje spajanjem eksperimentalnih metoda s matematičkim modeliranjem i simulacijskom analizom naglašava promjenjivu dinamiku reakcije šaržne hidrolize celuloze, na koju utječu vezanje enzima na supstrat i kompetitivna/nekompitivna inhibicija produktom.



Slika 11. Enzimska hidroliza NCC supstrata s početnim dodatkom (A) topivih celuloooligosaharida (COS), (B) celobioze (B) i (C) glukoze (G).

Za proučavanje pojedinačnih doprinosa celuloooligosaharida, celobioze i glukoze na inhibiciju celuloze proveden je niz eksperimenata enzimske hidrolize na NCC-u s dodatkom celuloooligosaharida, celobioze ili glukoze kao supstrata. Slika 11. pod A prikazuje hidrolizu celuloze u tri različita slučaja: s čistim NCC, s dodatkom 5% celuloooligosaharida i dodatkom 10% celuloooligosaharida. Na slici 11. pod A vidljivo je da je kod viših početnih koncentracija oligomera početna reakcija hidrolize trajala relativno kraće i rezultirala manjom konverzijom nakon provedenih 96 sati hidrolize. Iz ovih opažanja može se zaključiti da oligomeri snažno inhibiraju reakciju hidrolize. Pod B i C na slici 11. prikazane su za različite početne sastave supstrata (NCC). Učinak vanjskih dodataka, celobioze i glukoze (Slika 11. B i C) nije moguće razlikovati jer se pokazalo da su brzina i doseg hidrolize s povećanjem dodataka celobioze ili glukoze donekle nasumični. Razlog tomu može biti što zajedno s razgradnjom celuloze, ovi dodaci mogu potaknuti neke međukorake u hidrolizi celuloze pri čemu može doći do nastanka glukoze. Početne visoke koncentracije glukoze ili celobioze mogu inhibirati nastajanje topivih celuloooligomera i posljedično mogu smanjiti inhibiciju celuloze što će rezultirati većim dosegom hidrolize.

3. Pregledni dio

3.1.3. Matematički model 1,4- adicije α -ketoglutarne kiseline na akrilonitril uz MenD

MenD je enzim poznat kao sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (SEPHCHC) te je ovisan o tiamin difosfatu (ThDP) koji se nalazi u biosintetskom putu menakinona čiji se razvoj prati posljednjih 30 godina. Osim svog potencijala kao meta lijeka, MenD je pronašao primjenu kao biokatalizator zbog svoje sposobnosti da katalizira reakcije 1,4-adicije. Dodavanje aktiviranih aldehida ili ketokiseline α,β nezasićenim karbonilnim supstratima naziva se Stetterova reakcija. (34)

Sudar i suradnici (35) su proučavali kinetiku 1,4- adicije α -ketoglutarne kiseline na akrilonitril uz katalizator MenD. Shema reakcije prikazana je na slici 12. Kinetički model reakcije pojednostavljen je na dvosupstratnu Michaelis–Menteničinu kinetiku gdje brzina reakcije linearno ovisi o koncentraciji akrilonitrila. Kinetika reakcije ispitana je pomoću metode početne brzine reakcije. Utjecaj koncentracije svakog reakcijskog spoja na početnu brzinu reakcije ispitan je održavanjem koncentracije drugih spojeva konstantnim. Matematički model za 1,4-adiciju α -ketoglutarne kiseline na akrilonitril sastoji se od kinetičke jednadžbe i bilance tvari. Bilance tvari 53-63 postavljene su za dva tipa reaktora, za kotlasti reaktor i reaktor s dotokom supstrata. Razlog tomu je sprječavanje opadanja operacijske stabilnosti enzima te inhibicija enzima. (35)

Kinetički model prikazan je jednadžbom (52):

$$r = \frac{k \times f \times y_{MenD} \times c_{\alpha-KG}}{K_m^{\alpha-KG} + c_{\alpha-KG}} \times c_{AN} \times \frac{1}{1 + \frac{c_{inhibitor}}{K_i^{inhibitor}}} \quad (52)$$

Bilanca tvari za kotlasti reaktor prikazane su jednadžbama 53-55:

$$\frac{dc_{\alpha-KG}}{dt} = -r \quad (53)$$

$$\frac{dc_{AN}}{dt} = -r - r_1 \quad (54)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = r \quad (55)$$

Bilanca tvari za kotlasti reaktor s dotokom supstrata opisane su jednadžbama 56-63:

$$\frac{dc_{\alpha-KG}}{dt} = \frac{1}{V} \times \left(-c_{\alpha-KG} \times \frac{dV}{dT} + c_{\alpha-KG,0} \times q_1 \right) - r \quad (56)$$

$$\frac{dc_{AN}}{dt} = \frac{1}{V} \times \left(-c_{AN} \times \frac{dV}{dT} + c_{AN,0} \times q_2 \right) - r - r_1 \quad (57)$$

$$\frac{dc_P}{dt} = \frac{1}{V} \times \left(-c_P \times \frac{dV}{dT} \right) + r \quad (58)$$

$$\frac{dy_{MenD}}{dt} = \frac{1}{V} \times \left(-\gamma_{MenD} \times \frac{dV}{dT} + c_{MenD,0} \times q_1 \right) \quad (59)$$

$$\frac{dc_{inhibitor}}{dt} = \frac{1}{V} \times \left(-c_{inhibitor} \times \frac{dV}{dT} + c_{inhibitor} \times q_2 \right) \quad (60)$$

$$\frac{dc_{ThDP}}{dt} = \frac{1}{V} \times \left(-c_{ThDP} \times \frac{dV}{dT} + c_{ThDP,0} \times q_1 \right) \quad (61)$$

3. Pregledni dio

$$\frac{dc_{Mg^{2+}}}{dt} = \frac{1}{V} \times \left(-c_{Mg^{2+}} \times \frac{dV}{dT} + c_{Mg^{2+},0} \times q_1 \right) \quad (62)$$

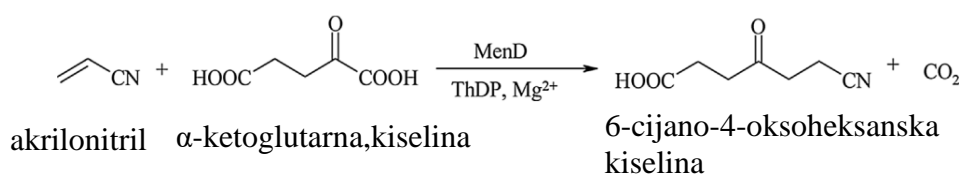
$$\frac{dV}{dt} = q_1 + q_2 \quad (63)$$

Za ove kinetičke i bilancne jednadžbe vrijedi da je k konstanta brzine reakcije prvog reda u min^{-1} . Molarne koncentracije (c) α -ketoglutarne kiseline (α -KG), akrilonitrila (AN), inhibitora, tiamin difosfata (ThDP), Mg^{2+} , 6-cijano-4-oksoheksanske kiseline (P) izražene su u mM. Konstanta inhibicije, odnosno k_i također je izražena u mM. Masena koncentracija (γ) za MenD je u mg ml^{-1} . Volumni protok (q) iskazan je u ml min^{-1} . Volumni protok akrilonitrila u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata (q_1) i volumni protok drugog dodatka u eksperimentu provedenom kotlastom reaktoru s dotokom supstrata koji sadrži ThDP, α -KG i Mg^{2+} (q_2) izraženi su u ml min^{-1} .

Sudar i suradnici (35) proveli su dva eksperimenta u šaržnom reaktoru pri različitim početnim uvjetima i reaktorima različitih volumena kako bi se procijenila mogućnost ponovne uporabe enzima i utjecaj akumulacije produkta na inhibiciju enzima MenD. Matematički model dobro je simulirao podatke iz oba eksperimenta. Stoga nije primijećena inhibicija produktom, a enzim se može ponovno koristiti nekoliko dana bez gubitka operacijske stabilnosti. Razvijeni matematički model također je korišten u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata. Odlučeno je da se vrijeme reakcije u ovom eksperimentu treba skratiti i strategija dotoka akrilonitrila prilagođena je održavanju koncentracije akrilonitrila ispod 100 mM tijekom eksperimenta. α -KG (α -ketoglutarina kiselina) se u reaktor dodaje kao drugi reaktant. U isto vrijeme u reaktor su dodani ThDP i Mg^{2+} kako bi se njihova koncentracija održala na početnoj razini. Rezultati su pokazali da je 200 mM produkta dobiveno u samo 12 sati s iskorištenjem produkta većim od 90 %. Ovo se iskorištenje može usporediti s eksperimentima šaržnog reaktora s početnom koncentracijom AN ispod 100 mM. Ista koncentracija produkta može se dobiti u šaržnom reaktoru korištenjem koncentracije supstrata od približno 500 mM prilikom čega će doći do 42 %-tnog iskorištenja produkta nakon 24 sata.

Reakcijski produkt 6-cijano-4-oksoheksanska kiselina može se lako izolirati iz reakcijske smjese te otvara novi put sintezi kemikalija koje se mogu dobiti iz ovog produkta.

3. Pregledni dio

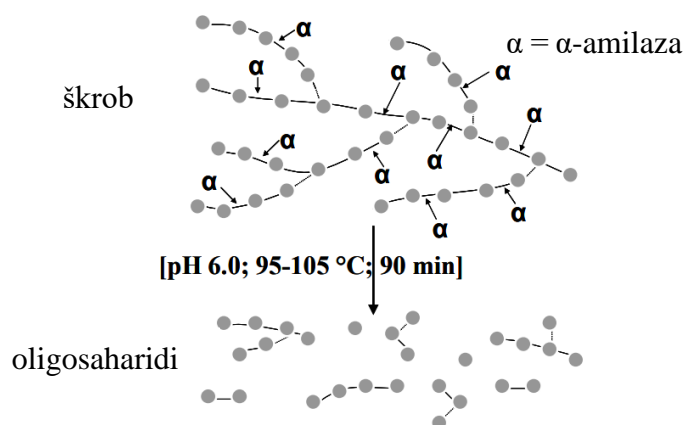


Slika 12. Shema 1,4-adicije α -ketoglutarne kiseline na akrilonitril uz MenD

3.1.4. Matematičko modeliranje hidrolize škroba katalizirane amilazom

Enzimska hidroliza škroba jedna je od najvažnijih enzimskih reakcija koja se provodi u industrijskim procesima. Provodi se uglavnom u šaržnom reaktoru postupkom koji se sastoji od dva koraka. Tijekom prvog koraka, ukapljivanja, škrob se otapa u vodi i djelomično hidrolizira u oligosaharide pomoću α -amilaze. U drugom koraku, saharifikaciji, enzimi za saharificiranje (glukoamilaza, pululanaza) pretvaraju ukapljeni škrob u konačne produkte koji mogu biti specifični oligosaharidi, glukoza, maltoza ili mješavina hidrolizata nazvanih maltodekstrini. (36) Enzimi koji se koriste za hidrolizu škroba (amilaza ili amilolitički enzimi) privukli su veliku pozornost zbog biotehnoloških pristupa i ekonomske iskoristivosti. Postoji nekoliko vrsta amilaza, a najčešće korištene u industriji su α -amilaze, β -amilaze i glikoamilaze. Amilaze se nalaze u širokom spektru organizama, uključujući biljke, životinje i mikroorganizme, pri čemu su prikladan izvor za proizvodnju enzima u industrijskim procesima zbog lakoće uzgoja. α -Amilaza je endoamilaza koja katalizira razgradnju škroba u maltozu, maltotriozu i glukoza. Izolirana iz mikrobnih izvora posjeduje jedinstvena svojstva termostabilnosti što ju čini korisnim alatom u industriji deterdženata. (37)

U radu Vrsalović Presečki i suradnika (36) koncentrirali su se na proces ukapljivanje odnosno na prvi korak hidrolize škroba prikazan na slici 13.



Slika 13. Proces ukapljivanja tokom hidrolize škroba

3. Pregledni dio

U svrhu hidrolize škroba katalizirane amilazom korištene su dvije komercijalne α -amilaze iz *Bacillus licheniformis*, poznate kao Termamyl i Liquozyme. Ispitana je pH i temperaturna ovisnost aktivnosti oba enzima.

Kinetički parametri Michaelis-Menteničinih jednadžbi (K_m , V_m i K_i) procijenjeni su iz eksperimentalnih podataka korištenjem metode početne brzine reakcije. Početne brzine reakcije definirane su kao smanjenje koncentracije škroba po minuti tijekom prvih pet minuta hidrolize. Brzina reakcije hidrolize škroba katalizirana α -amilazama opisana je pomoću Michaelis-Menteničinih jednadžbi s nekompetitivnom inhibicijom produktom prikazana jednadžbom (64). Bilance tvari za hidrolizu škroba 65-70 u šaržnom i šaržnom reaktoru s dotokom temelje se na pretpostavkama da se sadržaj reaktora smatra homogenim u aksijalnom i radijalnom smjeru te da bilanca energije nije uzeta u obzir jer je reaktor termostatiran. Kinetička mjerenja dokazala su da reakcija katalizirana s oba enzima nije snažno inhibirana produktom.

$$r = \frac{\varphi_{\alpha\text{-amilaza}} \times V_m \times c_{\text{škrob}}}{K_m + c_{\text{škrob}} \times \left(1 + \frac{c_{\text{glukoza}}}{K_i^{\text{glukoza}}} + \frac{c_{\text{maltoza}}}{K_i^{\text{maltoza}}} \right)} \quad (64)$$

Bilance tvari pretpostavljene za šaržni reaktor:

$$\frac{dc_{\text{škrob}}}{dt} = -r \quad (65)$$

$$\frac{dc_{\text{glukoza}}}{dt} = Y_{\text{glukoza/škrob}} \times r \quad (66)$$

$$\frac{dc_{\text{maltoza}}}{dt} = Y_{\text{maltoza/škrob}} \times r \quad (67)$$

Bilance tvari postavljene za šaržni reaktor s dotokom:

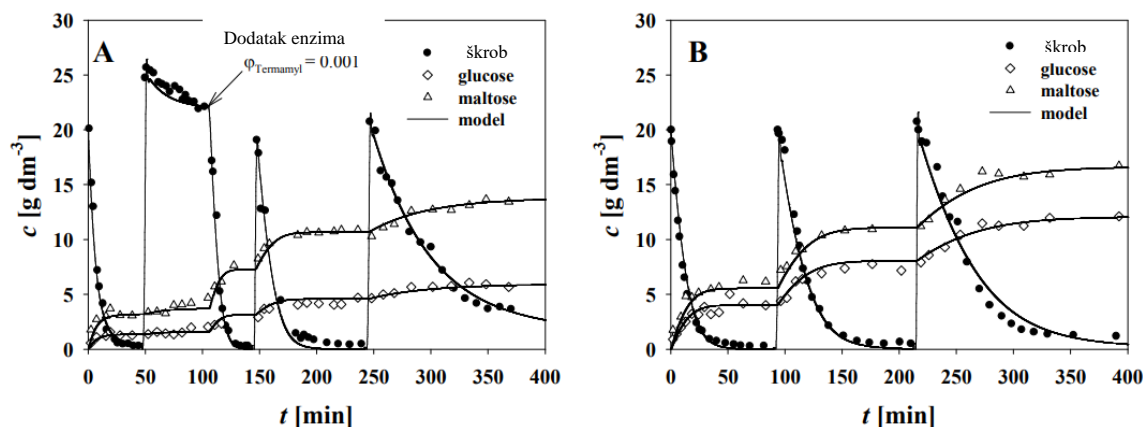
$$\frac{dc_{\text{škrob}}}{dt} = \frac{-c_{\text{škrob}} + c_{0,\text{škrob}}}{V} q_{c_0} - r \quad (68)$$

$$\frac{dc_{\text{glukoza}}}{dt} = -\frac{c_{\text{glukoza}}}{V} q_{c_0} + Y_{\text{glukoza/škrob}} \times r \quad (69)$$

$$\frac{dc_{\text{maltoza}}}{dt} = -\frac{c_{\text{maltoza}}}{V} q_{c_0} + Y_{\text{maltoza/škrob}} \times r \quad (70)$$

U gore navedenim bilancnim i kinetičkim jednadžbama $\varphi_{\alpha\text{-amilaza}}$ označava omjer volumena α -amilaza izražen u $\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$. $Y_{\text{glukoza/škrob}}$ prikazuje iskorištenje glukoze u odnosu na škrob. $Y_{\text{maltoza/škrob}}$ je iskorištenje maltoze u odnosu na škrob. Koncentracija (c) škroba, glukoze i maltoze izražena je u g dm^{-3} . Brzina reakcije (r) određena je u $\text{g dm}^{-3} \text{min}^{-1}$. Protok (q) izražen je u $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$.

3. Pregledni dio



Slika 14. Hidroliza škroba katalizirana α -amilazama u ponovljivom šaržnom reaktoru pri $T=80^{\circ}\text{C}$, pH vrijednost 7, volumen reaktora 50 cm^3 : A) α -amilazama - Termamyl B) α -amilazama - Liquozyme

Na slici 14. prikazan je jedan od rezultat hidrolize škroba katalizirane α -amilazama. Provedena je hidroliza škroba katalizirana α -amilazama u ponovljivom šaržnom reaktoru. Tijekom eksperimenta ostvarena je brza deaktivacija Termamyla već u prvom ciklusu što se može vidjeti na slici 14. pod A. Deaktivacija prvog reda za α -amilazu uključena je u matematički model i prikazana jednadžbom:

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d^{\alpha\text{-amilaza}} \times V_m \quad (71)$$

U gore navedenoj jednadžbi (71) k_d predstavlja konstantu deaktivacije izraženu u g dm^{-3} . Kako je hidroliza škroba u drugom ciklusu bila sporija u 108. minuti dodana je jednaka količina enzima kao i na početku reakcije. Omogućena je hidroliza 20 g/L škroba sa sljedeća tri dodatka. Naknadno dodani enzimi bili su manje deaktivirani, što se vidi iz konstante deaktivacije (k_d) koja je na početku iznosila 0.054 min^{-1} , a kasnije $0,012\text{ min}^{-1}$. U eksperimentu s Liquozymeom (slika 14. pod B) primijećena je također deaktivacija enzima, no slabija u odnosu na eksperiment s Termamylom. S dvostruko manjom početnom koncentracijom Liquozymea u odnosu na eksperiment proveden s Termamylom ostvarena je hidroliza škroba u tri ciklusa.

U slučaju oba enzima iskorištenje na maltozi veće je nego na glukozi. Više koncentracije maltoze i glukoze dobivene su tijekom hidrolize škroba u eksperimentu s Termamylom. Razvijeni matematički model opisan kinetičkom i bilancnim jednadžbama 64-67 i jednadžbom za deaktivaciju enzima (71) dobro opisuje eksperimentalne podatke.

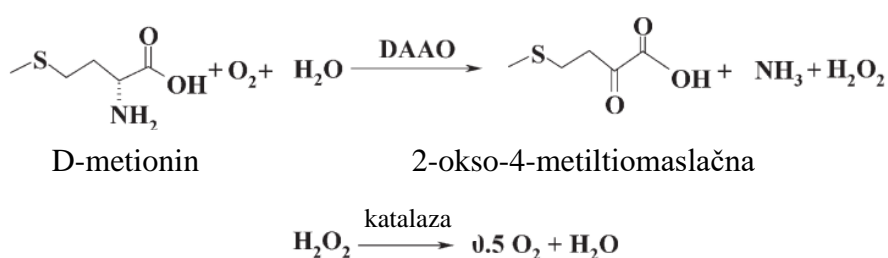
3. Pregledni dio

3.1.5. Stabilizacija D-aminokiselinske oksidaze kovalentnom imobilizacijom i matematički model oksidativne deaminacije D-metionina katalizirane imobiliziranim enzimom

Oksidaza D-aminokiselina (DAAO) iz *Rhodotorula gracilis* je flavoenzim koji katalizira oksidativnu deaminaciju D-aminokiseline dajući odgovarajuće α -keto kiseline, vodikov peroksid i amonijak. Ovaj enzim pokazuje zanimljiva svojstva koja omogućuju njegovu primjenu u industrijskoj proizvodnji polusintetskih cefalosporina. (38) Potencijalna industrijska uporaba enzima općenito je često ograničena njihovim nestabilnošću pri različitim uvjetima rada. Samim time svojstva enzima moraju se poboljšati prije njihove primjene u industrijskoj proizvodnji. Dostupne strategije stabilizacije su imobilizacija, proteinsko inženjerstvo ili kemijska modifikacija. Osim stabilizacije, imobilizacija enzima omogućuje nekoliko prednosti za industrijski proces, kao što je pojednostavljeno pročišćavanje produkta i jednostavnu regeneraciju enzima. (39)

DAAO je prvi opisao Krebs, koji je dokazao postojanost u bubrezima i jetri mnogih životinja. Budući da se enzim nalazi u proksimalnim bubrežnim kanalićima, a lokaliziran je intracelularno u peroksisomima stanica ovog tkiva, smatra se da je fiziološka uloga DAAO povezana s funkcijom proksimalnih bubrežnih kanalića i metabolizmom u peroksisomima. (40)

Tema znanstvenog rada Findrik i suradnika (40) ispitivanje je operativne stabilnosti imobilizirane D-aminokiselinske oksidaze iz svinjskog bubrega. Shema reakcije prikazana je na slici 15.



Slika 15. Shema reakcija oksidativne deaminacije D-metionina

DAAO različitog podrijetla imobilizirani su na različitim nosačima s izvanrednim rezultatima. Oksidaza D-aminokiselina iz svinjskog bubrega i katalaza iz *Micrococcus lysodeikticus* kovalentno su imobilizirane na Eupergitu C. Eksperimenti oksidativne deaminacije D-metionina provedeni su u šaržnom reaktoru volumena 50 cm³ opremljenim magnetskom miješalicom i termostatiranim na 30 °C bez aeracije i s aeracijom pri brzinama protoka zraka

3. Pregledni dio

od 0, 5 i 10 dm³ h⁻¹. Ukupna brzina reakcije oksidacije D-metionina koju katalizira DAAO u prisutnosti katalaze opisana je pojednostavljenom dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom.

Bilance tvari za D-metionin i 2-okso-4-metiltiomaslačnu kiselinu postavljene su za šaržni reaktor (75-76). Bilanca tvari za kisik (77) može se podijeliti u tri odvojena dijela: kisik se troši u reakciji kataliziranoj enzimima, kisik se otapa u reakcijskoj otopini, a brzina procesa opisuje se koeficijentom prijenosa volumena kisika te kisik nastaje u reakciji razgradnje vodikovog peroksida. Ukupna kinetika reakcije oksidacije D-metionina katalizirane DAAO u prisutnosti katalaze opisana je pojednostavljenom dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednadžbom (72). Parametri modela procijenjeni su nelinearnom regresijskom analizom i optimizirani korištenjem metode Simplex i metodom najmanjih kvadrata implementirane u softveru Scientist.

Kinetičke jednadžbe prikazane su sljedećim jednadžbama:

$$r = k \times c_{O_2} \times \frac{c_{D-met}}{K_m^{D-met} + c_{D-met}} \quad (72)$$

$$r_1 = k_{cat} \times c_{H_2O_2} \quad (73)$$

Bilance tvari za šaržni reaktor:

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \times V_m \quad (74)$$

$$\frac{dc_{D-met}}{dt} = -r_1 \quad (75)$$

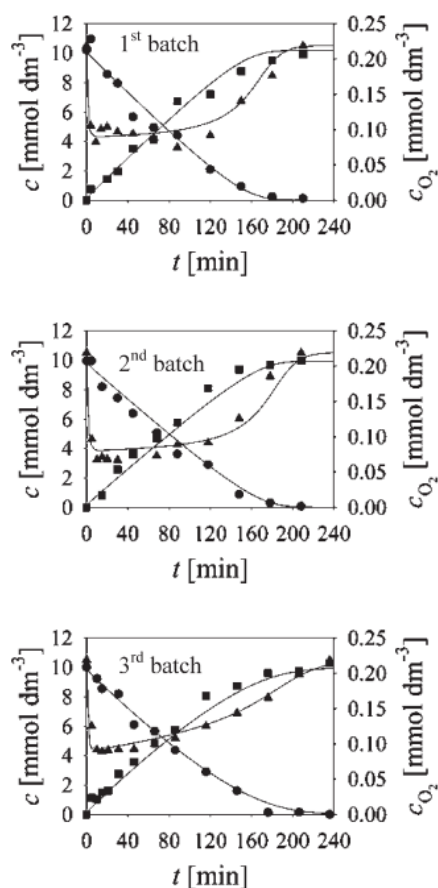
$$\frac{dc_{D-met}}{dt} = -r_1 \quad (76)$$

$$\frac{dc_{O_2}}{dt} = -r + k_L a' \times (c_{O_2}^* - c_{O_2}) + 0.5 \times r_1 \quad (77)$$

$$\frac{dc_{H_2O_2}}{dt} = r - r_1 \quad (78)$$

U kinetičkim jednadžbama 72-73 i bilancnim jednadžbama 74-78 vrijedi da je k konstanta brzine reakcije prvog reda izražena u min⁻¹, c_{O_2} , c_{D-met} , c_{2-okso} , $c_{H_2O_2}$ su koncentracije kisika, D-metionina, 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline i vodikovog peroksida izražena u mmol dm⁻³, a $c_{O_2}^*$ je koncentracija zasićenja kisikom. $k_L a'$ označava volumni koeficijent prijenosa kisika određen min⁻¹. Brzina reakcija (r , r_1) izražene su u mmol dm⁻³min⁻¹.

Pokazalo se da se imobilizacija DAAO svinjskog bubrega na česticama Eupergita C može koristiti za stabilizaciju DAAO. Afinitet enzima prema supstratima (D-metionin i kisik) smanjen je nakon procesa imobilizacije. Razvijeni matematički model dobro je opisao podatke i samim time omogućio je procjenu konstanti brzine opadanja operacijske stabilnosti enzima.



Slika 16. Oksidativna deaminacija D-metionina u ponovljivoj šaržnom reaktoru s aeracijom od $5 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$ katalizirane imobiliziranom DAAO iz svinjskog bubrega i katalazom

Kako je DAAO iz svinjskog bubrega iznimno osjetljiv na aeraciju i koncentraciju prisutnog kisika, dolazi do značajnog opadanja operacijske stabilnosti enzima te je onemogućena potpuna konverzija D-metionina. Slika 16. prikazuje primjer eksperimenta oksidativne deaminacije D-metionina s aeracijom od $5 \text{ dm}^3 \text{ h}^{-1}$ provedenog u ponovljivoj šaržnom reaktoru s dodatkom imobiliziranog DAAO i katalaze. Ukupni postotak imobiliziranih proteina za DAAO i katalazu iznosio je 96% i 84 %. Efikasnost imobilizacije za DAAO iznosila je 10.2%. Na temelju rezultata sa slike 15. uočava se kako koncentracija kisika (\blacktriangle) na početku eksperimenta opada, no manje nego u slučaju bez aeracije. Na temelju izračunatih početnih brzina reakcija za svaku od tri reakcijske smjese neznatna je razlika među njima pa se može zaključiti kako se enzim stabilizirao. Usporedbom s podacima dobivenim u šaržnom reaktoru s otopljenim enzimom, može se zaključiti da imobilizacija smanjuje enzimsku aktivnost. Matematički model simulirao je dobro eksperiment u prva dva reaktora pomoću kinetičkih jednadžbi 72-73 i bilancnih jednadžbi 75-78. Prilikom simuliranja eksperimenta u trećem reaktoru bilo je potrebno uvesti u matematički model i smanjenje operacijske stabilnosti enzima prikazane jednadžbom (74).

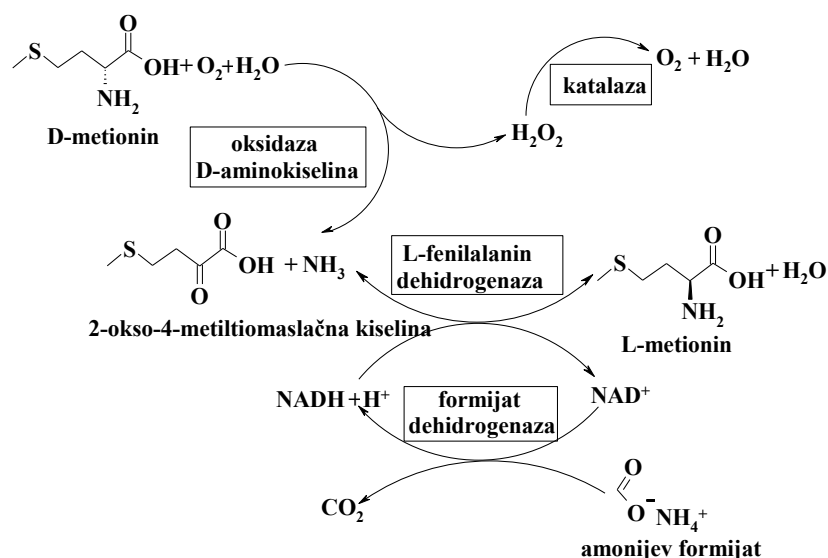
Također opadanje operacijske stabilnosti može se uočiti i usporedbom trajanja reakcije pretvorbe D-metionina u 2-okso-4-metiltiomaslačnu kiselinu koja u prve dvije reakcijske smjese reaktora traje 220 minuta, dok se u trećoj provodi 240 minuta. Do pada operacijske stabilnosti došlo je s produljenom uporabom imobiliziranog enzima, no u slučaju otopljenog enzima pad operacijske stabilnosti događa se odmah nakon početka eksperimenta.

3.1.6. Biotransformacija D- metionina u L-metionin u enzimskoj kaskadi s četiri enzima

Findrik i suradnici u ovom radu (41) proveli su reakciju oksidacije D-metionina i redukciju produkta 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline u L-metionin.

D-metionin je pretvoren u L-metionin u reakcijskom sustavu u kojem su korištena četiri enzima. D-aminokiselinska oksidaza (D-AAO) iz *Arthrobacter protophormiae* korištena je za potpunu konverziju D-metionina u 2-okso-4-metiltiomaslačnu kiselinu. (41) Oksidaze aminokiselina (AAO) kataliziraju reakciju oksidativne deaminacije D- ili L-aminokiselina čineći ih značajnim biotehnološkim i industrijskim enzimima. Djeluju bez dodavanja kofaktora i predstavljaju ključni enzim za razumijevanje mehanizma koji je u osnovi katalize flavina. Osim njihove upotrebe u sintezi antibiotika, također se mogu primijeniti u drugim procesima biotransformacije kao što je razdvajanje smjese racemičnih aminokiselina i priprema njihovih odgovarajućih α -keto kiselina. (42) Razvoj kaskadnih sustava (gdje se spoj A transformira u D s koracima B i C između) smatra se jednim od važnih budućih smjerova za provođenje održive organske sinteze. (41)

Prema shemi reakcije na slici 17. oksidaza D-aminokiselina dodana je za oksidaciju D-metionina, L-fenilalanin dehidrogenaza korištena je za redukcije 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline, formijat dehidrogenaza (FDH) služi za regeneraciju NADH i katalaza iz goveđe jetre za uklanjanje vodikovog peroksida koji nastaje reakcijom oksidacije D-metionina.



Slika 17. Shema reakcije oksidacije D-metionina i redukcije produkta 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline u L-metionin

Svi enzimi i supstrati dodani su na početku eksperimenta, te su praćene i izmjerene koncentracije reaktanta, u ovom slučaju D-metionina, intermedijarnog produkta 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline i glavnog produkta L-metionina. Ukupna brzina reakcije oksidacije D-metionina koju katalizira D-AAO u prisutnosti katalaze opisana je pomoću Michaelis–Menteničine kinetike s kompetitivnom inhibicijom produktom (2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline):

$$r_1 = \frac{V_m \times c_{D-met}}{K_m^{D-met} \times \left(1 + \frac{c_{2-okso}}{K_i^{2-okso}}\right) + c_{D-met}} \quad (79)$$

Bilance tvari za D-metionin i 2-okso-4-metiltiomaslačnu kiselinu postavljene su za šaržni reaktor:

$$\frac{dc_{D-met}}{dt} = -r_1 \quad (80)$$

$$\frac{dc_{2-okso}}{dt} = r_1 \quad (81)$$

Ukupna brzina drugog koraka reakcije u kojoj se 2-okso-4-metiltiomaslačna kiselina reducira u L-metionin u reakciji kataliziranoj s L-PheDH opisana je dvo- i trosupstratnom Michaelis–Menteničinom kinetikom.

Brzina reakcije reduktivne aminacije 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline opisana je trosupstratnom Michaelis–Menteničinom kinetikom. Brzina reverzne reakcije, odnosno oksidacije L-metionina opisana je dvosupstratnom Michaelis–Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom s NADH.

3. Pregledni dio

$$r_2 = \frac{V_{m2} \times c_{2-okso} \times c_{NADH} \times c_{NH4+} \times Y_{L-PheDH}}{(K_m^{2-okso} + c_{2-okso}) \times (K_m^{NADH} + c_{NADH}) \times (K_m^{NH4+} + c_{NH4+})} \quad (82)$$

$$r_3 = \frac{V_{m3} \times c_{L-met} \times c_{NAD+} \times Y_{L-PheDH}}{(K_m^{NAD+} \times (1 + c_{NADH}/K_{i2}^{NADH}) + c_{NAD+}) \times (K_m^{L-met} + c_{L-met})} \quad (83)$$

Bilance mase za reduktivnu aminaciju 2-okso-4-tiomaslačne kiseline prikazane su jednadžbama:

$$\frac{dc_{L-met}}{dt} = r_2 - r_3 \quad (84)$$

$$\frac{dc_{2-okso}}{dt} = -r_2 + r_3 \quad (85)$$

$$\frac{dc_{NH4+}}{dt} = -r_2 + r_3 \quad (86)$$

$$\frac{dc_{NAD+}}{dt} = r_2 - r_3 \quad (87)$$

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = -r_2 + r_3 \quad (88)$$

Ako postoji mogućnost regeneracija koenzima u reakciji reduktivne aminacije 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline u obzir se mora uzeti i brzina reakcija redukcije NAD^+ u reakcijama kataliziranim FDH. Kinetička jednadžba opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom NADH:

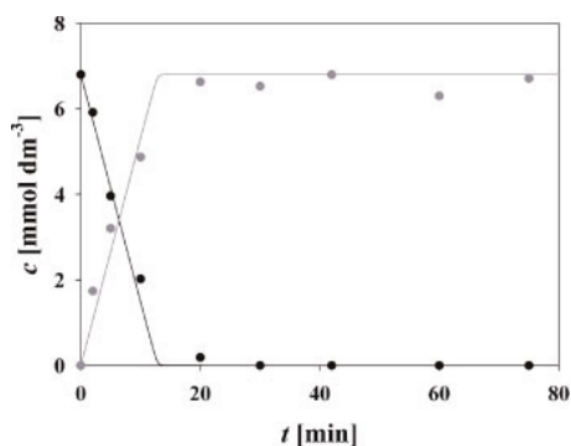
$$r_4 = \frac{V_m \times c_F \times c_{NAD+} \times Y_{FDH}}{(K_{m2}^{NAD+} \times (1 + c_{NADH}/K_{i3}^{NADH}) + c_{NAD+}) \times (K_m^F + c_F)} \quad (89)$$

Bilance mase za šaržni reaktor prilikom reduktivne aminacije 2-okso-4-tiomaslačne kiseline s mogućnošću regeneracije koenzima prikazana je jednadžbom:

$$\frac{dc_F}{dt} = -r_4 \quad (90)$$

$$\frac{dc_{NAD+}}{dt} = r_2 - r_3 - r_4 \quad (91)$$

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = -r_2 + r_3 + r_4 \quad (92)$$



Slika 18. Reduktivna aminacija 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline katalizirane L-fenilalanin dehidrogenazom i s regeneracijom koenzima katalizirane formijat dehidrogenazom (FDH) u šaržnom reaktoru

Proces reduktivne aminacije 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline katalizirane s L-PheDH uz regeneraciju koenzima proveden je u šaržnom reaktoru (slika 18.). NAD^* dodan je u reakcijski sustav na početku reakcije. Ostvarena je 100 % konverzija 2-okso-4-metiltiomaslačne kiseline te je razvijen i potvrđen matematički model opisan kinetičkim jednažbama 82-83, 84 i bilancnim jednažbama 84-88 i 90-92.

4. ZAKLJUČAK

Primjena enzima kao katalizatora u biokatalitičkim procesima pogodna je zbog njihove biorazgradivosti i visoke specifičnosti. Pomoću određivanja kinetičkih parametara procesa i pretpostavkom o ponašanju tvari u različitim reakcijskim uvjetima omogućeno je razvijanje matematičkih modela. Matematički modeli primjenjuju se u biokatalitičkim reakcijama gdje se u različitim reaktorima dobivaju različita iskorištenja koja nam pomažu pri određivanju reaktora pogodnog za određeni proces. Omogućavaju znanstvenicima kvantitativna predviđanja koja se mogu usporediti s eksperimentalnim podacima i samim time provjeriti valjanost samog modela ili pomoći pri njegovom usavršavanju. Također, matematički modeli pomažu prilikom analize velikog broja podataka i olakšavaju uočavanje uzoraka koji bi se teško uočili. Utjecaj matematičkog modeliranja u fizici, kemiji, biologiji kao i u samoj industriji se ne smije zanemariti.

5. LITERATURA

1. Ghisalba O, Meyer HP, Wohlgemuth R. Industrial Biotransformation. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology . Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. p. eib174.
2. Illanes A, editor. Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications. Dordrecht: Springer; 2008. 391 p. 1-15, 107-115, 155-166
3. Kara S, Liese A. Process Considerations for the Application of Enzymes. In: Vogel A, May O, editors. Industrial Enzyme Applications . Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2019. p. 71–94.
4. Abdelraheem EMM, Busch H, Hanefeld U, Tonin F. Biocatalysis Explained: From Pharmaceutical to Bulk Chemical Production. *React Chem Eng.* 2019;4(11):1878–94.
5. Sheldon RA, Woodley JM. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem Rev.* 2018;118(2):801–38.
6. Alcántara AR, Domínguez de María P, Littlechild JA, Schürmann M, Sheldon RA, Wohlgemuth R. Preface to Special Issue on Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry. *ChemSusChem.* 2022 ;15(9).
7. Sheldon RA. Biocatalysis and Green Chemistry. In: Patel RN, editor. *Green Biocatalysis.* Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc; 2016. p. 1–15.
8. Pollard DJ, Woodley JM. Biocatalysis for Pharmaceutical Intermediates: The Future is Now. *Trends Biotechnol.* 2007 (2):66–73.
9. Truppo MD. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. *ACS Med Chem Lett.* 2017;8(5):476–80.
10. Engqvist MKM, Rabe KS. Applications of Protein Engineering and Directed Evolution in Plant Research. *Plant Physiol.* 2019;179(3):907–17.

5. Literatura

11. Vermue MH, Tramper J. Biocatalysis in Non-conventional Media: Medium Engineering Aspects (Technical Report). *Pure Appl Chem.* 1995;67(2):345–73.
12. Robinson PK. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays Biochem.* 2015;59:1–41.
13. L. Stryer, J. Berg i J. Tymoczko, *Biochemistry*, 6th ed, W.H. Freeman and Company, New York p. 98-101
14. Illanes A, Cauerhff A, Wilson L, Castro GR. Recent Trends in Biocatalysis Engineering. *Bioresour Technol.* 2012;115:48–57.
15. Boyce S, Tipton KF. Enzyme Classification and Nomenclature. In: John Wiley & Sons, Ltd, editor. *eLS.* 1st ed. Wiley; 2001. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0000710>
16. Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: Guisan JM, editor. *Immobilization of Enzymes and Cells.* Totowa, NJ: Humana Press; 2013. p. 15–31. (Methods in Molecular Biology; vol. 1051).
17. Nisha, Karthick, Gobi S SA, N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme. p. 1-11
18. Melim Miguel AS, Souza T, Costa Figueiredo EV da, Paulo Lobo BW, Maria G. Enzymes in Bakery: Current and Future Trends. In: Muzzalupo I, editor. *Food Industry.* InTech; 2013
19. Marasović M, Marasović T, Miloš M. Robust Nonlinear Regression in Enzyme Kinetic Parameters Estimation. *J Chem.* 2017;2017:1–12.
20. Selamoglu Z, Khan U. Use of Enzymes in Dairy Industry: A Review of Current Progress. *Arch Razi Inst.* 2020 .
21. Fox PF. Egzogene proteinaze u mljekarskoj industriji, Irska, p. 1-16
22. Vogel A., May O., *Industrial Enzyme Applications.* Weinheim, Germany; 2019.; p.73-77

5. Literatura

23. Magdić D. Uvod u matematičko modeliranje (Nastavni tekst). Osijek: Prehrambeno-tehnološki fakultet: 2011.
24. Vasic-Racki D, Kragl U, Liese A. Benefits of Enzyme Kinetics Modelling. *Chem Biochem Eng Q.* 17 (1) 7-18: 2003
25. Murphy EF, Gilmour SG, Crabbe MJC. Efficient and Accurate Experimental Design for Enzyme Kinetics: Bayesian Studies Reveal a Systematic Approach. *J Biochem Biophys Methods.* 2003; 55(2):155–78.
26. Lehninger AL (1975) *Biochemistry. The Molecular Basis of Cell Structure and Function.* 2nd ed. Worth Publishers, New York:1104 pp. ISBN:0-87901-047-9.
27. Amacher MC. Methods of Obtaining and Analyzing Kinetic Data. In: Sparks DL, Suarez0 DL, editors. *SSSA Special Publications* . Madison, WI, USA: Soil Science Society of America; 2015. p. 19–59.
28. Kosar V., *Reaktori i bioreaktori (1. dio reaktori)*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Interna skripta, Zagreb, 2017., str 2-10.
29. Casado J, Lopez-Quintela MA, Lorenzo-Barral FM. The initial rate method in chemical kinetics: Evaluation and experimental illustration. *J Chem Educ.* 1986 May;63(5):450.
30. Gomzi Z. *Kemijski reaktori*, 2.izdanje HINUS, Zagreb; 2009, str. 39-62, 345-410.
31. Scott Fogler H. Elements of Chemical Reaction Engineering. *Chem Eng Sci.* 1987;42(10):2493.
32. Pilarek M, Szewczyk KW. Kinetic Model of 1,3-Specific Triacylglycerols Alcoholysis Catalyzed by Lipases. *J Biotechnol.* 2007;127(4):736–44.
33. Peri S, Karra S, Lee YY, Karim MN. Modeling Intrinsic Kinetics of Enzymatic Cellulose Hydrolysis. *Biotechnol Prog.* 2008;23(3):626–37.
34. Planas F, McLeish MJ, Himo F. Enzymatic Stetter Reaction: Computational Study of the - Reaction Mechanism of MenD. *ACS Catal.* 2021;11(19):12355–66.

5. Literatura

35. Sudar M, Vasić-Rački Đ, Müller M, Walter A, Blažević ZF. Mathematical Model of The MenD-catalyzed 1,4-Addition (Stetter Reaction) of α -Ketoglutaric Acid to Acrylonitrile. *J Biotechnol.* 2018 Feb;268:71–80.
36. Presečki AV, Findrik Z, Vasić-Rački Đ. Mathematical Modeling of Amylase Catalyzed Starch Hydrolysis.
37. de Souza IA, Orsi DC, Gomes AJ, Lunardi CN. Enzymatic Hydrolysis of Starch Into Sugars is Influenced by Microgel Assembly. *Biotechnol Rep.* 2019;22:e00342.
38. Obregón V, Mata I de la, Ramón F, Acebal C, Castellón MP. Oxidation by Hydrogen Peroxide of D-Amino Acid Oxidase from *Rhodotorula Gracilis*. In: *Progress in Biotechnology*. Elsevier; 1998. p. 89–94.
39. Findrik Z. Stabilization of D-Amino Acid Oxidase via Covalent Immobilization and Mathematical Model of D-Methionine Oxidative Deamination Catalyzed by Immobilized Enzyme. *Chem Biochem Eng Q J.* 2016;30(1):93–102.
40. Fukui K, Momoi K, Watanabe F, Miyake Y. Biosynthesis of Porcine Kidney D-Amino Acid Oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986;141(3):1222–8.
41. Findrik Z, Vasić-Rački Đ. Biotransformation of D-Methionine into L-Methionine in the Cascade of Four Enzymes. *Biotechnol Bioeng.* 2007; 1;98(5):956–67.
42. Findrik Z, Vasić-Rački D, Geueke B, Kuzu M, Hummel W. Kinetic Modeling of Amino Acid Oxidation Catalyzed by a New D-Amino Acid Oxidase from *Arthrobacter Protosphormiae*. *Eng Life Sci.* 2005;5(6):550–5.

6. ŽIVOTOPIS

Karlo Vojtkuf [REDACTED] Nakon završene Osnovne škole Vjekoslav Klaić, upisuje 2016. godine Gimnaziju Matija Mesić u Slavonskom Brodu. Preddiplomski studij Primijenjena kemija upisuje 2020. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Na trećoj godini preddiplomskog studija odrađuje praksu na Pročišćivaču otpadnih voda u Slavonskom Brodu gdje se upoznao s radom pročišćivača i važnosti same obrade otpadne vode.