

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Antonija Višević

OPTIMIRANJE DEZINTEGRACIJE STANICA *LACTOBACILLUS BREVIS*
U SVRHU IZOLACIJE ENZIMA ALKOHOL DEHIDROGENAZE

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitne komisije: Izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
Izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar
Doc. dr. sc. Hrvoje Kušić

Zagreb, rujan 2015.

Ovaj je rad izrađen u Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom prof. dr. sc. Ane Vrsalović Presečki.

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je optimirati dezintegraciju stanične stijenke *L. brevis* primjenom metode odzivnih površina (Design expert) u svrhu dobivanja maksimalne aktivnosti alkohol dehidrogenaze u ekstraktu proteina. Dezintegracija se provodila kombinacijom biološke i mehaničke metode tako da se prvo provodila enzimska razgradnja stanične membrane stanice *L. brevis* primjenom enzima lizozima, a zatim su se stanice izložile ultrazvučnim vibracijama uz prisutnost staklenih kuglica.

Dobiveni enzim u ekstraktu proteina je kinetički karakteriziran u reakciji sinteze kiralnog alkohola (*R*)-1-feniletanola iz acetofenona. Kinetika reakcije redukcije acetofenona i povratne reakcije oksidacije (*R*)-1-feniletanola su opisane Michaelis-Menteničinom kinetičkom jednadžbom.

Ključne riječi: *Lactobacillus brevis*, dezintegracija stanične stijenke, alkohol dehidrogenaza, lizozim, (*R*)-1-feniletanol, acetofenon

ABSTRACT

The aim of this study was to optimize the disintegration of the cell membrane of *L. brevis* using response surface methodology to obtain maximal alcohol dehydrogenase activity in the protein extract. The disintegration was carried out by a combination of biological and mechanical methods. First enzymatic degradation of cell membranes cells *L. brevis* using the enzyme lysozyme was carried out, and then the cells was exposed to the ultrasonic vibrations in the presence of glass beads.

The obtained enzyme in the protein extract was kinetically characterized in the reaction of the synthesis of chiral alcohol (*R*)-1-phenylethanol from acetophenone. The kinetics of the reduction reaction and the reverse reaction of acetophenone oxidation of (*R*)-1-phenylethanol were described by Michaelis-Menten kinetic equation.

Key words: *Lactobacillus brevis*, disintegration of the cell membrane, alcohol dehydrogenase, lysozyme, (*R*)-1-phenylethanol, acetophenone

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Bakterije mliječne kiseline.....	2
2.1.1. <i>Lactobacillus brevis</i>	2
2.2. Dezintegracija stanične stijenke bakterija.....	3
2.2.1. Metode dezintegracije stanične stijenke	4
2.3. Enzim alkohol dehidrogenaza.....	5
2.3.1. Enzim alkohol dehidrogenaza iz <i>Lactobacillus brevis</i>	6
2.4. Matematički model enzimatskih reakcija	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. Aparatura.....	9
3.1.1. Centrifuga s hlađenjem	9
3.1.2. Dvoznačni UV-VIS spektrofotometar	9
3.1.3. Ultrazvučni homogenizator.....	10
3.2. Dezintegracija stanične stijenke.....	10
3.3. Analitičke metode	11
3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima ADH u ekstraktu proteina iz stanica <i>L.brevis</i> ..	11
3.3.2. Određivanje kinetike enzima ADH u ekstraktu proteina iz stanica <i>L.brevis</i> ...	12
3.4. Obrada podataka	12
4. MATEMATIČKI MODEL BIOKATALITIČKE SINTEZE (<i>R</i>)-1-FENILETANOLA .	13
5. REZULTATI I RASPRAVA	15
5.1. Optimiranje procesa dezintegracije stanične stijenke	15
5.2. Kinetika alkohola dehidrogenaze u ekstraktu proteina iz <i>L.brevis</i>	17
5.3. Simulacije redukcije acetofenona uz <i>LbADH</i> u ekstraktu proteina u kotlastom reaktoru	21
6. ZAKLJUČAK.....	24
7. SIMBOLI	25
8. LITERATURA	26
9. ŽIVOTOPIS	27

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline su skupina gram-pozitivnih bakterija koje fermentiraju šećer (npr. glukoza) uglavnom u mliječnu kiselinu (laktat). Velik broj sudjeluje u fermentaciji razne hrane i pića kao što su mliječni proizvodi, meso, riba, razno povrće, kiselo tijesto, vino i sl.¹

Lactobacillus brevis je heterofermentativna bakterija mliječne kiseline koja se može naći u raznim okruženjima - fermentiranim namirnicama, ali i normalnoj crijevnoj mikroflori. Od široke primjene bakterija mliječne kiseline potrebno je naglasiti oksidoreduktazu *L. brevis* zbog intracelularnog enzima R-specifične NADPH-ovisne alkohol dehidrogenaze (*LbADH*) koji uz istodobnu oksidaciju koenzima NADPH katalizira enantioselektivnu redukciju prokiralnih ketona u odgovarajuće sekundarne kiralne alkohole.²

Alkohol dehidrogenaza iz *Lactobacillus brevis* (*LbADH*) je snažan i svestran enzim. Čak i u prisutnosti nekonvencionalnih medija, poput organskog otapala, superkritične tekućine ili plinovitih reaktanta, *LbADH* ostaje aktivan. Kako je *LbADH* intracelularni enzim potrebno je provesti dezintegraciju stanične stijenke da bi se mogla provesti biokatalitička redukcija prokiralnog ketona acetofenona u (*R*)-1-feniletanol.³

U ovom radu optimiran je proces dezintegracije stanične stijenke *L. brevis*. Optimiranje je matematički postupak koji se primjenjuje kako bi se postiglo najbolje moguće stanje ili rješenje što je u ovom slučaju bila maksimalna aktivnost enzima ADH u ekstraktu proteina.

2. OPĆI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) su gram-pozitivne, nesporgene, mezofilne bakterije, katalaza-negativne, ne sintetiziraju porfirine, nemaju citokroma, a rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama. Mogu biti koki ili štapići i glavna značajka im je proizvodnja mliječne kiseline kao krajnji proizvod svojeg metabolizma.¹ U prirodi se mogu naći na supstratima bogatim hranjivim tvarima kao što su meso, mlijeko, razgradljivi biljni materijal i u ljudskom gastrointestinalnom sustavu. Također, vrlo su važni za industriju jer se upotrebljavaju za dobivanje različitih fermentiranih proizvoda, a sve češće se BMK primjenjuje kao probiotik.⁴ Probiotik je pojedinačna ili mješovita kultura živih mikroorganizama koji blagotvorno djeluju na domaćina poboljšavajući svojstva mikroflore probavnog sustava. Djelovanje na zdravlje domaćina obuhvaća poboljšavanje metabolizma laktoze, suzbijanje urogenitalnih infekcija, crijevnih infekcija i alergijskih reakcija, stimuliranje imunološkog sustava i modifikaciju crijevne mikroflore.⁵ Važna karakteristika BMK je što imaju GRAS (engl. *Generally Recognized As Safe*) status što znači da se smatraju sigurnim dodatkom hrani.⁶

Sve bakterije mliječne kiseline razgrađuju ugljikohidrate heksoze i kao produkt razgradnje su D-(-)-mliječna kiselina, L-(+)-mliječna kiselina ili oboje. BMK se svrstavaju u dvije grupe s obzirom na način razgradnje heksoze: homofermentativne i heterofermentativne.⁷ Homofermentativni put razgradnje glukoze se odnosi na glikolizu, a heterofermentativni se odnosi na 6-fosfoglukonat/fosfoketolata put, koji se još može nazvati i pentoza fosfatni put. Na temelju ta dva fermentacijska puta BMK se dijele u tri osnovne skupine: homofermentativne, fakultativno heterofermentativne i obilgatno heterofermentativne. Pri normalnim uvjetima u glikolizi iz jedne molekule glukoze nastaju dvije molekule mliječne kiseline i dvije molekule adenozin tri fosfata (ATP). Prvi koraci su fosforilacija glukoze do fruktoze-1,6-difosfata (FDP) koji se razlaže na dihidroksiacetonfosfat (DHAP) i gliceraldehid-3-fosfat (GAP). GAP se prevodi u piruvat preko dvosupstratne fosforilacije, a piruvat se reducira do mliječne kiseline uz pomoć enzima laktat dehidrogenaze (LDH) i nikotinamid adenin dinukleotida (NADH) kao kofaktora.⁸

2.1.1. *Lactobacillus brevis*

Lactobacillus brevis (slika 2.1.) je vrsta bakterije mliječne kiseline koja je gram-pozitivna, štapićasta, heterofermentativna, nepokretna, nepatogena i mezofilna. Tvori glatke, svjetlucave, konveksne kolonije bez pigmenta. Potrebni faktori rasta za uzgoj su kalcijev pantotenat, nijacin, tiamin i folna kiselina. Optimalni uvjeti rasta su temperatura od 30°C i pH vrijednost između 4-6, a ne može rasti pri temperaturama višim od 45°C i pri niskim koncentracijama sumporovog dioksida. Preko heterofermentativnog 6-fosfoglukonat/fosfoketolat puta pretvara heksozu u mliječnu kiselinu, CO₂ i etanol.

L. brevis se može izolirati iz različitih okruženja, a glavnu ulogu ima kao starter kultura kod fermentacije određenih namirnica kao što su vino, kiseli kupus, salama, sir, kiseli krastavci, jogurt, kiselo tijesto, kakao i kava. Kod alkoholnih pića poput piva i vina, može doprinijeti kvaliteti proizvoda, ali može uzrokovati i kvarenje. Kod ljudi se koristi kao probiotik i poboljšava imunološki sustav.²



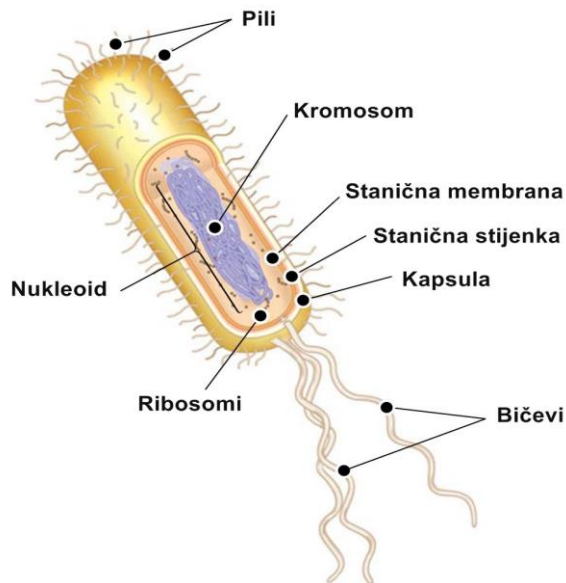
Slika 2.1. *Lactobacillus brevis*

2.2. Dezintegracija stanične stijenke bakterija

Stanična stijenka je propusna, ali čvrsta struktura koja štiti stanicu i daje joj stalan oblik. Osnovni spoj koji joj daje čvrstoću je murein i prema njenoj strukturi se razlikuju gram-pozitivne od gram-negativnih bakterija. Gram-negativne imaju tanju staničnu stijenku (debljine 10 nm), a kod gram-pozitivnih je stijenka puno deblja (20 - 40 nm). Citoplazma je od okoline odvojena polupropusnom membranom koja se sastoji od lipoproteina. Uloga stanične membrane je prijenos molekula unutar i izvan stanice, fotosinteza, izlučivanje izvanstaničnih enzima, razmnožavanje i sinteza stanične stijenke.

Dezintegracija stanične stijenke je jedna od najvažnijih operacija za dobivanje željenih komponenti iz stanica mikroorganizama jer je stanična membrana nepermeabilna za velik broj produkata.⁹ Dezintegracijom dolazi do privremene ili trajne promjene na membrani što poboljšava njenu permeabilnost ili potpuni raspad membrane, a samim time omogućava se transport molekula kroz nju i oslobađaju se svi sastojci stanice.¹⁰

Na slici 2.2 shematski je prikazana struktura bakterije.



Slika 2.2. Shematski prikaz bakterijske stanice

2.2.1. Metode dezintegracije stanične stijenke

Na temelju mehanizma dezintegracije metode se dijele na kemijske, fizikalne, biološke i mehaničke metode (tablica 2.1.). Metoda mora biti pažljivo odabrana kako se ne bi smanjila kvaliteta ili prinos produkta.¹⁰

Tablica 2.1. Metode dezintegracije stanične stijenke

Kemijske metode	djelovanje kiselinama ili lužinama ekstrakcija acetonom/toluenom djelovanje detergentima
Fizikalne metode	promjena osmotskog tlaka zamrzavanje/odmrzavanje dezintegracija zagrijavanjem
Mehaničke metode	mljevenje primjenom preša homogenizator miješanje s abrazivnim česticama ultrazvučne vibracije
Biološke metode	liza fagima inhibicija sinteze stanične membrane enzimska razgradnja stanične membrane

Kod primjene mehaničkih metoda u sustav se ne uvode nikakve dodatne kemikalije i enzimi, ali se oslobađa velika količina energije pa čitavo vrijeme izlaganja treba hladiti uzorak u kojem se nalaze suspendirane stanice kako ne bi došlo do denaturacije ili raspada unutarstaničnih produkata. Jedna od mehaničkih metoda dezintegracije stanične stijenke je primjena staklenih kuglica. Staklene kuglice odgovarajućeg promjera dodaju se u uzorak u kojemu se nalaze suspendirane stanice te se miješa na vortex mikseru, a suspenziju je potrebno adekvatno hladiti. Ova metoda je često korištena za razbijanje stanične stijenke i najčešće se koristi kada se radi s malim volumenima (do 15 mL), iako je moguć rad i s uzorcima većeg volumena ako se koristi prilagođena aparatura.

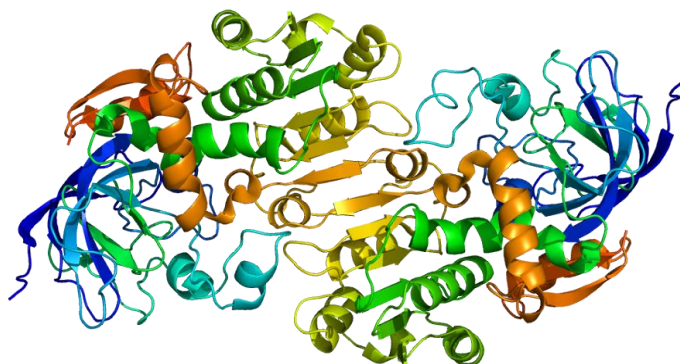
Dezintegracija stanične stijenke može se provoditi i primjenom ultrazvučnih vibracija. Stanice se izlože ultrazvučnim vibracijama tako da se ultrazvučna igla stavi u uzorak u kojem su suspendirane. Ultrazvučne vibracije mogu biti kontinuirane ili u obliku pulsa, a dužina izlaganja vibracijama ovisi o vrsti stanice, veličini uzorka i koncentraciji stanica. Ove vibracije visoke frekvencije uzrokuju formiranje sitnih mjehurića unutar kapljevitoz medija. Kada mjehurići postignu rezonancijsku veličinu pucaju i pritom oslobađaju mehaničku energiju u obliku udarnih valova ekvivalentnih nekoliko tisuća atmosfera te na taj način razaraju staničnu membranu. Metoda ultrazvučnim vibracijama se češće koristi u kombinaciji s nekom od kemijskih ili bioloških metoda tako da se stijenka najprije oslabi djelovanjem enzima ili detergenata.

Često korištena nemehanička metoda dezintegracije stanične stijenke je enzimatska metoda. To je metoda kojom se stanice pripremaju ili za dezintegraciju ili za dobivanje proteoplasta, stanice bez stanične stijenke koja se koristi za unošenje klonirane DNK. Primjenom enzima izbjegava se mogućnost kontaminacije unutarstaničnih produkata. Najčešće korišteni enzimi su lizozim, zimolaza, celulaza, lizostafin, glikanaza, proteaza i manaza. Lizozim lizira stanične stijenke bakterije koje su gram-pozitivne i često se koristi u kombinaciji s nekom drugom metodom dezintegracije, bilo mehaničkom, kemijskom ili fizikalnom. Glavni nedostaci enzimatske metode su da nije uvijek reproducibilna, nije prikladna za uzorke velikih razmjera jer zahtjeva veliku količinu enzima, nužno je uklanjanje ili inaktivacija enzima kako bi se mogla provesti izolacija željenog produkta te visoka cijena enzima.

2.3. Enzim alkohol dehidrogenaza

Enzim alkohol dehidrogenaza (ADH) je intracelularni enzim koji pripada skupini oksidoreduktaza što znači da za svoje katalitičko djelovanje zahtijeva koenzim NAD(P)H. Alkohol dehidrogenazu čini skupina izoenzima koji kataliziraju oksidaciju primarnih i sekundarnih alkohola u aldehide, odnosno ketone, a mogu katalizirati i obrnutu reakciju. Kod sisavaca to je redoks (oksidacija/redukcija) reakcija koja uključuje koenzim NAD(P)⁺. U ljudskom organizmu ADH postoji u nekoliko oblika i u visokim koncentracijama je prisutan u jetri i sluznici želuca. U kvascu i mnogim bakterijama ADH ima važnu ulogu u fermentaciji. Piruvat kao rezultat glikolize prelazi u acetaldehid i ugljični dioksid, a acetaldehid se zatim reducira do etanola uz pomoć ADH. Taj proces se koristi za proizvodnju alkoholnih pića, dopuštajući da kvasac fermentira razno voće ili žitarice.

ADH katalizira enantioselektivnu redukciju ketona pri čemu oksidacijom koenzima NAD(P)H nastaju odgovarajući alkoholi i NAD(P)⁺.³ Njegova struktura prikazana je na slici 2.3.

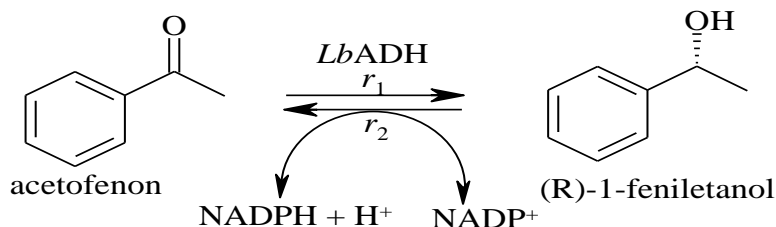


Slika 2.3. Kristalna struktura alkohola dehidrogenaze

2.3.1. Enzim alkohol dehidrogenaza iz *Lactobacillus brevis*

Enzim *LbADH* je NADP- ovisan enzim, klasificiran kao kratkolančana dehidrogenaza/reduktaza. Po strukturi je dimer izgrađen od 251 aminokiselinskog ostatka. Otkrili su ga Hummel i suradnici tijekom klasifikacije bakterije *Lactobacillus* tako što su uočili da ima velike sličnosti s alkohol dehidrogenazom iz bakterije *Lactobacillus kefir* (*LkADH*). Istraživanjima je dokazano da je *LbADH* znatno stabilnija od *LkADH* te da se istim postupkom pročišćavanja dobiva 10 puta veća količina.^{3,11}

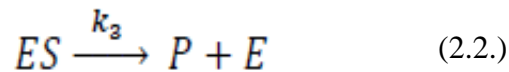
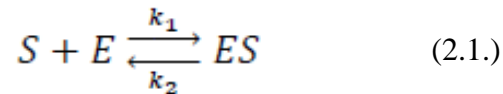
LbADH katalizira enantioselektivnu redukciju ketona do odgovarajućih alkohola i zahtjeva NAD(P)H (+H⁺) kao redukcijsko sredstvo. Pokazuje izrazitu kemo- i enantioselektivnost- zbog čega se koristi za sintezu kiralnih molekula. U većini slučajeva nastaju (R)-alkoholi uz tipični enantiomerni višak veći od 0,99. Preferirani supstrat za enzim R-specifičnu ADH u slučaju in vitro istraživanja je acetofenon čijom biokatalitičkom redukcijom djelovanjem R-specifične ADH nastaje R-feniletanol stopostotnog enantiomernog viška.^{3,12}



Slika 2.4. Općenita shema reakcije redukcije ketona u optički aktivan oblik alkohola u kojoj sudjeluje biokatalizator *LbADH* i u kojoj je prisutna regeneracija kofaktora NAD(P)H.

2.4. Matematički model enzimatskih reakcija

Brzina enzimске reakcije kod jednosupstratnih reakcija opisuje se Michaelis-Menteničinom kinetičkom jednađbom ovisnosti početne brzine reakcije, koncentracije supstrata i enzima. L. Michaelis i M. L. Menten su predložili matematički model reakcije koji uključuje enzim E koji se veže na supstrat S, tvoreći kompleks ES (jednađba 2.1.) koji se potom kemijski mijenja što rezultira stvaranjem produkta P i odvajanje od enzima (jednađba 2.2.)



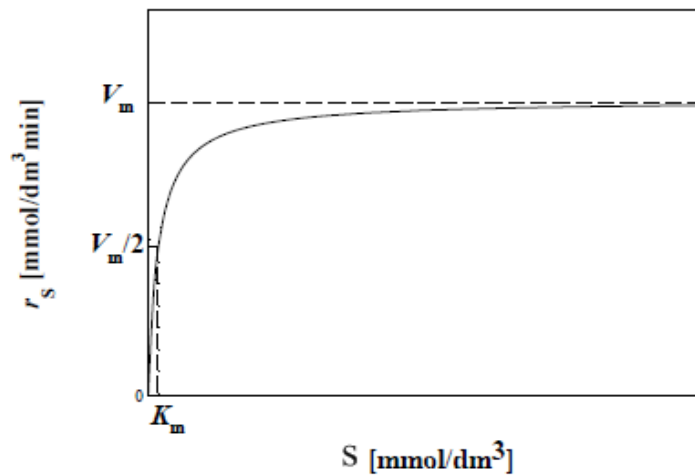
Obzirom da je koncentracija enzima obično mnogo manja nego koncentracija supstrata, većina enzima je tokom reakcije prisutna u obliku enzim-supstrat kompleks ES. Brzina potrošnje supstrata može se odrediti iz Michaelis-Menteničinog izraza (jednađba 2.3.):

$$r_s = \frac{v_{\max} \cdot S}{K_m + S} \quad (2.3.)$$

$$v_{\max} = k_2 \cdot E_0 \quad (2.4.)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.5.)$$

gdje S označava koncentraciju supstrata (mmol/dm^3), v_{\max} maksimalnu brzinu reakcije ($\text{mmol}/\text{dm}^3\text{min}$), a K_m Michaelis-Menteničinu konstantu (mmol/dm^3).



Slika 2.5. Grafički prikaz ovisnosti reakcijske brzine o koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menteničine kinetike

Na temelju slike 2.5. mogu se uočiti tri područja brzine reakcije. U području niske koncentracije supstrata, pri stalnoj koncentraciji enzima, brzina r je linearno proporcionalna koncentraciji supstrata pa se to područje aproksimira kinetikom reakcije prvog reda. U području visoke koncentracije supstrata, brzina r ne ovisi o koncentraciji supstrata pa se aproksimira kinetikom reakcije nultog reda. Treće područje je između prethodna dva područja i naziva se Michaelis-Menteničino područje.¹³

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Centrifuga s hlađenjem

Uzorci su centrifugirani na centrifuge DJB Labcare Ltd *Hettich Universal 320R* prikazanoj na slici 3.1.



Slika 3.1. Centrifuga s hlađenjem

3.1.2. Dvoznačni UV-VIS spektrofotometar

Mjerenje aktivnosti i kinetike enzima *LbADH* određivane su primjenom dvoznačnog spektrofotometra Shimadzu *UV-1800* (slika 3.2.) pri valnoj duljini od 340 nm (za aktivnost i kinetiku) i 660nm(zaOD).



Slika 3.2. Dvoznačni spektrofotometar

3.1.3. Ultrazvučni homogenizator

Za razbijanje stanica bakterije *L.brevis* primjenom ultrazvuka korišten je ultrazvučni homogenizator Bandelin Sonoplus Ultrasonic Homogenizers (slika 3.3.).



Slika 3.3. Ultrazvučni homogenizator

3.2. Dezintegracija stanične stijenke

Dezintegracija stanične stijenke *L.brevis* provodila se primjenom kombinacije enzimatskih (lizozim) i mehaničkih metoda (ultrazvuk i kuglice promjera 0,1 mm). Za dezintegraciju stanične stijenke *L.brevis* korištene su stanice iz zamrzivača.

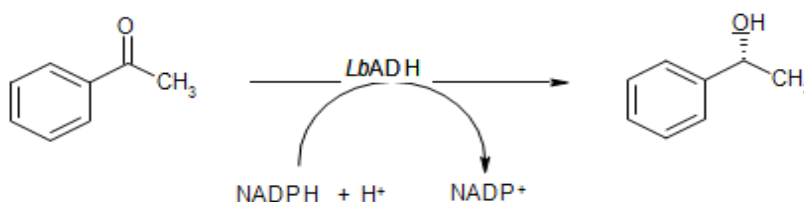
Otopina lizozima (1 mg/mL, fosfatni pufer 0,1 M pH 7) pomiješana je s otopinom stanica *L.brevis* tako da je konačna koncentracija 0,5% otopina stanica. Otopina lizozima i stanica *L.brevis* miješana je na 37°C tijekom 60 minuta. U otopinu, u koju su zatim dodane staklene kuglice promjera 0,1 mm u zadanome omjeru, uronjena je ultrazvučna igla. Otopina je tretirana ultrazvučnim vibracijama uz konstantno hlađenje tijekom zadanog vremena. Po završetku svakog od procesa dezintegracije stanične stijenke *L.brevis* uzorci u kojima su bile suspendirane staklene kuglice centrifugirani su 5 minuta pri temperaturi od 4°C na 14000 okr/min. Supernatant u kojemu se nalaze unutarstanični protein sačuvan je za određivanje aktivnosti enzima, a talog u kojemu se nalaze dezintegrirane stanice i staklene kuglice je bačen.

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima ADH u ekstraktu proteina iz stanica *L.brevis*

Mjerenje aktivnosti enzima ADH u ekstraktu proteina iz stanica *L.brevis* u reaktoru temeljilo se na reakciji redukcije acetofenona u (*R*)-1-feniletanol uz istovremenu oksidaciju koenzima NADPH, koja je prikazana na slici 3.4.

Za mjerenja *LbADH* korištene su sljedeće otopine: fosfatni puffer 0,1M pH7, otopina NADPH ($c_{\text{NADPH}} = 2 \text{ mg/cm}^3$), otopina acetofenona ($c = 12,58 \text{ mM}$) te otopina enzima *LbADH* u ekstraktu proteina.



Slika 3.4. Shematski prikaz redukcije acetofenona uz istovremenu oksidaciju NADPH katalizirane enzimom *LbADH*.

Brzina prikazane reakcije mjeri se brzinom nestajanja NADPH (slika 3.5), jer je proporcionalna aktivnosti enzima *LbADH*. Mjerenje brzine nestajanja NADPH prati se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 340 nm pri kojoj je molarni apsorpcijski koeficijent NADPH $6220 \text{ cm}^2/\text{mol}$. Za razliku od reduciranog oblika NADP⁺ neapsorbira svjetlost na intervalu od 300 do 400 nm.

U kvarcnu kivetu prvo je dodan fosfatni pufer, otopina supstrata i koenzima, a reakcija je započela dodatkom uzorka ekstrakta proteina u kojemu je enzim *LbADH*. P ad koncentracije NADPH praćen je na spektrofotometru pri valnoj duljini od 340 nm promjenom apsorbancije u vremenu, $\Delta\text{ABS}/\Delta t$. Volumna aktivnost enzima izračunata je prema izrazu (jednadžba 3.1.):

$$A_V = \frac{V_r}{\varepsilon_{340} \cdot d \cdot V_{LbADH}} \cdot \frac{\Delta\text{ABS}}{\Delta t} \quad (3.1.)$$

gdje A_V predstavlja volumnu aktivnost enzima (U/cm^3), V_r ukupni volumen uzorka u kiveti (cm^3), ε_{340} ekstinkcijski koeficijent pri valnoj duljini $\lambda=340\text{nm}$ (cm^2/mmol), d promjer kivete (cm), V_{LbADH} volumen dodanog enzima (cm^3), a $\Delta\text{ABS}/\Delta t$ promjenu apsorbancije u vremenu (nagib pravca) (min^{-1}).

3.3.2. Određivanje kinetike enzima ADH u ekstraktu proteina iz stanica *L.brevis*

Kinetika enzima *LbADH* u ekstraktu proteina određivana je u reakciji redukcije acetofenona u (*R*)-1-feniletanol (slika 3.4) te u povratnoj reakciji oksidacije (*R*)-1-feniletanola. Kinetika je mjerena metodom početnih brzina u 0,1 M fosfatnom puferu pH 7,0 na spektrofotometru pri valnoj duljini od 340 nm.

3.4. Obrada podataka

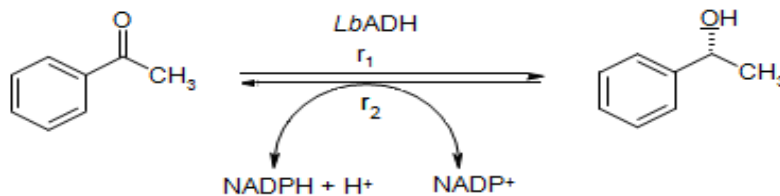
Eksperimentalni podaci dobiveni mjerenjem kinetike biokatalitičke reakcije redukcije acetofenona u (*R*)-1-feniletanol primjenom *LbADH* u ekstraktu proteina obrađeni su u programu *Scientist* u kojemu je provedena simulacija na temelju napisanog modela i eksperimentalnih podataka. Za procjenu parametara korištena je nelinearna regresija primjenom metode najmanjih kvadrata i simpleks metode koje se koriste za nalaženje minimalnog zbroja kvadrata pogreške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela. Simpleks metoda se koristi kada je velika razlika između početne vrijednosti parametara i njegove prave vrijednosti, te je dobra za određivanje približne vrijednosti parametara. Na temelju napisanog modela i procijenjenih parametara provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi određenog modela.

Numeričke metode za rješavanje seta diferencijalnih jednadžbi, koje koristi *Scientist*, su: Eulerova metoda, Runge-Kutta metoda IV, Bulirsch-Stoerov algoritam te Episode algoritam. Parametri poput brzine reakcije i konstante inhibicije procijenjeni su iz kinetičkih mjerenja, tj. ovisnosti početne brzine o koncentraciji. Ovi su parametri korišteni za predviđanje promjena koncentracije reaktanata i produkata s vremenom u kotlastom reaktoru, odnosno za simulacije uz pomoć modela.

4. MATEMATIČKI MODEL BOKATALITIČKE SINTEZE (R)-1-FENILETANOLA

Na temelju eksperimentalnih podataka postavljen je matematički model biokatalitičke sinteze (R)-1-feniletanola koji se temelji na nekoliko pretpostavki (reakcijski volumeje konstantan, miješanje u reaktoru je idealno, tijekom reakcije nema gubitka aktivnosti enzima i temperature je konstantna), a sastoji se od kinetičkih i bilancnih jednadžbi.

Kinetički je model razvijen na temelju sheme reakcije prikazane na slici 4.1, eksperimentalnih rezultata i procijenjenih kinetičkih parametara. Kako je biokatalitička redukcija acetofenona ravnotežna reakcija, nužno je postaviti dvije kinetičke jednadžbe: prvu za reakciju redukcije acetofenona, a drugu za povratnu reakciju oksidacije (R)-1-feniletanola.



Slika 4.1. Shema ravnotežne biokatalitičke reakcije redukcije acetofenona u (R)-1-feniletanol katalizirane LbADH u ekstraktu proteina uz istodobnu oksidaciju koenzima NADPH.

Kinetika redukcije acetofenona katalizirane LbADH u ekstraktu proteina određena je eksperimentalno i opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom NADP^+ (jednadžba 4.1.):

$$r_1 = \frac{V_{m1}^{ADH} \cdot c_{ADH} \cdot c_{\text{acetofenon}} \cdot c_{\text{NADPH}}}{\left(c_{\text{acetofenon}} + K_m^{\text{acetofenon}} \right) \cdot \left(c_{\text{NADPH}} + K_m^{\text{NADPH}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADP}^+}}{K_i^{\text{NADP}^+}} \right) \right)} \quad (4.1.)$$

Kinetika povratne reakcije odnosno kinetika oksidacije (R)-1-feniletanola opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom sa inhibicijom supstratom (NADP^+) i kompetitivnom inhibicijom produktima (acetofenon i NADPH) (jednadžba 4.2.).

$$r_2 = \frac{V_{m2}^{ADH} \cdot c_{ADH} \cdot c_{\text{feniletanol}} \cdot c_{\text{NADP}^+}}{\left(c_{\text{feniletanol}} + K_m^{\text{feniletanol}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{acetofenon}}}{K_i^{\text{acetofenon}}} \right) \right) \cdot \left(c_{\text{NADP}^+} + \frac{c_{\text{NADP}^+}^2}{K_{iS}^{\text{NADP}^+}} + K_m^{\text{NADP}^+} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADPH}}}{K_i^{\text{NADPH}}} \right) \right)} \quad (4.2.)$$

r_1 predstavlja molarnu brzinu reakcije redukcije acetofenona ($\text{mmol/dm}^3\text{h}$), r_2 predstavlja molarnu brzinu reakcije oksidacije (*R*)-1-feniletanola ($\text{mmol/dm}^3\text{h}$), V_m^{ADH} predstavlja maksimalnu aktivnost enzima (*LbADH*) ($\text{U/cm}^3\text{h}$), parametri K_m su Michaelis-Menteničine konstante za dotičnu komponentu (mmol/dm^3), parametar K_i predstavlja konstante inhibicije produktom reakcije (mmol/dm^3), a c je koncentracija dotične komponente (mmol/dm^3).

Matematički model za opisivanje biokatalitičke sinteze (*R*)-1-feniletanola uz enzim *LbADH* u šaržnome bioreaktoru uključuje i bilancne jednačbe 4.3. – 4.6.

$$\frac{dc_{\text{acetofenon}}}{dt} = r_2 - r_1 \quad (4.3.)$$

$$\frac{dc_{\text{feniletanol}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (4.4.)$$

$$\frac{dc_{\text{NADPH}}}{dt} = r_2 - r_1 \quad (4.5.)$$

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

Ove jednačbe opisuju vremenske promjene koncentracije reaktanata (acetofenona i NADPH-a) i produkata ((*R*)-1-feniletanola i NADP⁺-a) reakcije prikazane na slici 4.1.

5. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je optimiran proces razbijanja stanične stijenke *L.brevis* u svrhu dobivanja maksimalne aktivnosti enzima ADH u ekstraktu proteina te je ispitana kinetika dobivenog enzima u reakciji biotransformacija acetofenona. Dezintegracija stanične stijenke provedena je primjenom mehaničkih i nemehaničkih metoda te je praćen utjecaj vremena razbijanja stanične stijenke ultrazvučnim vibracijama i staklenim kuglicama i omjer mase stanica i mase staklenih kuglica.

5.1. Optimiranje procesa dezintegracije stanične stijenke

Kako bi se optimirao proces dezintegracije stanične stjenke primjenila se metoda odzivnih površina (Design Expert). Maseni omjer kuglica i stanica, m_{kugl}/m_{st} , mijenjao se u rasponu od 4 do 28 g/g, amplituda ultrazvuka, A , iznosila je 40% ili 62%, a vrijeme razbijanja na ultrazvuku, t , mijenjalo se u rasponu od 5 do 60 minuta. Aktivnost enzima ADH određivala se u staničnom ekstraktu koja se temelji na reakciji redukcije acetofenona u (*R*)-1-feniletanol.

U Design Expertu dobivena je matrica, odnosno početni uvjeti za dezintegraciju stanica pri amplitudi od 40% (tablica 5.1.) i 62% (tablica 5.2.). Za svaku amplitudu dobilo se po 9 točaka različitih kombinacija omjera masenih kuglica i stanica i vremena razbijanja na ultrazvuku te je za sve uvjete izmjerena volumna aktivnost enzima, A_v .

Tablica 5.1. Dobivena matrica za amplitudu od 40%

Eksperiment	m_{kugl}/m_{st} [g/g]	t [min]	A_v [U/cm ³]
1	4	5	0,225
2	16	5	0,119
3	28	5	0,040
4	4	32,5	0,309
5	16	32,5	0,241
6	28	32,5	0,192
7	4	60	0,215
8	16	60	0,137
9	28	60	0,218

Primjenom višestruke regresijske analize na dobivenu matricu na amplitudi od 40 % dobivena je sljedeća kvadratna jednadžba:

$$R = 0,14 - 0,031 \cdot A + 0,019 \cdot B + 0,029 \cdot A \cdot B + 0,021x A^2 - 0,055 \cdot B^2$$

gdje je R aktivnost enzima, A kodirana vrijednost za omjer mase kuglica i stanica, a B kodirana vrijednost za vrijeme.

Tablica 5.2. Dobivena matrica za amplitudu od 62%

Eksperiment	m_{kugl}/m_{st} [g/g]	t [min]	A_v [U/cm ³]
1	4	5	0,057
2	16	5	0,053
3	28	5	0,058
4	4	32,5	0,136
5	16	32,5	0,107
6	28	32,5	0,139
7	4	60	0,184
8	16	60	0,182
9	28	60	0,163

Primjenom višestruke regresijske analize na dobivenu matricu na amplitudi od 62 % dobivena je sljedeća linearna jednadžba:

$$R = 0,075 - 0,001642 \cdot A + 0,037 \cdot B$$

gdje je R aktivnost enzima, A kodirana vrijednost za omjer mase kuglica i stanica, a B kodirana vrijednost za vrijeme.

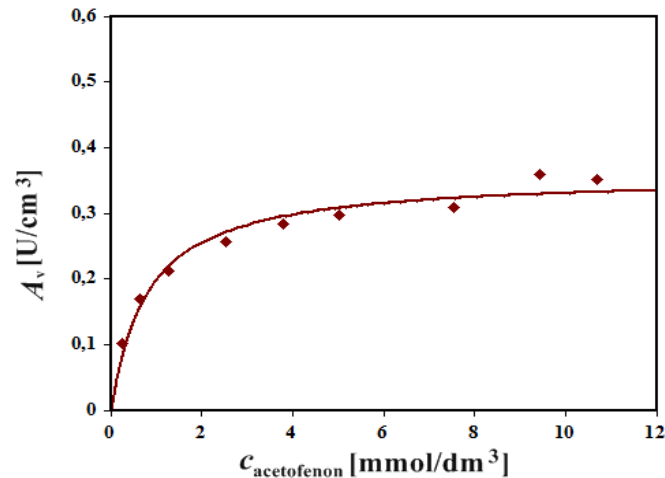
Korištenjem dobivenih jednadžbi određeni su optimum koji su prikazani u tablici 5.3. Usporedbom optimuma (tablica 5.3.) na različitim amplitudama može se vidjeti da je pri amplitudi od 40% modelom predviđena veća aktivnost nego kod amplitude od 62%. Pri amplitudi 40% treba dvostruko manje vremena dok je maseni omjer kuglica i stanica isti za obje amplitude. Dobiveni optimumi su potvrđeni i eksperimentalnim mjerenjem, te je dobiveno vrlo dobro slaganje (tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Usporedba optimuma na različitim amplitudama

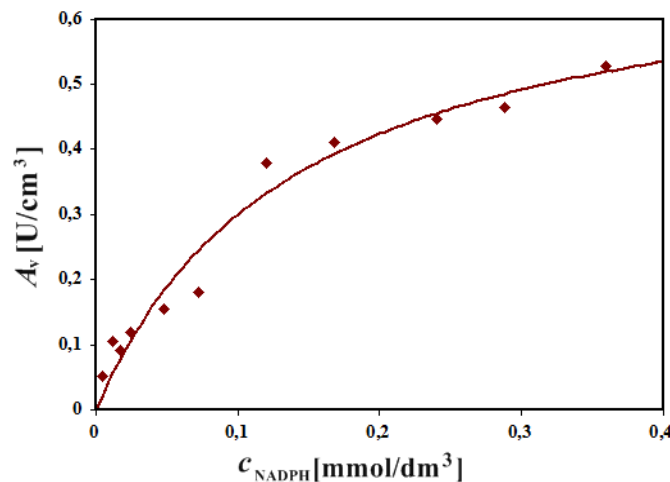
Amplituda [%]	t [min]	m_{kugl}/m_{st} [g/g]	A_v [U/cm ³]	A_v [U/cm ³]
			predviđen modelom	izmjereno
40	32,5	4	0,309	0,310
62	60	4	0,184	0,182

5.2. Kinetika alkohola dehidrogenaze u ekstraktu proteina iz *L.brevis*

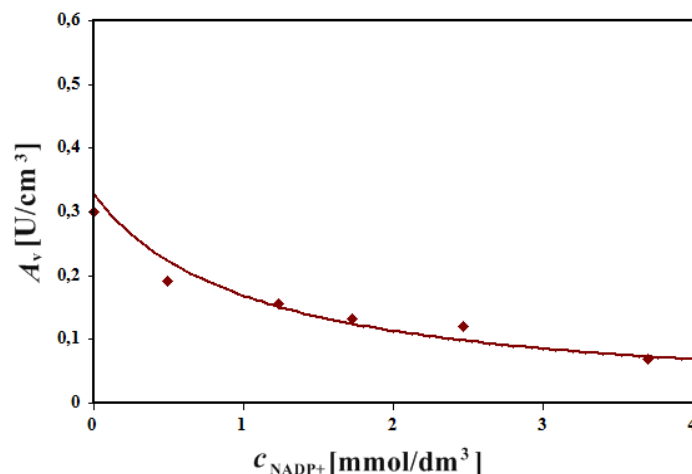
Kinetika reakcije biokatalitičke sinteze (*R*)-1-feniletanola iz acetofenona određena je metodom početnih brzina. Spektrofotometrijskim testom određena je ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji supstrata acetofenona (slika 5.1.), ovisnost koncentracije koenzima NADPH (slika 5.2.), kao i utjecaj produkata reakcije NADP⁺ na početnu reakcijsku brzinu (slika 5.3.)



Slika 5.1. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji redukcije acetofenona uz ADH u ekstraktu proteina iz stanica *L. brevis* o koncentraciji acetofenona ($c_{\text{NADPH}} = 0,12$ mmol/dm³, $\varphi_{\text{ekstrakt}} = 0,1$, fosfatni pufer 0,1 M pH 7, $T = 30^\circ\text{C}$, $\lambda = 340$ nm).



Slika 5.2. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji redukcije acetofenona uz ADH u ekstraktu proteina iz stanica *L. brevis* o koncentraciji NADPH ($c_{\text{acetofenon}} = 12,58$ mmol/dm³, $\varphi_{\text{ekstrakt}} = 0,1$, fosfatni pufer 0,1 M pH 7, $T = 30^\circ\text{C}$, $\lambda = 340$ nm).



Slika 5.3. Ispitivanje utjecaja NADP^+ na početnu reakcijsku brzinu u reakciji redukcije acetofenona uz ADH u ekstraktu proteina iz stanica *L.brevis* ($c_{\text{acetofenon}} = 12,58 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{NADPH}} = 0,12 \text{ mmol/dm}^3$, $\varphi_{\text{ekstrakt}} = 0,1$, fosfatni pufer $0,1 \text{ M}$ pH 7, $T = 30^\circ\text{C}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$).

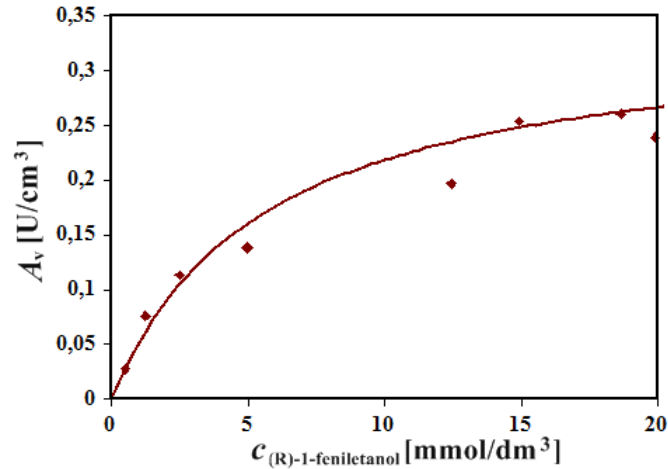
Na temelju rezultata vidi se da u reakciji redukcije acetofenona nastali product NADP^+ inhibira reakciju (slika 5.3), te djeluje kao kompetitivni inhibitor. Kinetika ove reakcije opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom NADP^+ (jednadžba 4.1.). Vrijednosti Michaelis-Menteničinih konstanti za acetofenon i koenzim NADPH ($K_m^{\text{acetofenon}}$ i K_m^{NADPH}), konstante inhibicije NADP^+ -om ($K_i^{\text{NADP}^+}$) te maksimalne aktivnosti enzima ADH u ekstraktu protein iz stanica *L.brevis* (V_m^{ADH}) procijenjeni su nelinearnom regresijskom analizom pomoću programskog paketa *Scientist* i prikazani su u tablici 5.4.

Tablica 5.4. Kinetički parametri u reakciji biokatalitičke redukcije acetofenona uz enzim alkohol dehidrogenaza u ekstraktu proteina iz stanica *L. Brevis*.

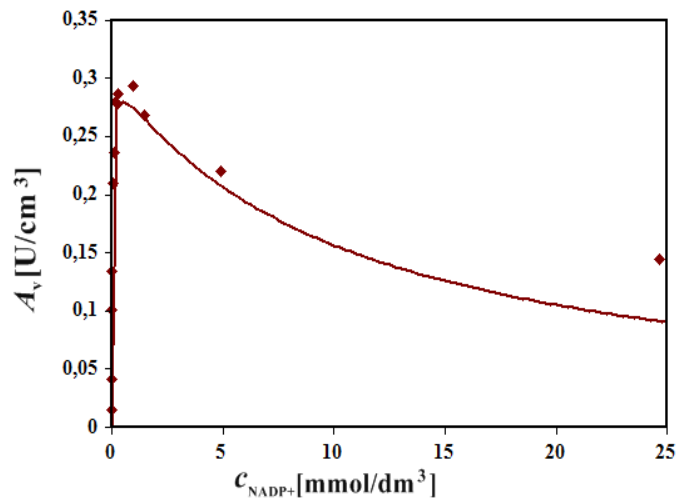
Komponenta	Vrijednost
V_{m1}^{ADH} , U/cm ³	$0,776 \pm 0,063$
$K_m^{\text{acetofenon}}$, mmol/dm ³	$0,787 \pm 0,188$
K_m^{NADPH} , mmol/dm ³	$0,141 \pm 0,025$
$K_i^{\text{NADP}^+}$, mmol/dm ³	$0,169 \pm 0,074$

Na temelju dobivenih parametara (tablica 5.4.) može se zaključiti da je NADPH specifičniji supstrat od acetofenona, te da je enzim značajno inhibiran produktom NADP^+ . Utjecaj (*R*)-1-feniletanola na brzine reakcije redukcije acetofenona se također ispitivao, ali nije uočeno da je isti inhibira.

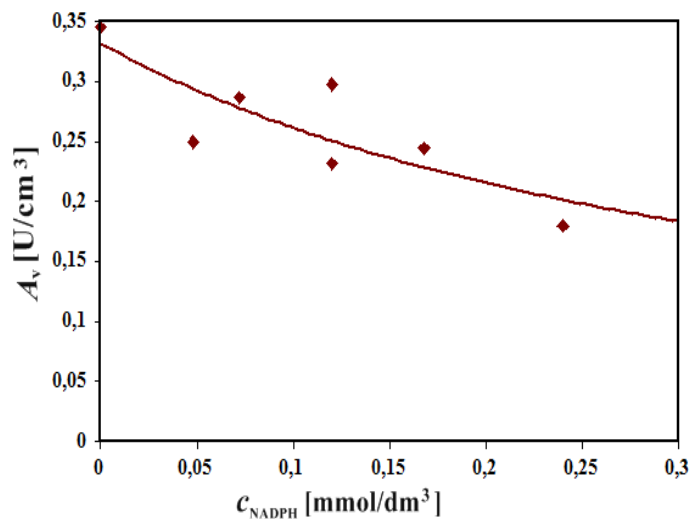
Obzirom da je reakcija redukcije acetofenona u (*R*)-1-feniletanol povratna reakcija ispitivana je i kinetika reakcije oksidacije (*R*)-1-feniletanola. U tu svrhu ispitivana je ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji (*R*)-1-feniletanola (slika 5.4) i NADP⁺ (slika 5.5). Također je i ispitivan utjecaj produkata, NADPH (slika 5.6) i acetofenona (slika 5.7) na početnu reakcijsku brzinu.



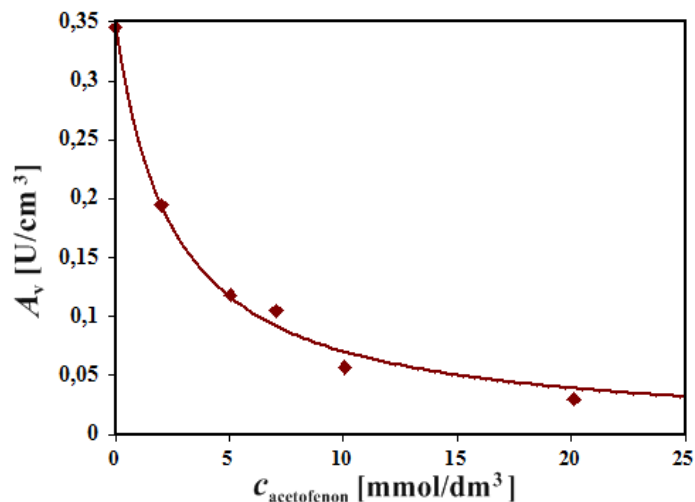
Slika 5.4. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije (*R*)-1-feniletanol u ekstraktu proteina iz stanica *L. brevis* o koncentraciji (*R*)-1-feniletanola ($c_{NADP^+} = 4,928$ mmol/dm³, $\varphi_{ekstrakt} = 0,1$, fosfatni pufer 0,1 M pH 7, $T = 30^\circ\text{C}$, $\lambda = 340$ nm).



Slika 5.5. Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije (*R*)-1-feniletanola u ekstraktu proteina iz stanica *L. brevis* o koncentraciji NADP⁺ ($c_{(R)-1-feniletanol} = 14,910$ mmol/dm³, fosfatni pufer 0,1 M pH 7, $T = 30^\circ\text{C}$, $\lambda = 340$ nm).



Slika 5.6. Ispitivanje utjecaja NADPH na početnu reakcijsku brzinu u reakciji oksidacije (*R*)-1-feniletanola u ekstraktu proteina iz stanica *L.brevis* ($c_{(R)\text{-1-feniletanol}} = 14,910 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{NADP}^+} = 4,928 \text{ mmol/dm}^3$, $\varphi_{\text{ekstrakt}} = 0,1$, fosfatni pufer 0,1 M pH 7, $T = 30^\circ\text{C}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$).



Slika 5.7. Ispitivanje utjecaja acetofenona na početnu reakcijsku brzinu u reakciji oksidacije (*R*)-1-feniletanola u ekstraktu proteina iz stanica *L.brevis* ($c_{(R)\text{-1-feniletanol}} = 14,910 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{NADP}^+} = 4,928 \text{ mmol/dm}^3$, $\varphi_{\text{ekstrakt}} = 0,1$, fosfatni pufer 0,1 M pH 7, $T = 30^\circ\text{C}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$).

Na temelju eksperimentalnih rezultata može se vidjeti da je reakcija inhibirana supstratom NADP^+ (slika 5.5) te oba produkta inhibiraju reakciju oksidacije (*R*)-1-feniletanola. Zato je reakcija opisana dvosupstratnom Mihaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju supstratom i kompetitivnom inhibicijom produktima (jednadžba 4.2.). Kinetički parametri procijenjeni su nelinearnom regresijom u programskom paketu *Scientist* i prikazani su u tablici 5.5.

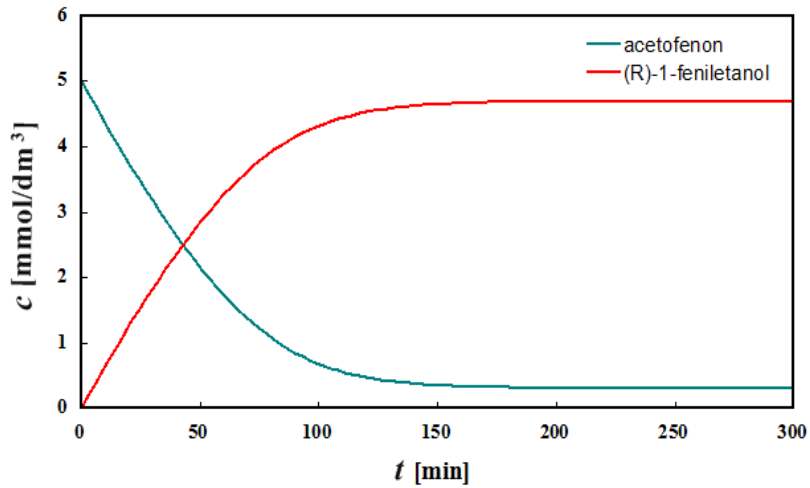
Tablica 5.5. Kinetički parametri u reakciji biokatalitičke oksidacije (*R*)-1-feniletanola uz enzim alkohol dehidrogenaza u ekstraktu proteina iz stanica *L. Brevis*.

Komponenta	Vrijednost
V_{m2}^{ADH} , U/cm ³	0,421 ± 0,039
$K_m^{feniletanol}$, mmol/dm ³	5,591 ± 0,605
$K_m^{NADP^+}$, mmol/dm ³	0,023 ± 0,005
$K_{iS}^{NADP^+}$, mmol/dm ³	10,478 ± 2,191
$K_i^{acetofenon}$, mmol/dm ³	0,698 ± 0,0060
K_i^{NADPH} , mmol/dm ³	0,0014 ± 0,0005

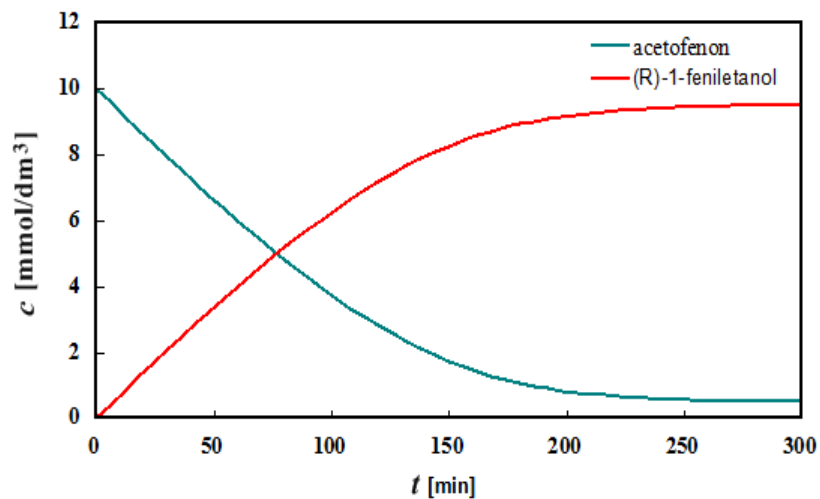
Iz dobivenih parametara može se zaključiti da je NADP^+ specifičniji supstrat od feniletanola. Zbog izrazito niskih vrijednosti konstanti inhibicija od NADPH i feniletanola u odnosu na K_m vrijednosti za NADP^+ i acetofenon može se zaključiti da je reakcija značajno inhibirana produktima reakcije. Usporedbom parametara za reakciju redukcije acetofenona i za povratnu reakciju iz vrijednosti maksimalnih aktivnosti se može zaključiti da će ravnoteža biti pomaknuta u stranu nastajanja feniletanola.

5.3. Simulacije redukcije acetofenona uz *LbADH* u ekstraktu proteina u kotlastom reaktoru

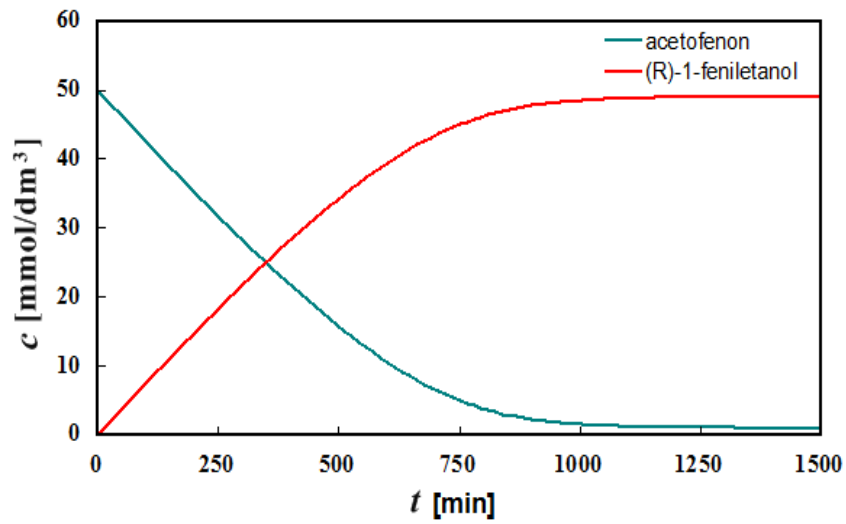
Korištenjem matematičkog modela prikazanog u poglavlju 4 te procijenjenih kinetičkih parametara napravljene su simulacije biotransformacije acetofenona u *LbADH* u ekstraktu proteina u kotlastom reaktoru. Navedene simulacije napravljene su u programskom paketu *Scientist* u svrhu određivanja ravnotežne konverzije acetofenona. Simulacije su napravljene sa različitim početnim koncentracijama supstrata i prikazane se na slikama 5.8. - 5.10.



Slika 5.8. Simulacija biotransformacije acetofenona u (*R*)-1-feniletanol uz *LbADH* u ekstraktu proteina u kotlastom reaktoru ($c_{\text{acetofenon}} = 5 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{NADPH}} = 5 \text{ mmol/dm}^3$, $\varphi_{\text{ekstrakt}} = 0,3$).



Slika 5.9. Simulacija biotransformacije acetofenona u (*R*)-1-feniletanol uz *LbADH* u ekstraktu proteina u kotlastom reaktoru ($c_{\text{acetofenon}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{NADPH}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $\varphi_{\text{ekstrakt}} = 0,3$).



Slika 5.10. Simulacija biotransformacije acetofenona u (*R*)-1-feniletanol uz *LbADH* u ekstraktu proteina u kotlastom reaktoru ($C_{\text{acetofenon}} = 50 \text{ mmol/dm}^3$, $C_{\text{NADPH}} = 50 \text{ mmol/dm}^3$, $\varphi_{\text{ekstrakt}} = 0,3$).

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je ravnoteža značajno pomaknuta u smjeru reakcije redukcije acetofenona te je prosječna konverzija acetofenona iznosila oko 95 %.

6. ZAKLJUČAK

Proces razbijanja stanične stijenke *L.brevis* optimiran je u svrhu dobivanja maksimalne aktivnosti enzima ADH u ekstraktu proteina. Maksimalna volumna aktivnost enzima *LbADH* u ekstraktu proteina za amplitudu 40% u vremenu od 32,5 minute iznosi 0,310 U/cm³, a za amplitudu 62% u vremenu od 60 minuta iznosi 0,182 U/cm³.

Kinetika redukcije acetofenona opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom NADP⁺, dok je kinetika povratne reakcije, odnosno kinetika oksidacije (*R*)-1-feniletanola opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom sa inhibicijom supstratom (NADP⁺) i kompetitivnom inhibicijom produktima (acetofenon i NADPH)

Korištenjem matematičkog modela procijenjenja je ravnotežna konverzija uz ekvimolarne početne kocentracije supstrata (acetofenona i NADPH) koja iznosi oko 95%. Na temelju navedenog može se zaključiti da je ravnoteža pomaknuta u stranu nastajanja produkta odnosno (*R*)-1-feniletanola.

7. SIMBOLI

A - kodirana vrijednost za omjer mase kuglica i stanica

A_V - volumna aktivnost enzima (U/cm^3)

B - kodirana vrijednost za vrijeme

c - koncentracija (mmol/dm^3)

k - konstanta brzine reakcije (min^{-1})

K_i - konstanta inhibicije (mmol/dm^3)

K_m - Michaelis-Menteničina konstanta (mmol/dm^3)

$m_{st} / m_{kugl.}$ - omjer mase stanica *L. brevis* i mase staklenih kuglica ($\phi = 0,1 \text{ mm}$) ($\text{g}_{st}/\text{g}_{sk}$)

R - aktivnost enzima

r - reakcijska brzina (U/mg)

t - vrijeme (min)

V - volumen (cm^3)

V_m - maksimalna brzina reakcije ($\text{mmol}/\text{dm}^3\text{min}$)

V_r - reakcijski volumen (cm^3)

ϵ_{340} - ekstincijski koeficijent

λ - valna duljina (nm)

Skraćenice

ABS - absorbancija

ADH - alkohol dehidrogenaza

ATP - adenzin trifosfat

BMK - bakterije mliječne kiseline

DHAP - dihidroksiacetonfosfat

E - biokatalizator

ES - kompleks biokatalizator-supstrat

FDP - fruktoza-1,6-difosfat

GAP - gliceraldehid-3-fosfat

LbADH - alkohol dehidrogenaza iz *Lactobacillus brevis*

LDH - laktat dehidrogenaza

LkADH - alkohol dehidrogenaza iz *Lactobacillus kefir*

NADH - nikotinamid adenin dinukleotid, reducirani oblik

NADP^+ - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, oksidirani oblik

NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, reducirani oblik

P - produkt

S - supstrat

8. LITERATURA

1. König, H. i Fröhlich, J., Lactic Acid Bacteria. *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*, Springer-Verlag, Heidelberg (2009), str. 3-29
2. Sakamoto, K., Beer spoilage bacteria and hop resistance in *Lactobacillus brevis*, *University of Groningen* (2002) str.4-6.
3. Leuchs, S. i Greiner, L., Alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*: a versatile robust catalyst for enantioselective transformations, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **25**(2) (2011), 267-281
4. Liu, S.-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations, *International Journal of Food Microbiology* **83** (2003), 115– 131
5. Šušković, J., Brkić, B., Matošić, S.: Mehanizam probiotičkog djelovanja bakterija mliječne kiseline, *Mljekarstvo* **47**(1997), 57-73
6. Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts, *AMB Express* **2** (2012)
7. Axelsson, L., Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology, *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*, Marcel Dekker, Inc, New York (2004), str. 1-66
8. Aarnikunnas, J., *Metabolic engineering of lactic acid Bacteria and characterization of novel enzymes for the production of industrially Important compounds*, dizertacija. Helsinki, Edita Prima Oy (2006)
9. Henriques, S. T. i Castanho, M.A., Translocation or membrane disintegration? Implication of peptide-membrane interactions in pep-1 activity, *The Journal of Peptide Science* **14**(4) (2008), 482-487
10. Edebo, L. i Magnusson, K. E., Disintegration of cells and protein recovery, *Pure and Applied Chemistry* (1973), str. 325-338
11. Hummel, W., New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* **58**(1997), 145-184
12. Schlieben, N.H., Niefind, K., Mueller, J., Riebel, B., Hummel, W. i Schomburg, D., Atomic resolution structures of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity, *Journal of Molecular Biology* **349** (2005), 801-813
13. Dunn, I. J., Heinze, E., Ingham, J., Prenosil, J. E., Biological Reaction Engineering: *Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2003), str. 68-72

9. ŽIVOTOPIS

Antonija Višević je rođena 25. kolovoza 1992. godine u Zagrebu. Osnovnu školu završila je u Vrbovcu nakon čega je upisala Zdravstveno učilište u Zagrebu, smjer farmaceutski tehničar. Srednju školu završava 2011. te na temelju položene državne mature upisuje preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Studentsku praksu odradila je u laboratoriju mesne industrije PIK Vrbovec.