

# Matematičko modeliranje kaskadne reakcije

---

Grošić, Karla

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:848016>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-21**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Karla Grošić  
ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Karla Grošić

MATEMATIČKO MODELIRANJE KASKADNE REAKCIJE  
ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitne komisije:

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2018.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement No 635595

## SAŽETAK

U ovom radu određena je kinetika oksidacije etanola u acetaldehid koja je katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom (ADH). Kinetički parametri procijenjeni su iz eksperimentalnih podataka ovisnosti početne brzine reakcije oksidacije etanola o koncentraciji etanola i  $\text{NAD}^+$ . Ispitivana reakcija je sporedna reakcija u kaskadnoj reakciji koja se sastoji od oksidacije alkohola u aldehid te aldolne adicije acetaldehida na aldehid pri čemu nastaje konačni produkt laktol. Ova kaskadna reakcija također uključuje i regeneraciju koenzima  $\text{NAD}^+$  kataliziranu enzimom NADH oksidazom (NOX).

Razvijen je matematički model kaskadne reakcije, te su provedene simulacije u programskom paketu SCIENTIST kako bi se ispitaio utjecaj pojedine komponente u reakciji na konačnu koncentraciju aldolnog produkta.

**Ključne riječi:** biokataliza, ADH,  $\text{NAD}^+$ , NOX, enzimi, kaskadna reakcija, Michaelis-Menteničina kinetika, matematičko modeliranje, SCIENTIST

## **ABSTRACT**

In this work the kinetics of ethanol oxidation into acetaldehyde catalyzed by alcohol dehydrogenase (ADH) was determined. Kinetic parameters were estimated from the experimental data of dependence of the initial reaction rate on the concentration of ethanol and  $\text{NAD}^+$ . This reaction is a side reaction in a cascade reaction of an alcohol oxidation to aldehyde and aldol addition of acetaldehyde to aldehyde in which the final product lactol is formed. This cascade reaction also includes a coenzyme regeneration of  $\text{NAD}^+$  catalyzed by NADH oxidase (NOX).

Mathematical model for the cascade reaction was developed and used for simulations in the software package SCIENTIST. The influence of concentrations of different components of the reaction system on the final aldol product concentration was investigated.

**Key words:** biocatalysis, ADH,  $\text{NAD}^+$ , NOX, enzymes, cascade reaction, Michaelis-Menten kinetics, mathematical modeling, SCIENTIST

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. BIOKATALIZATORI.....	2
2.1.1. Primjena biokatalizatora u indstriji.....	4
2.1.2. Prednosti uporabe biokatalize.....	5
2.1.3. Nedostatci uporabe biokatalizatora.....	5
2.2. KASKADNE REAKCIJE.....	5
2.2.1. Regeneracija koenzima.....	6
2.3. MATEMATIČKO MODELIRANJE.....	7
2.3.1. Michaelis-Menteničin kinetički model.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. Kemikalije.....	11
3.2. Aparatura.....	11
3.2.1. Analitička vaga.....	11
3.2.2. Homogenizator.....	11
3.2.3. Spektrofotometar.....	12
3.3. Određivanje kinetike reakcije oksidacije katalizirane ADH.....	12
4. MATEMATIČKO MODELIRANJE.....	14
5. REZULTATI I RASPRAVA.....	17
5.1. Kinetika oksidacije etanola.....	17

5.2. Simulacije oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu NOX-om...	21
5.3. Simulacije oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu ADH.....	22
5.4. Simulacije oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu ADH i NOX- om.....	23
5.5. Simulacije oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu i aldolne adicije.....	24
6. ZAKLJUČAK.....	26
7. LITERATURA.....	27
POPIS SIMBOLA.....	30
ŽIVOTOPIS.....	31



# 1. UVOD

Posljednjih desetljeća je postao popularan koncept "zelene kemije". Zelena kemija kao propulzivno područje istraživanja pokušava pronaći i održati ravnotežu između primjene prirodnih resursa, ekonomskog rasta i očuvanja okoliša (Anastas & Warner, 2000). Napredak se očituje kroz razna područja, kao što je npr. korištenje čistijih i za okoliš sigurnijih otapala, te uporaba obnovljivih sirovina. Ovakav održivi razvitak industrije omogućuje dobar utjecaj na okoliš, a daje i rješenja mnogim globalnim pitanjima s kojima se čovječanstvo danas susreće (Anastas & Kirchoff, 2002).

Jedan, odavno poznat, no u zadnje vrijeme često korišten koncept, jesu kaskadne reakcije. Kaskada se definira kao kombinacija najmanje dva kemijska koraka u jednoj reakcijskoj posudi bez izolacije intermedijera (Sheldon, 2008). Kaskadne reakcije mogu se smatrati "zelenom kemijom". Reakciju koja bi se inače provela u više uzastopnih stupnjeva, primjenom koncepta kaskadnih reakcija moguće je provesti lančanom reakcijom u jednom reaktoru (Schmidt et al., 2018).

Katalizatori su tvari koje ubrzavaju kemijsku reakciju i nakon reakcije ostaju nepromijenjeni. Enzimi su biokemijski katalizatori koji po svom sastavu spadaju u grupu globularnih proteina (Vrsalović & Presečki A., 2003). Zauzimaju vrlo važnu poziciju u razvitku novih tehnologija. Njihova ključna uloga u svim živim organizmima pokazatelj je njihove važnosti. Osim izvanredne katalitičke sposobnosti, njihovom uporabom reducira se nastanak nepotrebnih nusprodukata, čime se i smanjuje negativan utjecaj na okoliš, te ih stoga možemo smatrati dijelom "zelene kemije" (Saibi et al., 2012).

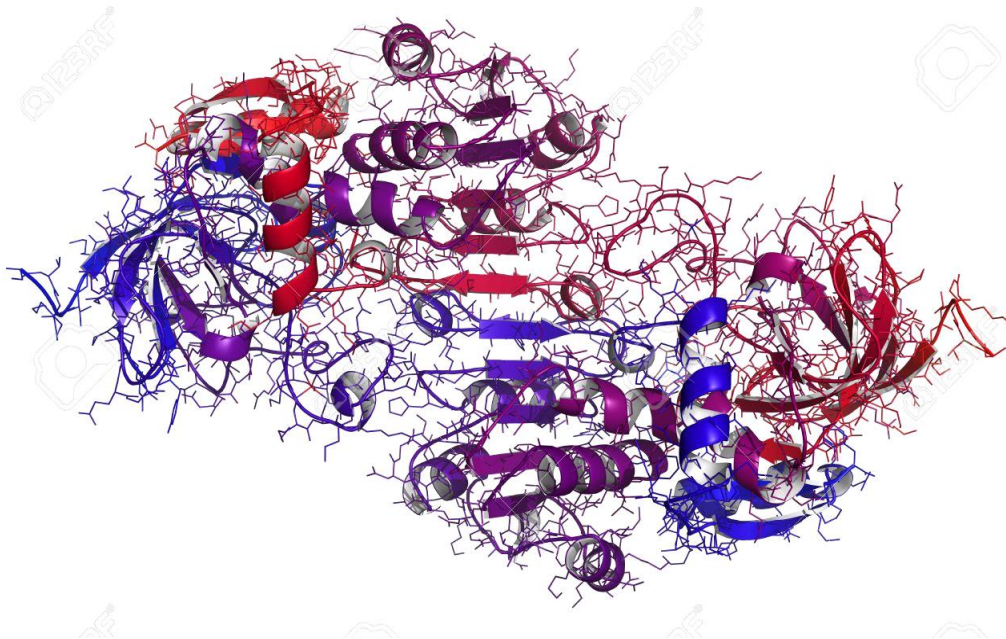
Modeliranje enzimskih reakcija predstavlja važnu ulogu u reakcijskom inženjerstvu. Razvijanje matematičkih modela daje uvid u ponašanje pojedinih enzima u specifičnim reakcijama, te mogućnost predviđanja ishoda pojedine reakcije, štedeći pri tome vrijeme, rad i utrošene resurse (Baş & Boyac, 2007). Time se i modeliranje dobro uklapa u koncepte "zelene kemije".

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BIOKATALIZATORI

Enzimi su proteini koji djeluju kao katalizatori u biokemijskim reakcijama. Kemijske se reakcije uz pomoć enzima odvijaju nekoliko milijuna puta brže nego bez njih (Van't Riet & Tramper, 1991). Oni ubrzavaju odgovarajuću reakciju dovodeći je do kemijske ravnoteže. Svaka reakcija koja se odvija u živom organizmu katalizirana je specifičnim katalizatorom (Bisswanger, 2008). Enzimi imaju istu zadaću kao i kemijski katalizatori, a to je snižavanje energije aktivacije reakcije kako bi se ubrzala biokemijska reakcije u živim organizmima. Međutim, enzimi imaju vrlo različita svojstva u usporedbi s kemijskim katalizatorima zbog svoje složene strukture. Općenito, možemo ih koristiti u dva osnovna oblika: kao pročišćene enzime i enzime u cijelim stanicama (živim ili neživim) (Illanes, 2008).

Enzimi su globularni proteini koji su organizirani u četiri strukturalna nivoa (Scrutton & Young, 1972). Primarnu strukturu enzima čine aminokiseline povezane peptidnim vezama u peptidni lanac, dok se u sekundarnoj strukturi peptidni lanci međusobno savijaju u spiralu gdje dolazi do stvaranja vodikovih veza. U tercijarnoj strukturi peptidni lanci se preklapaju, a u kvartarnoj se spajaju u veće aglomerate, pri čemu dolazi do stvaranja disulfidnih veza. Enzimi mogu biti monomeri koji sadrže samo jedan polipeptidni lanac, kojega čini sto ili više aminokiselina ili oligomeri koji sadrže veći broj polipeptidnih lanaca, koji mogu biti jednaki ili se mogu međusobno razlikovati (Stryer, 1991). Na slici 1. prikazana je struktura enzima alkohol dehidrogenaze (ADH).



**Slika 1.** Struktura enzima alkohol dehidrogenaza (ADH)

([https://www.123rf.com/photo\\_16083629\\_chemical-structure-of-a-molecule-of-human-alcohol-dehydrogenase-b3-adh-the-adh-enzyme-catalyses-the-.html](https://www.123rf.com/photo_16083629_chemical-structure-of-a-molecule-of-human-alcohol-dehydrogenase-b3-adh-the-adh-enzyme-catalyses-the-.html))

Na aktivnost enzima utječu razni čimbenici kao što su pH, temperatura, koncentracija enzima i supstrata. Brzina enzimske reakcije raste s temperaturom do određenog maksimuma, a s daljnjim rastom temperature ona opada zbog denaturacije enzima. Iz toga slijedi da su enzimi katalitički aktivni pri određenoj pH vrijednosti i temperaturi. Na aktivnost enzima mogu utjecati i inhibitori koji smanjuju aktivnost enzima odnosno usporavaju reakciju (Illanes, 2008).

Enzimi se klasificiraju prema smjernicama Odbora za nomenklaturu Međunarodne unije biokemije i molekularne biologije (IUBMB) u šest skupina, prema tipu katalizirane kemijske reakcije:

- Oksidoreduktaze - kataliziraju reakcije oksidacije / redukcije koje uključuju prijenos elektrona, atoma vodika ili kisika, pripadaju im dehidrogenaze, oksidaze, peroksidaze, hidroksilaze i oksigenaze.
- Transferaze - kataliziraju prijenos različitih funkcionalnih skupina s odgovarajućim akceptorom.

- Hidrolaze - kataliziraju reakcije hidrolize, to jest cijepanje kemijske veze djelovanjem vode, a pripadaju im dekarboksilaze, aldolaze, hidrataze, dehidrataze i sintetaze.
- Liaze - kataliziraju kidanje kovalentnih veza (najčešće C–C, C–O i C–N) reakcijama eliminacije funkcionalnih skupina uz nastanak dvostruke veze.
- Izomeraze - kataliziraju reakcije pretvorbe supstrata u izomer, tj. tvar koja ima isti broj i vrste atoma.
- Ligaze - kataliziraju stvaranje kovalentne veze (Illanes, 2008).

### **2.1.1. Primjena biokatalizatora u industriji**

Trend uporabe biokatalizatora u industriji raste iz godine u godinu, gdje se primjećuje kontinuirana integracija kroz različite procese i proizvodnje. Razvitak molekularne biologije, sam napredak u tehnologiji i uporabi novijih instrumenata, doveo je do principa usmjerene evolucije biokatalizatora, te njihovog inženjeringa kako bi se povećala i prilagodila njihova aktivnost i selektivnost (Hui, 2006).

Razlikuju se dva tipa procesa. Proces u kojima je enzimatska konverzija sirovine u proizvod ključna operacija i procesi u kojima se enzim koristi kao aditiv za modificiranje određene funkcionalne karakteristike proizvoda. U prvom slučaju enzimatska reakcija se provodi u kontroliranom okolišu pri optimalnim uvjetima, dok u drugom slučaju uvjeti za djelovanje enzima nisu specifični te njegovo djelovanje nije kontrolirano. Primjeri prvog slučaja su proizvodnja visoko fruktoznih sirupa s imobiliziranom glukozom i izomerazom i proizvodnjom 6-aminopenicilanske kiseline iz penicilina-G s imobiliziranom penicilinskom acilazom, a primjeri drugog slučaja su upotreba gljivičnih proteaza u izradi tijesta (Illanes, 2008).

Većina konvencionalnih upotreba enzima odnosi se na korištenje hidrolaza kao procesnih katalizatora ili aditiva za hranu, detergent, kožu i tekstilnu industriju i unatoč impresivnim napredcima u biokatalizi oni i dalje predstavljaju glavni dio tržišta enzima (Illanes et al., 2012).

### 2.1.2. Prednosti uporabe biokatalizatora

Brojne su prednosti biokatalize u usporedbi s kemijskom katalizom. Kod biokatalize su brzine reakcija veće, a reakcijski uvjeti blaži nego kod kemijske katalize, veća je specifičnost i selektivnost, apsolutna stereospecifičnost i nema toksičnih nusprodukata. Aktivnost enzima se može regulirati alosteričkom regulacijom te kovalentnim modifikacijama (kovalentna ugradnja neke male kemijske skupine u enzim) (Ghisalba et al., 2010).

### 2.1.3. Nedostatci uporabe biokatalizatora

Jedan od problema biokatalizatora je njihova operacijska stabilnost koja je najbitniji parametar u provedbi procesa. Operacijska stabilnost predstavlja stabilnost enzima tijekom kontinuirane uporabe koja se često izražava kao vrijeme poluraspada enzima ( $t_{1/2}$ ). Vrijeme poluraspada je vrijeme potrebno da se njegova početna aktivnost snizi na polovinu početne vrijednosti (Kragl et al., 1993).

## 2.2. KASKADNE REAKCIJE

Prva enzimatska kaskada, ispitivana *in vitro*, je transformacija šećera u etanol i CO<sub>2</sub>, što je dovelo do otkrića enzima i intermedijera glikolize. U povijesti biokatalize prvi članak u kojem su kaskade s enzimima svrstane posebno u odnosu na glikolizu objavljen je 1949. Enzimski katalizirane reakcije unutar žive stanice vrsta su kaskadnih reakcija (Schrittwieser et al., 2017).

Kaskada se definira kao kombinacija najmanje dva kemijska koraka u jednoj reakcijskoj posudi bez izolacije intermedijera. Kod biokatalitičkih kaskada je potreban najmanje jedan biokatalizator za barem jedan korak u slijedu transformacija (Sheldon, 2008). Biokatalitičke kaskade klasificiraju se prema različitim parametrima. Jedan od bitnih parametara je broj reakcijskih koraka u linearnoj sekvenci. Broj katalizatora može biti veći od broja koraka npr. kod kaskade u kojima supstrat ima istu funkciju nekoliko puta i stoga ga katalizator može transformirati više puta. Sve druge kaskade zahtijevaju najmanje dva katalizatora (Schrittwieser et al., 2017).

Jedna od prednosti kaskadnih reakcija je zaobilaznje izolacije reakcijskih međuprodukata, što štedi resurse, reagense i vrijeme zbog čega se kaskadne reakcije mogu

smatrati "zelenom kemijom". Također, na ovaj način je moguće riješiti problem nestabilnih međuprodukata. (Schmidt et al., 2018).

### **2.2.1. Regeneracija koenzima**

Za primjenu sinteza ovisnih o koenzimima, regeneracija koenzima je vrlo bitan faktor.  $\text{NAD}^+$  koenzimi, pogotovo u svojoj reduciranoj formi su preskupi da bi se koristili u stehiometrijskim omjerima stoga je važno provoditi regeneraciju koenzima kako bi se izbjegli visoki troškovi njihova korištenja (Woodyer et al., 2006). Uz to, regeneracija je isplativ način da se termodinamički nepovoljne reakcije pomaknu prema nastajanju produkta. Koenzimi su organske neproteinske molekule koje se udružuju s enzimima u kataliziranju biokemijskih reakcija. Neki od poznatih i često korištenih koenzima su ATP, FAD, koenzim A te nikotinamidi ( $\text{NAD}^+$ ) (Hummel, 1999).

Regeneracija koenzima  $\text{NAD}^+$  vrlo je važna u oksidaciji alkohola u odgovarajuće aldehide. Regeneracijom se pojednostavljuje izolacija dobivenog produkta i sprječavaju se problemi koje mogu uzrokovati inhibicije od strane koenzima (Sudar et al., 2014).

NADH oksidaza (NOX) je flavoprotein koji oksidira NADH u  $\text{NAD}^+$  pomoću usporedne reakcije molekularnog kisika u vodu u četvero-elektronskoj redukciji (Nox-2 enzimi) ili vodikov peroksid u dvo-elektronskoj redukciji (Nox-1 enzimi). Najveća prednost korištenja NOX-a za regeneraciju koenzima  $\text{NAD}^+$  je ta što katalizira nepovratnu reakciju koja potom pomiče ravnotežu primarne reakcije na stranu formiranja produkta (Sudar et al., 2014).

## 2.3. MATEMATIČKO MODELIRANJE

Kako bismo razumjeli kinetiku enzimatskih reakcija vrlo je bitno proučiti ponašanje enzima te moći predvidjeti kako će određeni enzim reagirati u nekoj specifičnoj reakciji, pri različitim radnim uvjetima. U tu svrhu, razvijaju se matematički modeli (Brass et al., 1997).

Matematičko modeliranje je postupak koji opisuje realni sustav matematičkim jednadžbama s ciljem uporabe matematičkog modela za kasnije analize, projektiranje i optimiranje sustava za koji je model izrađen. U modelu se svojstva sustava predstavljaju varijablama. Mogu postojati različiti tipovi varijabli, pa tako one mogu biti:

- a) Ulazne i izlazne
- b) Zavisne i nezavisne
- c) Slučajne varijable (Bender, 1978).

Razvoj kinetičkog modela se temelji na matematičkoj obradi eksperimentalnih podataka dobivenih provođenjem enzimski katalizirane reakcije. Enzimski kinetički model razvija se kroz nekoliko koraka (Straathof, 2001). Eksperimentalno se određuje početna brzina reakcije pri različitim koncentracijama supstrata. Nakon toga slijedi matematička obrada rezultata te formuliranje izraza za brzinu reakcije. Procjenjuju se kinetički parametri i određuje se ukupna brzina reakcije, te se eksperimentalno potvrđuje razvijeni model (Murphy et al., 2002). Na kraju se na temelju razvijenog modela predviđaju optimalni procesni uvjeti za specifičnu reakciju. Jedan od najpoznatijih i najviše korištenih jest Michaelis-Menteničin kinetički model karakterističan za enzimске reakcije (Murphy et al., 2002).

Kombinacije matematičkog modela i modernih računalnih tehnika vrlo su korisne za pronalazak optimalnih radnih uvjeta i mikrokruženja za biokatalizator. Studij teorijskog modela enzimskog reakcijskog sustava od velikog je interesa za industrijsku primjenu biokatalizatora. Matematički model omogućuje procjenu konverzije u reaktoru te sami volumen reaktora (Baş & Boyac, 2007).

### 2.3.1. Michaelis-Menteničin kinetički model

Michaelis-Menteničin kinetički model razvili su Leonor Michaelis i Maud Menten (1912) po kojima je model dobio ime. Model daje korelaciju između brzine enzimske reakcije i koncentracije supstrata. Opisuje se sljedećim izrazom (jed. 1.):

$$r_s = V_m \cdot \frac{c_s}{K_m + c_s} \quad (1.)$$

gdje su:

$r_s$  - brzina reakcije (mM)

$V_m$  - maksimalna brzina reakcije ( $\text{U mg}^{-1}$ )

$c_s$  - koncentracija supstrata (mM)

$K_m$  - Michaelisova konstanta (mM).

Parametar  $V_m$  se može opisati sljedećim izrazom (jed. 2.):

$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad (2.)$$

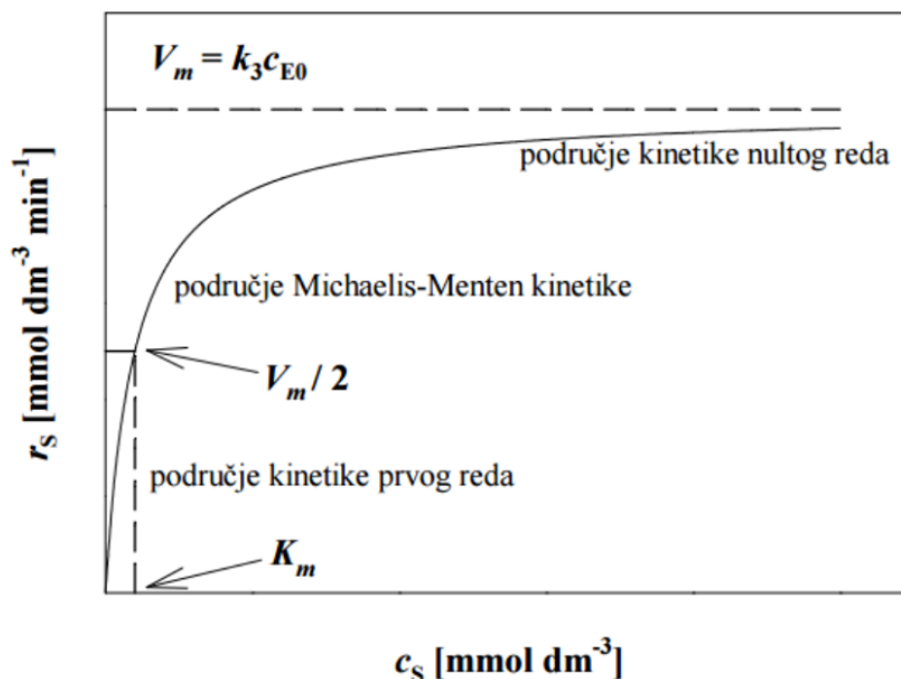
gdje su:

$k_3$  - katalitička konstanta enzima ( $\text{min}^{-1}$ )

$c_{E0}$  - početna koncentracija enzima (mM) (Cornish-Bowden, 2012).

Michaelis-Menteničina jednadžba opisuje tri područja brzine reakcije. Na slici 3. prikazan je dijagram ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata koja je dana Michaelis-Menteničinim kinetičkim modelom.





**Slika 2.** Ovisnost reakcijske brzine o koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menteničine kinetike (Findrik Blažević, 2011)

Iz dijagrama je vidljivo područje kinetike prvog reda koje opisuje linearnu ovisnost reakcijske brzine o koncentraciji supstrata kod malih koncentracija. Aproksimira se prema  $c_s \ll K_m$ . Područje velikih koncentracija aproksimira se kinetikom nultog reda prema  $c_s \gg K_m$  (Cornish-Bowden, 2012).

Michaelisova konstanta  $K_m$  jednaka je koncentraciji supstrata koja je potrebna da bi se postigla polovica maksimalne brzine. Ona govori o afinitetu enzima prema supstratu. Što je niža vrijednost to su enzim i supstrat kompatibilniji (Purich & Alison, 2000). Izraz koji opisuje Michaelisovu konstantu iskazan je konstantom brzine formiranja enzim-supstrat kompleksa, konstantom brzine disocijacije enzim-supstrat kompleksa te konstantom brzine formiranja produkta. Naime, model se temelji na pretpostavci da se prvo vežu enzim (E) i supstrat (S) dajući pritom kompleks enzim-supstrat (ES). Taj kompleks se pritom kemijski mijenja što rezultira stvaranjem produkta (P) i njegovim odvajanjem od enzima (Duraković & Redžepova, 1996).

Michaelisova konstanta može se opisati sljedećim izrazom (jed. 3.):

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (3.)$$

gdje su:

$k_1$  - konstanta brzine formiranja enzim-supstrat kompleksa (ES) ( $\text{min}^{-1}$ )

$k_2$  - konstanta brzine disocijacije enzim-supstrat kompleksa (ES) ( $\text{min}^{-1}$ )

$k_3$  - konstanta brzine formiranja produkta ( $\text{min}^{-1}$ ) (Geueke & Hummel, 2002).

Što je konstanta brzine  $k_1$  veća u odnosu na sumu konstanti brzina  $k_2 + k_3$  to je Michaelisova konstanta  $K_m$  manja iz čega slijedi da je reakcija nastajanja međukompleksa ES brža, a time i enzim ima dobar afinitet prema supstratu. Što je konstanta brzine  $k_1$  manja u odnosu na sumu konstanti vrijednosti  $k_2 + k_3$  to je Michaelisova konstanta  $K_m$  veća te je brzina nastajanja međukompleksa ES manja. Ovakav enzim ima loš afinitet prema supstratu (Purich & Alison, 2000 ).

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Kemikalije

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- Etanol, Gram-mol, Hrvatska
- ADH Sigma Aldrich, Njemačka
- NAD<sup>+</sup> Applichem, Španjolska
- Trietanolamin hidroklorid (TEA HCl) Acros Organics, Belgija.

#### 3.2. Aparatura

##### 3.2.1. Analitička vaga

Vaga SHIMADZU AUW120 (Japan) prikazana na slici 3. korištena je za pripremu odvaga za potrebne otopine.



**Slika 3.** Vaga SHIMADZU AUW120

##### 3.2.2. Homogenizator

Homogenizator (Vibrofix VF1, IKA-Werke, Njemačka) je uređaj koji osigurava učinkovitije otapanje komponenti te visok stupanj homogenizacije otopine. Korišten je za homogeniziranje reakcijskih otopina.

### 3.2.3. Spektrofotometar

Za ispitivanje aktivnosti enzima ADH spektrofotometrijskom metodom korišten je spektrofotometar SHIMADZU UV-1800 prikazan na slici 4.



**Slika 4.** Spektrofotometar SHIMADZU UV-1800

### 3.3. Određivanje kinetike reakcije oksidacije katalizirane ADH

Kinetika reakcije oksidacije etanola ispitana je mjerenjem aktivnosti enzima ADH u ovisnosti o koncentraciji etanola i  $\text{NAD}^+$ . Prilikom određivanja kinetike oksidacije etanola katalizirane enzimom ADH korištena je metoda početnih reakcijskih brzina. Pri tome je određen utjecaj koncentracija oba supstrata, etanola i  $\text{NAD}^+$ , na početnu brzinu reakcije dok je koncentracija ADH bila konstantna. Mjerenja su bila provedena na način da je koncentracija jednog reaktanta bila konstantna u svim mjerenjima, dok je koncentracija drugog reaktanta bila varirana od neke minimalne do maksimalne vrijednosti. Aktivnost enzima ADH određena je na spektrofotometru pri valnoj duljini od 340 nm jer na toj valnoj duljini NADH apsorbira svjetlost. Mjerenja su provedena u 50 mM TEA HCl puferu pH 8. Otopine su pripravljene u kvarcnim kivetama koje su postavljene u spektrofotometar i praćena je promjena apsorbancije s vremenom. Iz dobivenih vrijednosti je izračunata volumna i specifična aktivnost enzima prema jednadžbama 1 i 2.

$$V. A. = \frac{V_r}{\epsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (1)$$

$$S. A. = \frac{V_r}{\gamma_E} \quad (2)$$

Gdje su:

$V_T$  - ukupni volumen uzorka u kiveti (mL)

$V_E$  - volumen dodanog enzima (mL)

$\varepsilon$  - ekstinkcijski koeficijent ( $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

$d$  - promjer kivete (cm)

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$  - promjena apsorbancije uvremenu ( $\text{min}^{-1}$ )

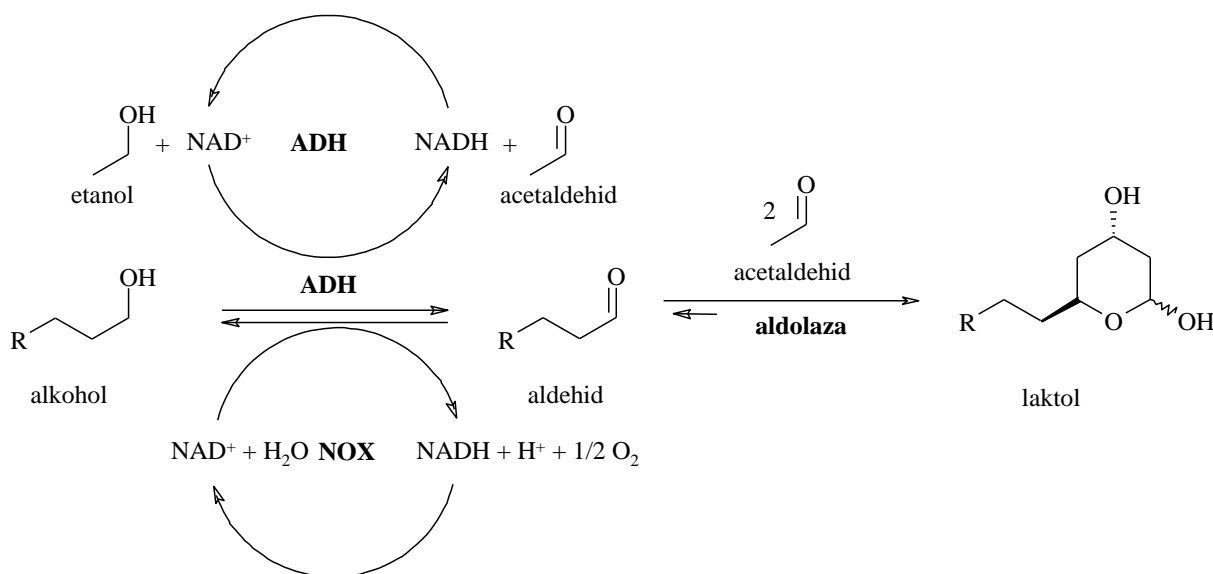
$V.A.$  - volumna aktivnost ( $U \text{ mL}^{-1}$ )

$S.A.$  - specifična aktivnost ( $U \text{ mL}^{-1}$ )

$\gamma_E$  - masena koncentracija enzima ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

#### 4. MATEMATIČKO MODELIRANJE

Na slici 5. prikazana je shema kaskadne reakcije koja se sastoji od oksidacije alkohola te aldolne adicije dvije molekule acetaldehida na aldehid pri čemu nastaje aldol. Oksidacija alkohola se provodi uz enzim ADH. Koenzim  $\text{NAD}^+$  koji prenosi elektrone tijekom oksidacije prelazi u reducirani oblik  $\text{NADH}$ . Reakcija oksidacije je povratna reakcija što znači da ADH katalizira i redukciju aldehida u alkohol. Potrebno je provoditi regeneraciju koenzima  $\text{NAD}^+$  tj. potrebno je reducirani oblik  $\text{NADH}$  prevesti u oksidirani oblik  $\text{NAD}^+$  kako bi mogao prenositi elektrone. Ova reakcija je katalizirana enzimom NOX-om. Aldehid koji nastaje sudjeluje u reakciji aldolne adicije katalizirane enzimom aldolazom. U ovoj reakciji dolazi do adicije dvije molekule acetaldehida na dobiveni aldehid pri čemu nastaje konačni produkt, aldol. U ovoj kaskadi dolazi i do sporedne reakcije u kojoj se acetaldehid reducira u etanol, a katalizira ju enzim ADH. Ova sporedna reakcija je također još jedan dodatan način regeneracije koenzima  $\text{NAD}^+$ .



Slika 5. Shema kaskadne reakcije

Razvijen je matematički model kaskadne reakcije oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima i aldolne adicije koji se sastoji od kinetičkih i bilancnih jednadžbi.

Brzina reakcije oksidacije alkohola katalizirane enzimom ADH u kaskadnoj reakciji može se opisati dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednadžbom s inhibicijom aldehidom,  $\text{NAD}^+$  i acetaldehidom (jednadžba 1).

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot ADH \cdot alk \cdot nad}{\left( K_{malk1} \cdot \left( 1 + \frac{ald}{K_{iald1}} + \frac{AA}{K_{iAA1}} \right) + alk \right) \cdot \left( K_{mnad1} \cdot \left( 1 + \frac{nadh}{K_{inadh1}} \right) + nad \right)} \quad (1.)$$

Brzina reakcije redukcije aldehida katalizirane enzimom ADH u kaskadnoj reakciji može se opisati dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednađbom s inhibicijom aldehidom, etanolom i NAD<sup>+</sup> (jednađba 2).

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot ADH \cdot ald \cdot nadh}{\left( K_{mald2} \cdot \left( 1 + \frac{EtOH}{K_{iEtOH2}} \right) + ald + \frac{ald \cdot ald}{K_{iald2}} \right) \cdot \left( K_{mnadh2} \cdot \left( 1 + \frac{nad}{K_{inadh2}} \right) + nadh \right)} \quad (2.)$$

Brzina reakcije redukcije acetaldehida enzimom ADH u kaskadnoj reakciji može se opisati dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednađbom s inhibicijom etanolom, alkoholom, acetaldehidom i NAD<sup>+</sup> (jednađbe 3).

$$r_3 = \frac{V_{m3} \cdot ADH \cdot AA \cdot nadh}{\left( K_{mAA3} \cdot \left( 1 + \frac{EtOH}{K_{iEtOH3}} + \frac{alk}{K_{ialk3}} \right) + AA + \frac{AA \cdot AA}{K_{iAA3}} \right) \cdot \left( K_{mnadh3} \cdot \left( 1 + \frac{nad}{K_{inadh3}} \right) + nadh \right)} \quad (3.)$$

Brzina reakcije oksidacije etanola katalizirane enzimom ADH u kaskadnoj reakciji može se opisati dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednađbom s inhibicijom aldehidom, etanolom, NADH i acetaldehidom (jednađba 4).

$$r_4 = \frac{V_{m4} \cdot ADH \cdot EtOH \cdot nad}{\left( K_{mEtOH4} \cdot \left( 1 + \frac{ald}{K_{iald4}} + \frac{AA}{K_{iAA4}} \right) + EtOH + \frac{EtOH \cdot EtOH}{K_{iEtOH4}} \right) \cdot \left( K_{mnadh4} \cdot \left( 1 + \frac{nadh}{K_{inadh4}} \right) + nad \right)} \quad (4.)$$

Brzina reakcije regeneracije koenzima NAD<sup>+</sup> katalizirane enzimom NOX-om u kaskadnoj reakciji može se opisati Michaelis-Menteničinom jednađbom s inhibicijom NAD<sup>+</sup>, acetaldehidom, etanolom, alkoholom i aldehidom (jednađba 5).

$$r_5 = \frac{V_{m5} \cdot NOX \cdot nadh}{K_{mnadh5} \cdot \left( 1 + \frac{nad}{K_{inadh5}} + \frac{AA}{K_{iAA5}} + \frac{EtOH}{K_{iEtOH5}} + \frac{alk}{K_{ialk5}} + \frac{ald}{K_{iald5}} \right) + nadh} \quad (5.)$$

Brzina reakcije aldolne adicije acetaldehida na aldehid u kaskadnoj reakciji također se može opisati dvosupstratnom Michaelis-Mentenčinom jednadžbom s inhibicijom acetaldehidom (jednadžba 6).

$$r_6 = \frac{V_{m6} \cdot ald \cdot AA \cdot aldoza}{(K_{mald6} + ald) \cdot \left( K_{mAA6} + \frac{AA \cdot AA}{K_{iAA6}} + AA \right)} \quad (6.)$$

Jednadžbe 7.-13. predstavljaju bilance tvari u reaktoru za sve komponente u reakcijskom sustavu.

Bilanca tvari za alkohol (jed. 7.):

$$\frac{dc_{ALK}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (7.)$$

Bilanca tvari za aldehid (jed. 8.):

$$\frac{dc_{ALD}}{dt} = r_1 - r_2 - r_6 \quad (8.)$$

Bilanca tvari za  $NAD^+$  (jed. 9.):

$$\frac{dc_{NAD^+}}{dt} = -r_1 + r_2 + r_3 - r_4 + r_5 \quad (9.)$$

Bilanca tvari za  $NADH$  (jed. 10.):

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 + r_4 - r_5 \quad (10.)$$

Bilanca tvari za acetaldehid (jed. 11.):

$$\frac{dc_{AA}}{dt} = -r_3 + r_4 - 2 \cdot r_6 \quad (11.)$$

Bilanca tvari za etanol (jed. 12.):

$$\frac{dc_{EtOH}}{dt} = -r_3 + r_4 \quad (12.)$$

Bilanca tvari za aldol (jed. 13.):

$$\frac{dc_{ALDOL}}{dt} = r_6 \quad (13.)$$



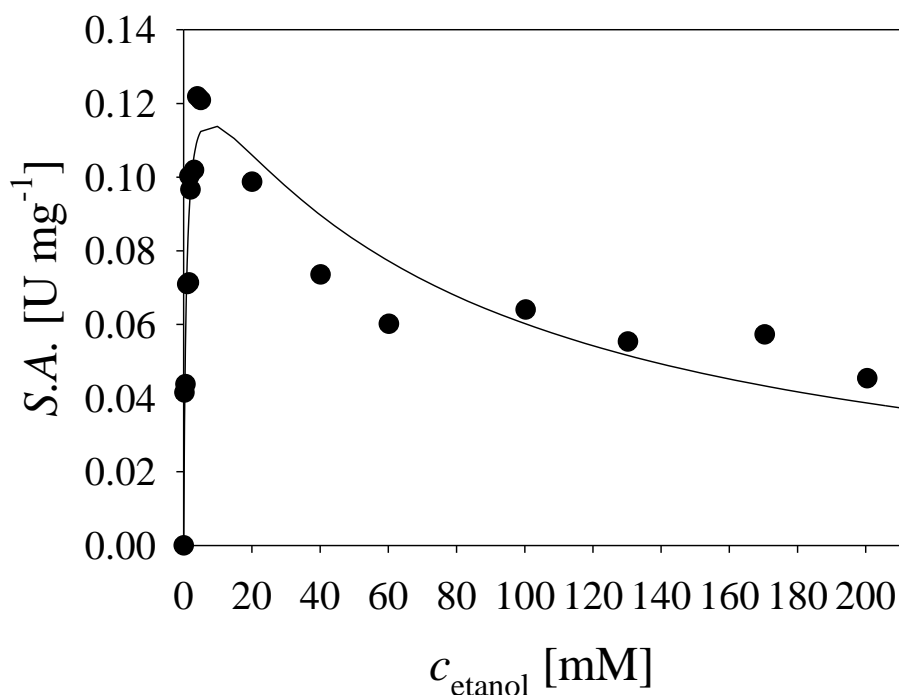
## 5. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj rada je bilo optimiranje početnih uvjeta kaskadne reakcije (slika 5.) pomoću matematičkog modela. Provedena su eksperimentalna istraživanja kinetike oksidacije etanola uz enzim alkohol dehidrogenazu. Ostale reakcije u kaskadi već su ranije ispitane te je njihova kinetika određena. Na temelju sheme reakcije i svih kinetičkih parametara razvijen matematički model koji je korišten za ispitivanje utjecaja koncentracija  $\text{NAD}^+$ , NOX-a, acetaldehida i ADH na koncentraciju nastalog produkta, aldehida, u reakciji oksidacije alkohola te utjecaj koncentracija alkohola i acetaldehida na koncentraciju aldola u kaskadnoj reakciji. Ispitivanja su provedena u svrhu optimiranja koncentracija navedenih komponenti kako bi se dobila što veća koncentracija aldehida tj. konačnog produkta aldola.

### 5.1. Kinetika oksidacije etanola

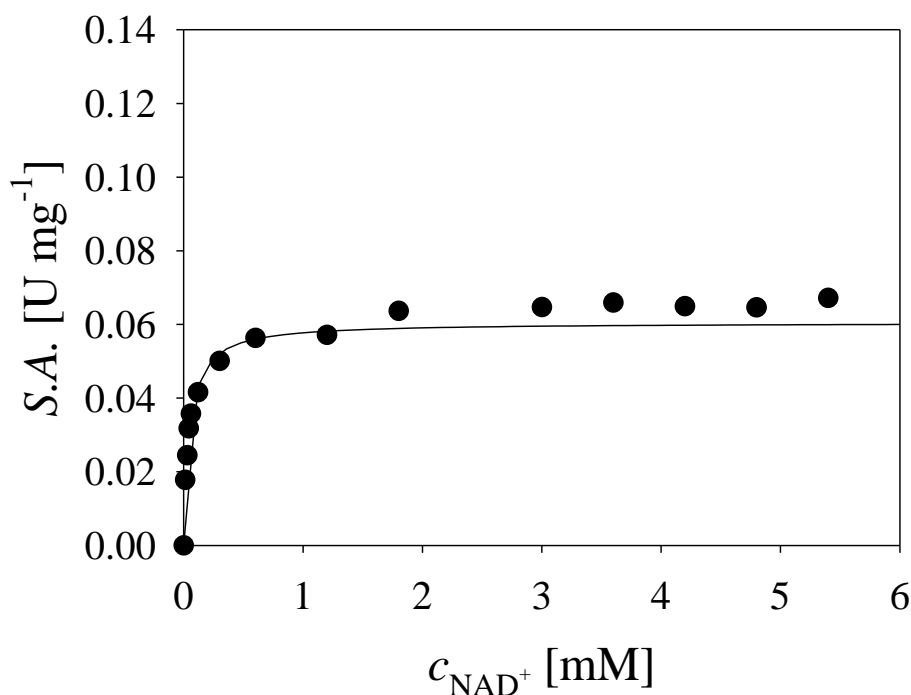
Za određivanje kinetike oksidacije etanola bilo je potrebno ispitati utjecaj koncentracije reakcijskih komponenti, etanola i  $\text{NAD}^+$ , na početnu brzinu reakcije oksidacije etanola.

Na slici 6. prikazan je utjecaj koncentracije etanola na početnu brzinu reakcije oksidacije etanola katalizirane ADH. Iz rezultata je vidljivo da brzina reakcije oksidacije raste do koncentracije etanola od 10 mM nakon čega slijedi pad brzine reakcije oksidacije s povećanjem koncentracije etanola što znači da dolazi do inhibicije supstratom.



**Slika 6.** Utjecaj etanola na početnu brzinu reakcije u oksidaciji etanola kataliziranoj ADH (50 mM TEA HCl pH 8.0,  $\gamma_{\text{ADH}} = 0.125 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+} = 8.99 \text{ mM}$ ).

Na slici 7. prikazan je utjecaj koncentracije drugog supstrata,  $\text{NAD}^+$ , na početnu brzinu oksidacije etanola. Rezultati pokazuju da povećanjem koncentracije dolazi do povećanja brzine reakcije oksidacije do koncentracije  $\text{NAD}^+$  od 0.7 mM nakon koje brzina reakcije oksidacije ne mijenja vrijednost nego je konstantna. Naime, iz trenda eksperimentalnih podataka se može zaključiti da se radi o Michaelis-Menteničinoj kinetici.



**Slika 7.** Utjecaj  $\text{NAD}^+$  na početnu brzinu reakcije u oksidaciji etanola kataliziranoj ADH (50 mM TEA HCl pH 8.0,  $\gamma_{\text{ADH}} = 0.125 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{etanol}} = 100.22 \text{ mM}$ ).

Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri oksidacije etanola (tablica 1.). Iz procijenjenih kinetičkih parametara za reakciju oksidacije etanola može se zaključiti da je Michaelisova konstanta  $K_m$  za  $\text{NAD}^+$  manja od konstante za etanol, što ukazuje na bolji afinitet enzima ADH za  $\text{NAD}^+$  kao supstrat.

**Tablica 1.** Procijenjeni kinetički parametri za oksidaciju etanola

Parametar	Mjerna jedinica	Vrijednost
$V_m$	$\text{U mg}^{-1}$	$0.138 \pm 0.003$
$K_m^{\text{etanol}}$	mM	$0.777 \pm 0.239$
$K_i^{\text{etanol}}$	mM	$78.892 \pm 19.512$
$K_m^{\text{NAD}^+}$	mM	$0.048 \pm 0.006$

U tablici 2. prikazani su kinetički parametri za ostale reakcije u kaskadnom sustavu prikazanom na slici 5 koji su ranije određeni te su korišteni za razvoj matematičkog modela reakcije (Sudar et al., 2018).

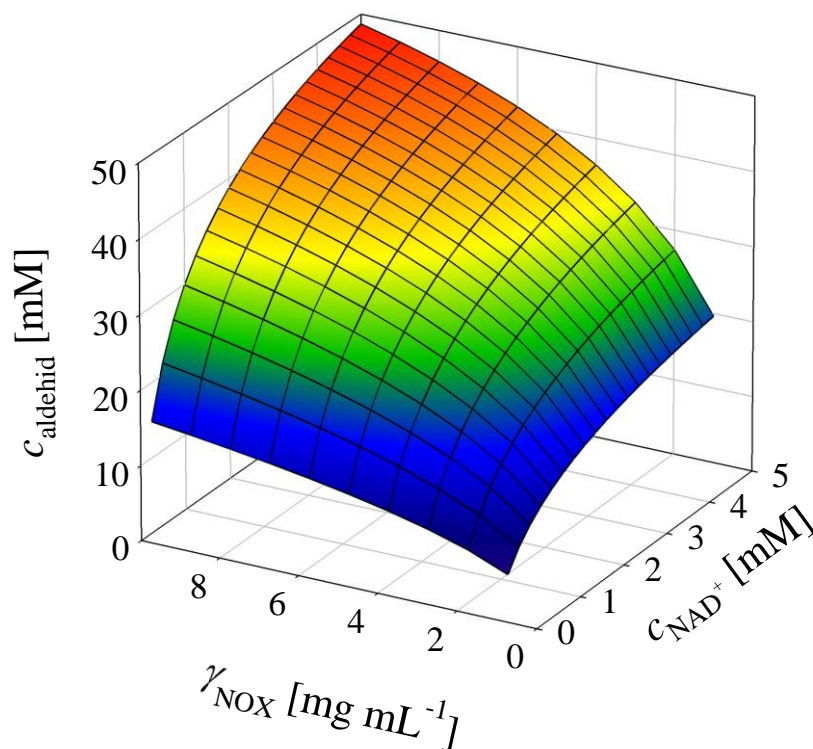
**Tablica 2.** Kinetički parametri korišteni u modelu

Parametar	Mjerna jedinica	Vrijednost
<b>Oksidacija alkohola</b>		
$V_m$	U mg <sup>-1</sup>	0.109 ± 0.0007
$K_m^{\text{alkohol}}$	mM	51.919 ± 2.263
$K_m^{\text{NAD}^+}$	mM	0.916 ± 0.121
<b>Redukcija aldehida</b>		
$V_m$	U mg <sup>-1</sup>	0.626 ± 0.007
$K_m^{\text{aldehid}}$	mM	1.981 ± 0.341
$K_i^{\text{aldehid}}$	mM	40.950 ± 7.592
$K_m^{\text{NADH}}$	μM	9.969 ± 1.168
$K_i^{\text{NAD}^+}$	mM	0.222 ± 0.015
$K_i^{\text{etanol}}$	mM	1.493 ± 0.095
<b>Regeneracija koenzima katalizirana NADH oksidazom</b>		
$V_m$	U mg <sup>-1</sup>	1.761 ± 0.115
$K_m^{\text{NADH}}$	mM	0.075 ± 0.012
$K_i^{\text{NAD}^+}$	mM	0.630 ± 0.045
$K_i^{\text{acetaldehid}}$	mM	77.326 ± 5.315
$K_i^{\text{aldehid}}$	mM	3.361 ± 0.414
$K_i^{\text{alkohol}}$	mM	42.265 ± 3.874
<b>Redukcija acetaldehida</b>		
$V_m$	U mg <sup>-1</sup>	0.530 ± 0.010
$K_m^{\text{acetaldehid}}$	mM	0.065 ± 0.009
$K_i^{\text{acetaldehid}}$	mM	7605.023 ± 1908.241
$K_m^{\text{NADH}}$	μM	8.333 ± 1.383
$K_i^{\text{etanol}}$	μM	9.163 ± 0.955
$K_i^{\text{NAD}^+}$	mM	0.141 ± 0.018
$K_i^{\text{alkohol}}$	mM	0.041 ± 0.005
<b>Oksidacija etanola</b>		
$K_i^{\text{NADH}}$	μM	8.987 ± 0.643
$K_i^{\text{aldehid}}$	mM	1.967 ± 0.171
$K_i^{\text{acetaldehid}}$	mM	0.058 ± 0.011
<b>Aldolna adicija</b>		
$V_m$	U mg <sup>-1</sup>	0.183 ± 0.009
$K_m^{\text{aldehid}}$	mM	66.862 ± 3.242
$K_m^{\text{acetaldehid}}$	mM	5.236 ± 0.574
$K_i^{\text{acetaldehid}}$	mM	279.041 ± 38.725
$K_i^{\text{alkohol}}$	mM	68.103 ± 1.556
$K_i^{\text{NAD}^+}$	mM	1.210 ± 0.116

## 5.2. Simulacije oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu NOX-om

Razvijen je model za oksidaciju alkohola s regeneracijom koenzima kataliziranom NOX-om. Provedene su simulacije s različitim koncentracijama NOX-a i  $\text{NAD}^+$  kako bi se odredio njihov utjecaj na koncentraciju produkta reakcije oksidacije tj. aldehida. Jednadžbe koje su korištene za razvijanje modela su jednadžba 1 iz koje je izostavljena inhibicija s aldehidom, acetaldehidom i  $\text{NAD}^+$ , jednadžba 2 iz koje je izostavljena inhibicija s aldehidom, etanolom i  $\text{NAD}^+$  te jednadžba 5 iz koje je izostavljena inhibicija s acetaldehidom, aldehidom,  $\text{NAD}^+$  etanolom i alkoholom.

Na slici 8. prikazani su dobiveni rezultati. Koncentracije ADH i alkohola su bile konstantne. Iz rezultata je vidljivo da se povećanjem koncentracije i koenzima i enzima povećava koncentracija produkta, tj. aldehida. Maksimalna koncentracija aldehida koju je moguće dobiti iz 100 mM alkohola je oko 50 mM pri koncentraciji ADH od  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , koncentraciji NOX-a oko  $15 \text{ mg mL}^{-1}$  i koncentraciji  $\text{NAD}^+$  oko 4.5 mM.

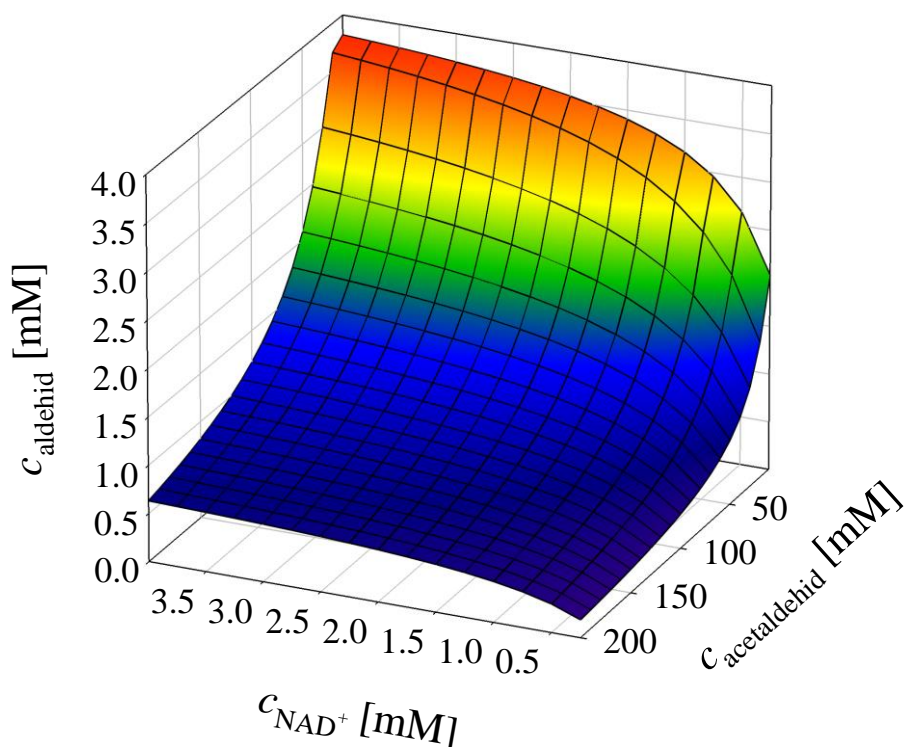


**Slika 8.** Utjecaj  $\text{NAD}^+$  i NOX-a na koncentraciju nastalog produkta u reakciji oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu NOX-om ( $\gamma_{\text{ADH}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{alkohol}} = 100 \text{ mM}$ ,  $t = 11.65 \text{ h}$ ).

### 5.3. Simulacije oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu ADH

S obzirom da u kaskadnoj reakciji kao jedan od supstrata aldolne adicije sudjeluje acetaldehid, ispitan je utjecaj koncentracije  $\text{NAD}^+$  i acetaldehida na koncentraciju aldehida u reakciji oksidacije alkohola bez dodatka NOX-a. Acetaldehid sudjeluje u sporednoj reakciji koja je katalizirana enzimom ADH. U ovoj reakciji se acetaldehid reducira u etanol uz koenzim NADH što znači da ova reakcija predstavlja dodatnu metodu regeneracije koenzima  $\text{NAD}^+$ . Razvijen je model za oksidaciju s regeneracijom koenzima kataliziranu ADH. Jednadžbe koje su korištene za razvijanje modela su jednadžbe 1, 2, 3 i 4 iz kojih se izostavlja inhibicija. Kod jednadžbe 1 je izostavljena inhibicija s aldehidom, acetaldehidom i  $\text{NAD}^+$ , kod jednadžbe 2 inhibicija s aldehidom, etanolom i  $\text{NAD}^+$ , kod jednadžbe 3 inhibicija s etanolom, alkoholom, acetaldehidom i  $\text{NAD}^+$  te kod jednadžbe 4 inhibicija s aldehidom, etanolom, NADH i acetaldehidom.

Na slici 9. prikazani su dobiveni rezultati. Koncentracije ADH i alkohola su bile konstantne u ovim simulacijama. Iz rezultata je vidljivo da se povećanjem koncentracije koenzima te smanjenjem koncentracije acetaldehida povećava koncentracija produkta, tj aldehida. Maksimalna koncentracija aldehida koju je moguće dobiti iz 100 mM alkohola je oko 3.75 mM pri koncentraciji ADH od  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , koncentraciji koenzima oko 3.5 mM te koncentraciji acetaldehida oko 50 mM. Iz rezultata je također vidljivo da je koncentracije dobivenog aldehida oko 3.75 mM manje kod regeneracije s ADH u odnosu na koncentracije dobivenog aldehida oko 50 mM kod regeneracije s NOX-om iz čega se može zaključiti da je regeneracija s NOX-om učinkovitija.



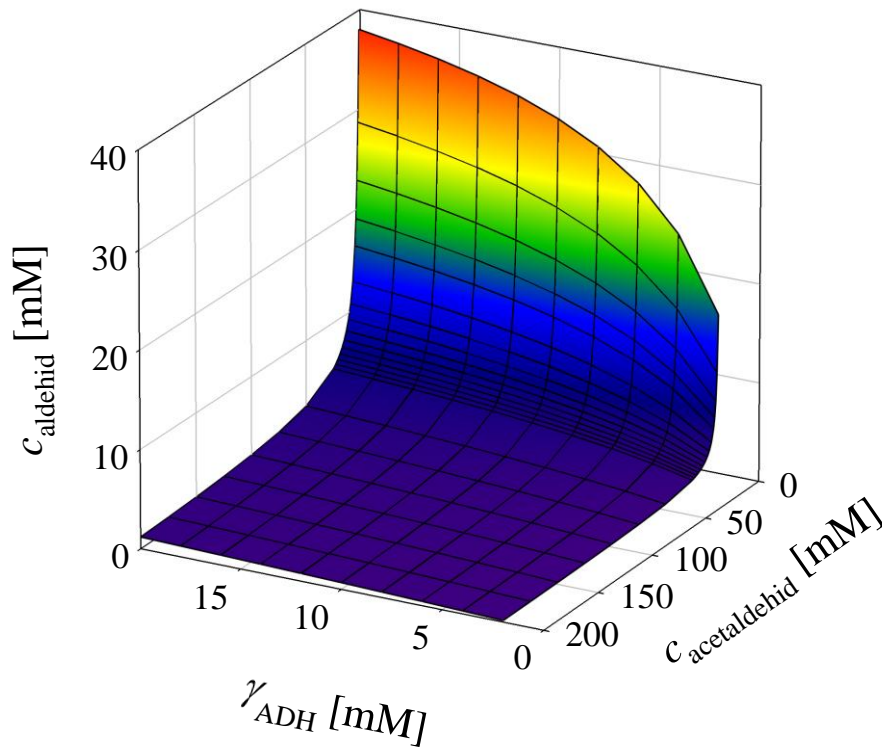
**Slika 9.** Utjecaj  $\text{NAD}^+$  i acetaldehida na koncentraciju nastalog produkta u reakciji oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu ADH ( $\gamma_{\text{ADH}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{alkohol}} = 100 \text{ mM}$ ,  $t = 25 \text{ h}$ ).

#### 5.4. Simulacije oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu ADH i NOX-om

Razvijen je model za oksidaciju alkohola s regeneracijom koenzima kataliziranu NOX-om te uz dodatak acetaldehida. Provedene su simulacije s različitim koncentracijama ADH i acetaldehida kako bi se odredio njihov utjecaj na koncentraciju produkta reakcije oksidacije tj. aldehida. Jednadžbe koje su korištene za razvijanje modela su jednadžbe 1, 2, 3, 4 i 5 iz kojih je izostavljena inhibicija. Kod jednadžbe 1 je izostavljena inhibicija s aldehydom, acetaldehydom i  $\text{NAD}^+$ , kod jednadžba 2 inhibicija s aldehydom, etanolom i  $\text{NAD}^+$ , kod jednadžbe 3 inhibicija s etanolom, alkoholom, acetaldehydom i  $\text{NAD}^+$ , kod jednadžbe 4 inhibicija s aldehydom, etanolom,  $\text{NADH}$  i acetaldehydom te kod jednadžbe 5 inhibicija s acetaldehydom, aldehydom,  $\text{NAD}^+$ , etanolom i alkoholom.

Na slici 10. prikazani su dobiveni rezultati. Prilikom provođenja ovih simulacija koncentracije NOX-a, alkohola i  $\text{NAD}^+$  su bile konstantne. Iz rezultata je vidljivo da se povećanjem koncentracije ADH te smanjenjem koncentracije acetaldehida povećava koncentracija produkta, tj. aldehida. Maksimalna koncentracija aldehida kod regeneracije s

ADH i NOX-om iznosi oko 37 mM, dok maskimalna koncentracija aldehida kod regeneracije s NOX-om odnosno s ADH iznosi oko 50 mM odnosno 3.75 mM. Može se zaključiti da je regeneracija s NOX-om najučinkovitija dok je regeneracija s ADH i NOX-om učinkovitija od regeneracije samo s ADH.



**Slika 10.** Utjecaj ADH i acetaldehida na koncentraciju nastalog produkta u reakciji oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu ADH i NOX-om ( $\gamma_{\text{NOX}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{alkohol}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NAD}^+} = 5 \text{ mM}$ ,  $t = 57.33 \text{ h}$ ).

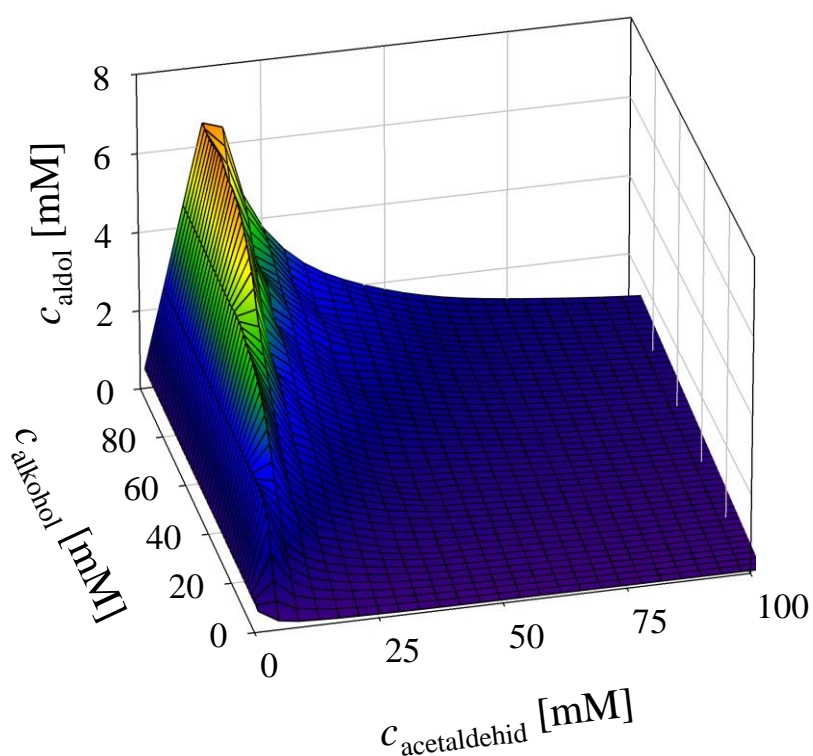
### 5.5. Simulacije kaskadne reakcije oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima kataliziranu i aldolne adicije

Simulacija prikazuje utjecaj koncentracija alkohola i acetaldehida na koncentraciju nastalog produkta u kaskadnoj reakciji oksidacije alkohola i aldolne adicije acetaldehida na nastali aldehid. Model koji je korišten za provođenje simulacija sastoji se od reakcije oksidacije s regeneracijom koenzima i aldolne adicije acetaldehida na aldehid. Jednadžbe koje su korištene za razvijanje modela su jednadžbe 1, 2, 3, 4 i 5 iz kojih je izostavljena inhibicija. Kod jednadžbe 1 je izostavljena inhibicija s aldehidom, acetaldehidom i  $\text{NAD}^+$ , kod jednadžba 2 inhibicija s aldehidom, etanolom i  $\text{NAD}^+$ , kod jednadžbe 3 inhibicija s etanolom,



alkoholom, acetaldehidom i  $\text{NAD}^+$ , kod jednadžbe 4 inhibicija s aldehidom, etanolom,  $\text{NADH}$  i acetaldehidom, kod jednadžbe 5 inhibicija s acetaldehidom, aldehidom,  $\text{NAD}^+$  etanolom i alkoholom te kod jednadžbe 6 inhibicija s acetaldehidom.

Na slici 11. prikazani su dobiveni rezultati. Prilikom provođenja ovih simulacija koncentracije ADH, NOX-a, aldolaze i  $\text{NAD}^+$  su bile konstantne. Iz rezultata je vidljivo da se povećanjem koncentracije alkohola te smanjenjem koncentracije acetaldehida povećava koncentracija nastalog produkta, tj. aldola. Maksimalna dobivena koncentracija aldola iznosi oko 6.8 mM pri koncentraciji NOX-a, ADH i aldolaze od  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , koncentraciji  $\text{NAD}^+$  od 1 mM, koncentraciji alkohola oko 90 mM i koncentraciji acetaldehida oko 5 mM.



**Slika 11.** Utjecaj alkohola i acetaldehida na koncentraciju nastalog produkta u kaskadnoj reakciji oksidacije alkohola uz regeneraciju koenzima i aldolne adicije ( $\gamma_{\text{NOX}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\gamma_{\text{ADH}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\gamma_{\text{aldolaza}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mM}$ ,  $t = 37 \text{ h}$ ).

## 6. ZAKLJUČAK

Iz procijenjenih kinetičkih parametara za reakciju oksidacije alkohola može se zaključiti da je Michaelisova konstanta za aldehid manja od konstante za alkohol, što ukazuje na visoku specifičnost enzima ADH na aldehid kao supstrat.

Na temelju simulacija provedenih u svrhu optimiranja početnih uvjeta može se zaključiti da sve ispitane komponente ( $\text{NAD}^+$ , NOX, NADH, ADH, acetaldehid, alkohol) imaju utjecaja na konačnu koncentraciju aldolnog produkta. Prvo se razvija model samo za oksidaciju uz regeneraciju s NOX-om, nakon čega se razvija model samo za oksidaciju uz regeneraciju s ADH te na kraju se razvija model za oksidaciju u koji su uključene obje metode regeneracije. Navedeni modeli se razvijaju u svrhu dobivanja najučinkovitije metode regeneracije. Razvijanjem navedenih modela te provođenjem ispitivanja utjecaja određenih koncentracija komponenta na maksimalnu dobivenu koncentraciju aldehida može se zaključiti da je regeneracija s NOX-om najučinkovitija.

Razvijen je model za kaskadnu reakciju koji objedinjuje oksidaciju alkohola s regeneracijom koenzima te aldolnu adiciju. Iz modela se može zaključiti da se povećanjem koncentracije alkohola te smanjenjem koncentracije acetaldehida povećava koncentracija aldola. Maksimalna dobivena koncentracija aldola je oko 6.8 mM pri koncentraciji NOX-a, ADH i aldolaze od  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ , koncentraciji  $\text{NAD}^+$  od 1 mM, koncentraciji alkohola oko 90 mM i koncentraciji acetaldehida oko 5 mM.

## 7. LITERATURA

1. Anastas, P.T., Kirchoff, M.M., Origins, current status, and future challenges of green chemistry, *Accounts of Chemical Research*, 35 (2002) 686-694.
2. Anastas, P.T., Warner, J.C., *Green chemistry, Theory and practice*, Oxford University Press, Engleska, 2000., str. 20-22.
3. Brass, J.M., Hoeks, F.W.J.M.M., Rohner, M., Application of modelling techniques for the improvement of industrial bioprocesses received, *Journal of Biotechnology*, 59 (1997) 63-72.
4. Baş D., Boyacı, I.H., Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology, *Journal of Food Engineering*, 78 (2007) 836-845.
5. Bender, E., *An Introduction to Mathematical Modeling*, Dover Publications, New York, 1978., str. 1-4.
6. Bisswagner, H., *Enzyme Kinetics, Principles and Methods*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA , Germany, 2008., str. 55-56.
7. Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of Enzyme kinetics*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA , Germany, 2012., str. 28-34.
8. Duraković, S., Redžepova, S., *Uvod u opću mikrobiologiju*, Kugler d.o.o., Zagreb, 1996., str. 231-232.
9. Findrik Blažević, Z. (2011) *Kemijsko i biokemijsko inženjerstvo: 5. predavanje, nastavni materijal za kolegij Kemijsko i biokemijsko inženjerstvo*, Sveučilišta u Zagrebu,  
[https://www.fkit.unizg.hr/\\_download/repository/Kemijsko\\_i\\_biokemijsko\\_inzenjerstvob\\_9-10.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Kemijsko_i_biokemijsko_inzenjerstvob_9-10.pdf)
10. Geueke, B., Hummel, W.; A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization, *Enzyme and Microbial Technology*, 31 (2002) 77-87.
11. Ghisalpa, O., Meyer, H.P., Wolhgemuth, R. u: Flickinger, C.M., *Industrial Biotransformation, Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, New York, John Wiley & Sons, 1 (2010) 1-16.
12. [https://www.123rf.com/photo\\_16083629\\_chemical-structure-of-a-molecule-of-human-alcohol-dehydrogenase-b3-adh-the-adh-enzyme-catalyses-the-.html](https://www.123rf.com/photo_16083629_chemical-structure-of-a-molecule-of-human-alcohol-dehydrogenase-b3-adh-the-adh-enzyme-catalyses-the-.html)  
(pristup 22. kolovoz 2018.)

13. Hui, Y.H. ed., Wai-Kit, N. ed., M.L. Nollet, L. ed., Paliyath Ph.D., G. ed., Simpson, B.K. ed., Food biochemistry and food processing, Blackwell Publishing, USA, 2006., str. 12.
14. Hummel, W., Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments, *Trends in Biotechnology*, 17 (1999) 487-92.
15. Illanes, A., *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*, Springer, Chile, 2008., str. 1-19.
16. Illanes, A., Cauerrhff, A., Wilson, L., Catstro, R.G., Recent trends in biocatalysis engineering, *Bioresource Technology*, 115 (2012) 48-57.
17. Kragl, U., Vasić-Rački, Đ., Wandrey, C., Continuous processes with soluble enzymes; *Indian Journal of Chemistry* 32B (1993) 103-117
18. Murphy, E.F., Gilmour, S.G., Crabb, M.J., Effective experimental design: enzyme kinetics in the bioinformatics era, *Drug Discovery Today*, 7 (2002) 187-191.
19. Purich, D.L., Allison, R.D., *Biochemical Kinetics*, Academic Press, Florida, 2000., str. 387, 467
20. Saibi, W., Abdeljalil, S., Masmoudi, K., Gargouri, A., Biocatalysts: Beautiful creatures, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 426(3) (2012) 289-293.
21. Schmidt, S., Castiglione, K., Kourist, R., Enzyme Cascade Reactions: Overcoming the Incompatibility Challenge in Chemoenzymatic and Multi-Catalytic Cascade Reactions, *Chemistry A European Journal*, 24 (2018) 1755-1768.
22. Schrittwieser, J.H., Velikogne, S., Hall, M., Kroutil, W., Artificial Biocatalytic Linear Cascades for Preparation of Organic Molecules, *Chemical Reviews*, 18 (2018) 270-348.
23. Sheldon, A.R. u Gracia-Junceda E., *Multi-Step Enzyme Catalysis: biotransformations nad chemoenzymatic synthesis*, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, 6 (2008) 109-110.
24. Scrutton, M.C., Young M.R. u Boyer P.D., *The Enzymes*, New York and London, Academic Press, 1 (1972) 1-2.
25. Sudar, M., Findrik, Z., Vuković Domanovac, M., Vasić-Rački, Đ., Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactococcus lactis*, *Biochemical Engineering Journal*, 88 (2014) 12-18.
26. Sudar, M., Vasić-Rački, Đ., Hernandez, K., Clapes, P., Findrik Blažević, Z., Lescai, F. ed., Rudelsheim, P. ed.; *Kinetic characterization of enzymes in a multi-*

enzyme cascade reaction for the synthesis of statin side-chain precursors, *European congress od Biotechnology 2018*, Elsevier, (2018) 63-63.

27. 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.
28. Stryer, L., *Biokemija*, 2. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 1991., str. 35-53.
29. Van't Riet K., Tramper J., *Basic Bioreactor Design*, Marcel Dekker, New York, 1991, str. 91-94
30. Vasić-Rački, Đ., Presečki, A.V., Mathematical modelling of the dehydrogenase catalyzed hexanol oxidation with coenzyme regeneration by NADH oxidase, *Process Biochemistry*, 44 (2009) 54-61.
31. Woodyer, R.D., Johannes T.W., Zhao Huimin u Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C., u: Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.S., Larroche, C., *Enzyme Technology, Cofactor Regeneration of Biocatalytic Applications*, New Delhi, India, Asiatech Publishers Inc., Springer Science, 5 (2004) 83-101.

## POPIS SIMBOLA

$\gamma_{ADH}$  - masena koncentracija alkohol dehidrogenaze (ADH),  $\text{mg mL}^{-1}$

$\gamma_E$  - masena koncentracija enzima,  $\text{mg mL}^{-1}$

$\gamma_{NOX}$  - masena koncentracija NOX,  $\text{mg mL}^{-1}$

$\mathcal{E}$  - ekstincijski koeficijent,  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

$\mathcal{C}_{E0}$  - početna koncentracija enzima, mM

$c_S$  - koncentracija supstrata, mM

$d$  - promjer kivete, cm

$K_i$  - konstanta inhibicije, mM

$K_m$  - Michaelisova konstanta, mM

$k_3$  - katalitička konstanta enzima,  $\text{min}^{-1}$

$r_S$  - brzina reakcije, mM

$t$  - vrijeme, h

$V_E$  - volumen dodanog enzima, mL

$V_m$  - maksimalna brzina reakcije,  $\text{U mg}^{-1}$

$V_r$  - ukupni volumen uzorka u kiveti, mL

ADH - enzim alkohol dehidrogenaza

$\text{NAD}^+$  - koenzim nikotinamid adenin dinukleotid

NADH - reducirani oblik koenzima nikotinamid adenin dinukleotid

NOX - enzim NADH oksidaza

$S.A.$  - specifična aktivnost,  $\text{U mL}^{-1}$

$V.A.$  - volumna aktivnost,  $\text{U mL}^{-1}$

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$  - promjena apsorbancije u vremenu,  $\text{min}^{-1}$

## **ŽIVOTOPIS**

Karla Grošić [REDACTED] Završila je OŠ Mate Lovraka u Petrinji. Nakon završene osnovne škole upisala je Tehničku školu Sisak, maturirala 2015. godine, te iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Primijenjena kemija.