

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

ANA STANIĆ  
**BIOTRANSFORMACIJA GLUKOZE ENZIMOM GLUKOZA  
DEHIDROGENAZOM U MIKROREAKTORU**

ZAGREB, 2024.

*Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za mjerenje, regulaciju i automatizaciju Zavoda za procesno inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ane Jurinjak Tušek i komentorstvom doc. dr. sc. Anite Šalić sa Zavoda za termodinamiku, strojarstvo i energetiku Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2023./2024.*



Rad je izrađen u sklopu projekta „Integrirani mikrosustav za enzimatsku proizvodnju biovodika (MicroBioH<sub>2</sub>)“ financiranog od Hrvatske zaklade za znanost (IP-2022-10-2175).

## POPIS SIMBOLA I KRATICA

### *Simboli*

$A$	apsorbancija	-
$Bo$	Bondov broj	-
$c$	koncentracija	$\text{mol dm}^{-3}$
$Ca$	kapilarni broj	-
$D$	koeficijent difuzije	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$d$	promjer	m
$Fo$	Fourierov broj	-
$g$	ubrzanje sile teže	$\text{m s}^{-2}$
$k$	koeficijent brzine reakcije prvog reda	$\text{s}^{-1}$
$K_m$	konstanta zasićenja	$\text{mol dm}^{-3}$
$L$	duljina	m
$M$	molarna masa	$\text{g mol}^{-1}$
$p$	tlak	Pa
$Pe$	Pecletov broj	-
$q$	volumni protok	$\text{mm}^3 \text{min}^{-1}$
$r$	brzina enzimske reakcije	$\text{U cm}^{-3}$
$Re$	Reynoldsova značajka	-
$T$	temperatura	K
$t$	vrijeme	s
$v$	srednja prividna linearna brzina strujanja	$\text{m s}^{-1}$
$V$	volumen	$\text{m}^3$
$\bar{V}$	molarni volumen	$\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$
$V_m$	maksimalna brzina reakcije	$\text{U mg}^{-1}$
$W$	širina mikroreaktora	m
$We$	Weberov broj	-
$x$	koordinata u smjeru duljine mikrokanala	m
$y$	koordinata u smjeru širine mikrokanala	m
$z$	bočna koordinata	m

### *Grčka slova*

$\delta$	Kroneckerov simbol	-
----------	--------------------	---

$\Delta$	promjena	-
$\gamma$	masena koncentracija	$\text{g dm}^{-3}$
$\eta$	kinematička viskoznost	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$\lambda$	valna duljina	nm
$\mu$	dinamička viskoznost	$\text{kg m}^{-1} \text{s}^{-1}$
$\xi$	bezdimenzijska veličina $x/W$	-
$\rho$	gustoća	$\text{kg m}^{-3}$
$\sigma$	površinska napetost	$\text{N m}^{-1}$
$\tau$	vrijeme zadržavanja	s
$\psi$	bezdimenzijska veličina $y/W$	-
$\psi_B$	konstanta koja označava interakciju između otapala	-
$\nabla$	nabla operator	-

### ***Indeksi***

A	otopljena tvar
B	otapalo
i, j, k	komponente jediničnog vektora
u	ulaz

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Mikroreaktori</b> .....	1
1.1.1. Struktura, izvedba i svojstva mikroreaktora .....	2
1.1.2. Materijali za izradu mikroreaktora.....	4
1.1.3. Strujanje u mikroreaktorima .....	4
1.1.3.1. Dvofazni sustav kapljevina-kapljevina u mikroreaktoru.....	7
1.1.4. Biotransformacije u mikroreaktorima .....	8
1.1.5. Nedostatci mikroreaktora.....	15
<b>1.2. Glukoza dehidrogenaza</b> .....	15
1.2.1. Izvori glukoza dehidrogenaze .....	16
1.2.2. Primjena glukoza dehidrogenaze .....	17
<b>2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA</b> .....	19
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	20
<b>3.1. Materijali</b> .....	21
3.1.1. Kemikalije.....	21
3.1.2. Radni instrumenti.....	21
3.1.3. Pribor.....	22
3.1.4. Programski paketi .....	22
3.1.5. Priprema otopina .....	22
<b>3.2. Analitičke metode</b> .....	24
3.2.1. Mjerenje koncentracije glukoze .....	24
3.2.2. Mjerenje koncentracije proteina.....	25
<b>3.3. Provedba mjerenja</b> .....	26
3.3.1. Analiza profila strujanja dvofaznog sustava u mikroreaktoru .....	26
3.3.2. Analiza efektivne difuzivnosti .....	27
3.3.3. Provedba biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom porijeklom iz <i>Pseudomonas spp.</i> u mikroreaktorskom sustavu .....	28
3.3.3.1. Provedba biotransformacije glukoze s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u staklenom mikroreaktoru .....	28
3.3.3.2. Provedba biotransformacije glukoze s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u teflonskom cijevnom mikroreaktoru .....	29
<b>3.4. Matematičko modeliranje i obrada rezultata</b> .....	30
3.4.1. Matematički model procesa difuzije.....	30
3.4.1.1. Proračun difuzijskih koeficijenata.....	32

3.4.2. Kinetički model biotrasformacije glukoze u mikroreaktoru .....	34
3.4.3. Matematički model biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru.....	36
3.4.3.1. Matematički model idealnog homogenog cijevnog reaktora za opis procesa biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru.....	42
3.4.3.2. Matematički model dvaju idealnih cijevnih reaktora za opis procesa biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru.....	43
3.4.4. Procjena primjenjivosti predloženih matematičkih modela.....	44
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. Analiza profila strujanja vodenog dvofaznog sustava u mikroreaktoru .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. Analiza efektivnih difuzivnosti komponenata u mikroreaktoru .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3. Biotransformacija glukoze sa suspendiranim enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru .....</b>	<b>55</b>
4.3.1. Simulacija modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru.....	55
4.3.2. Ocjena valjanosti matematičkog modela procesa biotransformacije glukoze sa suspendiranom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru .....	76
<b>4.4. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom.....</b>	<b>84</b>
4.4.1. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u staklenom mikroreaktoru .....	84
4.4.2. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u teflonskom cijevnom reaktoru .....	87
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>90</b>
<b>5.1. Analiza profila strujanja vodenog dvofaznog sustava u mikroreaktoru .....</b>	<b>90</b>
<b>5.2. Analiza efektivnih difuzivnosti komponenata u mikroreaktoru .....</b>	<b>91</b>
<b>5.3. Biotransformacija glukoze suspendiranim enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru.....</b>	<b>93</b>
<b>5.4. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru.....</b>	<b>96</b>
<b>5.5. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u teflonskom reaktoru .....</b>	<b>97</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>98</b>
<b>7. ZAHVALA .....</b>	<b>99</b>
<b>8. POPIS LITERATURE .....</b>	<b>100</b>
<b>Sažetak.....</b>	<b>112</b>





## **1. UVOD**

## 1.1. Mikroreaktori

Prelazak na mikrorazinu i primjena mikrotehnologije predstavljaju inovativan i značajan pristup u kemijskom inženjerstvu i biotehnologiji, omogućujući značajna poboljšanja u učinkovitosti, sigurnosti i održivosti kemijskih i/ili biotehnoloških procesa. U posljednjih nekoliko godina, raste interes za primjenom mikroreaktorskih sustava. Mikroreaktori se mogu definirati kao umanjeni reaktorski sustavi čije su dimenzije kanala (mikrokanala) u rasponu od 10  $\mu\text{m}$  do 500  $\mu\text{m}$  (Gojun i sur., 2019). Često se u kontekstu opisa mikroreaktora koristi sinonim „laboratorij na čipu“ (engl. *lab-on-a-chip*) zbog mogućnosti integracije brojnih reakcijskih i separacijskih koraka na jednoj ili više mikroreaktorskih jedinica. Mikroreaktore karakterizira veliki omjer međufazne površine i volumena što u konačnici rezultira većim prijenosom tvari i topline (Shrimal i sur., 2020). Visoka specifična površina omogućava česte sudare molekula uslijed čega se povećava i produktivnost procesa provedenih u takvim sustavima. Specifična površina mikroreaktora obično je u rasponu od 10.000 do 50.000  $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$ , dok je kod konvencionalnih makroreaktorskih sustava 100  $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$ , odnosno 1000  $\text{m}^2 \text{m}^{-3}$  u zasebnim slučajevima (Gretić i sur., 2017; Ehrfeld i sur., 2000). Za postizanje intenzivnijeg prijenosa topline, nerijetko se u mikroreaktore ugrađuju i mikroizmjenjivači topline koji služe kao dodatni regulatori topline (Šalić i sur., 2010). U usporedbi s konvencionalnim makroreaktorima, u mikroreaktorima je olakšano praćenje i kontrola procesnih uvjeta. Verdnik i sur. (2022) ističu i prednosti mikroreaktora u kontekstu ekološke i energetske održivosti. Naime, mikroreaktorski sustavi zahtijevaju značajno manje količine energije, kemikalija i otapala, a kako bi se postigla maksimalna održivost sve se više primjenjuju alternativna („zelena“) otapala poput vode, superkritičnih fluida, ionskih kapljevina te eutektičkih kapljevina kao radni medij u mikroreaktorima. Osim toga, mikroreaktorska tehnologija donosi i ekonomske prednosti zbog niskog udjela nusproizvoda, visokih prinosa te znatno nižih ulaganja u procesnu opremu. Ovi sustavi sigurni su za izvođenje reakcija pri povišenim tlakovima i temperaturama. Primjerice, reakcija nitracije klasičan je postupak uvođenja nitro skupina u organski spoj te s njom treba pažljivo upravljati kako bi se spriječilo nekontrolirano oslobađanje topline i eksplozija (Wang i sur., 2017; Brocklehurst i sur., 2011). Provođenjem reakcije u mikroreaktoru, omogućena je preciznija kontrola reakcijskih uvjeta čime se značajno smanjuje opasnost od eksplozije i nastanka neželjenih nusproizvoda.

Mikroreaktori nisu ograničeni samo na laboratorijsku primjenu, već se primjenjuju i u industrijskom mjerilu. Uvećanje procesa (engl. *scale-up*) kod mikroreaktora značajno je

jednostavnije u usporedbi s klasičnim reaktorskim sustavima. Jednostavnim i preciznim povezivanjem više procesnih jedinica (engl. *numbering-up*) u jednu cjelinu postiže se značajno povećanje ukupnog kapaciteta (Pavlović i sur., 2019). Ovakvim pristupom, u slučaju kvara na jednoj jedinici, neće doći do ometanja i prestanka rada ostalih jedinica. Osim toga, provedba reakcija istovjetna je na svakoj jedinici što značajno utječe na kontrolu procesa. Također, klasični „*scale-up*“ je složeniji, dugotrajniji, a istodobno iziskuje i veća financijska ulaganja (Gretić i sur., 2017).

Povezivanje procesnih jedinica u cjelinu može biti provedeno na dva načina. Razlikuju se vanjsko povećanje broja jedinica (engl. *external numbering-up*) i unutarnje povećanje broja jedinica (engl. *internal numbering-up*). Vanjsko povećanje odnosi se na povećanje broja čipova s jednim elementom u paralelni sustav (Šalić i sur., 2010). Unutarnje povećanje podrazumijeva miješanje reakcijskih faza nakon čega se reakcijska smjesa distribuira preko niza mikrokanala (Su i sur., 2016), odnosno serijsko povezivanje više elemenata unutar istog čipa. Unutarnje povećanje ekonomski je isplativije i prostorno manje zahtjevno, no problem se može javiti u neujednačenom protoku, a samim time može doći do pojave različitih reakcijskih uvjeta u pojedinim jedinicama. Kako bi uvećanje broja procesnih jedinica bilo provedeno na što bolji i učinkovitiji način, nužno je pažljivo pratiti i optimirati procesne uvjete.

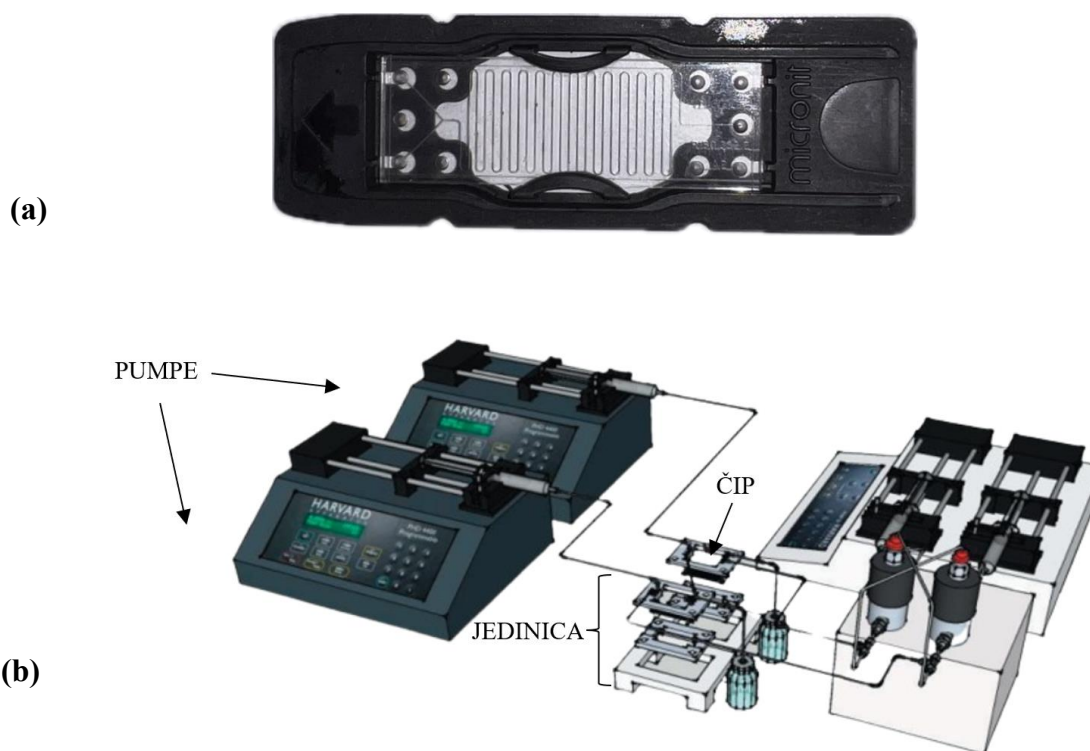
#### 1.1.1. Struktura, izvedba i svojstva mikroreaktora

Osnovnom građevnom jedinicom mikroreaktorskog sustava smatra se mikrokanal. Mikrokanali se ističu po izrazito malim dimenzijama (submilimetarske i submakrometarske veličine), a najčešće su pravokutnog ili kružnog poprečnog presjeka.

Postoje brojne tehnike koje se koriste za proizvodnju mikroreaktora, a od najvažnijih treba izdvojiti litografiju, mikromehaničku obradu i jetkanje. Litografija koristi elektroničko rendgensko zračenje za oblikovanje specifičnih oblika. Mikromehanička obrada, odnosno mikro-elektro-mehanički sustavi (engl. *Micro-Electro-Mechanical Systems*, MEMS) uključuju glodanje, bušenje, urezivanje, a pogodni su za obradu plemenitih metala i raznih legura (Brandner, 2013). Jetkanje predstavlja jedan od najčešćih postupaka u proizvodnji mikroreaktora. Najčešći pristupi uključuju mokro (kemijsko) i suho jetkanje. Kako navode Bojang i Wu (2020) mokro jetkanje primjenjuje se za staklene proizvode, a uključuje upotrebu kemijskih sredstva za selektivno uklanjanje materijala. Za razliku od toga, suho jetkanje koristi visokoučinkovite operacije poput plazme (plazma jetkanje) ili ionskog zračenja (duboko

reaktivno ionsko jetkanje). Suho jetkanje ima široku primjenu zbog postizanja visokih performansi što ga čini pogodnim za masovnu proizvodnju.

Za ispravno funkcioniranje, uz mikrokanal nužni su i dodatni dijelovi opreme (Gojun i sur., 2019). U element koji je najčešće pravokutnog oblika postavlja se osnovni dio mikroreaktorskog sustava, mikrokanal. Mikrokanali se prethodno spomenutim specijalnim tehnikama urezuju u elemente koji mogu biti od različitih materijala. Elementi mogu biti izvedeni s nekoliko ulazno/izlaznih procesnih tokova koji se spajaju/razdvajaju u zajedničke/odvojene tokove pomoću „Y“, „T“ i „ψ“-spojnica (Šalić i sur., 2010). Element i mikrokanal zajedno formiraju mikroreaktorski čip. Čip ima posebne otvore za spajanje vanjskih kapilarnih cjevčica koji služe za dovod i odvod fluida (slika 1a). Mikroreaktorski čip moguće je postaviti u posebno dizajnirana kućišta od nehrđajućeg čelika kako bi se postigla dodatna stabilnost i čvrstoća. Čip zajedno s odvodnim i dovodnim cjevčicama čini mikroreaktorsku jedinicu. U radu se koriste i precizne visokotlačne klipne pumpe koje su odgovorne za kontinuirani dovod i odvod reaktanata, a osim toga reguliraju stabilni protok. Jedinica zajedno sa svom dodatnom procesnom opremom (pumpe, detektori) čini povezani mikroreaktorski sustav (slika 1b).



**Slika 1.** (a) Mikroreaktorski čip s dva ulaza i jednim izlazom (vlastita fotografija); (b) Prikaz mikroreaktorskog sustava (prema Šalić i Zelić, 2018)

### 1.1.2. Materijali za izradu mikroreaktora

Mikroreaktori mogu biti proizvedeni iz različitih materijala, poput stakla, kvarca, silicija, metala i polimera (Šalić i Zelić, 2018). Odabir materijala ovisi o raznim čimbenicima uključujući radne uvjete (tlak i temperatura), fizikalna svojstva reakcijske smjese (pH, viskoznost, reaktivnost), cijenu, jednostavnost izrade, ali i mogućnost masovne proizvodnje (Suryawanshi i sur., 2018).

- Staklo je materijal koji se najviše koristi u proizvodnji mikroreaktorskih sustava, a ono što ga izdvaja pred ostalim materijalima je kemijska inertnost i transparentnost čime je omogućeno vizualno praćenje reakcije.
- Kvarc je materijal koji je otporan na udarce, visoke temperature i kemikalije, no glavni problem predstavlja previsoka cijena (Domínguez i sur., 2021).
- Silicij je pogodan za korištenje na visokim temperaturama i tlakovima, no moguća je laka lomljivost u slučaju mehaničkih udaraca.
- Metali, od kojih su najčešći nehrđajući čelik, titanij, aluminij i bakar upotrebljavaju se zbog izvanrednih mehaničkih, fizikalnih i toplinskih svojstava (Gretić i sur., 2017). Također, otporni su na korozivne promjene te imaju odličnu toplinsku i električnu vodljivost. Problem može nastati zbog moguće reakcije s određenim kemikalijama.
- Polimerni materijali cjenovno su pristupačni, fleksibilni i optički transparentni. Moguća je ograničenost upotrebe zbog korištenja visokih temperatura i tlakova.

### 1.1.3. Strujanje u mikroreaktorima

U mikroreaktorima, moguće je provoditi jednofazne i višefazne procese. Kod mikroreaktora s kontinuiranim protokom jedne faze, strujanje se dominantno može opisati laminarnim profilom (Chen i Lv, 2022). Višefazno strujanje u mikroreaktorskim sustavima odnosi se na mikrostrujanje u kojem su prepoznatljive dvije ili više različitih faza, odnosno kontinuirana faza i jedna ili više dispergiranih faza. Ako se radi o dvofaznom toku koji označava kombinaciju dviju različitih faza, dva najčešća tipa su plin-kapljevina (engl. *gas-liquid*, GL) i kapljevina-kapljevina (engl. *liquid-liquid*, LL) (Etminan i sur., 2021). Prednost višefaznog sustava je u tome što reakcijska zona nije u kontaktu s vanjskim stjenkama kanala (Chen i Lv, 2022). Isto tako, kada je riječ o višefaznim sustavima, važno je osigurati dobro miješanje i dobar prijenos tvari. Kako bi se osigurali optimalni uvjeti procesa u sustavima s više faza, potrebno

je analizirati hidrodinamičke uvjete i uvjete prijenosa topline i tvari (Jurinjak Tušek i sur., 2019).

Temeljna jednadžba kojom se može opisati strujanje tekućina unutar mikroreaktora je Navier-Stokesova jednadžba (Hessel i sur., 2003). Ova jednadžba proizlazi iz drugog Newtonovog zakona koji se odnosi na protok tekućina. Jednadžba 1 prikazuje prošireni izraz Navier-Stokesove jednadžbe za stlačive fluide koja je primjenjiva za sustave s plinskom fazom:

$$\rho \cdot \left( \frac{\partial v_i}{\partial t} + v_j \cdot \frac{\partial v_i}{\partial x_j} \right) = - \frac{\partial p}{\partial x_i} + \rho \cdot g_i + \frac{\partial}{\partial x_k} \left[ \mu \cdot \left( \frac{\partial v_i}{\partial x_k} + \frac{\partial v_k}{\partial x_i} - \frac{2}{3} \cdot \delta_{ik} \cdot \frac{\partial v_j}{\partial x_j} \right) \right] \quad [1]$$

gdje je  $v_i$  komponenta brzine strujanja u smjeru  $i$ ,  $\rho$  gustoća fluida,  $\mu$  dinamička viskoznost,  $p$  tlak,  $g_i$  ubrzanje sile teže,  $\delta_{ij}$  Kroneckerov simbol,  $v$  i  $g$  vektorske veličine te  $i, j$  i  $k$  komponente vektora.

Navier-Stokesova jednadžba definira skup od tri jednadžbe s četiri nepoznanice ( $v_i, v_j, v_k$  i  $p$ ). Kako bi stvorili cjelovit izraz potrebna je još jedna jednadžba, a to je jednadžba očuvanja mase (jednadžba 2):

$$\frac{\partial p}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x_i} (\rho \cdot v_i) = 0. \quad [2]$$

Za razliku od plinova, tekućine su nestlačive. Za nestlačivi tok, odnosno konstantnu gustoću  $\rho$ , koristi se pojednostavljeni oblik Navier-Stokesove jednadžbe (jednadžba 3) i pripadajuća jednadžba očuvanja mase (jednadžba 4) (Hessel i sur., 2003):

$$\frac{\partial v_i}{\partial t} + v_j \cdot \frac{\partial v_i}{\partial x_j} = - \frac{1}{\rho} \cdot \frac{\partial p}{\partial x_i} + g_i + \frac{1}{\rho} \cdot \frac{\partial}{\partial x_j} \left( \mu \cdot \frac{\partial}{\partial x_j} \cdot v_i \right), \quad [3]$$

$$\frac{\partial v_i}{\partial x_i} = 0. \quad [4]$$

Pad tlaka je važna varijabla u projektiranju (mikro)reaktora jer se pomoću pada tlaka mogu predvidjeti neke od ključnih informacija poput potrošnje energije, potrebnog kapaciteta pumpi kao i materijala potrebnog za konstrukciju uređaja (Jovanović i sur., 2012). Hagen-Poiseuilleova jednadžba (jednadžba 5) opisuje odnos između pada tlaka, brzine protoka i otpora mikrokanala sa specifičnom geometrijom, duljinom ( $L$ ) i promjerom ( $d$ ) mikrokanala. Pretpostavke koje se moraju uzeti u obzir su da se radi o nestlačivoj i viskoznoj tekućini, da je

prisutno laminarno strujanje kroz kanal konstantnog presjeka i da nema ubrzanja tekućine. Početne hipoteze u potpunosti su zadovoljene u promatranim mikrofluidnim sustavima (Zanella i Biral, 2013). Ovim matematičkim izrazom može se doći do procjene brzine protoka s poznatim primijenjenim tlakom i poznatom geometrijom mikrokanala (Hrynevich i sur., 2022).

$$\Delta P = \frac{8 \cdot \mu \cdot q \cdot L}{\pi \cdot d^4} \quad [5]$$

Kako bi se olakšalo rješavanje Navier-Stokesove jednadžbe koriste se bezdimenzijske značajke. Bezdimenzijske značajke mogu predstavljati omjer različitih fizikalnih veličina, a imaju značajnu ulogu u analizi profila strujanja i međudjelovanja između faza (Etminan i sur., 2021). Tablica 1 prikazuje neke od najvažnijih bezdimenzijskih značajki koje se koriste u opisivanju višefaznih sustava u mikrokanalima.

**Tablica 1.** Najvažnije bezdimenzijske značajke koje opisuju strujanje višefaznih sustava (prema Etminan i sur., 2021)

Naziv	Oznaka	Matematički izraz	Opis
Bondov broj	Bo	$\frac{(\rho_1 - \rho_2) \cdot g \cdot d^2}{\sigma}$	$\frac{\text{gravitacijska sila}}{\text{površinska napetost}}$
Cahnov broj	Cn	$\frac{\xi}{d}$	$\frac{\text{kapilarna duljina}}{\text{promjer cijevi}}$
Kapilarni broj	Ca	$\frac{\mu \cdot v}{\sigma}$	$\frac{\text{viskozna sila}}{\text{površinska napetost}}$
Freudov broj	Fr	$\frac{p_2 \cdot v^2}{(\rho_1 - \rho_2) \cdot g \cdot d}$	$\frac{\text{inercijska sila}}{\text{gravitacijska sila}}$
Reynoldsov broj	Re	$\frac{v \cdot d \cdot \rho}{\eta}$	$\frac{\text{inercijska sila}}{\text{viskozna sila}}$
Weberov broj	We	$\frac{v^2 \cdot d \cdot \rho}{\sigma}$	$\frac{\text{inercijska sila}}{\text{površinska napetost}}$

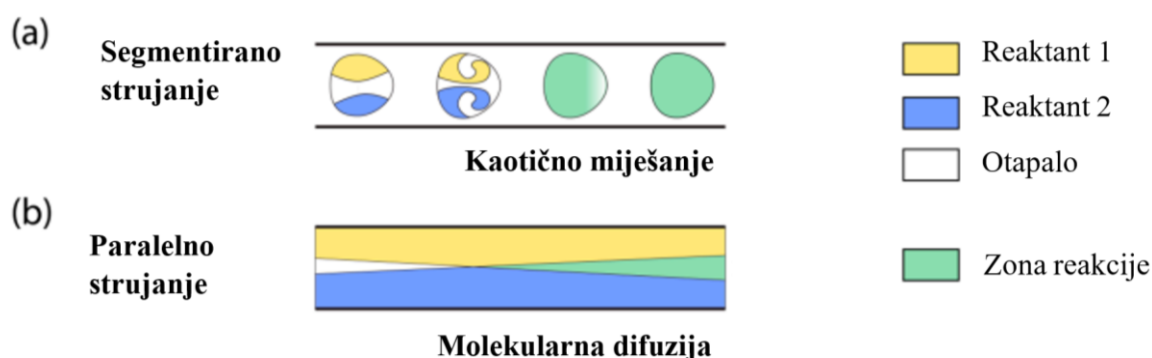
Kod makrosustava prisutan je veliki utjecaj inercijskih sila, dok je kod mikrosustava dominantniji utjecaj visokoznih sila te je stoga vrijednost Reynoldsovog (*Re*) broja mala, odnosno prisutno je laminarno strujanje. Vrijednosti Reynoldsove značajke u pravilu ne prelaze 100 u mikrokanalima (Plazl i Lakner, 2010).

### 1.1.3.1. Dvofazni sustav kapljevina-kapljevina u mikroreaktoru

Sustavi kapljevina-kapljevina imaju široku primjenu u različitim procesima poput enzimskih reakcija, ekstrakcije, kristalizacije, separacije stanica i polimerizacije (Kashid i sur., 2011). U dvofaznim sustavima kapljevina-kapljevina moguće je formiranje nekoliko oblika strujanja: segmentirano (Taylorovo), mješurica, paralelno i anularno (Jovanović i sur., 2012) pri čemu su najčešća segmentirano i paralelno strujanje (slika 2) (Chen i sur., 2022). Uobičajeno se u mikrokanalima s glatkim stjenkama uspostavlja paralelno strujanje, dok je segmentirano strujanje tipično za mikrokanale s hrapavim stjenkama (Gojun i sur., 2019).

Kod segmentiranog strujanja, fluid je podijeljen u manje, odvojene segmente ili kapljice koji se kreću mikrokanalom. Prijenos tvari ostvaruje se putem kaotične advencije (slika 2a) (Gonidec i Puigmartí-Luis, 2019). U sustavima kapljevina-kapljevina segmentacija se stvara zbog velike razlike u površinskoj napetosti dviju tekućina koje se ne miješaju (Suryawanshi i sur., 2018). Gore spomenuti bezdimenzijski brojevi (tablica 1) pokazali su se izvrsnima u opisivanju i klasificiranju dominantnih sila različitog ponašanja segmentiranog strujanja (He i sur., 2020).

Mikroreaktori s paralelnim tokom smatraju se najjednostavnijim mikrofluidnim sustavima (Li i sur., 2020). Kod paralelnog strujanja dvije faze struje u slojevima, miješanje je sporo i postiže se samo molekularnom difuzijom (slika 2b). Za razliku od segmentiranog strujanja, ovdje nema unutarnje cirkulacije (Chen i sur., 2022).



**Slika 2.** Najčešći profili strujanja u dvofaznom sustavu kapljevina-kapljevina (prema Gonidec i Puigmartí-Luis, 2018)

Difuzija se definira kao proces širenja molekula iz područja više koncentracije prema području niže koncentracije putem Brownovog gibanja, što rezultira postupnim miješanjem materijala (Capretto i sur., 2011). Difuzijski procesi prate Fickov zakon (jednadžba 6):



$$J = -D \cdot \frac{d\varphi}{dx} \quad [6]$$

gdje  $J$  označava difuzijski tok,  $D$  difuzijski koeficijent, a  $d\varphi/dx$  koncentracijski gradijent, odnosno promjenu koncentracije  $\varphi$  s obzirom na promjenu položaja  $x$ . Ovaj izraz značajno pomaže u razumijevanju i predviđanju difuzije pojedinih reaktanata u mikrokanalu. Važno je tijekom reakcija postići homogenost otopine, odnosno odrediti optimalno vrijeme miješanja. Jednadžbom 7 moguće je procijeniti karakteristično trajanje molekularne difuzije u mikrokanalu:

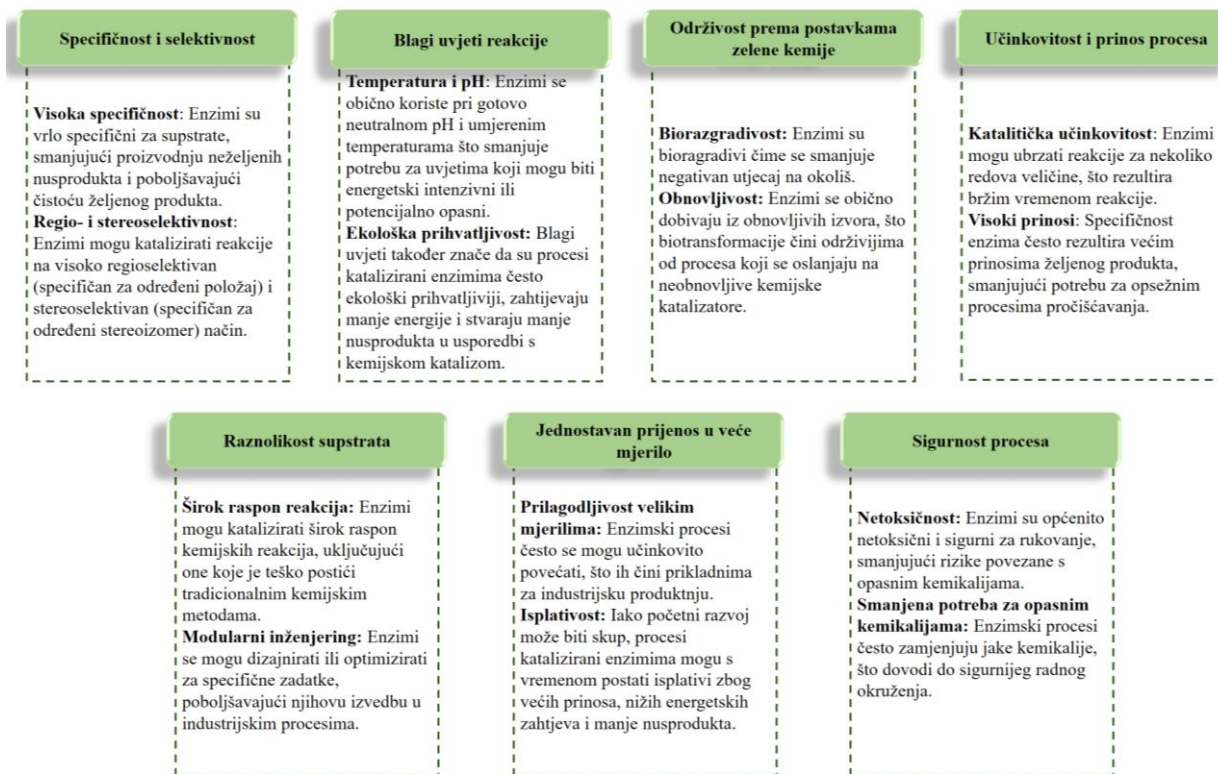
$$t_D = \frac{L^2}{D} \quad [7]$$

gdje  $L$  predstavlja karakterističnu duljinu mikrokanala, a  $D$  koeficijent difuzivnosti. Male dimenzije mikroreaktora rezultiraju kraćim difuzijskim vremenima i bržim miješanjem, što omogućuje ravnomjerniju raspodjelu reagensa i katalizatora u otapalu unutar mikrokanala (Chen i sur., 2022).

#### 1.1.4. Biotransformacije u mikroreaktorima

Kemijski katalitički procesi u novije se vrijeme zamjenjuju biokatalitičkim procesima u kojima se toksična organska otapala zamjenjuju „zelenim“ organskim otapalima, a umjesto kemijskih katalizatora koriste se biokatalizatori kao što su enzimi (Sokač Cvetnić i sur., 2023). Kontinuirani protočni mikroreaktorski sustavi imaju potencijal unaprijediti primjenu enzima u smislu integriranog procesiranja i analitičke kontrole procesa (Gkantzou i sur., 2018). Prema tumačenju Roberge i sur. (2005), 50 % reakcija koje se primjenjuju u proizvodnji finih kemikalija i farmaceutskoj industriji moglo bi imati koristi od kontinuirane proizvodnje, a za čak 44 % njih mikroreaktorski sustavi bi bili najbolji izbor za proizvodne postupke.

Enzimi su biološki katalizatori koji ubrzavaju odvijanje kemijskih reakcija pritom ne mijenjajući ravnotežu reakcije. Proteinske su građe, a posjeduju izvrsna svojstva, poput visoke aktivnosti, visoke selektivnosti i specifičnosti prema supstratima koja omogućuju izvođenje najsloženijih reakcija pri blagim eksperimentalnim uvjetima (Vasić i sur., 2020). Prednosti primjene enzima prikazane su na slici 3.



**Slika 3.** Prednosti primjene enzima kao katalizatora (prema Robinson, 2015)

U enzimskim mikroreaktorima, enzimi mogu biti suspendirani ili imobilizirani (Šalić i sur., 2011). Kod suspendiranih enzima, reakcija započinje uvođenjem otopina supstrata i enzima kroz odvojene ulaze, te se nastavlja kontinuiranim protokom reaktanata tijekom vremena (Laurenti i dos Santos Vianna Jr., 2016). U tablici 2 dan je prikaz biotransformacija korištenjem suspendiranih enzima u mikroprotočnim sustavima.

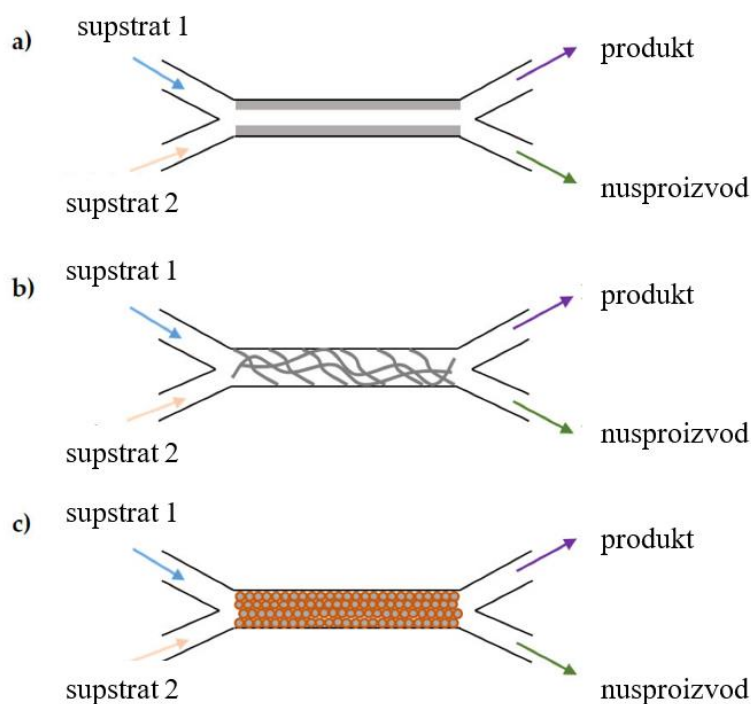
**Tablica 2.** Enzimske biotransformacije u mikroreaktorskim sustavima sa suspendiranim enzimima

Biotransformacija	Enzim/i	Vrsta sustava	Produktivnost procesa	Referenca
Sinteza izoamil acetata	lipaza iz <i>Candida antarctica</i>	ionska tekućina / <i>n</i> -heptan	trostruko povećanje brzine reakcije u usporedbi s šaržnim postupkom	Pohar i sur., 2009
Regeneracija NAD <sup>+</sup>	alkohol dehidrogenaza iz <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	vodeni dvofazni	konverzija od 65,3 % postignuta je za vrijeme zadržavanja od 36 sekundi	Šalić i sur., 2013
Oksidacija katehola i L-DOPA	lakaza iz <i>Trametes versicolor</i>	vodeni dvofazni	konverzija katehola od 41,3 % postignuta za 72 sekunde za ulaznu koncentraciju kisika od 0,271 mmol dm <sup>-3</sup> ; konverzija L-DOPA od 45 % postignuta za ulaznu koncentraciju kisika od 0,544 mmol dm <sup>-3</sup>	Jurinjak Tušek i sur., 2013
Sinteza (S)-2-hidroksipropiofenona iz benzaldehida i acetaldehida	benzoilformat dekarboksilaza iz <i>Pseudomonas putida</i>	voda – organsko otapalo	svi mikroreaktori pokazali su 72 puta veću volumnu produktivnost	Valinger i sur., 2014
Oksidacija heksanola s potpuno integriranom regeneracijom NADH	alkohol dehidrogenaza iz <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	vodena faza – organsko otapalo (heksan)	upotrebom suspendiranog enzima postignuta je 100 %-tna konverzija koenzima uz kratko vrijeme zadržavanja ( $\tau = 0,8$ s)	Šalić i Zelić, 2014

**Tablica 2.** Enzimske biotransformacije u mikroreaktorskim sustavima sa suspendiranim enzimima – *nastavak*

Biotransformacija	Enzim/i	Vrsta sustava	Produktivnost procesa	Referenca
Hidratacija akrilonitrila u akrilamid	nitril hidrataza i mirujuće stanice iz <i>Rhodococcus ruber</i>	vodena faza – uljna faza	postignuta stopa konverzije od 90 %	Li i sur., 2017
Sinteza biodizela	lipaza iz <i>Thermomyces lanuginosus</i>	vodena faza – uljna emulzija	prinos veći od 30 % postignut za vrijeme zadržavanja od 32 minute; predložen PTFE cijevni reaktor zbog smanjene mogućnosti začepjenja	Gojun i sur., 2019
Hidroliza estera astaksantina	lipaza iz <i>Aspergillus niger</i>	vodena faza – uljna faza	stopa hidrolize dosegla je 75,4 % za vremenski period od 200 minuta	Mei i sur., 2020
Hidroliza 4-nitrofenil acetata	lipaza iz <i>Pseudomonas fluorescens</i>	voda – ionska tekućina	ne dolazi do pjenjenja tijekom reakcije; postignuta visoka razina pročišćavanja i trostruko recikliranje enzima	Deng i sur., 2020
Sinteza purinskih nukleozidnih estera	lipaza iz <i>Thermomyces lanuginosus</i>	organski ( <i>tert</i> -amilni alkohol)	sintetizirano 12 purinskih nukleozidnih estera s prinosima od 78 do 93 %	Zhang i sur., 2024

Upotreba enzima u reaktorima doživljava svakodnevni rast, a posebice u primjeni imobiliziranih enzimskih reaktora (engl. *Immobilized-Enzyme Reactors*, IMER), gdje su enzimi vezani ili zarobljeni na čvrstu podlogu. Imobilizacija enzima pruža mogućnost ponovne upotrebe, jednostavnost rukovanja, olakšanu separaciju produkta od enzima i povećanu stabilnost enzima na promjene radnih uvjeta (Nagy i sur., 2022). U tablici 3 dan je pregled biotransformacija korištenjem enzima imobiliziranih u mikroreaktorskim sustavima tzv.  $\mu$ -IMER sustavima. Kako navode Zhu i sur. (2020) postoje osnovna tri pristupa klasifikacije  $\mu$ -IMER unutarnjih struktura: (i) tip s premazom na stjenkama, (ii) monolitni tip i (iii) tip s punjenjem (slika 4). Kod mikroreaktora s premazom na stjenkama, enzim je izravno imobiliziran na unutarnju stjenku mikrokanala. Dostupne površine stjenki mikroprotočnih sustava su ograničene, što rezultira niskim kapacitetom punjenja enzima. Enzimski mikroreaktori s punjenjem nude najveći omjer površine i volumena što ih čini boljima u odnosu na tipove sa zidnim premazom. Kod ovakvih tipova  $\mu$ -IMER-a koriste se imobilizacijske tehnike adsorpcije, kovalentne imobilizacije, ionskog vezanja i unakrsnog povezivanja (Gkantzou i sur., 2018). Monolitni mikroreaktori ispunjeni su monolitnim materijalima s međusobno povezanim mezo- ili mikroporoznim strukturama (Sokač Cvetnić i sur., 2023). Ovakva izvedba znatno je skuplja i zahtjevnija od ostalih.



**Slika 4.** Vrste mikroreaktora s imobiliziranim enzimima: a) tip s premazom na stjenkama, b) monolitni tip i c) tip s punjenjem (prema Sokač Cvetnić i sur., 2023)

**Tablica 3.** Enzimske biotransformacije u mikroreaktorskim sustavima s imobiliziranim enzimima

Biotransformacija	Enzim/i	Metoda imobilizacije enzima	Produktivnost procesa	Referenca
Proizvodnja izomaltooligosaharida iz dekstrana T40	endodekstranaza iz <i>Penicillium spp.</i>	imobilizacija na epoksi-aktiviranom monolitnom CIM® disku	učinkovitost imobilizacije je oko 15,9 %, enzim je zadržao više od 77 % početne aktivnosti tijekom razdoblja od 78 dana	Bertrand i sur., 2014
Biokatalitička oksidacija katehola	lakaza iz <i>Trametes versicolor</i>	kovalentna imobilizacija na stijenci cijevnog staklenog mikroreaktora	konverzija od 25 % za vrijeme zadržavanja od 22 s	Jurinjak Tušek i sur., 2017
Sinteza acetofenona i L-alanina	$\omega$ -transaminaza iz <i>Escherichia coli</i>	mikroreaktor s punjenjem koji koristi sloj LentiKats® - PVA čestica kao nosača	više od 80 % početne produktivnosti zadržano je nakon 21 dana neprekidnog rada na 24 °C	Bajić i sur., 2017
Transglukozilacija iz saharoze u glukozil glicerol	saharoza fosforilaza iz <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	kovalentna imobilizacija na porozne nosače (polimetakrilat i CPG)	postignuti su prinosi > 85 %	Bolivar i sur., 2017

**Tablica 3.** Enzimske biotransformacije u mikroreaktorskim sustavima s imobiliziranim enzimima – *nastavak*

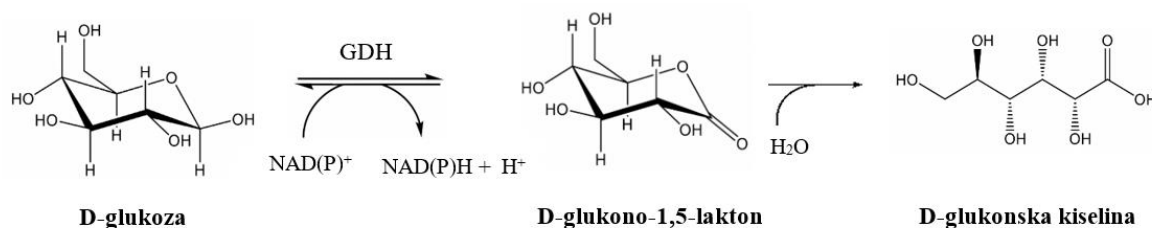
Biotransformacija	Enzim/i	Metoda imobilizacije enzima	Produktivnost procesa	Referenca
Proizvodnja kiralnih cijanohirina	hiroksinitril liaze iz <i>Hevea brasiliensis</i> i <i>Manihot asculenta</i>	kovalentna imobilizacija na silikatnom monolitnom mikroreaktoru	konverzija od 97 % za vrijeme zadržavanja od 3,2 minute	Van Der Helm i sur., 2019
Kontinuirana transaminacija	aminska transaminaza iz <i>Escherichie coli</i>	porozna kopolimerna hidrogel-matrica formirana na mikroreaktoru	nakon 10 dana zadržano je 92 % početne produktivnosti; prinos od 80 % dobiven je zadržavanjem od 310 minuta	Menegatti i Žnidaršič-Plazl, 2021
Hidrolizacija karboksimetil celuloze (CMC)	celulaza iz <i>Aspergillus niger</i>	kovalentno vezanje DA i PEI na površine mikroreaktora	97,2 % veća proizvodnja glukoze u mikroreaktoru u odnosu na druge reakcijske sustave	Lin i sur., 2022
Sinteza (S)-1-Boc-3-aminopiperidina	$\omega$ -transaminaza	kovalentna imobilizacija na epoksidnoj smoli	konverzija od 95 % postignuta je unutar zadržavanja od 10 minuta	Wang i sur., 2022
Biosinteza (S)-2-aminobutan-1-ola	amin dehidrogenaza i glukoza dehidrogenaza iz <i>Escherichie coli</i>	kovalentna imobilizacija na amino, ionsko-izmjenjivačkoj i epoksidnoj smoli	konverzija za 48-satni kontinuirani proces je 91,8 %	Xie i sur., 2024
Proizvodnja konjugata galne kiseline i dekstrana	lakaze iz <i>Trametes versicolor</i>	kovalentna imobilizacija na CIMmultus® CDI monolitnoj koloni	1,43 mg lakaze uspješno je imobilizirano dajući stopu konverzije mase od 32,17 %	Hou i sur., 2024

### 1.1.5. Nedostatci mikroreaktora

Unatoč brojnim prednostima mikroreaktorskih sustava, njihov mali protok još uvijek predstavlja velik izazov za industrijsku primjenu (Wang i sur., 2020). Isto tako, cijena proizvodnje može značajno porasti ovisno o korištenom materijalu, tehnici proizvodnje i složenosti mikroreaktorskog sustava. Također, nužno je i korištenje ostalih dijelova opreme, poput pumpi i senzora koji dodatno povećavaju troškove (Gojun i sur., 2019). Važno je voditi brigu o odabiru adekvatnog materijala za izradu mikroreaktora kako bi se izbjegla eventualna oštećenja. U radu s viskoznim i čvrstim sustavima, mali promjeri mikrokanala mogu predstavljati problem zbog mogućeg začepljenja. Kako bi se minimizirala začepljenja, prije upotrebe mikroreaktora potrebno je provesti postupak filtracije. Isto tako, izravna upotreba reaktanata u krutom obliku nije prikladna za upotrebu u ovakvim sustavima (Zong i Yue, 2022). Ovom problemu pristupa se s ozbiljnošću, budući da značajan dio industrijskih procesa uključuje korištenje krutina. Predloženo je nekoliko mogućnosti kojima bi se spriječilo začepljenje, a to je korištenje višefaznog protoka, modifikacija vlažnosti površine kanala i najučinkovitija, djelovanje ultrazvukom niskog intenziteta. Osnovni princip rada ultrazvuka zasniva se na fenomenu kavitacije. Uslijed djelovanja kavitacije, dolazi do snažnog miješanja u mikrokanalima, a osim toga i do „razbijanja“ nakupina čestica (Dong i sur., 2020).

## 1.2. Glukoza dehidrogenaza

Glukoza dehidrogenaza (EC 1.1.1.47;  $\beta$ -D-glukoza: NAD(P)<sup>+</sup> 1-oksidoreduktaza) pripada skupini oksidoreduktaza. Oksidoreduktaze su skupina enzima koje kataliziraju oksido-redukcijske reakcije odnosno prijenos elektrona s jedne molekule na drugu. Glukoza dehidrogenaza (GDH) katalizira oksidaciju  $\beta$ -D-glukoze u D-glukono-1,5-lakton (glukonolakton) uz istodobnu redukciju NAD(P)<sup>+</sup> u NAD(P)H. Glukonolakton spontano hidrolizira u glukonsku kiselinu (slika 5).



Slika 5. Strukturni prikaz reakcije katalizirane enzimom GDH



Nikotinamid-adenin dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) prvi je put opisan 1906. godine kao komponenta koja može povećati brzinu fermentacije u kvascu (Xie i sur., 2020). Nešto kasnije, utvrđeno je kako je ovaj koenzim ključan u prijenosu elektrona s jedne reakcije na drugu što je od iznimnog značaja za energetski metabolizam stanice. Nikotinamid-adenin dinukleotid fosfat ( $\text{NADP}^+$ ) razlikuje se od  $\text{NAD}^+$  po dodatnoj fosfatnoj skupini na prstenu riboze. Važan je koenzim u stanici jer se koristi u biosintetskim reakcijama kao „reduktivna snaga“. Naime, služi kao reducens predajući elektrone, odnosno njegovom se oksidacijom oslobađa dostatna količina energije za nesmetano odvijanje reakcije. Većina enzima oksidoreduktaza zahtijeva skupe nikotinamidne koenzime ( $\text{NADH}$  ili  $\text{NADPH}$ ), stoga je imperativ postaviti učinkovit sustav regeneracije ovog koenzima.

Glukoza dehidrogenaze moguće je podijeliti u tri skupine ovisno o vrsti korištenog kofaktora:

- nikotin adenin dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) ili nikotin adenin dinukleotid fosfat ( $\text{NADP}^+$ ) – GDH
- pirolokinolin-kinon (PQQ) – GDH
- flavin adenin dinukleotid (FAD) – GDH (Boontim, 2006).

PQQ-ovisna GDH koristi pirolokinolin-kinon kao prostetsku skupinu koja ostaje vezana tijekom cijelog katalitičkog procesa. Potpuna molekularna struktura enzima PQQ-GDH otkrivena je tek 80-ih godina prošlog stoljeća (Lisdar, 2020). Osim glukoza dehidrogenaze, PQQ sadrže i alkohol dehidrogenaza te sorbitol dehidrogenaza. FAD-ovisna GDH koristi flavin adenin dinukleotid kao primarni akceptor elektrona. Zbog široke supstratne specifičnosti PQQ-GDH može izazvati ozbiljne pogreške u senzoru glukoze, te zbog toga FAD-GDH postaje najpouzdaniji enzim za senzor glukoze (Yoshida i sur., 2015). Međutim, senzori bazirani na FAD-GDH imaju nedostatke poput zahtjevnog procesa pripreme i visokih operativnih troškova (Kim i sur., 2013).

### 1.2.1. Izvori glukoza dehidrogenaze

Ovaj enzim pojavljuje se u raznim organizmima kao što su *Bacillus magaterium*, *Bacillus subtilis*, *Gluconobacter suboxydans*, *Halobacterium mediterranes*, *Thermoplasma acidophilum*, *Sulfobus solfataricus* i *Haloferax mediterranei*. Glukoza dehidrogenaza izolirana iz različitih organizama pokazuje i različita biokemijska svojstva poput aktivnosti i stabilnosti, ali i sklonosti prema kofaktorima ( $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$ ) (Pongtharangkul i sur., 2015). Primjerice,

GDH iz *Bacillus subtilis* poželjna je za biokatalitičke procese zahvaljujući izvrsnim svojstvima (Shah i sur., 2020). Ima oblik tetramera s molekulskom masom 126 kDa, pokazuje pH optimum na 8,0 i široki temperaturni raspon od 45 °C do 50 °C (Weckbecker i Hummel, 2005). GDH iz *Bacillus subtilis* intenzivno se koristi za regeneraciju NAD(P)H (Pongtharangkul i sur., 2015).

U tablici 4 prikazani su kinetički parametri i svojstva glukoza dehidrogenaza izoliranih iz različitih vrsta organizama. Kinetički parametri za GDH izoliranu iz *Paenibacillus pini* pokazuju različit afinitet prema NAD<sup>+</sup> odnosno NADP<sup>+</sup> koenzimu. Enzim je pokazao manju Michaelis-Menteničinu konstantu ( $K_M$ ) za NAD<sup>+</sup> u iznosu od 0,25 mM, u odnosu na 2,16 mM za NADP<sup>+</sup>. Ovaj podatak ukazuje na veći afinitet enzima za NAD<sup>+</sup> u odnosu na NADP<sup>+</sup>. Nasuprot tome, GDH izolirana iz *Haloferax mediterranei* ne pokazuje aktivnost prema NAD<sup>+</sup>, već prema NADP<sup>+</sup> i β-D glukozi.

**Tablica 4.** Kinetičke konstante i svojstva GDH izoliranih iz različitih vrsta organizama

Organizam	konstanta $K_M$ (mM)			pH <sub>opt.</sub>	$t_{opt.}$ (°C)	Referenca
	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>	β-D glukoza			
<i>Haloferax mediterranei</i>	NA*	0,035	2,8	8,0	37	Pire i sur., 2001
<i>Lysinibacillus spaericus</i>	0,09	0,07	5,1	9,5	50	Ding i sur., 2011
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0,25	0,05	5,5	8,0	45-50	Pongtharangkul i sur., 2015
<i>Paenibacillus pini</i>	0,25	2,16	26,75	8,0	50	Shah i sur., 2020

NA\* – nema aktivnosti

### 1.2.2. Primjena glukoza dehidrogenaze

Glukoza dehidrogenaza je enzim s nekoliko važnih primjena u raznim područjima, posebice u biotehnologiji, medicini i industrijskim procesima. Pregled primjena GDH dan je u tablici 5.

**Tablica 5.** Pregled primjene enzima glukoza dehidrogenaze

Primjena GDH	Opis	Referenca
Biosenzori i mjerenje koncentracije glukoze	<p><i>Mjerenje koncentracije glukoze u krvi:</i> Jedna od najčešćih primjena GDH su biosenzori za mjerenje glukoze u krvi, posebno u kontroli dijabetesa. GDH se koristi u trakama za mjerenje glukoze i sustavima za kontinuirano mjerenje razine glukoze u krvi. Enzim katalizira oksidaciju glukoze u glukonolakton, zajedno s redukcijom kofaktora (npr. <math>\text{NAD}^+</math> ili FAD) kako bi proizveo mjerljivi signal.</p> <p><i>Prehrambena industrija:</i> Biosenzori temeljeni na GDH koriste se u prehrambenoj industriji za analizu razine glukoze u proizvodima, osiguravajući kontrolu kvalitete tijekom proizvodnih procesa.</p>	Tang i sur., 2020; Bollella i sur., 2019  Wijavanti i sur., 2023; Stredansky, 2018
Biokataliza i biotransformacija	<p><i>Proizvodnja finih kemikalija:</i> GDH se koristi u proizvodnji finih kemikalija i farmaceutskih proizvoda, gdje služi kao biokatalizator za stereoselektivnu redukciju ketona u kiralne alkohole. Sposobnost enzima da regenerira kofaktore poput NADH ili NADPH tijekom ovih reakcija posebno je vrijedna u učinkovitom pokretanju sintetskih procesa.</p> <p><i>Regeneracija kofaktora:</i> GDH se često koristi u biokatalitičkim procesima za regeneraciju NADH ili NADPH iz <math>\text{NAD}^+</math> odnosno <math>\text{NADP}^+</math>. Ova regeneracija kofaktora ključna je za pokretanje drugih enzimskih reakcija koje zahtijevaju kontinuiranu opskrbu smanjenim kofaktorima, čineći proces isplativijim i održivijim.</p>	Karagoz i sur., 2020  Yan i sur., 2022; Pongtharangkul i sur., 2015
Dijagnostičke primjene	<p><i>Klinička dijagnostika:</i> GDH se koristi u dijagnostičkim setovima za mjerenje razine glukoze u različitim biološkim tekućinama, uključujući krv, urin i cerebrospinalnu tekućinu. Ta su mjerenja ključna za dijagnosticiranje i praćenje bolesti poput dijabetesa.</p>	Sonagra i sur., 2024; Zhao i sur., 2021;

**Tablica 5.** Pregled primjene enzima glukoza dehidrogenaze – nastavak

	<i>Detekcija patogena:</i> U nekim dijagnostičkim testovima, GDH se koristi zajedno s drugim enzimima za otkrivanje specifičnih patogena ili metabolita, nudeći pouzdan alat za medicinsku dijagnostiku.	Lee i sur., 2020; Khodaparast. 2019; Bilen i sur., 2007
Biogorivne ćelije	<i>Enzimске ćelije za biogorivo:</i> GDH se koristi u razvoju ćelija za biogorivo, gdje djeluje kao anodni katalizator. Ove ćelije s biogorivom proizvode električnu energiju iz oksidacije glukoze, s potencijalnom primjenom u napajanju medicinskih uređaja poput srčanih stimulatora ili biosenzora.	Jeon i sur., 2019; Okuda-Shimazaki i sur., 2008
Prehrambena industrija	<i>Analiza i kontrola slatkoće:</i> GDH se može koristiti za analizu razine glukoze u pićima i hrani za kontrolu slatkoće i procesa fermentacije, osiguravajući dosljednost i kvalitetu u proizvodima poput sokova, vina i piva. <i>Kontrola fermentacije:</i> tijekom fermentacije GDH pomaže u analizi razine glukoze, što je bitno za optimiranje uvjeta fermentacije i osiguravanje željene kvalitete proizvoda u pivarskoj i pekarskoj industriji.	Ando i sur., 2023; Zhang i sur., 2023; Wijayanti i sur., 2023; Vasilarou i sur., 2000
Istraživanje i razvoj	<i>Metaboličke studije:</i> GDH se koristi u istraživanjima za proučavanje metabolizma glukoze i kinetiku enzima. Razumijevajući kako se glukoza razgrađuje u različitim biološkim sustavima, istraživači mogu steći uvid u metaboličke poremećaje i razviti nove terapijske strategije. <i>Sintetska biologija:</i> U sintetskoj biologiji, GDH se konstruira ili koristi u kombinaciji s drugim enzimima za stvaranje novih biosintetskih putova ili za optimiziranje metaboličkih procesa u mikroorganizmima.	Sun i sur., 2024; Rozova i sur., 2021; Pongtharangkul i sur., 2015; Penkler i sur., 2015
Zaštita okoliša	<i>Bioremedijacija:</i> GDH se može koristiti u procesima bioremedijacije za otkrivanje i razgradnju zagađivača na bazi glukoze u otpadnim vodama, pridonoseći naporima za čišćenje okoliša.	Sainz i sur., 2016; Ahuja i sur., 2004

## **2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA**

Na temelju dostupnih literaturnih podataka postavljeni su opći i specifični ciljevi ovoga rada.

Opći cilj ovoga rada uključuje povećanje znanja o mogućoj primjeni mikroreaktora za provedbu biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom. Kako bi se pridonijelo općem cilju u okviru ovoga rada postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

- analizirati profile strujanja vodenog dvofaznog sustava u mikroreaktoru pri različitim protocima
- analizirati difuzivnosti komponenata reakcijske smjese u mikroreaktoru te provesti simulaciju modela difuzivnosti metodom konačnih razlika te metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora
- provesti eksperimente biotransformacije glukoze enzimom GDH u mikroreaktoru pri različitim ulaznim koncentracijama glukoze i koenzima  $\text{NAD}^+$
- usporediti primjenjivost matematičkog modela biotransformacije glukoze za predviđanje promjene koncentracije glukoze pri različitim vremenima zadržavanja riješenog metodom konačnih razlika, metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora te metodom idealnog homogenog cijevnog reaktora
- provesti eksperimente biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom imobiliziranom na stjenke staklenog mikroreaktora i teflonskog cijevnog reaktora.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Kemikalije

Za eksperimente provedene u ovome radu korištene su sljedeće kemikalije:

- Albumin iz goveđeg seruma, BSA (Sigma-Aldrich, SAD)
- APTES (3-aminopropiltrioksisilan) (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- beta-nikotinamid adenin dinukleotid, 97 % (Thermo Scientific, SAD)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma-Aldrich, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- D-glukoza (Gram-mol, Hrvatska)
- Dušična kiselina (Scharlau, Španjolska)
- Etanol (Kefo, Slovenija)
- Fosfatna kiselina, 85 % (Kemika, Hrvatska)
- Glukoza dehidrogenaza porijeklom iz *Pseudomonas spp.* (Sigma-Aldrich, SAD)
- Glukoza-PAP otopina (Greiner diagnostic GmbH, Njemačka)
- Glutaralhid (Sigma-Aldrich, Njemačka)
- Klorovodična kiselina (Fisher Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Natrijev hidroksid (Carlo Erba Reagents SAS, Francuska)
- TRIS baza (Tris (hidroksimetil) aminometan) (BDH Prolabo, Ujedinjeno Kraljevstvo).

#### 3.1.2. Radni instrumenti

Za eksperimente provedene u ovome radu korišteni su sljedeći radni instrumenti:

- Analitička vaga (Kern, Njemčka)
- Homogenizator (Neuation, Indija)
- Magnetska miješalica (SB 162-3, Stuart, Ujedinjeno Kraljevstvo)
- Mikroreaktori (Micronit Microfluidics, Nizozemska)
- Mikroskop (B1-220A, Motic, Njemačka)
- pH-metar (914, Metrohm, Švicarska)
- Pumpe mikroreaktora (New Era Pump Systems, SAD; Harvard Apparatus, SAD)
- Spektrofotometar (Libra S11, Biochrom, Engleska)
- Vodena kupelj (IKA-Werke, Njemačka).



### 3.1.3. Pribor

Za eksperimente provedene u ovome radu korišten je sljedeći radni pribor:

- Automatske pipete
- Eppendorf vijale
- Falcon epruvete
- Filteri
- Hvataljke
- Kvarcna kiveta
- Mehaničke pipete
- Menzure (10 i 50 cm<sup>3</sup>)
- Nastavci za pipete
- Odmjerne tikvice (25, 50, 100 cm<sup>3</sup>)
- Plastična boca štrcaljka
- Plastične kivete
- Staklene čaše (25, 50, 100, 150 cm<sup>3</sup>)
- Stakleni lijevak
- Stakleni štapić.

### 3.1.4.. Programski paketi

U radu su korišteni sljedeći programi:

- Microsoft Exel 2016 (Microsoft Corporation, SAD)
- Mathematica 10.0 (Wolfram Research, SAD).

### 3.1.5. Priprema otopina

- **0,1 mol dm<sup>-3</sup> Tris-HCl pufer pH 7**

Tris-HCl pufer pripremljen je otapanjem 121,14 g Trisa u 800 cm<sup>3</sup> destilirane vode te je pH vrijednost podešena zakiseljavanjem s koncentriranom klorovodičnom kiselinom do konačnih pH 7 uz kontinuirano miješanje na magnetskoj miješalici.

- **otopine glukoze**

Različite koncentracije otopina glukoze ( $c_{\text{glukoza}} = 1; 4,7; 9,7 \text{ i } 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) pripravljene su otapanjem glukoze u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl puferu pH 7.

- **otopine beta-nikotinamid adenin dinukleotida**

Otopine beta-nikotinamid adenin dinukleotida ( $c_{\text{NAD}^+} = 1,1; 2,2 \text{ i } 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) pripravljene su resuspendiranjem beta-nikotinamid adenin dinukleotida u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  u Tris-HCl puferu pH 7.

- **suspenzije enzima glukoza dehidrogenaze**

Suspenzije enzima glukoza dehidrogenaze ( $\gamma_{\text{GDH}} = 0,001 \text{ i } 0,09 \text{ mg cm}^{-3}$ ) pripravljene su resuspendiranjem glukoza dehidrogenaze u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  u Tris-HCl puferu pH 7.

- **Bradford reagens**

Bradford reagens pripremljen je otapanjem 100 mg bojila Commassie Brilliant Blue G-250 s  $50 \text{ cm}^3$  etanola,  $100 \text{ cm}^3$  ortofosforne kiseline i  $850 \text{ cm}^3$  destilirane vode. Ovako pripremljeni reagens je filtriran (Filtar Chromafil Xtra RC-20/25  $0,45 \mu\text{m}$ , Macherrey-Nager, Njemačka) te potom skladišten na temperaturi hladnjaka ( $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) u boci zaštićenoj aluminijskom folijom kako bi se spriječilo prodiranje svjetlosti. Prije svakog ponovnog korištenja reagens je zagrijan na radnu temperaturu ( $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) uz kontinuirano miješanje na magnetskoj miješalici.

- **10 %-tna vodena otopina APTES-a**

Otopina je priređena miješanjem  $1 \text{ cm}^3$  APTES-a s  $9 \text{ cm}^3$  destilirane vode.

- **5 %-tna otopina glutaraldehida**

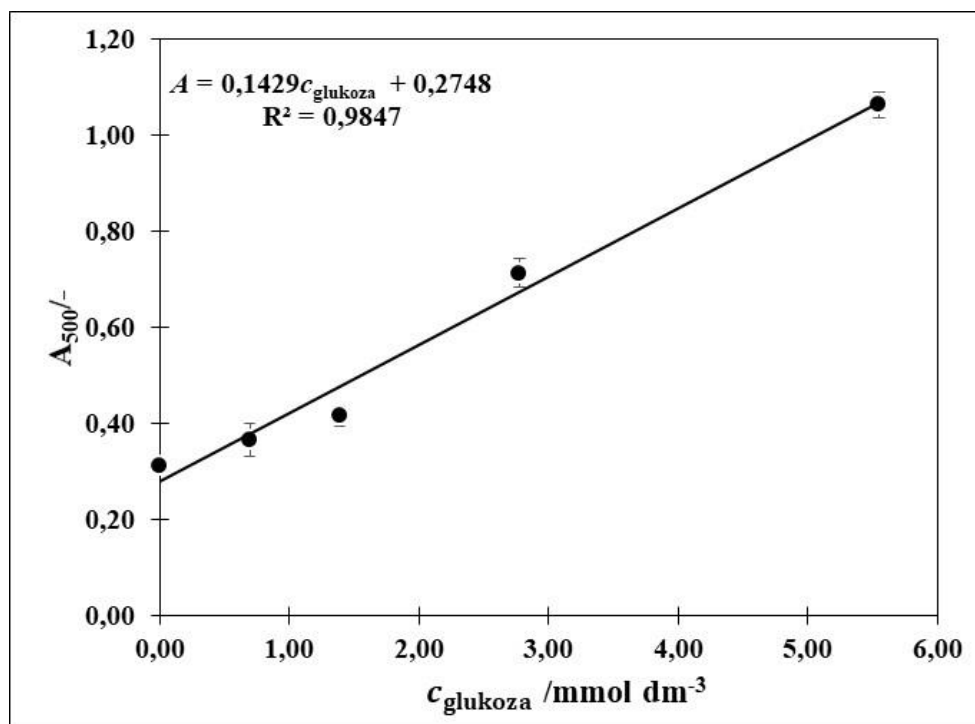
Otopina je priređena miješanjem  $0,5 \text{ cm}^3$  glutaraldehida i  $9,5 \text{ cm}^3$  destilirane vode.

### 3.2. Analitičke metode

#### 3.2.1. Mjerenje koncentracije glukoze

Koncentracija glukoze u uzorcima određena je pomoću enzimске GOD-PAP metode. Nepoznata koncentracija glukoze u uzorku određivana je spektrofotometrijski pri  $\lambda = 500 \text{ nm}$  i sobnoj temperaturi ( $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) u plastičnim kivetama ( $V = 1 \text{ cm}^3$ ) uz pomoć baždarnog dijagrama.

Za izradu baždarnog dijagrama korištena je standardna otopina glukoze  $c_{\text{glukoza}} = 5,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  koja je razrijeđena na šest otopina koncentracija u rasponu od  $c_{\text{glukoza}} = 0,69 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $c_{\text{glukoza}} = 5,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Mjerenje je provedeno na način da je u kivete dodano  $1 \text{ cm}^3$  glukoza-PAP otopine i  $10 \text{ mm}^3$  otopine glukoze. Ovako pripremljene otopine ostave se na sobnoj temperaturi kroz 30 min nakon čega se pristupa mjerenju apsorbancije. Svi uzorci analizirani su u tri paralele. Baždarni dijagram predstavlja ovisnost apsorbancije o poznatoj koncentraciji glukoze, a dobiveni dijagram s pripadajućom jednažbom pravca prikazan je na slici 6.

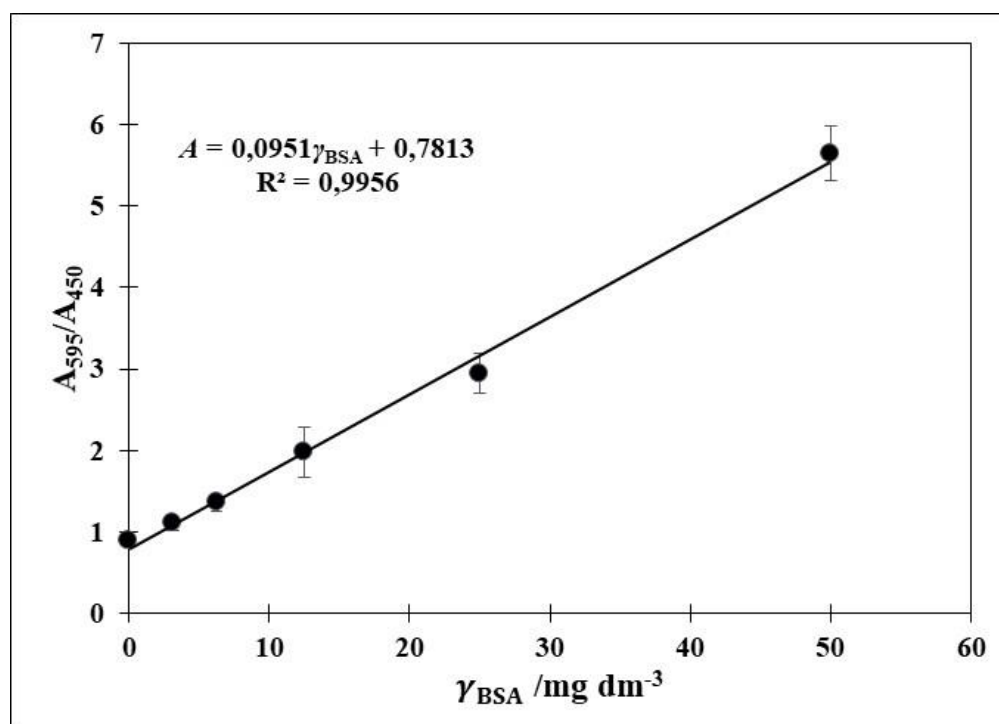


Slika 6. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije glukoze

### 3.2.2. Mjerenje koncentracije proteina

Koncentracija proteina u uzorku mjerena je lineariziranim metodom po Bradfordu. Ova metoda temelji se na vezanju bojila Commassie Brilliant Blue G-250 za protein. Baždarni dijagram potrebno je izraditi korištenjem otopine albumina iz goveđeg seruma (BSA) koncentracije  $\gamma_{\text{BSA}} = 1,0 \text{ mg cm}^{-3}$ . Koncentracija otopine odgovara apsorbanciji od 0,660 pri valnoj duljini  $\lambda = 280 \text{ nm}$  u kvarnoj kiveti. Ovako pripremljena otopina razrjeđuje se na potrebne koncentracije u rasponu koncentracija od  $\gamma_{\text{BSA}} = 0,5 \text{ mg dm}^{-3}$  do  $\gamma_{\text{BSA}} = 100 \text{ mg dm}^{-3}$ . Linearno područje ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina postignuto je za koncentracije  $0\text{-}50 \text{ mg dm}^{-3}$ .

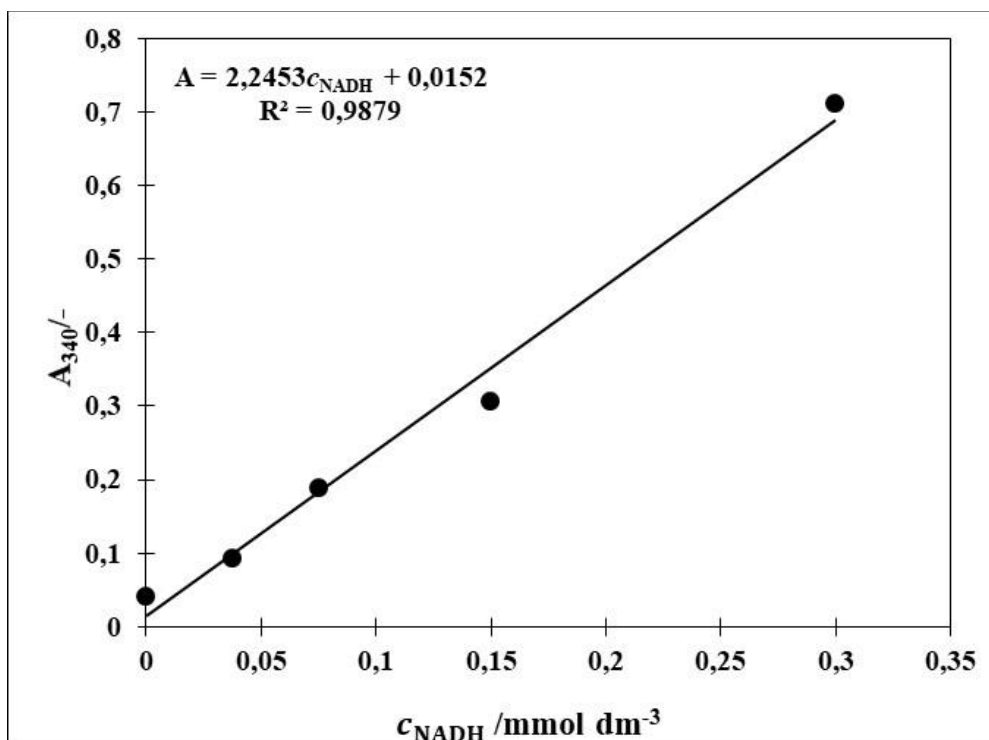
Koncentracija proteina određuje se spektrofotometrijski pri valnim duljinama  $\lambda = 595 \text{ nm}$  i  $\lambda = 400 \text{ nm}$ . U plastične kivete dodano je  $500 \mu\text{L}$  uzorka i  $500 \mu\text{L}$  prethodno pripremljenog Bradford reagensa. Otopina se kratko homogenizira te se potom inkubira pet minuta na sobnoj temperaturi kako bi došlo do razvoja karakterističnog plavog obojenja. Nakon isteka vremena mjeri se apsorbancija pri valnim duljinama  $\lambda = 595 \text{ nm}$  i  $\lambda = 400 \text{ nm}$  na UV-Vis spektrofotometru. Svi uzorci su analizirani u tri paralele. Koncentracija proteina u uzorku dobivena je iz baždarnog dijagrama pri čemu je korišten omjer izmjerenih apsorbancija ( $595 \text{ nm} / 400 \text{ nm}$ ). Dobiveni dijagram s pripadajućom jednadžbom pravca prikazan je na slici 7.



Slika 7. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina

### 3.2.3. Mjerenje koncentracije NADH

Mjerenje koncentracije NADH provodi se spektrofotometrijski pri valnoj duljini  $\lambda = 340$  nm. Iz izmjerene apsorbancije izračunata je koncentracija NADH u uzorcima pomoću prethodno konstruirane baždarne krivulje. Baždarna krivulja dobivena je mjerenjem apsorbancije standardnih otopina pri valnoj duljini  $\lambda = 340$  nm. Dobiveni dijagram s pripadajućom jednažbom pravca prikazan je na slici 8.



Slika 8. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije NADH

## 3.3. Provedba mjerenja

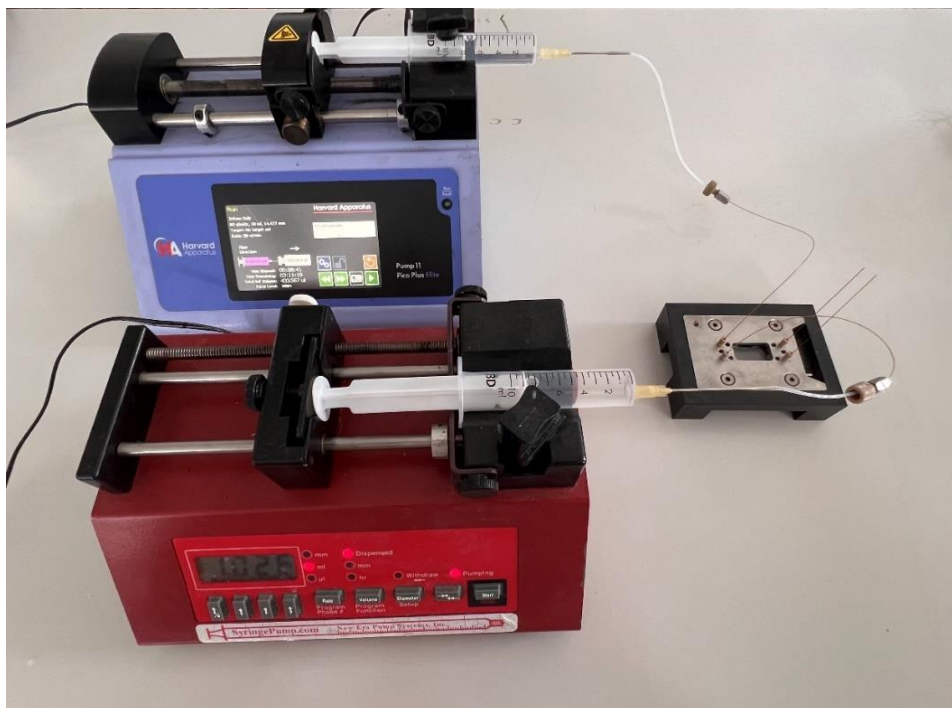
### 3.3.1. Analiza profila strujanja dvofaznog sustava u mikroreaktoru

U staklenom mikroreaktoru (Micronit Microfluidics, Nizozemska) karakterističnih dimenzija mikrokanala ( $W = 250 \mu\text{m}$ ,  $h = 50 \mu\text{m}$  i  $L = 330 \text{mm}$ ) provedena je analiza profila strujanja. Za uvođenje dvije vodene faze korištene su klipne pumpe (New Era Pump Systems, SAD i Harvard Apparatus, SAD) koje su pomoću dovodnih cjevčica povezane s ulazima na mikroreaktoru. U jednu od vodenih faza dodana je otopina Coomassie Brilliant Blue G-250 kako bi se faze mogle jasno razlikovati i vizualno bolje promotriti dok je druga faza bio  $1 \text{mol dm}^{-3}$  Tris-HCl pufer pH 7. Tok u reaktoru promatran je pomoću mikroskopa (Motic B1-220A,

binokularni, Njemačka) pod povećanjem od 40 puta. Svi su pokusi provedeni pri jednakim omjerima protoka objiju faza 1:1. Profili strujanja kod različitih volumnih protoka  $q = 2, 5, 10, 20, 50, 100$  i  $200 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  zabilježeni su fotoaparatom na tri pozicije uzduž mikrokanala (ulaz, sredina i izlaz).

### 3.3.2. Analiza efektivne difuzivnosti

Analiza efektivne difuzivnosti provedena je u staklenom mikroreaktoru volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$  s dva ulaza (Y-oblik) i dva izlaza (Y-oblik) i glatkim stjenkama. Reaktor je postavljen u metalno kućište kako bi se pomoću dovodnih cjevčica povezali ulazi u mikroreaktor s klipnim pumpama koje mogu raditi na različitim volumnim protocima (slika 9). Pokusi su provedeni na način da je jedna od faza koje su uvedene u mikroreaktor bila otopina glukoze ( $c_{\text{glukoza,u}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) ili otopina NADH ( $\gamma_{\text{NADH,u}} = 1,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) ili suspenzija enzima glukoza dehidrogenaze ( $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ) u  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl puferu pH 7, dok je druga faza bio  $1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl puferu pH 7. Eksperimenti su provedeni pri različitim vremenima zadržavanja od  $\tau = 0,6 \text{ s}$  do  $\tau = 24 \text{ s}$ . Odvojeno su prikupljeni uzorci na dva izlaza iz mikroreaktora. Koncentracije glukoze u objema fazama određene su primjenom glukoza-PAP testa, koncentracija NADH spektrofotometrijski, a koncentracije enzima glukoza dehidrogenaze određene su metodom po Bradfordu.



**Slika 9.** Mikroreaktorski sustav korišten pri analizi efektivne difuzivnosti (vlastita fotografija)

### 3.3.3. Provedba biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom porijeklom iz *Pseudomonas spp.* u mikroreaktorskom sustavu

Provedena je biotransformacija glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom porijeklom iz *Pseudomonas spp.* u staklenom mikroreaktoru volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$ . Ukupno je provedeno pet pokusa primjenom različitih ulaznih koncentracija glukoze i koenzima  $\text{NAD}^+$ :

- (i)  $c_{\text{glukoza, u}} = 4,7 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 1,1 \text{ mmol dm}^{-3}$
- (ii)  $c_{\text{glukoza, u}} = 9,4 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$
- (iii)  $c_{\text{glukoza, u}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$
- (iv)  $c_{\text{glukoza, u}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$
- (v)  $c_{\text{glukoza, u}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$

U svim eksperimentima koncentracija enzima glukoza dehidrogenaze je bila  $\gamma_{\text{GDH, u}} = 0,001 \text{ mg cm}^{-3}$ . Eksperimenti su provedeni pri različitim vremenima zadržavanja od  $\tau = 0,6; 1,2; 2,4; 3; 4,8; 12$  i  $24 \text{ s}$ . Uzorci su u određenim vremenskim intervalima skupljani u kivete s otopinom  $\text{HCl}$ ,  $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ , kako bi se inaktivirao enzim i zaustavila reakcija biotransformacije glukoze. Praćene su dinamičke promjene koncentracije glukoze i koncentracije  $\text{NADH}$ .

#### 3.3.3.1. Provedba biotransformacije glukoze s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u staklenom mikroreaktoru

Provedbe biotransformacije u staklenom mikroreaktoru ( $V = 4 \text{ mm}^3$ ) temelje se na postupcima prethodno opisanima u eksperimentalnom radu Stojković i sur. (2011), a kasnije primijenjenima u istraživanju Jurinjak Tušek (2013).

Unutrašnjost mikrokanala tretirana je otopinom  $\text{NaOH}$  koncentracije  $c = 4 \text{ mol dm}^{-3}$  volumnim protokom  $q = 2 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  kroz period od  $30 \text{ min}$  kako bi se uklonile sve nečistoće. Nakon toga, mikrokanali su isprani destiliranom vodom protokom  $q = 2 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  kroz vremenski period od  $30 \text{ min}$ . Uslijedilo je tretiranje otopinom  $\text{HNO}_3$  koncentracije  $c = 5 \text{ mol dm}^{-3}$  kroz vremenski period od  $120 \text{ min}$  na temperaturi od  $90 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon ponovnog ispiranja destiliranom vodom, unutarja površina mikrokanala podvrgnuta je postupku silaniziranja  $10 \text{ \%}$ -tnom vodenom otopinom APTES-a kroz vremenski period od  $24 \text{ h}$ . Nakon isteka vremena, mikrokanali su isprani destiliranom vodom te potom tretirani  $5 \text{ \%}$ -tnom otopinom glutaraldehida protokom  $q = 2 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  kroz period od  $120 \text{ min}$ . Zadnji korak prije imobilizacije bio je ispiranje s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris- $\text{HCl}$  puferom  $\text{pH } 7$  u trajanju od  $30 \text{ min}$ .

Suspenzija enzima uvedena je u mikroreaktor te tako ostavljena kroz period od 24 h kako bi se enzim vezao na površinu. Naposljetku, enzim koji se nije vezao, ispran je s  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl puferom pH 7 kroz period od 30 min.

Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom provedena je pri različitim protocima otopine glukoze i koenzima ( $c_{\text{glukoza,u}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Uzorci su skupljani u kivete s vodenom otopinom HCl,  $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ , radi inaktivacije enzima ispranog sa stjenki mikroreaktora. Aparatura korištena u ovom eksperimentu prikazana je na slici 10. Praćene su dinamičke promjene koncentracije glukoze i koncentracije NADH. Stabilnost imobiliziranog enzima praćena je tijekom sedam dana kontinuirane biotransformacije glukoze.



**Slika 10.** Aparatura za provedbu biotransformacije s imobiliziranim enzimom u staklenom mikroreaktoru (vlastita fotografija)

### 3.3.3.2. Provedba biotransformacije glukoze s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u teflonskom cijevnom mikroreaktoru

Teflonski cijevni mikroreaktor ( $d = 1 \text{ mm}$ ,  $L = 30 \text{ cm}$ ,  $V = 235,62 \text{ mm}^3$ ) tretiran je 97 %-tnom otopinom  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pri protoku  $q = 2 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  kroz period od 60 min na temperaturi od  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nakon ispiranja mikroreaktora destiliranom vodom, započet je proces silaniziranja 10 %-tnom vodenom otopinom APTES-a pri protoku  $q = 2 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  u trajanju 24 h. Nakon toga, uslijedilo je ponovno tridesetminutno ispiranje destiliranom vodom pri protoku  $q = 2 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$ , a nakon toga tretiranje 5 %-tnom vodenom otopinom glutaraldehida pri istom protoku, ali u



trajanju od 120 min. Teflonski cijevni mikroreaktor potom je ispran fosfatnim puferom pH 6,6 koncentracije  $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , a nakon toga uvedena je suspenzija enzima koja je ostavljena stajati 24 h. Na samome kraju ovog dijela, enzim koji se nije vezao, ispran je  $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$  Tris-HCl puferom pH 7 u trajanju od 30 min.

Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom je provedena pri različitim protocima otopine glukoze i koenzima ( $c_{\text{glukoza,u}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Uzorci su skupljani u kivete s vodenom otopinom HCl,  $c = 1 \text{ mol dm}^{-3}$ , radi inaktivacije enzima ispranog sa stjenki mikroreaktora. Aparatura korištena u ovom eksperimentu prikazana je na slici 11. Praćene su dinamičke promjene koncentracije glukoze i koncentracije NADH. Stabilnost imobiliziranog enzima praćena je tijekom sedam dana kontinuirane biotransformacije glukoze.



**Slika 11.** Aparatura za provedbu biotransformacije s imobiliziranim enzimom u teflonskom cijevnom mikroreaktoru (vlastita fotografija)

### 3.4. Matematičko modeliranje i obrada rezultata

#### 3.4.1. Matematički model procesa difuzije

Matematički model procesa difuzije postavljen je na temelju sljedećih pretpostavki:

- strujanje u reaktoru je laminarno
- viskoznost objiju faza je jednaka

- reaktor radi u izotermnim uvjetima
- transport tvari u mikrokkanalu odvija se konvekcijom u smjeru gibanja kapljevine (smjer  $x$ ) i difuzijom u dva smjera ( $x$  i  $y$ ).

U ovom radu korišten je matematički model koji se temelji na istraživanju Tišma i sur. (2009), a koji je potom detaljno razrađen i opisan u radu Jurinjak Tušek (2013). Proces difuzije u mikroreaktoru opisan je 2D modelom, a uključuje konvekciju u aksijalnom smjeru (osi  $x$ ) i difuziju u aksijalnom i radijalnom smjeru (osi  $x$  i  $y$ ). Matematički model procesa difuzije za mikroreaktor u stacionarnom stanju za glukozu,  $\text{NAD}^+$  i enzim glukozu dehidrogenazu definiran je pomoću parcijalnih diferencijalnih jednačbi u bezdimenzijskom obliku s pripadajućim početnim i rubnim uvjetima (jednačbe 8-10):

Bilanca tvari za glukozu:

$$\begin{aligned}
 v \cdot \frac{\partial c_{\text{glukoza}}}{\partial \xi} &= \frac{D_{\text{glukoza/pufer}}}{W} \cdot \left[ \frac{\partial^2 c_{\text{glukoza}}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 c_{\text{glukoza}}}{\partial \psi^2} \right] \\
 c_{\text{glukoza}}(0, \psi) &= c_{u,\text{glukoza}} & -1 \leq \psi < 0 \\
 c_{\text{glukoza}}(L, \psi) &= 0 & 0 < \psi \leq 1 \\
 \frac{\partial c_{\text{glukoza}}}{\partial \xi} \left( \frac{L}{W}, \psi \right) &= 0 & -1 \leq \psi \leq 1 \\
 \frac{\partial c_{\text{glukoza}}}{\partial \xi}(\xi, \pm 1) &= 0 & 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}
 \end{aligned} \tag{8}$$

Bilanca tvari za NADH:

$$\begin{aligned}
 v \cdot \frac{\partial c_{\text{NADH}}}{\partial \xi} &= \frac{D_{\text{NADH/pufer}}}{W} \cdot \left[ \frac{\partial^2 c_{\text{NADH}}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 c_{\text{NADH}}}{\partial \psi^2} \right] \\
 c_{\text{NADH}}(0, \psi) &= c_{u,\text{NADH}} & -1 \leq \psi < 0 \\
 c_{\text{NADH}}(L, \psi) &= 0 & 0 < \psi \leq 1 \\
 \frac{\partial c_{\text{NADH}}}{\partial \xi} \left( \frac{L}{W}, \psi \right) &= 0 & -1 \leq \psi \leq 1 \\
 \frac{\partial c_{\text{NADH}}}{\partial \xi}(\xi, \pm 1) &= 0 & 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}
 \end{aligned} \tag{9}$$

Bilanca tvari za enzim glukoza dehidrogenazu (GDH):

$$\begin{aligned}
 v \cdot \frac{\partial \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \xi} &= \frac{D_{\text{GDH/pufer}}}{W} \cdot \left[ \frac{\partial^2 \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \psi^2} \right] \\
 \gamma_{\text{GDH}}(0, \psi) &= \gamma_{u, \text{GDH}} & -1 \leq \psi < 0 \\
 \gamma_{\text{GDH}}(0, \psi) &= 0 & 0 < \psi \leq 1 \\
 \frac{\partial \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \xi} \left( \frac{L}{W}, \psi \right) &= 0 & 1 \leq \psi \leq 1 \\
 \frac{\partial \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \xi} (\xi, \pm 1) &= 0 & 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}
 \end{aligned} \tag{10}$$

pri čemu su  $\xi$  i  $\psi$  bezdimenzijske varijable  $\xi = x/W$ ,  $\psi = y/W$ , a  $x$  i  $y$  predstavljaju koordinate u smjeru duljine ( $L$ ) i širine ( $2W$ ) mikrokanala.  $D_{\text{glukoza/pufer}}$ ,  $D_{\text{NADH/pufer}}$ ,  $D_{\text{GDH/pufer}}$  difuzijski koeficijenti glukoze, NADH i enzima glukoze dehidrogenaze u puferu pri određenoj temperaturi.

Sustav parcijalnih diferencijalnih jednadžbi koji opisuje proces difuzije u mikroreaktoru u stacionarnom stanju za glukožu, NADH i enzim glukoza dehidrogenazu riješen je korištenjem 2D metode konačnih razlika. Parcijalne diferencijalne jednadžbe su diskretizirane na statičkoj ekvidistantnoj mreži 50 x 50 u programskom paketu WR Mathematica 10.0.

#### 3.4.1.1. Proračun difuzijskih koeficijenata

Difuzijski koeficijenti komponenata reakcijske smjese biotransformacije glukoze izračunati su primjenom Hayduk-Laudie korelacije (Li i Carr, 1997) prema jednadžbi 11:

$$D_{A/B} = 13,26 \cdot 10^{-5} \cdot \eta_B^{-1,4} \cdot (\bar{V}_A)^{-0,589} \tag{11}$$

gdje  $\eta_B$  predstavlja viskoznost otapala, a  $\bar{V}_A$  molarni volumen molekule koja se otapa. Vrijednosti molarnih volumena i izračunatih koeficijenata difuzije komponenata reakcijske smjese biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom prikazane su tablici 6.

**Tablica 6.** Vrijednosti molarnih volumena i izračunatih koeficijenata difuzije komponenata reakcijske smjese biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom

Molekula	Molarni volumen (cm <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	Referenca	Difuzijski koeficijent (m <sup>2</sup> s <sup>-1</sup> )
glukoza	113,3	Gepert i Moskaluk, 2007	1,4822 · 10 <sup>-9</sup>
NAD <sup>+</sup>	304,2	Anonymous, 2024	8,2681 · 10 <sup>-10</sup>
NADH	305,2	Shina i sur., 2008	8,2681 · 10 <sup>-10</sup>
glukonolakton	103,5	Anonymous, 2024	1,5633 · 10 <sup>-9</sup>
glukonska kiselina	111,2	Anonymous, 2024	1,4986 · 10 <sup>-9</sup>

Difuzivnost gukoza dehidrogenaze ( $D_{GDH/pufer} = 1,2071 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ) izračunata je primjenom Youngove korelacije (Young i sur., 1980) prikazane jednačbom 12:

$$D_{A/B} = 8,34 \cdot 10^{-8} \cdot \left( \frac{T}{\eta_B \cdot M_A^{1/3}} \right) \quad [12]$$

gdje  $M_A$  predstavlja molarnu masu enzima (263000 g mol<sup>-1</sup>).

#### 3.4.1.2. Numerička aproksimacija metodom dva idealna paralelna cijevna reaktora

Sustav parcijalnih diferencijalnih jednačbi mikroreaktoru u stacionarnom stanju za glukožu, NADH i enzim glukoza dehidrogenazu riješen je također numeričkom aproksimacijom metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora (Jurinjak Tušek i sur., 2013). Metoda se bazira na tome da se svaka od dvije faze u mikroreaktoru razmatra kao idealan cijevni reaktor u stacionarnom stanju. Prijenos tvari između dva idealana cijevna reaktora modelira se s difuzijom koja se opisuje kao kvocijent koncentracijskog gradijenta između dva položaja u mikroreaktoru i razmaka između odabranih položaja (Fickov prvi zakon). Pojednostavljene bilance tvari za glukožu, NADH i enzim glukoza dehidrogenazu prikazane su jednačbama 13-18. Sustav diferencijalnih jednačbi riješen je u programskom paketu WR Mathematica 10.0.

$$v \cdot \frac{\partial c_{glukoza}^1}{\partial x} = \frac{D_{glukoza/pufer}}{W^2} \cdot (c_{glukoza}^2 - c_{glukoza}^1) \quad [13]$$

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{glukoza}}^2}{\partial x} = -\frac{D_{\text{glukoza/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{glukoza}}^2 - c_{\text{glukoza}}^1) \quad [14]$$

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{NADH}}^1}{\partial x} = \frac{D_{\text{NADH/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{NADH}}^2 - c_{\text{NADH}}^1) \quad [15]$$

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{NADH}}^2}{\partial x} = -\frac{D_{\text{NADH/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{NADH}}^2 - c_{\text{NADH}}^1) \quad [16]$$

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{GDH}}^1}{\partial x} = \frac{D_{\text{GDH/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{GDH}}^2 - c_{\text{GDH}}^1) \quad [17]$$

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{GDH}}^2}{\partial x} = -\frac{D_{\text{GDH/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{GDH}}^2 - c_{\text{GDH}}^1) \quad [18]$$

### 3.4.2. Kinetički model biotrasformacije glukoze u mikroreaktoru

Brzine reakcije oksidacije ( $r_1$ ) i redukcije glukoze ( $r_2$ ) katalizirane GDH (slika 5) opisane su pomoću dvosupstratne Michaelis-Menteničine jednadžbe s inhibicijom supstratom i kompetitivnom inhibicijom produktom (jednadžbe 19 i 20). Produkt oksidacije glukoze koju katalizira GDH je glukonolakton, koji se spontano hidrolizira u glukonsku kiselinu ( $r_3$ ). Spontana hidroliza glukonolaktona opisana je kinetikom prvog reda (jednadžba 21). Popis vrijednosti kinetičkih parametra navedenih reakcija procijenjenih na temelju nezavisnih eksperimenata u šaržnom reaktoru dan je u tablici 7.

$$r_1 = \frac{V_{\max 1} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukoza}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left( K_m^{\text{NAD}^+} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i^{\text{NADH}}} \right) + c_{\text{NAD}^+} \right) \cdot \left( K_m^{\text{glukoza}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonolakton}}}{K_i^{\text{glukonolakton}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i1}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukoza}}^2}{K_i^{\text{glukoza}}} + c_{\text{glukoza}} \right) \right)} \quad [19]$$

$$r_2 = \frac{V_{\max 2} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukonolakton}} \cdot c_{\text{NADH}}}{\left( K_m^{\text{NADH}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NAD}^+}}{K_i^{\text{NAD}^+}} \right) + c_{\text{NADH}} \right) \cdot \left( K_m^{\text{lakton}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukoza}}}{K_i^{\text{glukoza}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i2}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukonolakton}}^2}{K_i^{\text{glukonolakton}}} + c_{\text{lakton}} \right) \right)} \quad [20]$$

$$r_3 = K \cdot c_{\text{glukonolakton}} \quad [21]$$

gdje  $r$  označava brzinu enzimske reakcije,  $V_{\max}$  maksimalnu brzinu enzimske reakcije,  $\gamma_{\text{GDH}}$  masenu koncentraciju enzima glukoza dehidrogenaze,  $c_{\text{glukoza}}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}$ ,  $c_{\text{NADH}}$ ,  $c_{\text{glukonolakton}}$ , i  $c_{\text{glukonska kis.}}$  množinske koncentracije glukoze,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ , glukonolakton i glukonske kiseline.  $K_m^{\text{glukoza}}$ ,  $K_m^{\text{NAD}^+}$ ,  $K_m^{\text{NADH}}$ ,  $K_m^{\text{glukonolakton}}$  i  $K_m^{\text{glukonska kis.}}$  opisuje Michaelis-Menteničine konstante za glukožu,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ , glukonolakton i glukonsku kiselinu.  $K_i^{\text{glukoza}}$ ,  $K_i^{\text{NAD}^+}$ ,  $K_i^{\text{NADH}}$ ,  $K_i^{\text{glukonolakton}}$  i  $K_i^{\text{glukonska kis.}}$  opisuje konstante inhibicije za glukožu,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ , glukonolakton i glukonsku kiselinu.

**Tablica 7.** Vrijednosti kinetičkih parametara modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom

Reakcija	Kinetički parametar	Procijenjena vrijednost
Oksidacija glukoze (Čulo, 2024)	$V_{\max 1}$ (U mg <sup>-1</sup> )	373,64 ± 95,41
	$K_m^{\text{glukoza}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	103,14 ± 54,62
	$K_m^{\text{NAD}^+}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	0,0042 ± 0,0012
	$K_i^{\text{glukoza}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	723,97 ± 423,21
	$K_i^{\text{glukonolakton}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	1,31 ± 0,29
	$K_i^{\text{NADH}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	0,0078 ± 0,0011
	$K_{i1}^{\text{glukonska kis.}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	58,40 ± 22,27
Redukcija glukoze (Čulo, 2024)	$V_{\max 2}$ (U mg <sup>-1</sup> )	70,02 ± 9,76
	$K_m^{\text{glukonolakton}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	2,60 ± 0,75
	$K_m^{\text{NADH}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	0,0044 ± 0,0012
	$K_i^{\text{lakton}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	40,65 ± 12,50
	$K_i^{\text{glukoza}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	10,35 ± 3,06
	$K_i^{\text{NAD}^+}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	0,0107 ± 0,0013
	$K_{i2}^{\text{glukonska kis.}}$ (mmol dm <sup>-3</sup> )	24,37 ± 3,89
Hidrolizira glukonolaktona (Furlanović, 2010)	$K$ (min <sup>-1</sup> )	0,000776 ± 0,000111

### 3.4.3. Matematički model biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru

2D matematički model proces biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru uključuje konvekciju u smjeru strujanja, difuziju u dva smjera i kinetiku procesa. Bilance tvari komponenata reakcijske smjese u obliku parcijalnih diferencijalnih jednadžbi u bezdimenzijskom obliku s pripadajućim početnim i rubnim uvjetima dane su jednadžbama 22-27:

Bilanca tvari za glukozu:

$$\begin{aligned}
 v \cdot \frac{\partial c_{\text{glukoza}}}{\partial \xi} &= \frac{D_{\text{glukoza}}}{W} \cdot \left[ \frac{\partial^2 c_{\text{glukoza}}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 c_{\text{glukoza}}}{\partial \psi^2} \right] - \\
 &\frac{W \cdot V_{\text{max1}} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukoza}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left( K_m^{\text{NAD}^+} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i^{\text{NADH}}} \right) + c_{\text{NAD}^+} \right) \cdot \left( K_m^{\text{glukoza}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonoglukonolakton}}}{K_i^{\text{glukonolakton}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i1}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukoza}}^2}{K_i^{\text{glukoza}}} + c_{\text{glukoza}} \right) \right)} + \\
 &\frac{W \cdot V_{\text{max2}} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukonolakton}} \cdot c_{\text{NADH}}}{\left( K_m^{\text{NADH}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NAD}}}{K_i^{\text{NAD}}} \right) + c_{\text{NADH}} \right) \cdot \left( K_m^{\text{glukonolakton}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukoza}}}{K_i^{\text{glukoza}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i2}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukonolakton}}^2}{K_i^{\text{glukonolakton}}} + c_{\text{glukonolakton}} \right) \right)}
 \end{aligned}$$

$$c_{\text{glukoza}}(0, \psi) = c_{u,\text{glukoza}} \quad -1 \leq \psi < 0$$

$$c_{\text{glukoza}}(0, \psi) = 0 \quad 0 < \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{glukoza}}}{\partial \xi} \left( \frac{L}{W}, \psi \right) = 0 \quad -1 \leq \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{glukoza}}}{\partial \xi}(\xi, \pm 1) = 0 \quad 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}$$

[22]



Bilanca tvari za  $\text{NAD}^+$ :

$$\begin{aligned}
 v \cdot \frac{\partial c_{\text{NAD}^+}}{\partial \xi} &= \frac{D_{\text{NAD}^+}}{\text{pufer}} \cdot \left[ \frac{\partial^2 c_{\text{NAD}^+}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 c_{\text{NAD}^+}}{\partial \psi^2} \right] - \\
 &\frac{W \cdot V_{\text{max}1} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukoza}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left( K_m^{\text{NAD}^+} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i^{\text{NADH}}} \right) + c_{\text{NAD}^+} \right) \cdot \left( K_m^{\text{glukoza}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonolakton}}}{K_i^{\text{glukonolakton}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i1}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukoza}}^2}{K_i^{\text{glukoza}}} + c_{\text{glukoza}} \right) \right)} + \\
 &\frac{W \cdot V_{\text{max}2} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukonolakton}} \cdot c_{\text{NADH}}}{\left( K_m^{\text{NADH}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NAD}}}{K_i^{\text{NAD}}} \right) + c_{\text{NADH}} \right) \cdot \left( K_m^{\text{glukonolakton}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukoza}}}{K_i^{\text{glukoza}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i2}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukonolakton}}^2}{K_i^{\text{glukonolakton}}} + c_{\text{glukonolakton}} \right) \right)}
 \end{aligned}$$

$$c_{\text{NAD}^+}(0, \psi) = c_{\text{u,NAD}^+} \quad -1 \leq \psi < 0$$

$$c_{\text{NAD}^+}(0, \psi) = 0 \quad 0 < \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{NAD}^+}}{\partial \xi} \left( \frac{L}{W}, \psi \right) = 0 \quad -1 \leq \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{NAD}^+}}{\partial \xi}(\xi, \pm 1) = 0 \quad 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}$$

[23]

Bilanca tvari za NADH:

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{NADH}}}{\partial \xi} = \frac{D_{\text{NADH}}^{\text{pufer}}}{W} \cdot \left[ \frac{\partial^2 c_{\text{NADH}}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 c_{\text{NADH}}}{\partial \psi^2} \right] +$$

$$\frac{W \cdot V_{\text{max1}} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukoza}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left( K_m^{\text{NAD}^+} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i^{\text{NADH}}} \right) + c_{\text{NAD}^+} \right) \cdot \left( K_m^{\text{glukoza}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonolakton}}}{K_i^{\text{glukonolakton}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i1}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukoza}}^2}{K_i^{\text{glukoza}}} + c_{\text{glukoza}} \right) \right)}$$

$$\frac{W \cdot V_{\text{max2}} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukonolakton}} \cdot c_{\text{NADH}}}{\left( K_m^{\text{NADH}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NAD}}}{K_i^{\text{NAD}}} \right) + c_{\text{NADH}} \right) \cdot \left( K_m^{\text{glukonolakton}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukoza}}}{K_i^{\text{glukoza}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i2}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukonolakton}}^2}{K_i^{\text{glukonolakton}}} + c_{\text{glukonolakton}} \right) \right)}$$

$$c_{\text{NADH}}(0, \psi) = 0 \quad -1 \leq \psi < 0$$

$$c_{\text{NADH}}(0, \psi) = 0 \quad 0 < \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{NADH}}}{\partial \xi} \left( \frac{L}{W}, \psi \right) = 0 \quad -1 \leq \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{NADH}}}{\partial \xi} (\xi, \pm 1) = 0 \quad 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}$$

[24]

Bilanca tvari za glukonolakton:

$$\begin{aligned}
 v \cdot \frac{\partial c_{\text{glukonolakton}}}{\partial \xi} &= \frac{D_{\text{glukonolakton}}}{W} \cdot \left[ \frac{\partial^2 c_{\text{glukonolakton}}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 c_{\text{glukonolakton}}}{\partial \psi^2} \right] + \\
 &\frac{\left( K_m^{\text{NAD}^+} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i^{\text{NADH}}} \right) + c_{\text{NAD}^+} \right) \cdot \left( K_m^{\text{glukoza}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonolakton}}}{K_i^{\text{glukonolakton}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i1}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukoza}}^2}{K_i^{\text{glukoza}}} + c_{\text{glukoza}} \right) \right)}{W \cdot V_{\text{max}1} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukoza}} \cdot c_{\text{NAD}^+}} - \\
 &\frac{\left( K_m^{\text{NADH}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NAD}}}{K_i^{\text{NAD}}} \right) + c_{\text{NADH}} \right) \cdot \left( K_m^{\text{glukonolakton}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukoza}}}{K_i^{\text{glukoza}}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{glukonska kis.}}}{K_{i2}^{\text{glukonska kis.}}} \right) + \left( \frac{c_{\text{glukonolakton}}^2}{K_i^{\text{glukonolakton}}} + c_{\text{glukonolakton}} \right) \right)}{W \cdot V_{\text{max}2} \cdot \gamma_{\text{GDH}} \cdot c_{\text{glukonolakton}} \cdot c_{\text{NADH}}} - K \cdot c_{\text{glukonolakton}}
 \end{aligned}$$

$$c_{\text{glukonolakton}}(0, \psi) = 0 \quad -1 \leq \psi < 0$$

$$c_{\text{glukonolakton}}(0, \psi) = 0 \quad 0 < \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{glukonolakton}}}{\partial \xi} \left( \frac{L}{W}, \psi \right) = 0 \quad -1 \leq \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{glukonolakton}}}{\partial \xi} (\xi, \pm 1) = 0 \quad 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}$$

[25]

Bilanca tvari za glukonsku kiselinu:

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{glukonska kis.}}}{\partial \xi} = \frac{D_{\text{glukonska kis.}}}{W} \cdot \left[ \frac{\partial^2 c_{\text{glukonska kis.}}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 c_{\text{glukonska kis.}}}{\partial \psi^2} \right] + K \cdot c_{\text{glukonolakton}}$$

$$c_{\text{glukonska kis.}}(0, \psi) = 0 \quad -1 \leq \psi < 0$$

$$c_{\text{glukonska kis.}}(0, \psi) = 0 \quad 0 < \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{glukonska kis.}}}{\partial \xi} \left( \frac{L}{W}, \psi \right) = 0 \quad -1 \leq \psi \leq 1$$

$$\frac{\partial c_{\text{glukonska kis.}}}{\partial \xi} (\xi, \pm 1) = 0 \quad 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W}$$

[26]

Bilanca tvari za glukoza dehidrogenazu:

$$v \cdot \frac{\partial \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \xi} = \frac{D_{\text{GDH/pufer}}}{W} \cdot \left[ \frac{\partial^2 \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \xi^2} + \frac{\partial^2 \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \psi^2} \right]$$

$$\begin{aligned} \gamma_{\text{GDH}}(0, \psi) &= 0 & -1 \leq \psi < 0 \\ \gamma_{\text{GDH}}(0, \psi) &= \gamma_{u, \text{GDH}} & 0 < \psi \leq 1 \\ \frac{\partial \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \xi} \left( \frac{L}{W}, \psi \right) &= 0 & -1 \leq \psi \leq 1 \\ \frac{\partial \gamma_{\text{GDH}}}{\partial \xi} (\xi, \pm 1) &= 0 & 0 \leq \xi \leq \frac{L}{W} \end{aligned} \quad [27]$$

Sustav parcijalnih diferencijalnih jednadžbi koji opisuje proces biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru u stacionarnom stanju za glukoza,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$ , glukonolakton, glukonsku kiselinu i enzim glukoza dehidrogenazu riješen je korištenjem 2D metode konačnih razlika. Parcijalne diferencijalne jednadžbe su diskretizirane na statičkoj ekvidistantnoj mreži 50 x 50 u programskom paketu WR Mathematica 10.0.

#### 3.4.3.1. Matematički model idealnog homogenog cijevnog reaktora za opis procesa biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru

Proces biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom opisan je modelom idealnog homogenog cijevnog reaktora. Bilance tvari komponenata reakcijske smjese u obliku diferencijalnih jednadžbi dane su jednadžbama 28-32.

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{glukoza}}}{\partial x} = -r_1 + r_2 \quad [28]$$

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{NAD}^+}}{\partial x} = -r_1 + r_2 \quad [29]$$

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{NADH}}}{\partial x} = r_1 - r_2 \quad [30]$$

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{glukonolakton}}}{\partial x} = r_1 - r_2 - r_3 \quad [31]$$

$$v \cdot \frac{\partial c_{\text{glukonska kis.}}}{\partial x} = r_3 \quad [32]$$

Sustav diferencijalnih jednadžbi riješen je u programskom paketu WR Mathematica 10.0.

### 3.4.3.2. Matematički model dvaju idealnih cijevnih reaktora za opis procesa biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru

Proces biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom opisan je također modelom dvaju idealnih cijevnih reaktora. Bilance tvari komponenata reakcijske smjese u obliku diferencijalnih jednadžbi dane su jednadžbama 33-44.

$$v_1 \cdot \frac{\partial c_{\text{glukoza}}^1}{\partial x} = -\frac{D_{\text{glukoza/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{glukoza}}^1 - c_{\text{glukoza}}^2) - r_1 + r_2 \quad [33]$$

$$v_2 \cdot \frac{\partial c_{\text{glukoza}}^2}{\partial x} = \frac{D_{\text{glukoza/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{glukoza}}^1 - c_{\text{glukoza}}^2) - r_1 + r_2 \quad [34]$$

$$v_1 \cdot \frac{\partial c_{\text{NAD}^+}^1}{\partial x} = -\frac{D_{\text{NAD}^+/\text{pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{NAD}^+}^1 - c_{\text{NAD}^+}^2) - r_1 + r_2 \quad [35]$$

$$v_2 \cdot \frac{\partial c_{\text{NAD}^+}^2}{\partial x} = \frac{D_{\text{NAD}^+/\text{pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{NAD}^+}^1 - c_{\text{NAD}^+}^2) - r_1 + r_2 \quad [36]$$

$$v_1 \cdot \frac{\partial c_{\text{NADH}}^1}{\partial x} = \frac{D_{\text{NADH/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{NADH}}^2 - c_{\text{NADH}}^1) + r_1 - r_2 \quad [37]$$

$$v_2 \cdot \frac{\partial c_{\text{NADH}}^2}{\partial x} = -\frac{D_{\text{NADH/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{NADH}}^2 - c_{\text{NADH}}^1) + r_1 - r_2 \quad [38]$$

$$v_1 \cdot \frac{\partial c_{\text{glukonolakton}}^1}{\partial x} = \frac{D_{\text{glukonolakton/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{glukonolakton}}^2 - c_{\text{glukonolakton}}^1) + r_1 - r_2 - r_3 \quad [39]$$

$$v_2 \cdot \frac{\partial c_{\text{glukonolakton}}^2}{\partial x} = -\frac{D_{\text{glukonolakton/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{glukonolakton}}^2 - c_{\text{glukonolakton}}^1) + r_1 - r_2 - r_3 \quad [40]$$

$$v_1 \cdot \frac{\partial c_{\text{glukonska kis.}}^1}{\partial x} = \frac{D_{\text{glukonska kis./pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{glukonska kis.}}^2 - c_{\text{glukonska kis.}}^1) + r_3 \quad [41]$$

$$v_2 \cdot \frac{\partial c_{\text{glukonska kis.}}^2}{\partial x} = -\frac{D_{\text{glukonska kis./pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{glukonska kis.}}^2 - c_{\text{glukonska kis.}}^1) + r_3 \quad [42]$$

$$v_1 \cdot \frac{\partial c_{\text{GDH}}^1}{\partial x} = \frac{D_{\text{GDH/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{GDH}}^2 - c_{\text{GDH}}^1) \quad [43]$$

$$v_2 \cdot \frac{\partial c_{\text{GDH}}^2}{\partial x} = -\frac{D_{\text{GDH/pufer}}}{W^2} \cdot (c_{\text{GDH}}^2 - c_{\text{GDH}}^1) \quad [44]$$

Sustav diferencijalnih jednadžbi riješen je u programskom paketu WR Mathematica 10.0.

#### 3.4.4. Procjena primjenjivosti predloženih matematičkih modela

Primjenjivost predloženih matematičkih modela analizirana je primjenom sljedećih statističkih kriterija:

a) koeficijent determinacije:

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad [45]$$

gdje  $y_i$  predstavlja eksperimentalne podatke,  $\hat{y}_i$  predstavlja modelom predviđene vrijednosti,  $\bar{y}$  predstavlja srednju vrijednost eksperimentalnih podataka, a  $n$  broj eksperimentalnih podataka.

b) korigirani koeficijent determinacije:

$$R_{\text{adj}}^2 = 1 - \left( \frac{(1 - R^2) \cdot (n - 1)}{n - p - 1} \right) \quad [46]$$

gdje  $R^2$  predstavlja koeficijent determinacije,  $n$  broj eksperimentalnih podataka, a  $p$  broj nezavisnih varijabli matematičkog modela.

c) srednja kvadratna pogreška (engl. *Root Mean Square Error*, RMSE):

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad [47]$$

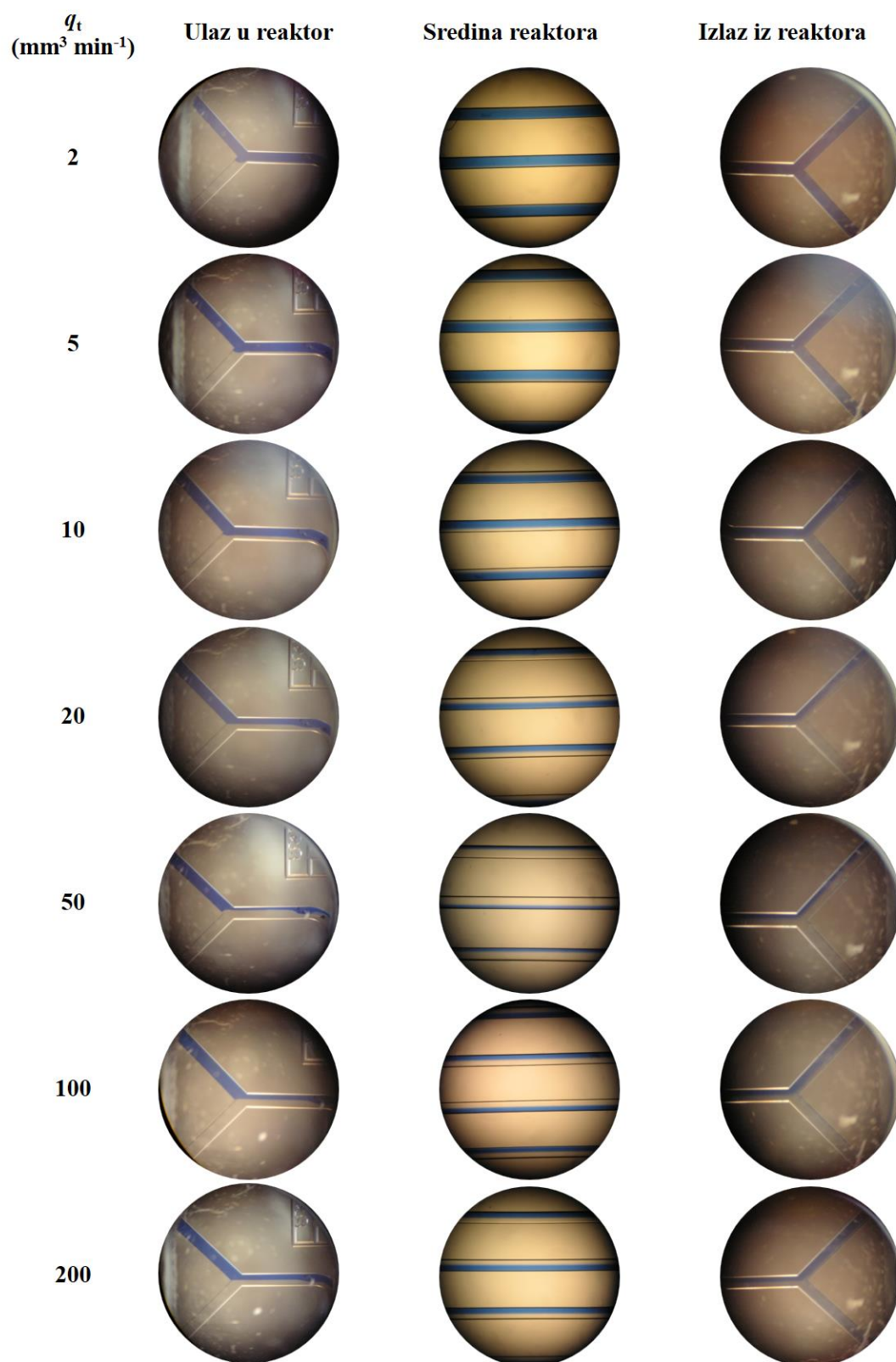
gdje  $y_i$  predstavlja eksperimentalne podatke,  $\hat{y}_i$  predstavlja modelom predviđene vrijednosti, a  $n$  broj eksperimentalnih podataka.

## **4. REZULTATI**

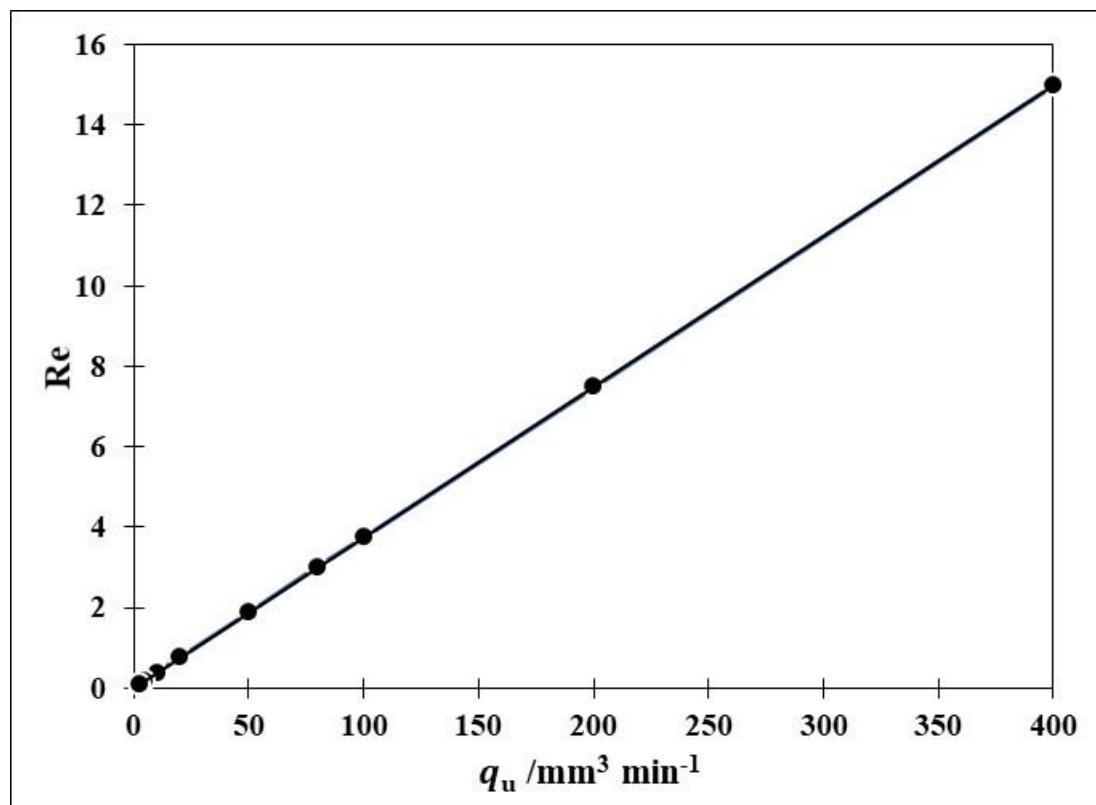


#### 4.1. Analiza profila strujanja vodenog dvofaznog sustava u mikroreaktoru

Provedena je analiza profila strujanja vodenog dvofaznog sustava u mikroreaktoru volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$  s dva ulaza i dva izlaza. Profili strujanja dobiveni su pri različitim volumnim protocima u rasponu od  $q = 2 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  do  $q = 200 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$ . U jednu vodenu fazu dodana je otopina Coomassie Brilliant Blue G-250 radi boljeg međusobnog razlikovanja faza. Profili strujanja fotografirani su na ulazu u reaktor, središnjem dijelu te na izlazu iz reaktora (slika 12). Grafički prikaz ovisnosti Reynoldsove značajke o zadanim protocima dan je na slici 13.



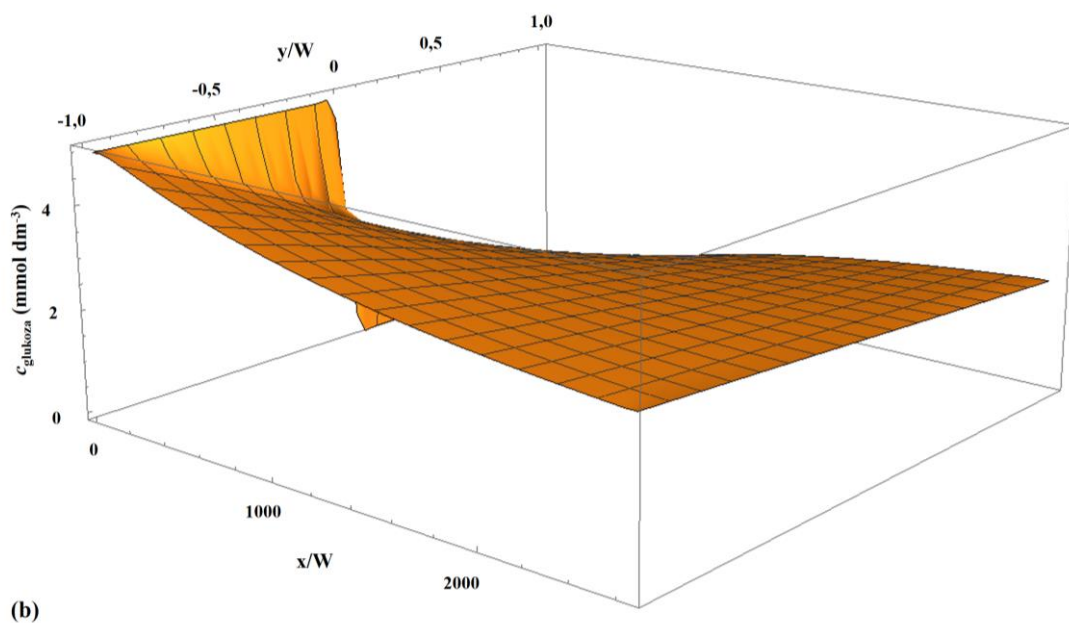
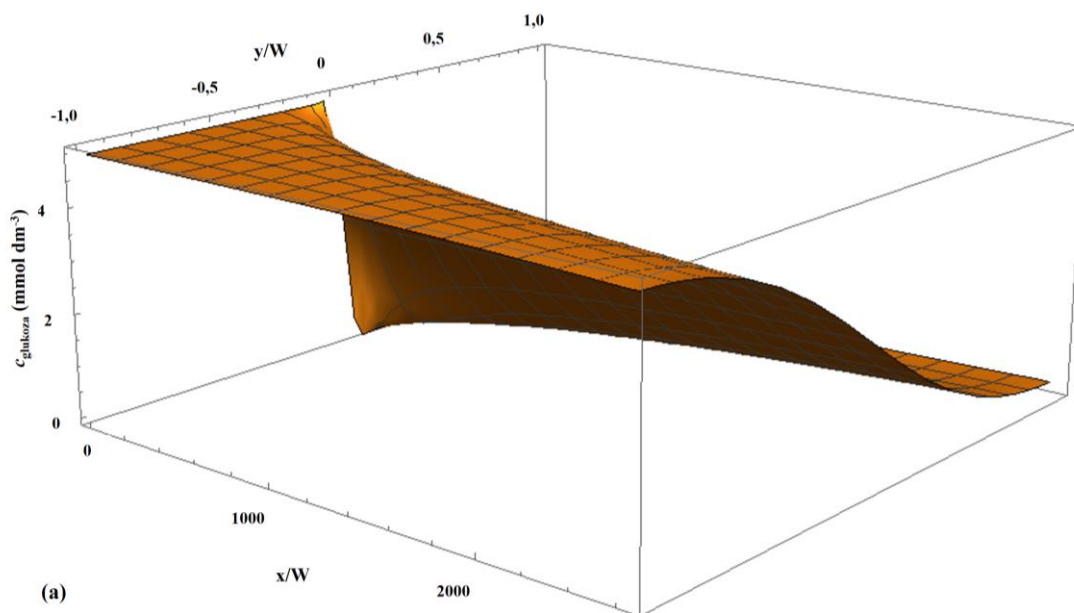
**Slika 12.** Profili strujanja vodenog dvofaznog sustava pri različitim ukupnim protocima u mikroreaktoru volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$  s dva ulaza i dva izlaza (uvećanje 40 puta)



**Slika 13.** Grafički prikaz ovisnosti Reynoldsove značajke o protoku u dvofaznom vodenom sustavu u mikroreaktoru, volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$

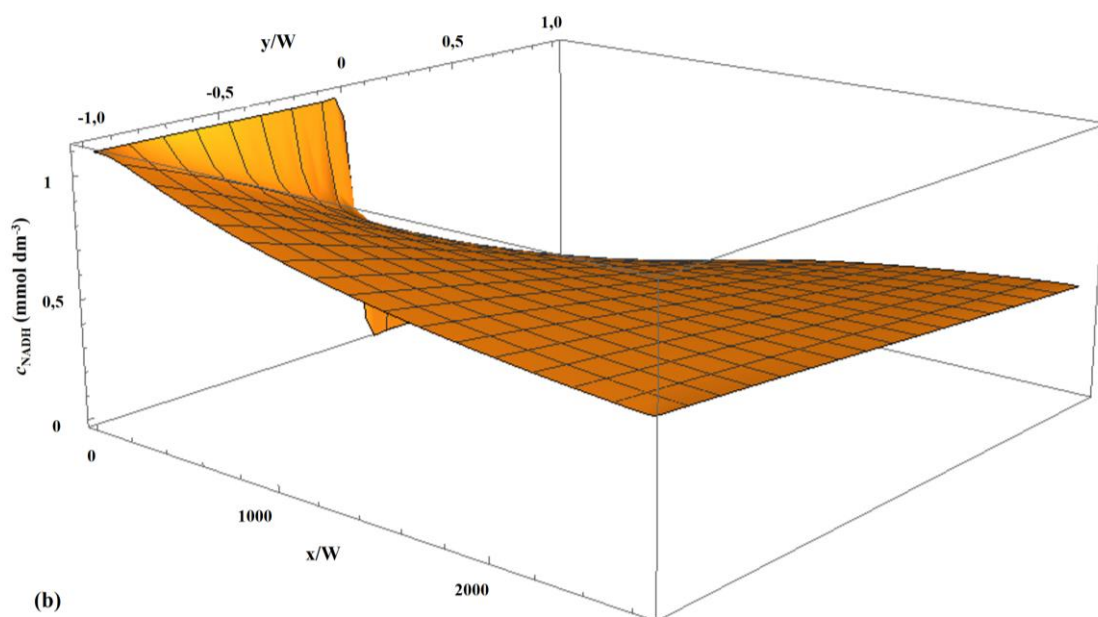
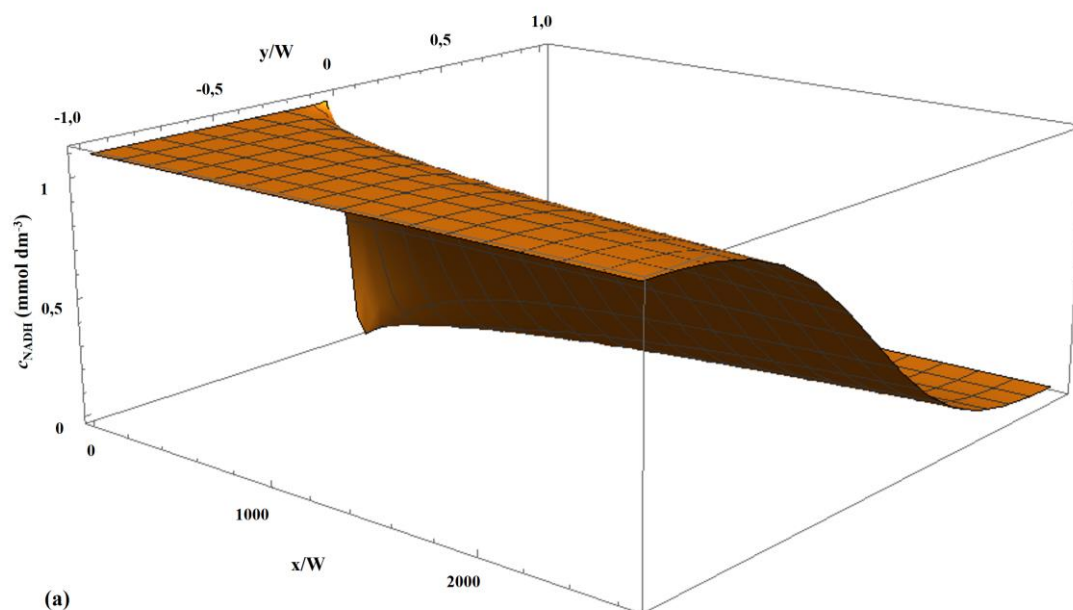
#### 4.2. Analiza efektivnih difuzivnosti komponenata u mikroreaktoru

Analiza efektivnih difuzivnosti provedena je u staklenom mikroreaktoru volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$  s dva ulaza i dva izlaza. Analizirane su difuzivnosti glukoze, NADH te enzima glukoza dehidrogenaze (GDH) pri različitim vremenima zadržavanja (slike 14-16). Usporedba rezultata eksperimenata i rezultata simulacije matematičkog modela procesa difuzije riješenog metodom dvaju idealnih cijevnih reaktora i metodom konačnih razlika na primjeru ovisnosti koncentracija glukoze, NADH i enzima glukoza dehidrogenaze o vremenu zadržavanja na izlazu iz mikroreaktora za svaku od faza vodenog dvofaznog sustava predložena je slikovnim prikazima 17-19. Usporedba statističkih kriterija primjenjivosti predloženih metoda simulacije matematičkog modela procesa difuzije u mikroreaktoru prikazana je u tablici 8.



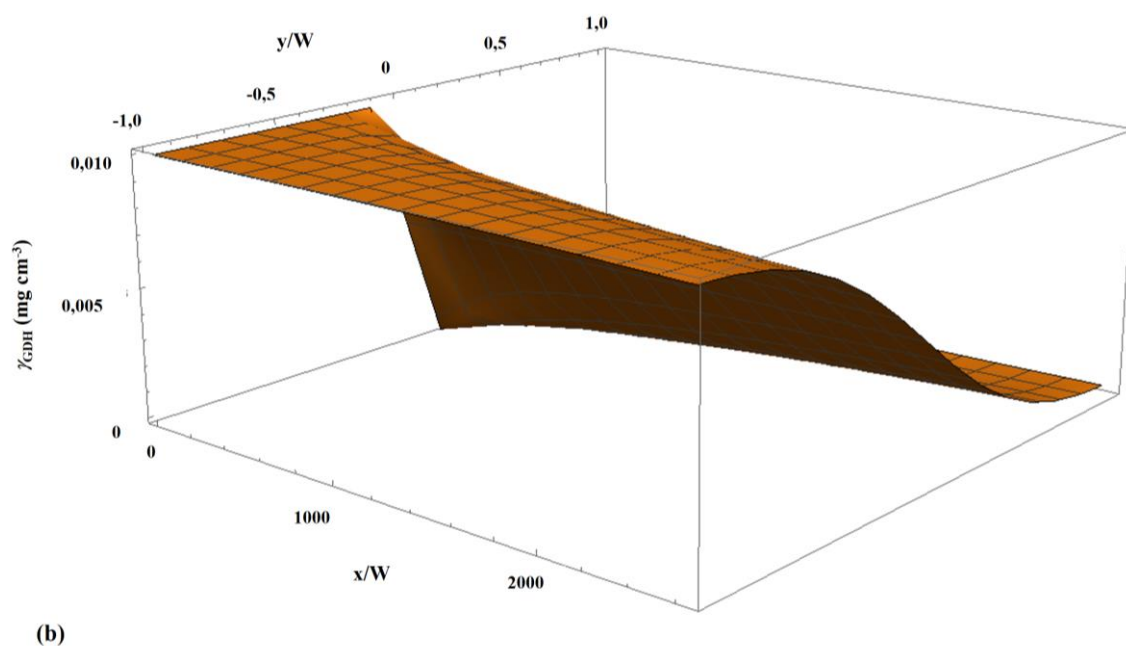
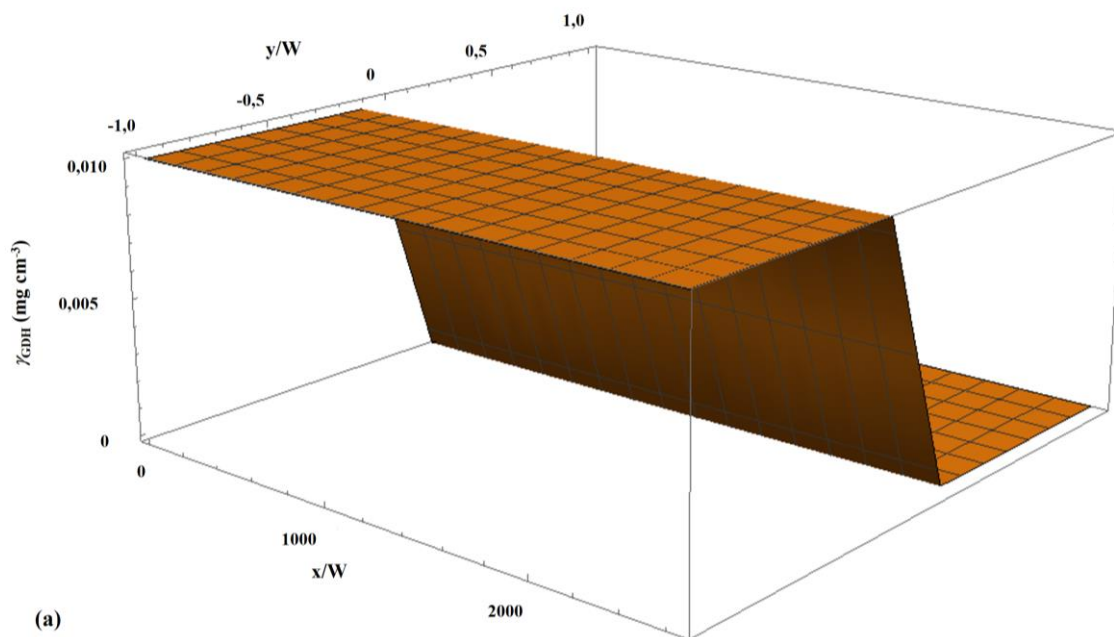
**Slika 14.** Promjena koncentracije glukoze po dužini i širini mikroreaktora dobivena simulacijom matematičkog modela difuzije u mikroreaktoru pri različitim vremenima zadržavanja; (a)  $\tau = 1,2$  s, (b)  $\tau = 96$  s. ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza}} = 5$  mmol dm<sup>-3</sup>,

$$D_{\text{glukoza/pufer}} = 1,482 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$$

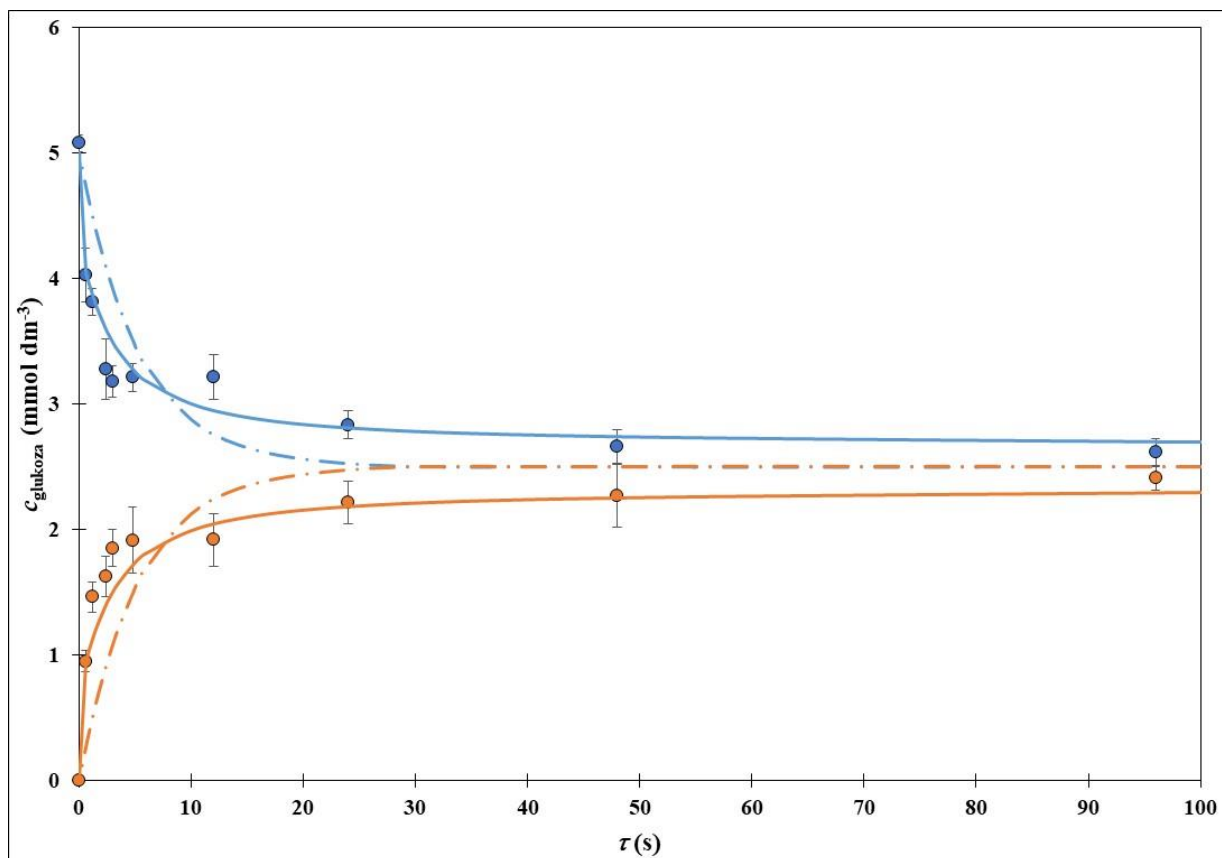


**Slika 15.** Promjena koncentracije NADH po dužini i širini mikroreaktora dobivena simulacijom matematičkog modela difuzije u mikroreaktoru pri različitim vremenima zadržavanja; (a)  $\tau = 1,2$  s, (b)  $\tau = 96$  s. ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu$ m,  $c_{\text{NADH}} = 1,1$  mmol dm<sup>-3</sup>,

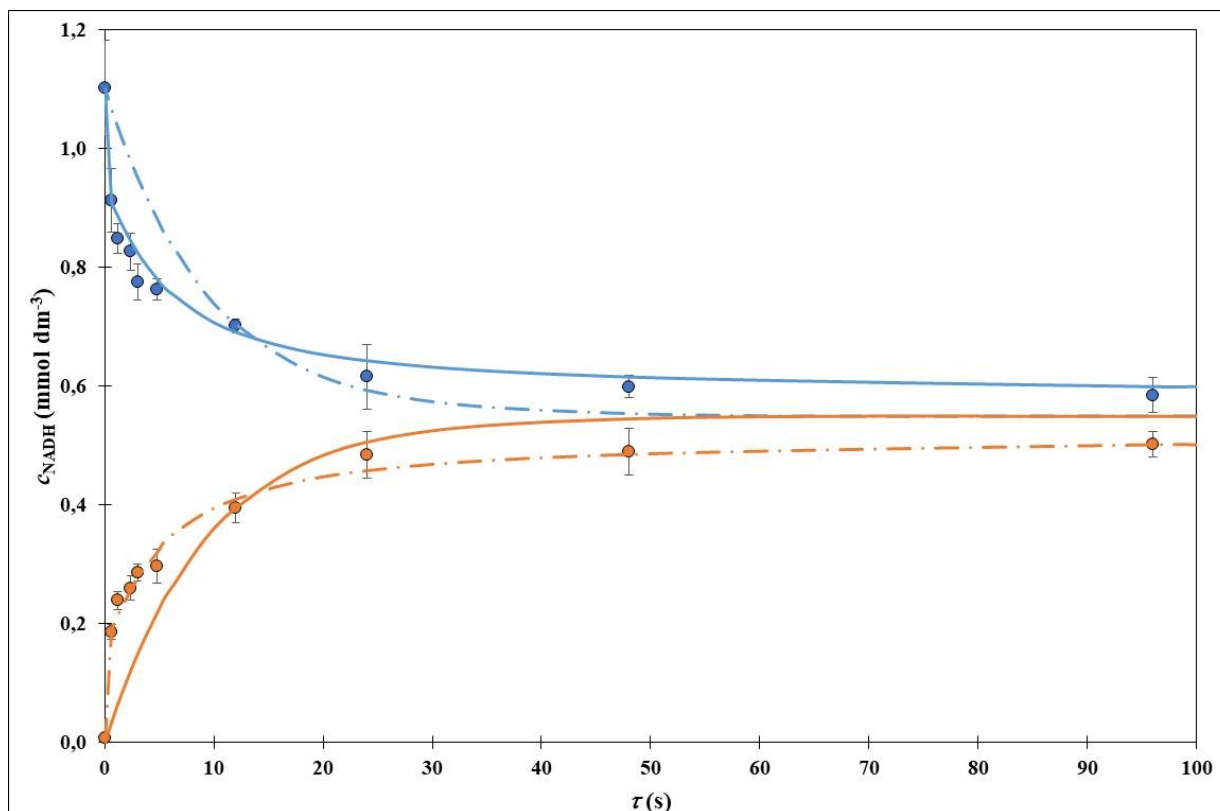
$$D_{\text{NADH/puffer}} = 8,268 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$$



**Slika 16.** Promjena koncentracije GDH po dužini i širini mikroreaktora dobivena simulacijom matematičkog modela difuzije u mikroreaktoru pri različitim vremenima zadržavanja; (a)  $\tau = 1,2$  s, (b)  $\tau = 96$  s. ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $\gamma_{\text{GDH}} = 1,1$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $D_{\text{NADH/puffer}} = 1,207 \cdot 10^{-11}$  m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>)

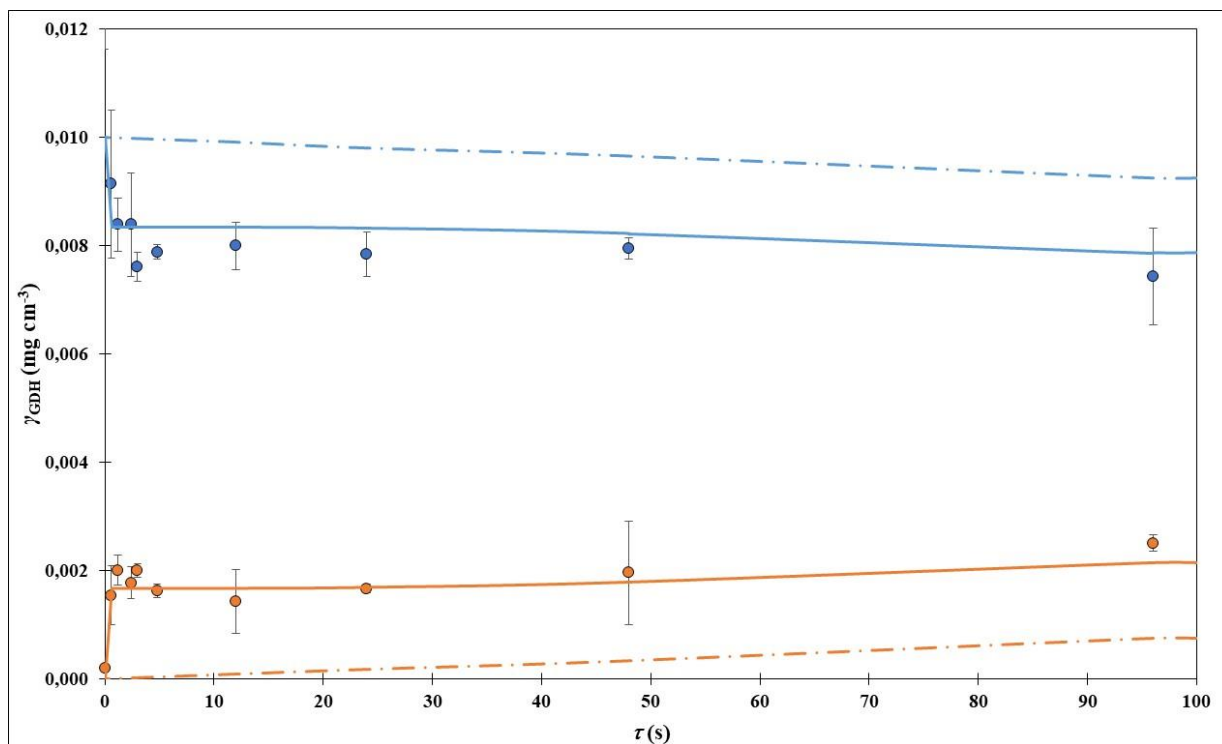


**Slika 17.** Promjena koncentracije glukoze u fazi 1 (•) i fazi 2 (•) na izlazu iz mikroreaktora za vodeni dvofazni sustav u ovisnosti o vremenu zadržavanja; usporedba rezultata eksperimenata i rezultata simulacije matematičkog modela procesa difuzije riješenog (----) metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora i (—) metodom konačnih razlika ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 5$  mmol dm<sup>-3</sup>)



**Slika 18.** Promjena koncentracije NADH u fazi 1 (•) i fazi 2 (•) na izlazu iz mikroreaktora za vodeni dvofazni sustav u ovisnosti o vremenu zadržavanja; usporedba rezultata eksperimenata i rezultata simulacije matematičkog modela procesa difuzije riješenog (----) metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora i (—) metodom konačnih razlika ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{NADH,u}} = 1,1$  mmol dm<sup>-3</sup>)





**Slika 19.** Promjena koncentracije GDH u fazi 1 (•) i fazi 2 (•) na izlazu iz mikroreaktora za vodeni dvofazni sustav u ovisnosti o vremenu zadržavanja; usporedba rezultata eksperimenata i rezultata simulacije matematičkog modela procesa difuzije riješenog (---) metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora i (—) metodom konačnih razlika ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu$ m,  $\gamma_{GDH,u} = 0,01$  mg cm<sup>-3</sup>)

**Tablica 8.** Statistički kriteriji za analizu primjenjivosti metode simulacije matematičkog modela difuzije mikroreaktoru (HCR-homogeni cijevni reaktor, DPCR-dva paralelna cijevna reaktora, MKR-metoda konačnih razlika)

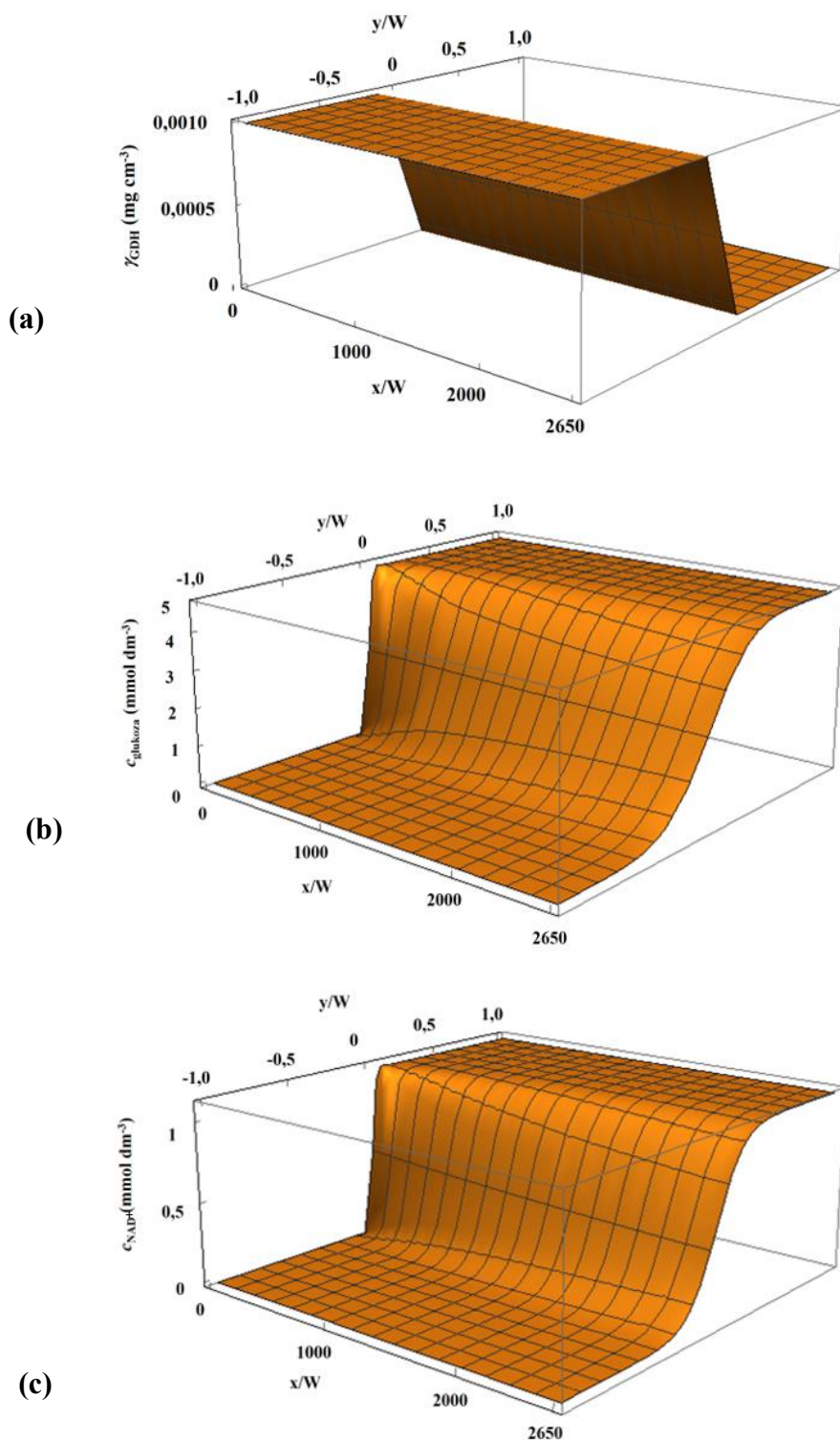
Varijabla	Faza	Metoda	$R^2$	$R^2_{adj}$	RMSE
glukoza	Faza 1	DPCR	0,1240	0,0266	0,0021
		MKR	0,7326	0,6801	0,0020
	Faza 2	DPCR	0,3051	0,2279	0,0016
		MKR	0,7919	0,7193	0,0007
NADH	Faza 1	DPCR	0,8461	0,8290	0,1135
		MKR	0,8626	0,8429	0,2642
	Faza 2	DPCR	0,8872	0,8746	0,1013
		MKR	0,8321	0,8081	0,2593
glukoza dehidrogenaza	Faza 1	DPCR	0,1240	0,0266	0,0021
		MKR	0,6326	0,5801	0,0020
	Faza 2	DPCR	0,3051	0,2279	0,0016
		MKR	0,4919	0,4193	0,0007

### 4.3. Biotransformacija glukoze sa suspendiranim enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru

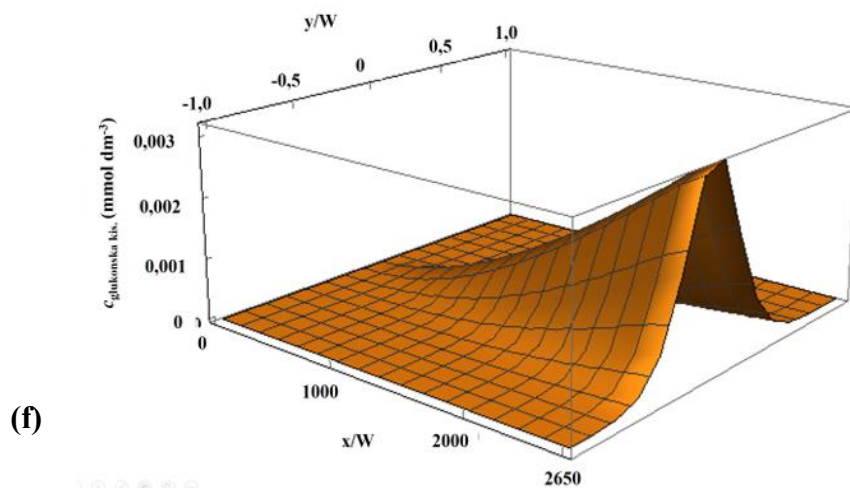
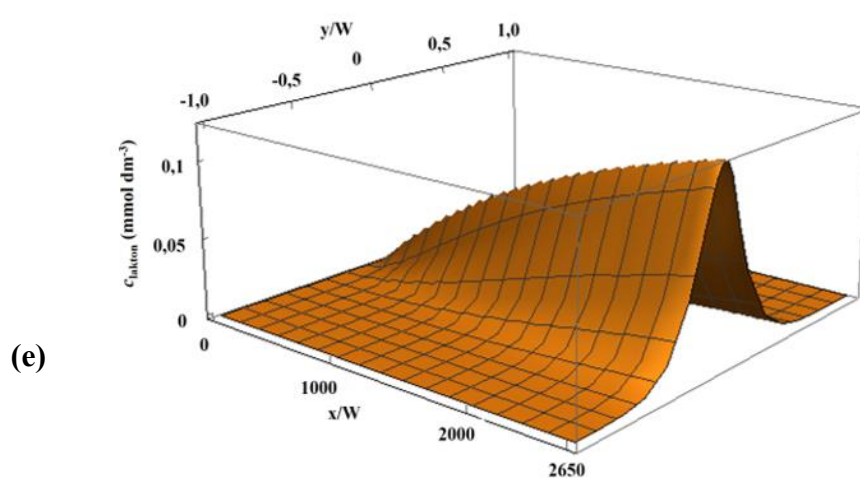
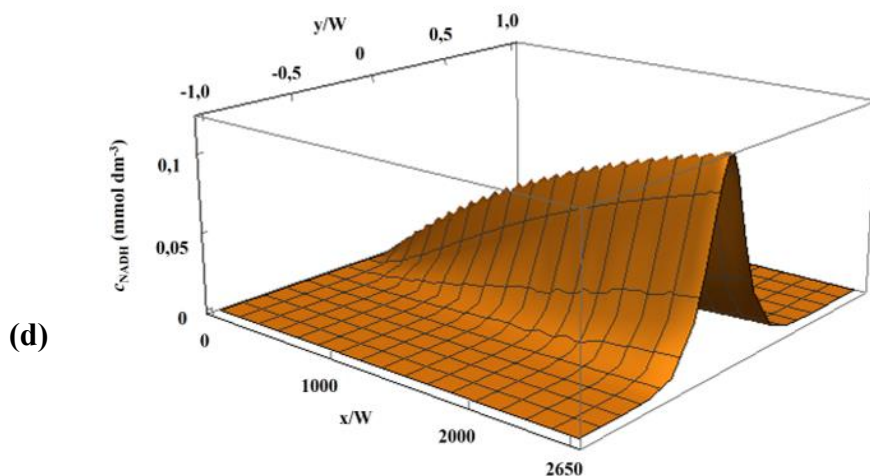
Ocjena valjanosti matematičkog modela procesa biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom porijeklom iz *Pseudomonas spp.* (jednadžbe 22-27) u staklenom mikroreaktoru volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$ . Ukupno je provedeno pet pokusa primjenom različitih ulaznih koncentracija glukoze i koenzima  $\text{NAD}^+$  ( $c_{\text{glukoza, u}} = 4,7 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 1,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{glukoza, u}} = 9,4 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{glukoza, u}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{glukoza, u}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{glukoza, u}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). U svim pokusima praćen je utjecaj vremena zadržavanja na promjenu koncentracije glukoze i NADH.

#### 4.3.1. Simulacija modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru

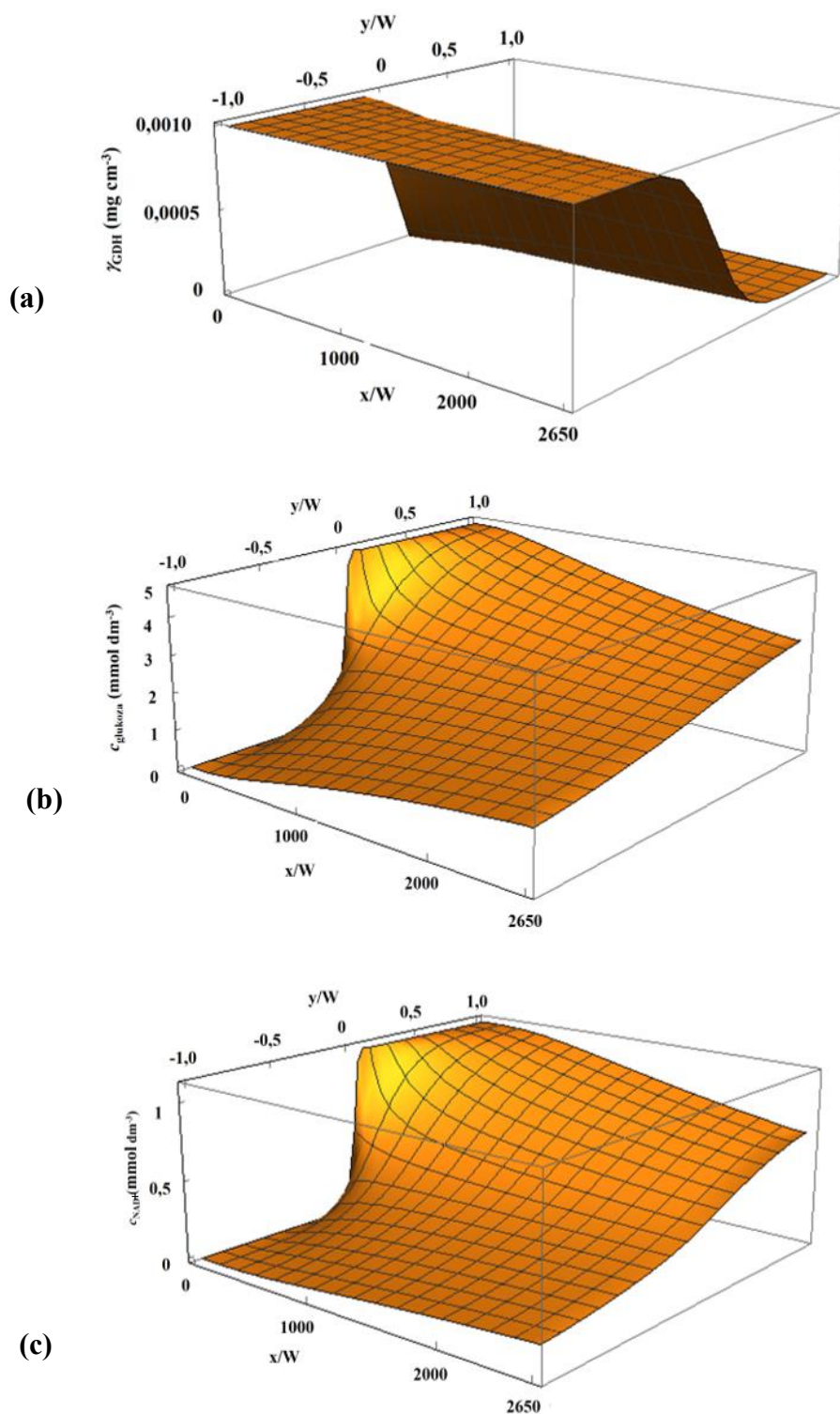
Simulacije matematičkog modela procesa biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom porijeklom iz *Pseudomonas spp.* provedene su kod različitih vremena zadržavanja na primjeru promjene koncentracija glukoza dehidrogenaze, glukoze,  $\text{NAD}^+$ , NADH, glukonolaktona i glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora za ulaznu koncentraciju za svih pet prethodno nabrojanih ulaznih koncentracija glukoze i koenzima  $\text{NAD}^+$ . Rezultati su prikazani na slikama 20-29.



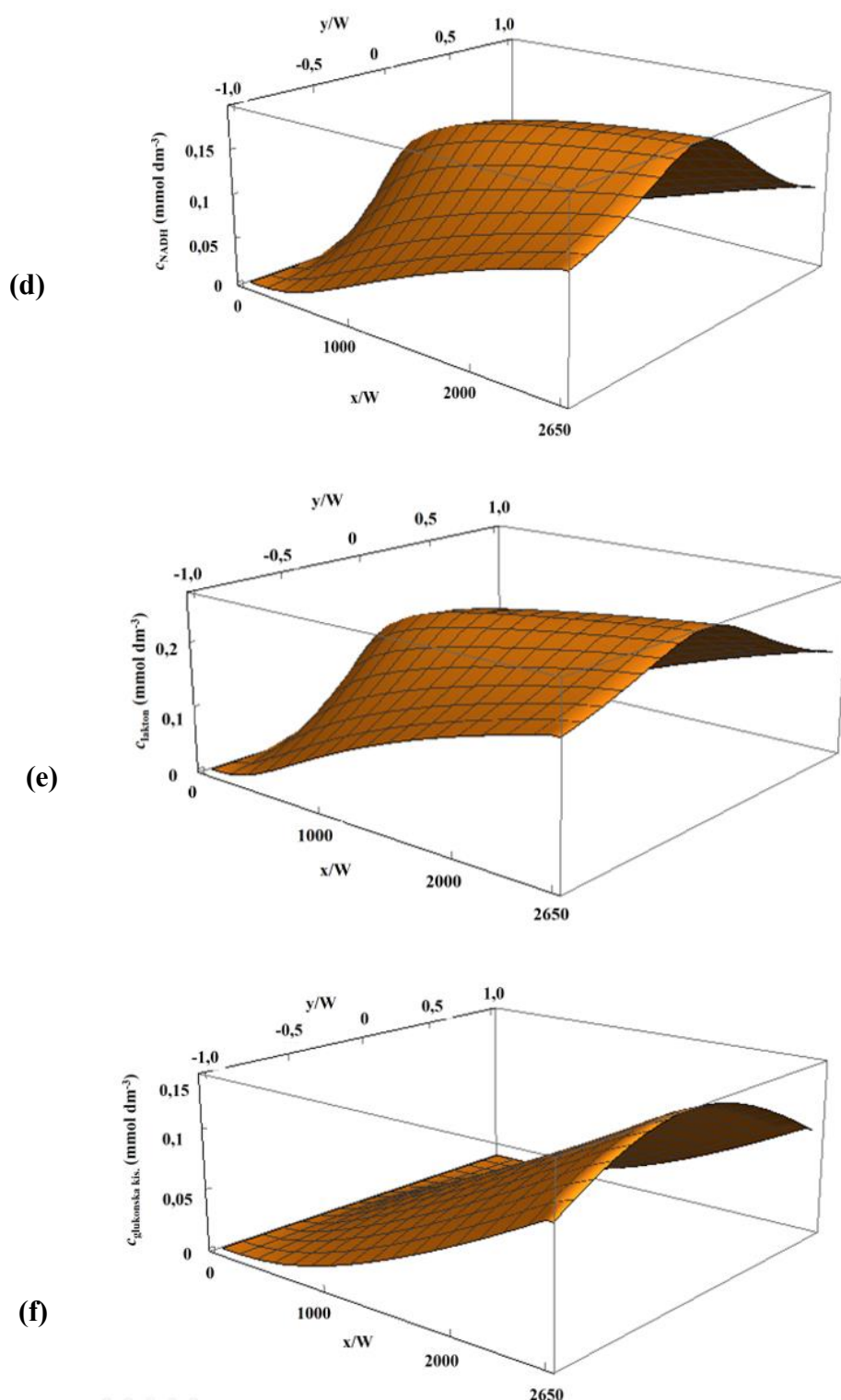
**Slika 20.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 4,7$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 1,1$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$  mg  $\text{cm}^{-3}$ )



**Slika 20.**(*nastavak*) Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 4,7$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 1,1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )

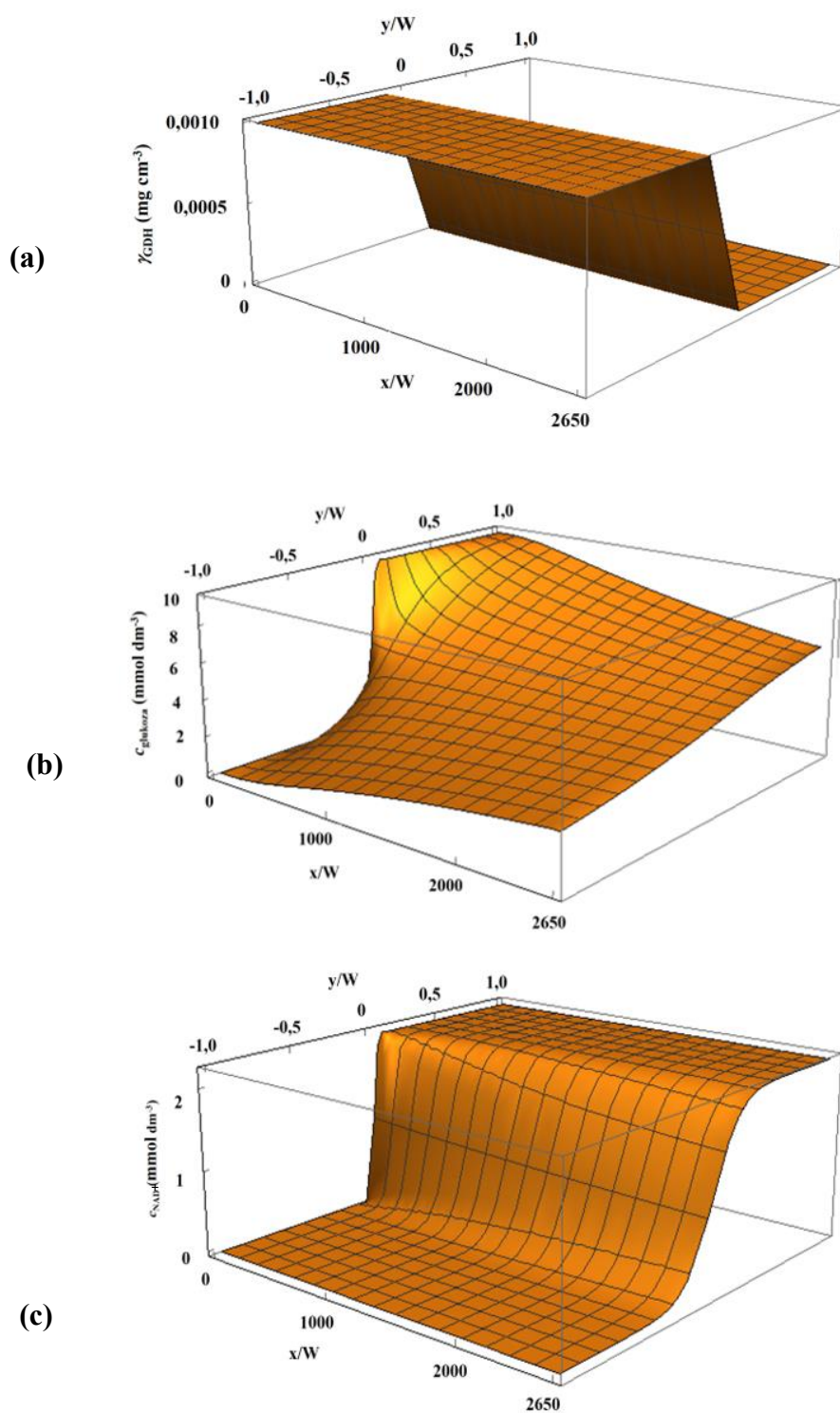


**Slika 21.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 4,7$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 1,1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )



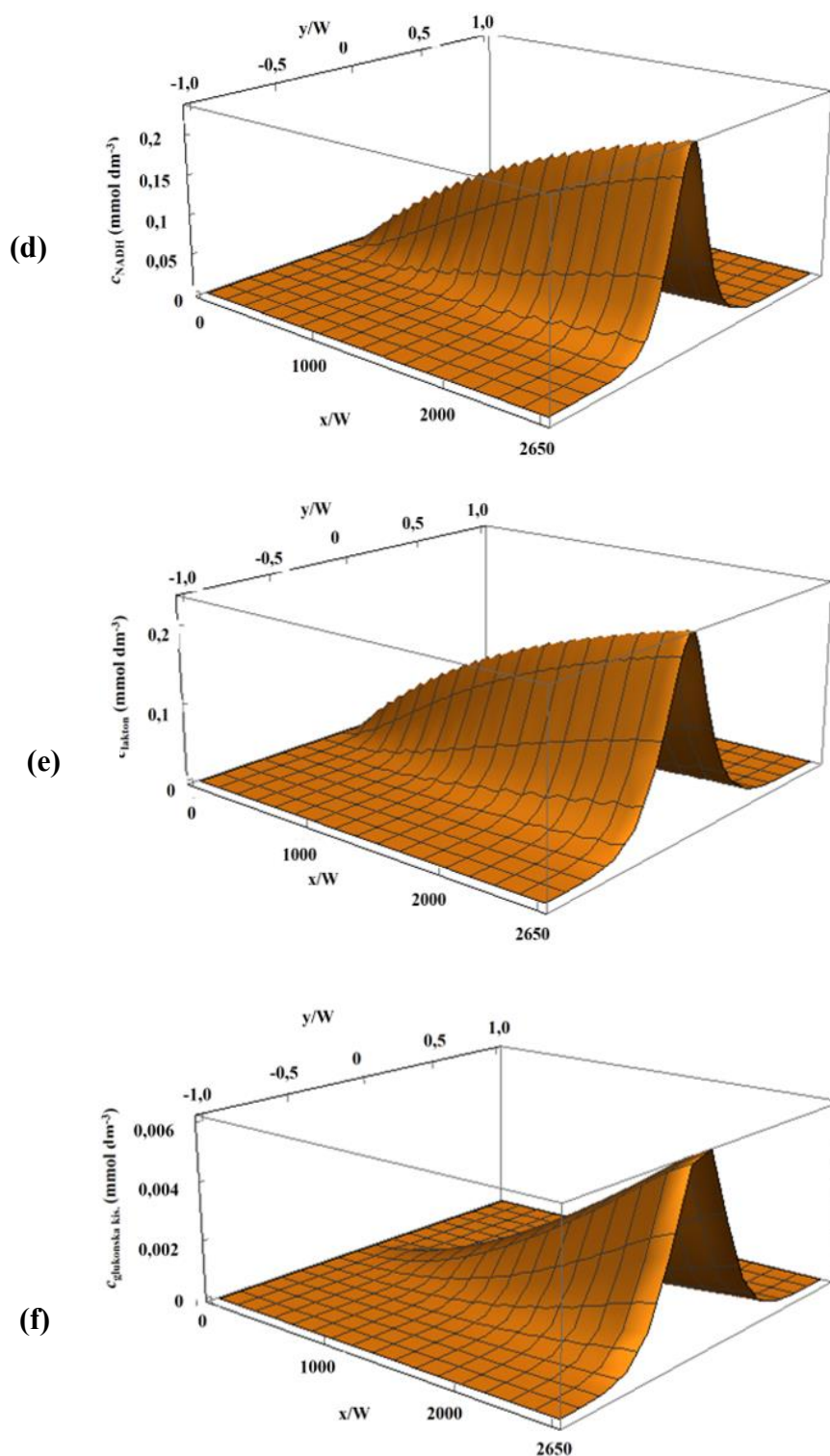
**Slika 21.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktone i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 4,7$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 1,1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )



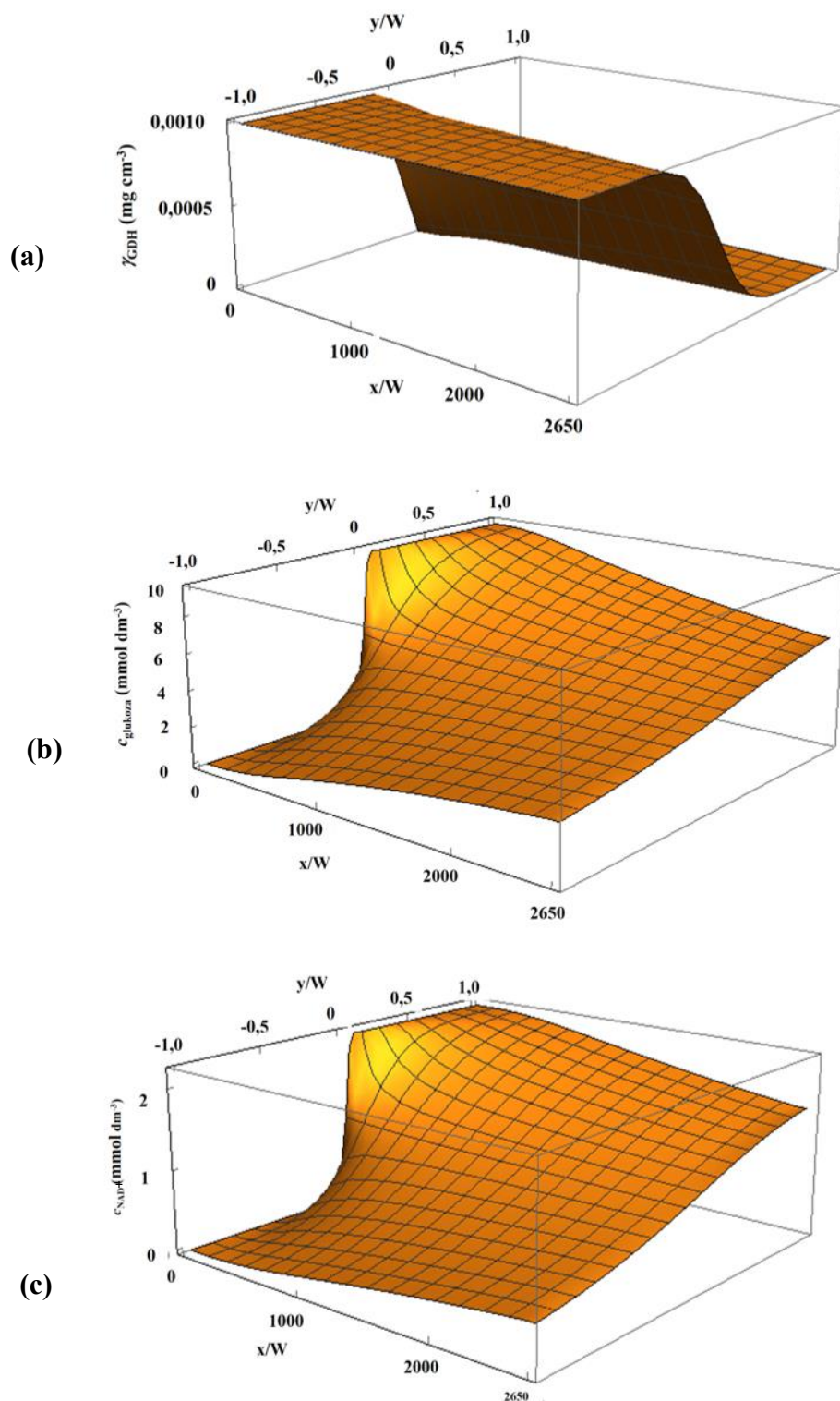


**Slika 22.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $C_{\text{glukoza,u}} = 9,4$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $C_{\text{NAD}^+,u} = 2,2$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )

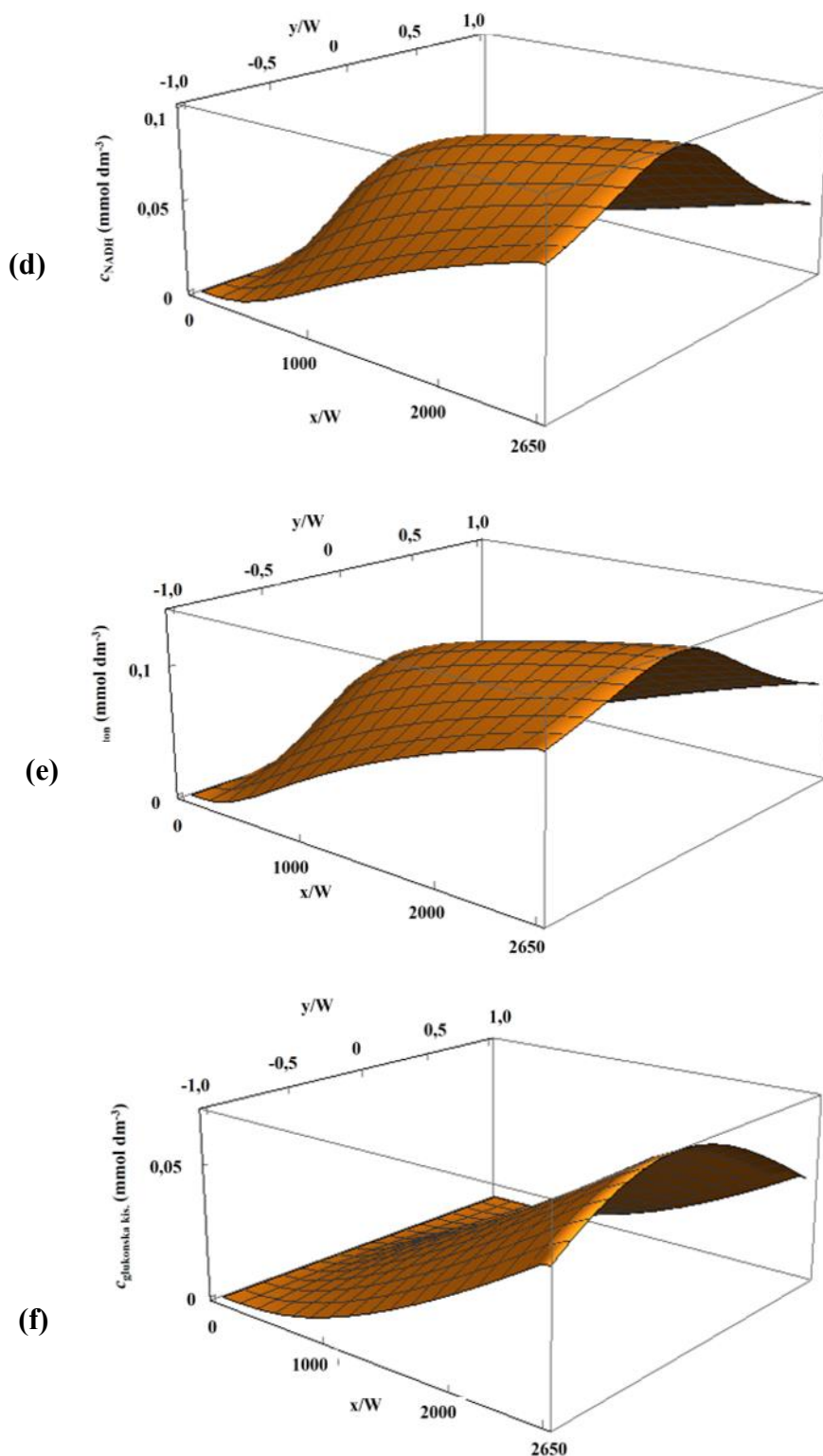




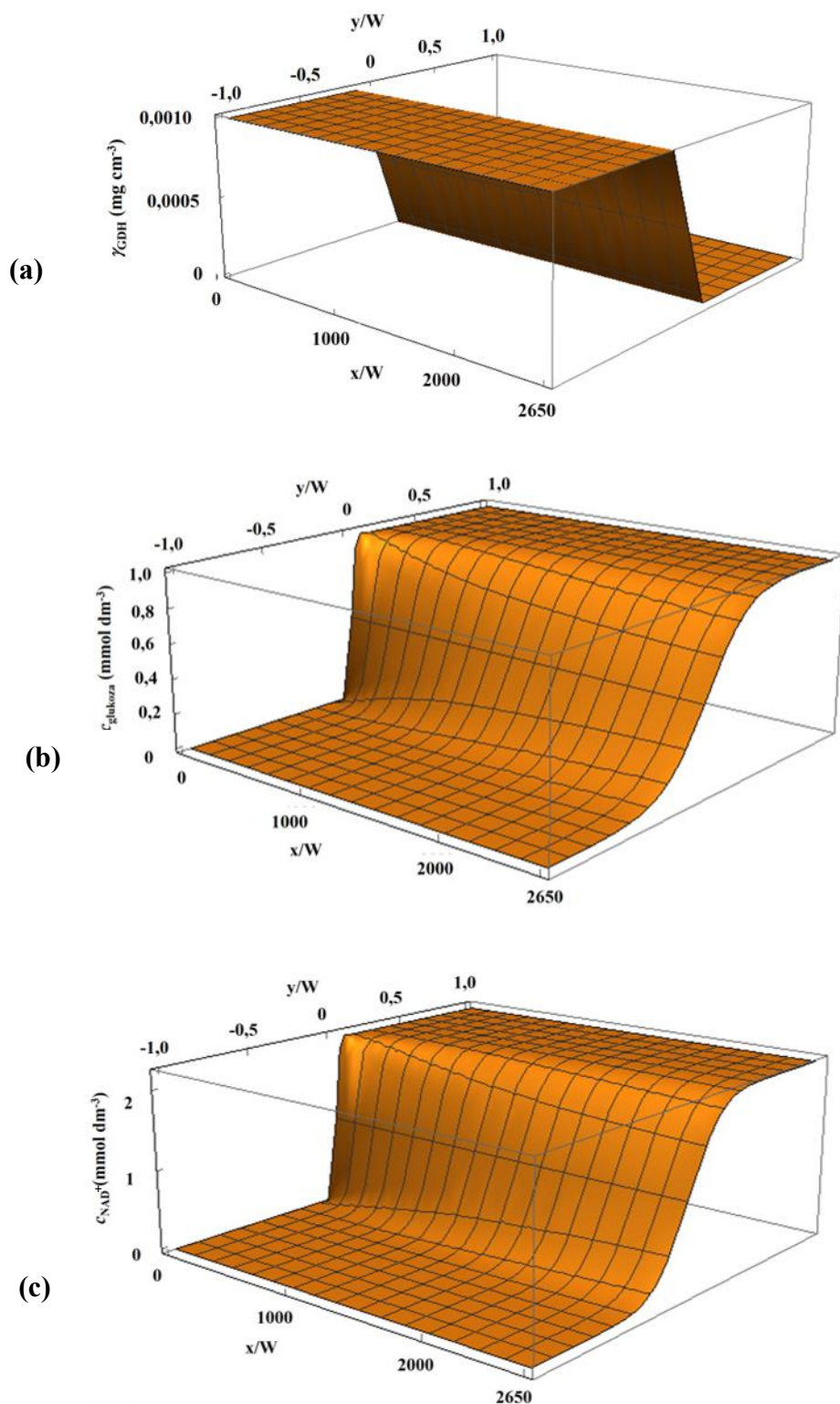
**Slika 22.** (nastavak) Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 9,4$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 2,2$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )



**Slika 23.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d) NADH, (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24 \text{ s}$  ( $L = 332 \text{ mm}$ ,  $W = 250 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 9,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001 \text{ mg cm}^{-3}$ )

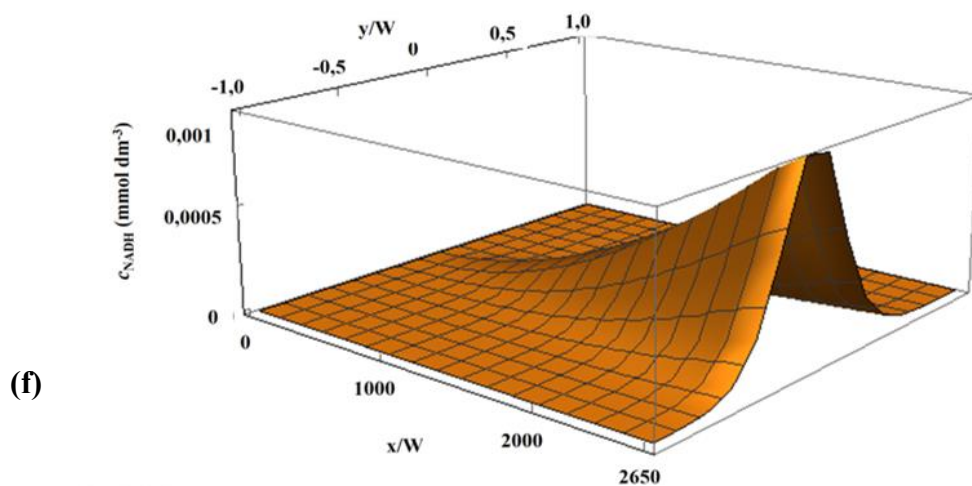
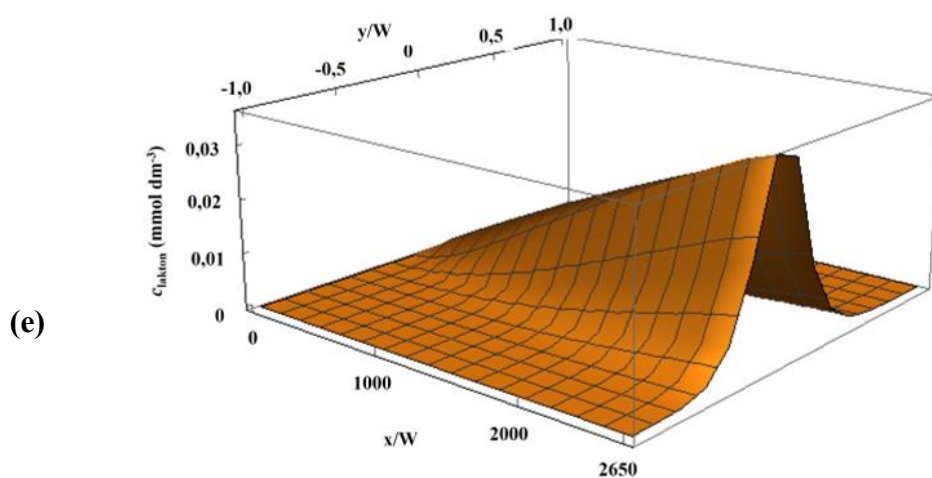
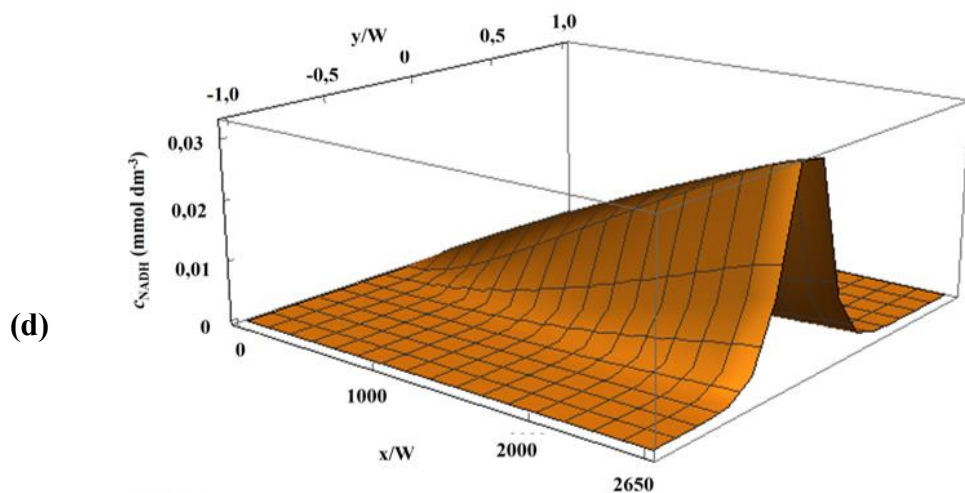


**Slika 23.** (nastavak) Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 9,4$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 2,2$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$  mg cm<sup>-3</sup>)

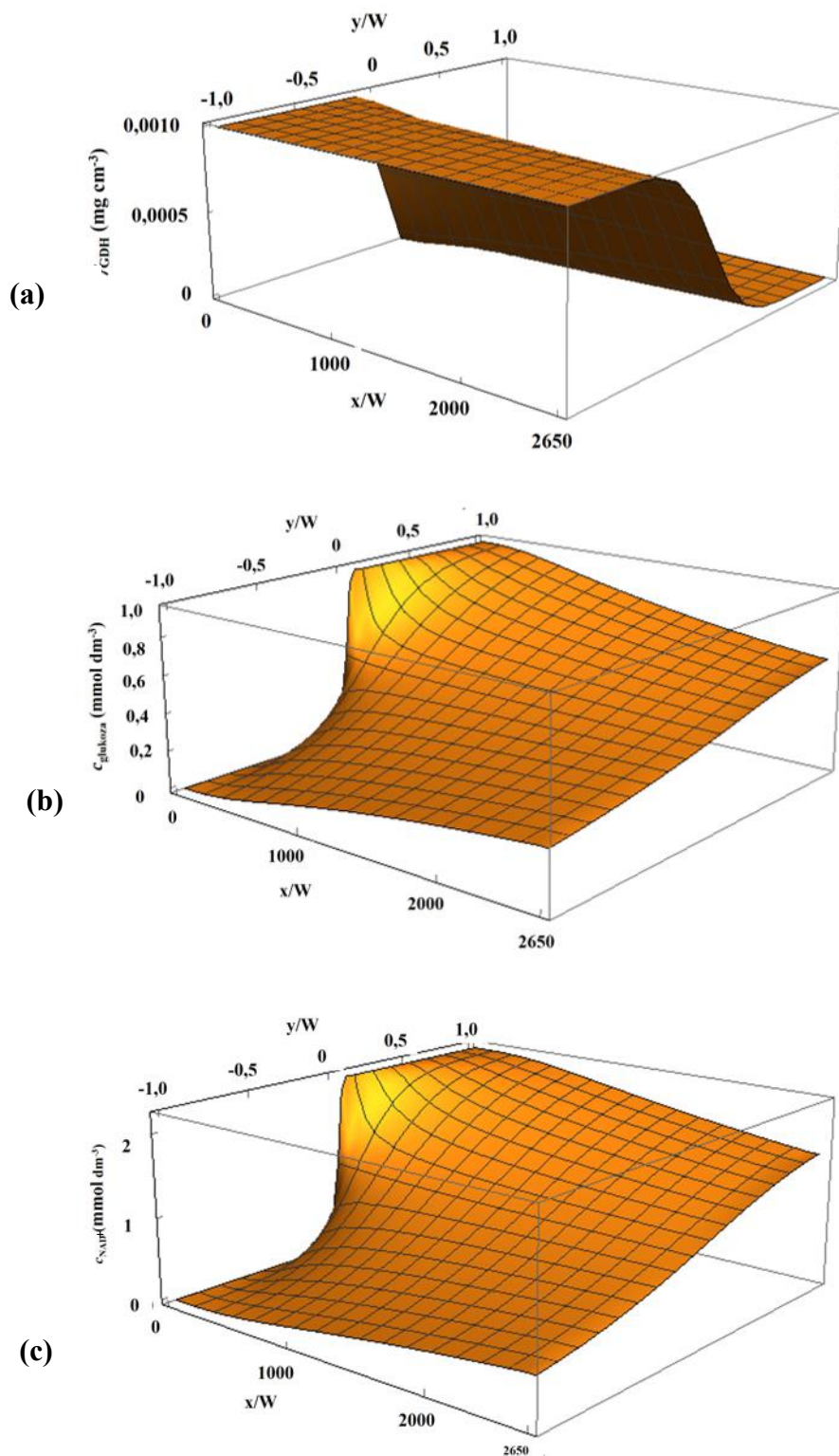


**Slika 24.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 2,2$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$  mg  $\text{cm}^{-3}$ )

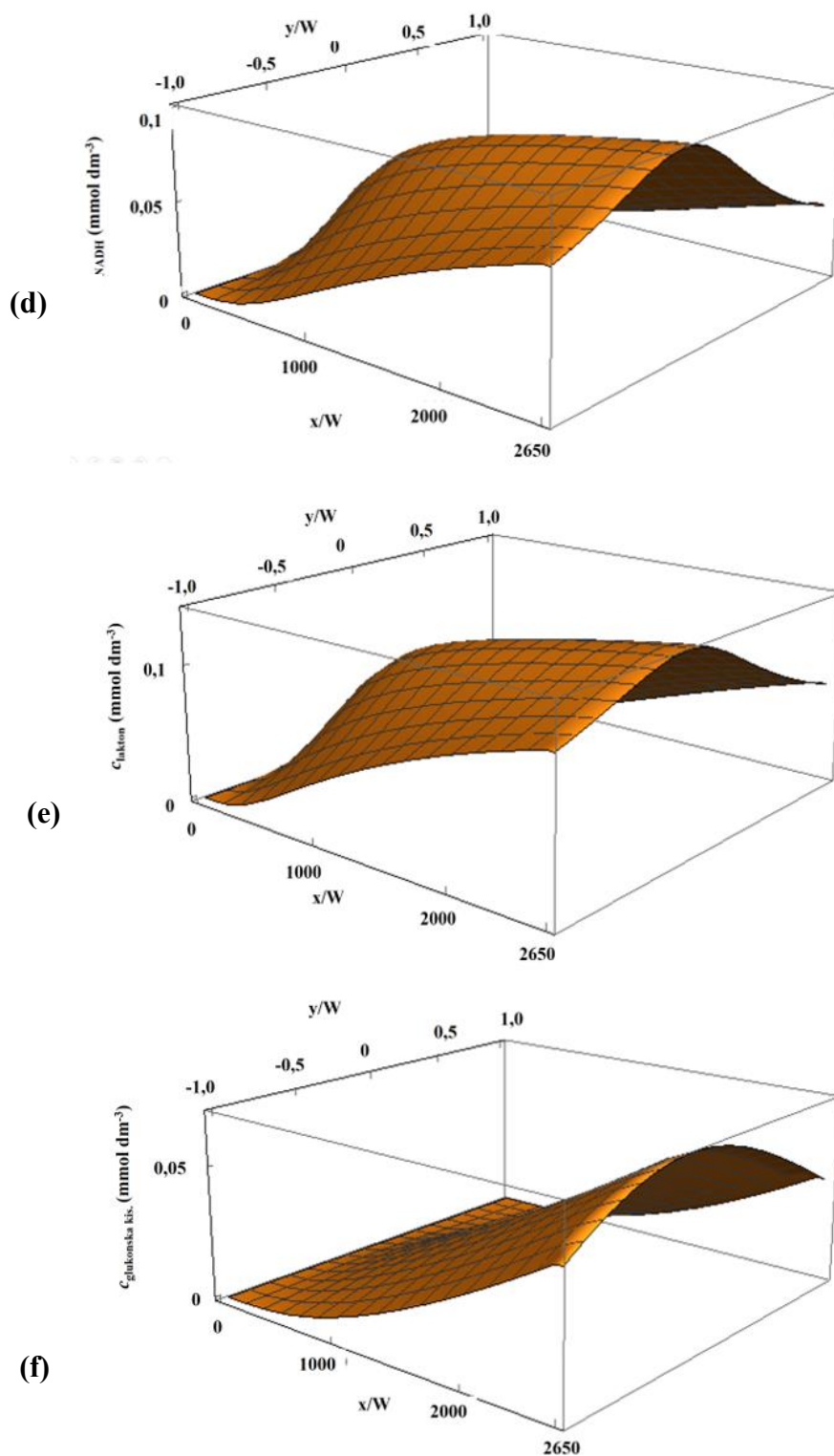




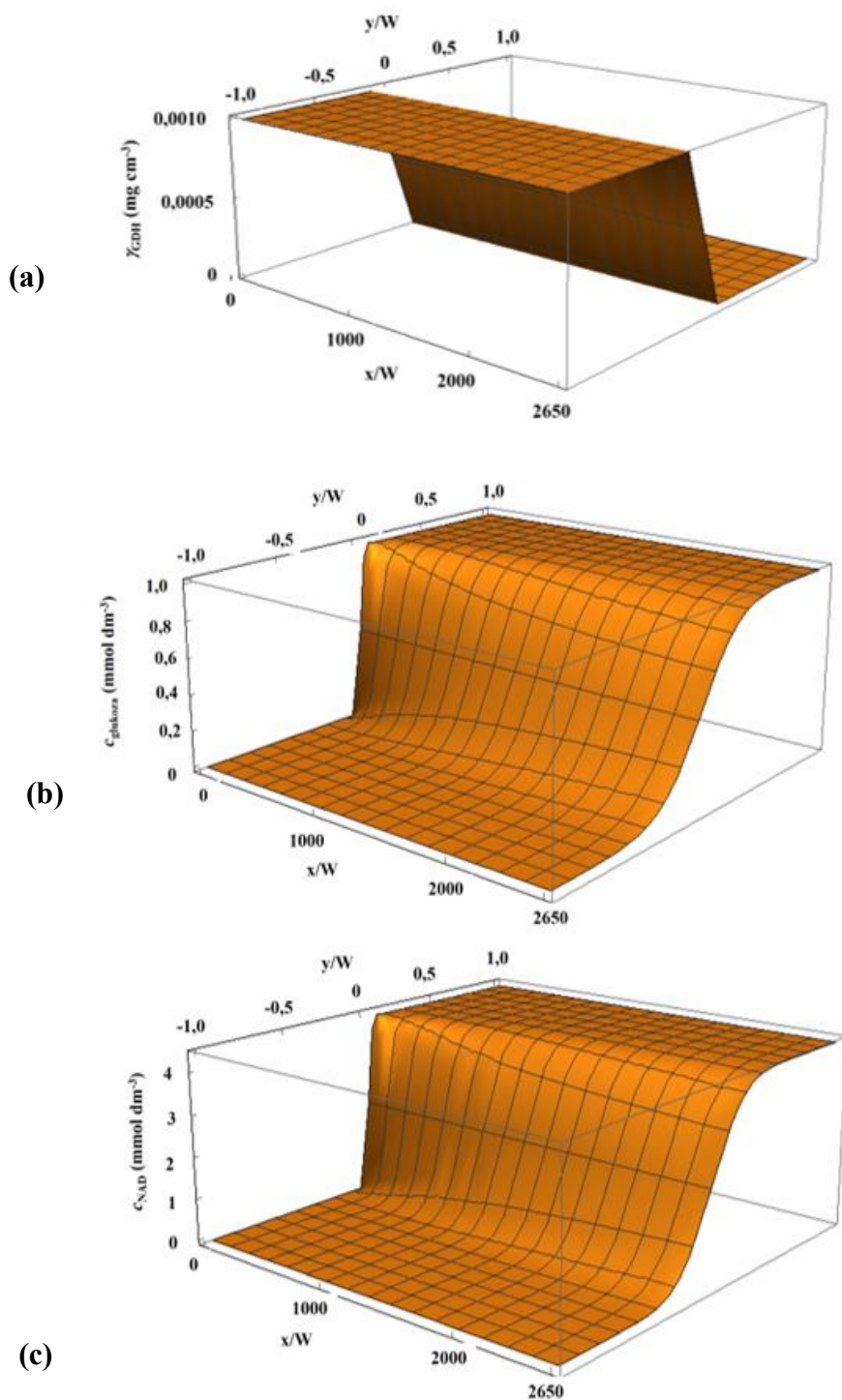
**Slika 24.** (nastavak) Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 2,2$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )



**Slika 25.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d) NADH, (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24$  s. ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 2,2$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$  mg  $\text{cm}^{-3}$ )

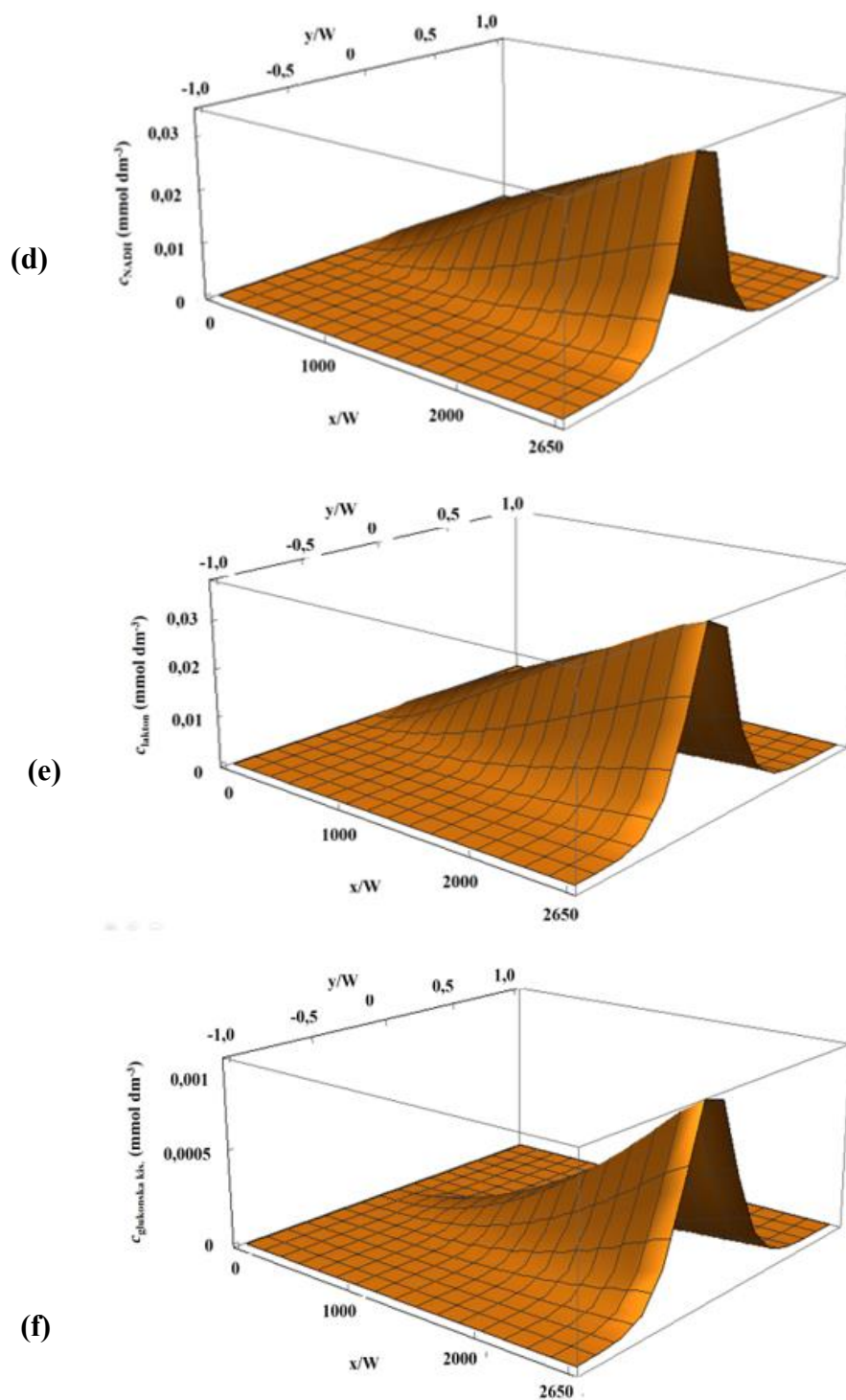


**Slika 25.** (nastavak) Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d) NADH, (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24$  s. ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 2,2$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )

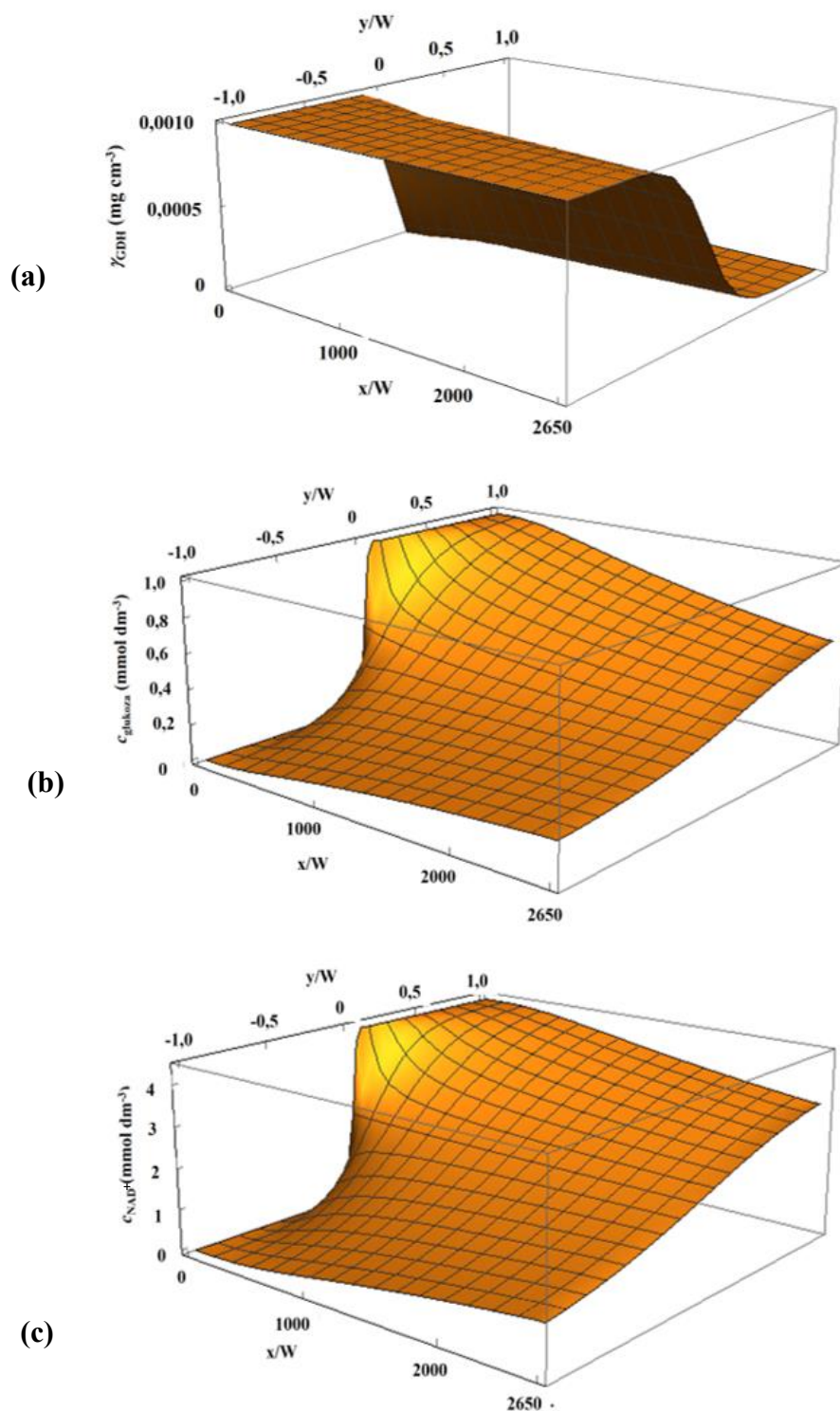


**Slika 26.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )

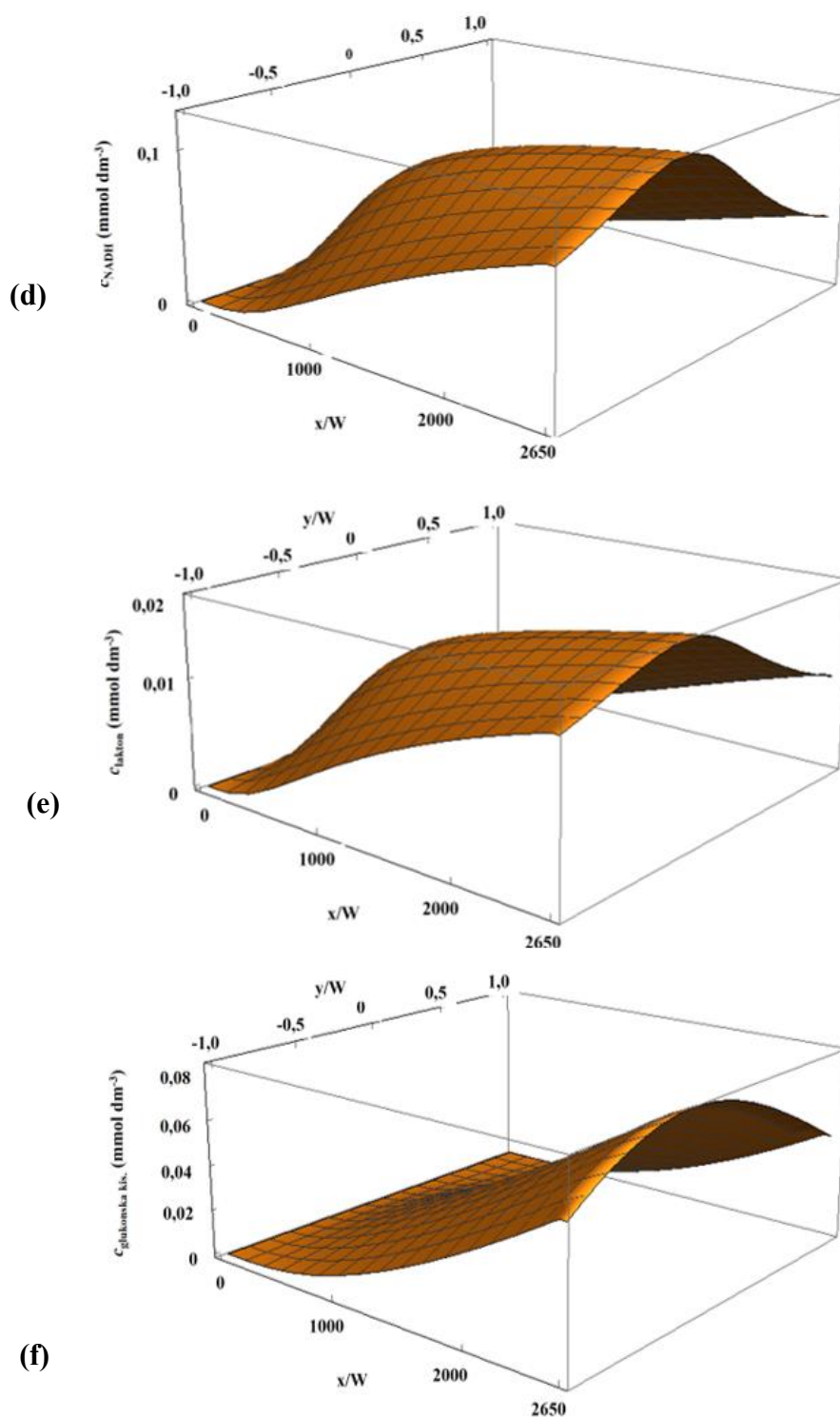




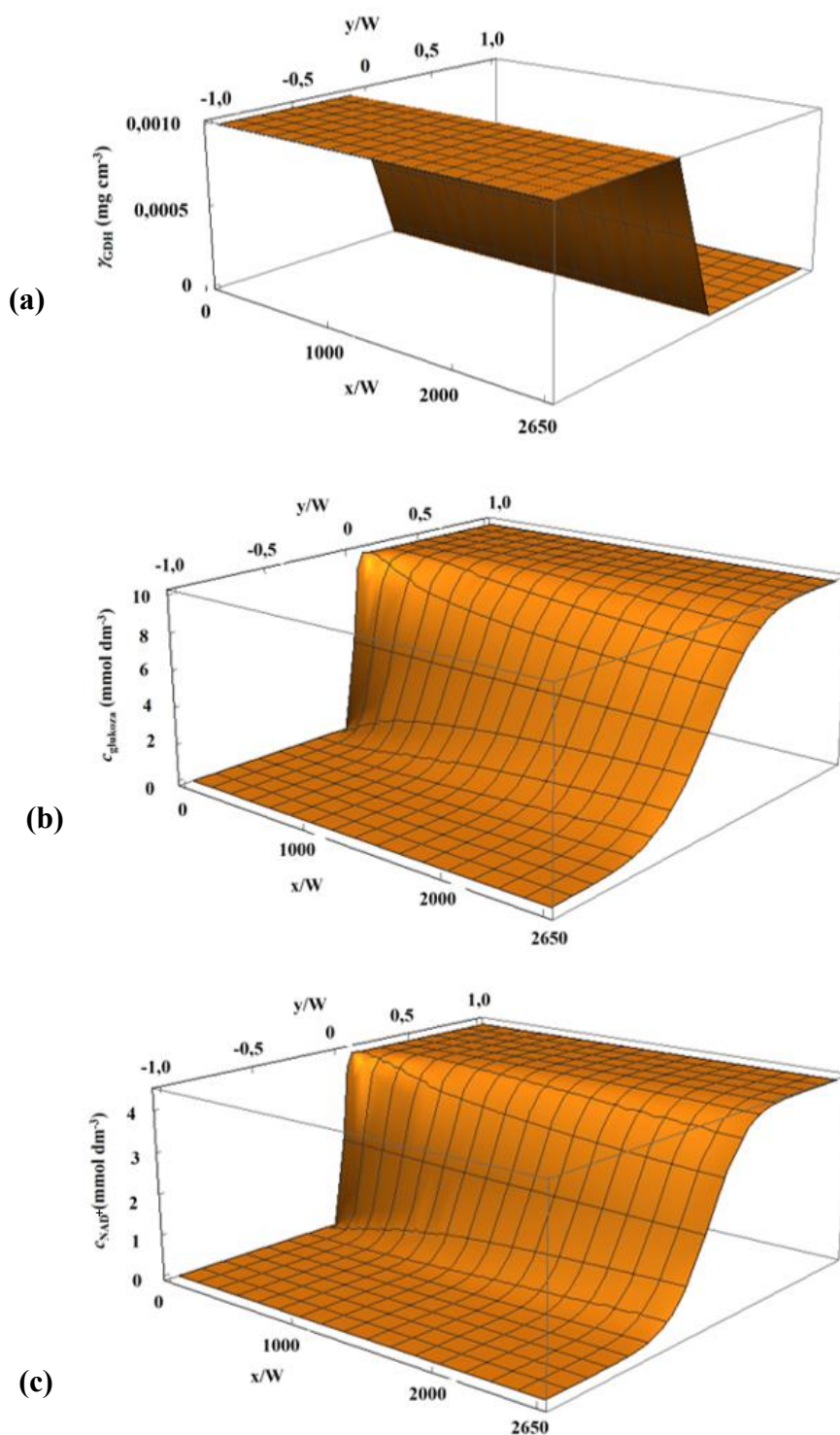
**Slika 26.** (nastavak) Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )



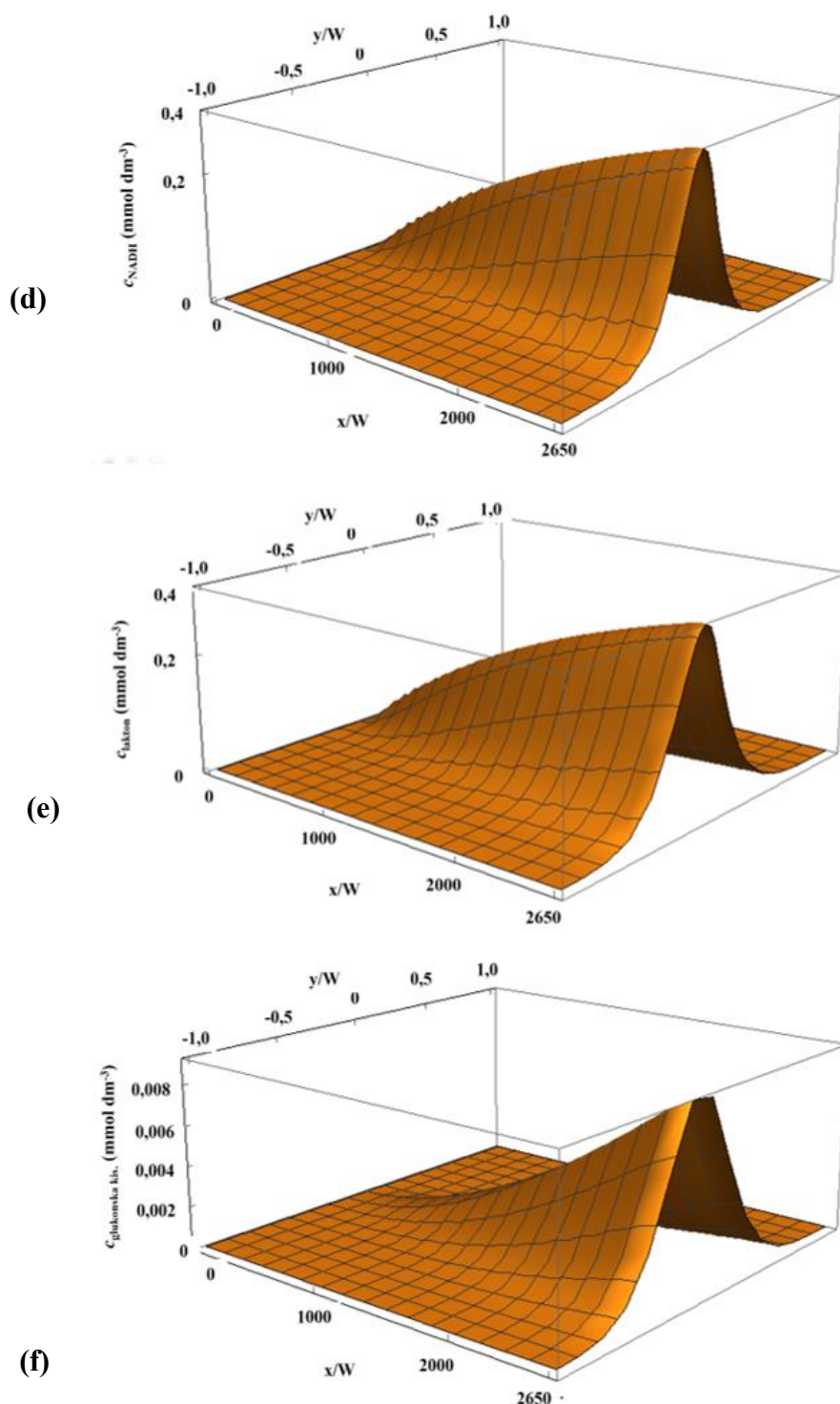
**Slika 27.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )



**Slika 27.** (nastavak) Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d) NADH, (e) glukonolaktone i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )

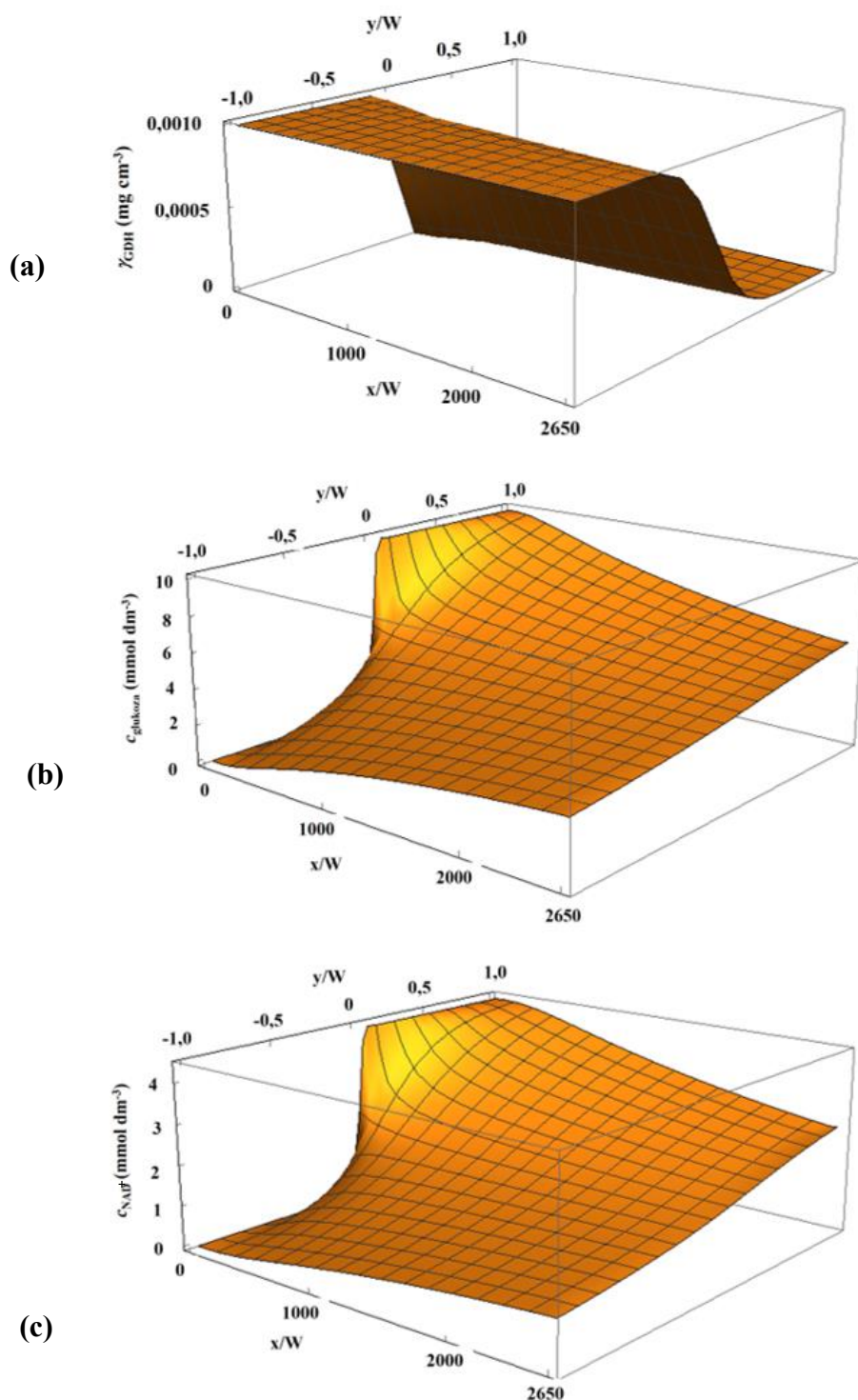


**Slika 28.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 10$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )

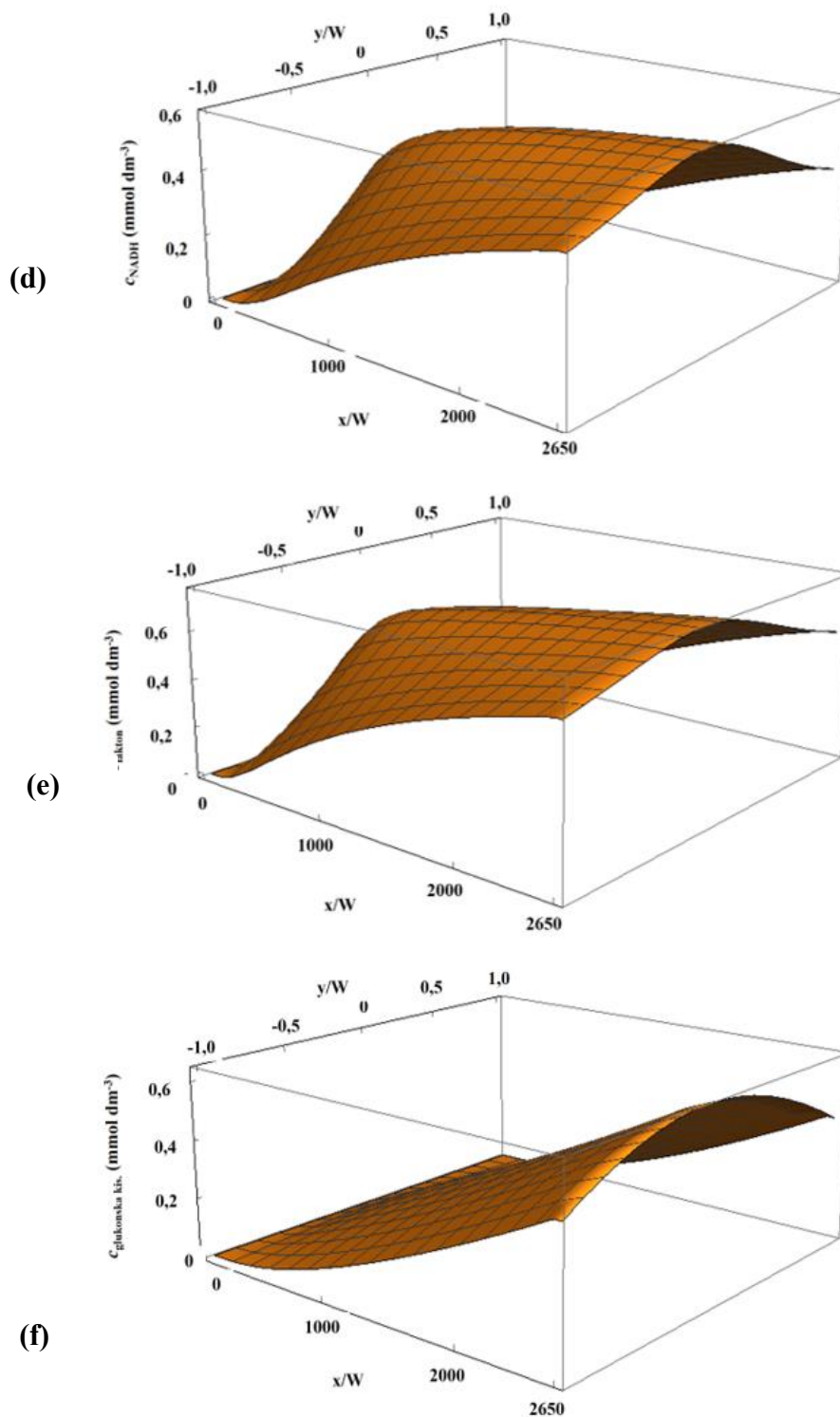


**Slika 28.**(*nastavak*) Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d)  $\text{NADH}$ , (e) glukonolaktone i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 10$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )





**Slika 29.** Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d) NADH, (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 10$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$  mmol  $\text{dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$  mg  $\text{cm}^{-3}$ )

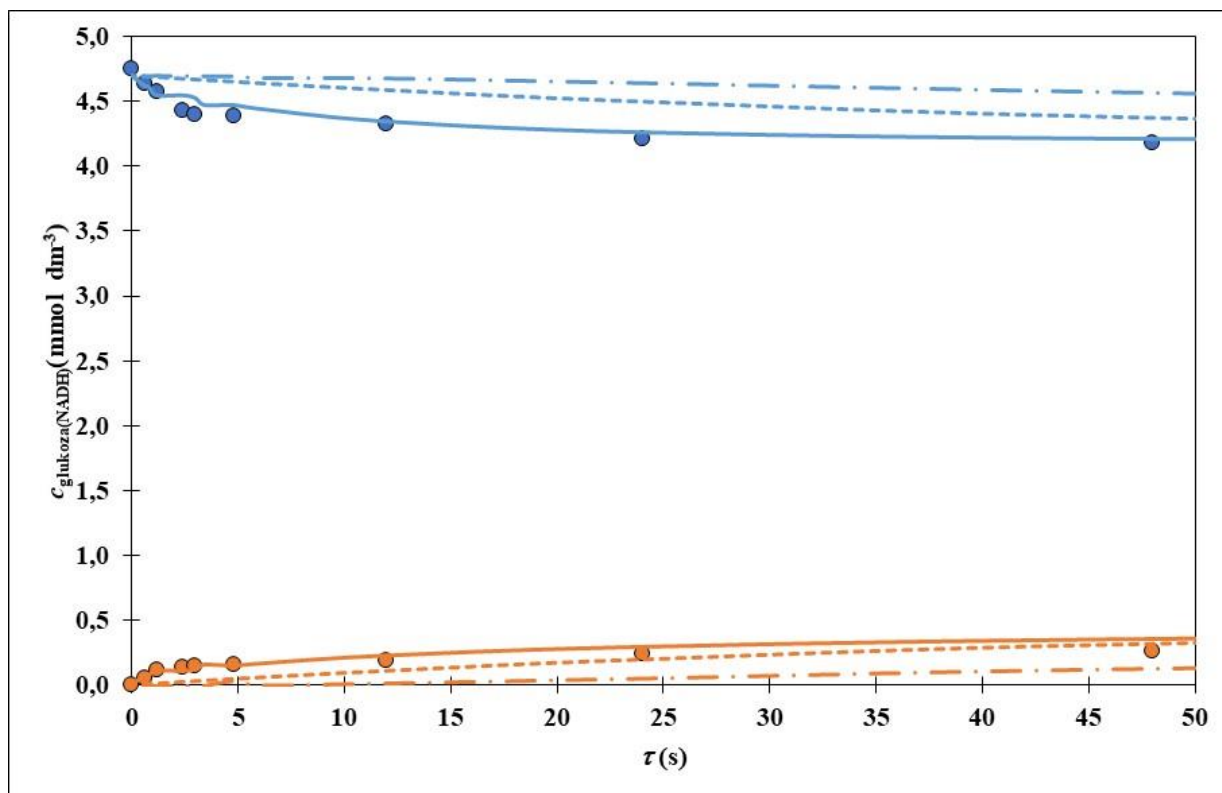


**Slika 29.** (nastavak) Promjene koncentracija (a) glukoza dehidrogenaze, (b) glukoze (c)  $\text{NAD}^+$ , (d) NADH, (e) glukonolaktona i (f) glukonske kiseline po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenu zadržavanja  $\tau = 24$  s ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 10$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$   $\text{mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$   $\text{mg cm}^{-3}$ )

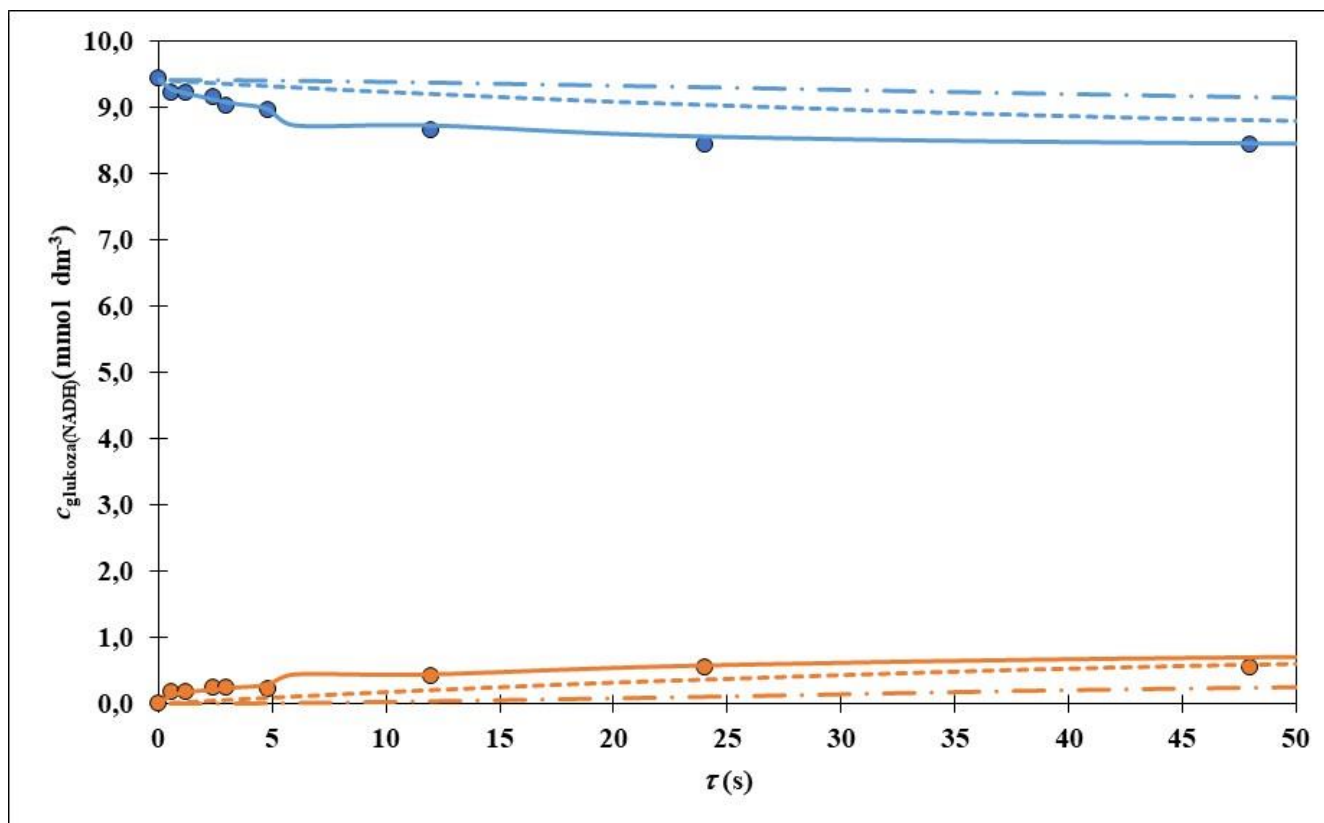
#### 4.3.2. Ocjena valjanosti matematičkog modela procesa biotransformacije glukoze sa suspendiranom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru

Usporedba promjene koncentracije glukoze i NADH o vremenu zadržavanja u mikroreaktoru dobivene eksperimentalno simulacijom matematičkog modela procesa s tri metode: (i) metoda homogenog cijevnog reaktora, (ii) metoda dva idealna paralelna cijevna reaktora i (iii) metoda konačnih razlika prikazana je na slikama 30 - 34. Usporedba statističkih kriterija primjenjivosti predloženih metoda simulacije matematičkog modela procesa biotransformacije glukoze sa suspendiranom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru prikazana je u tablici 9.

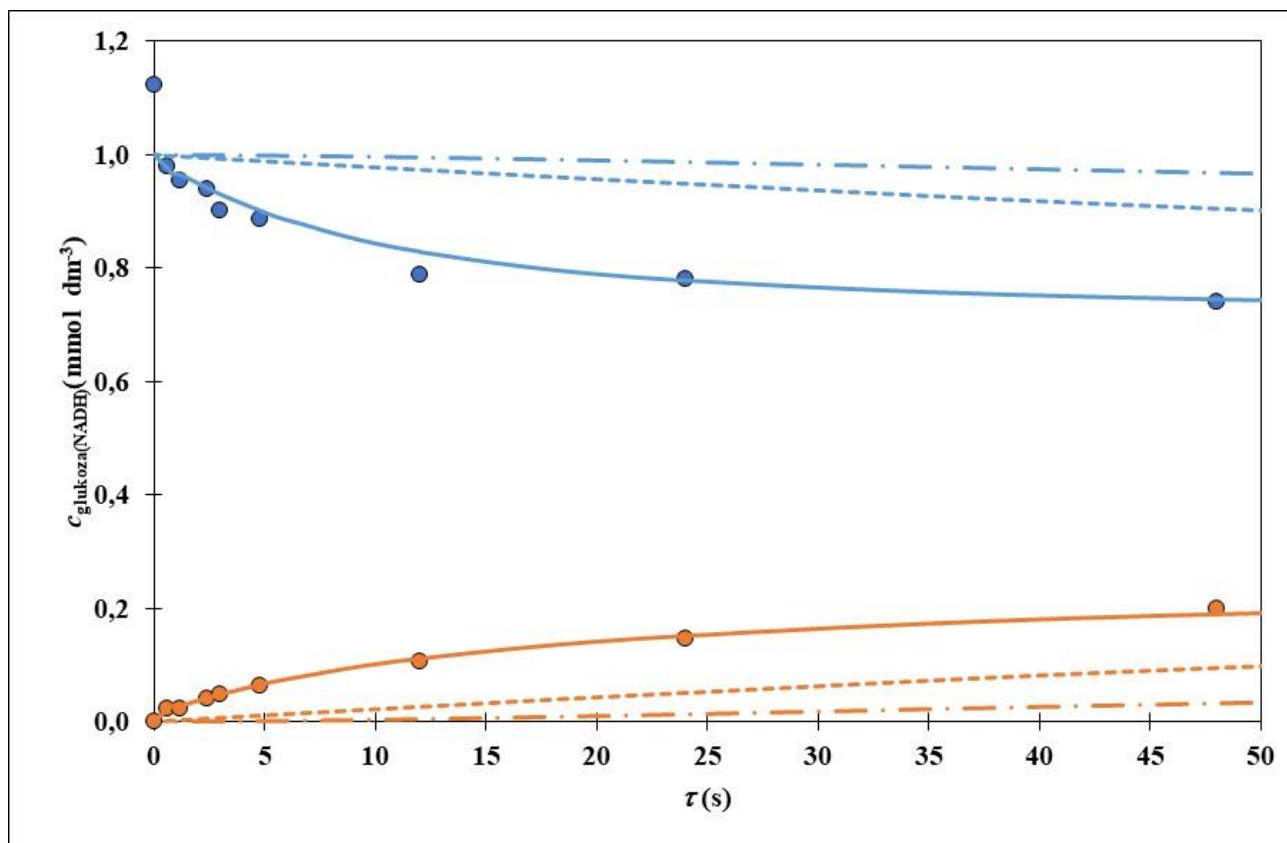




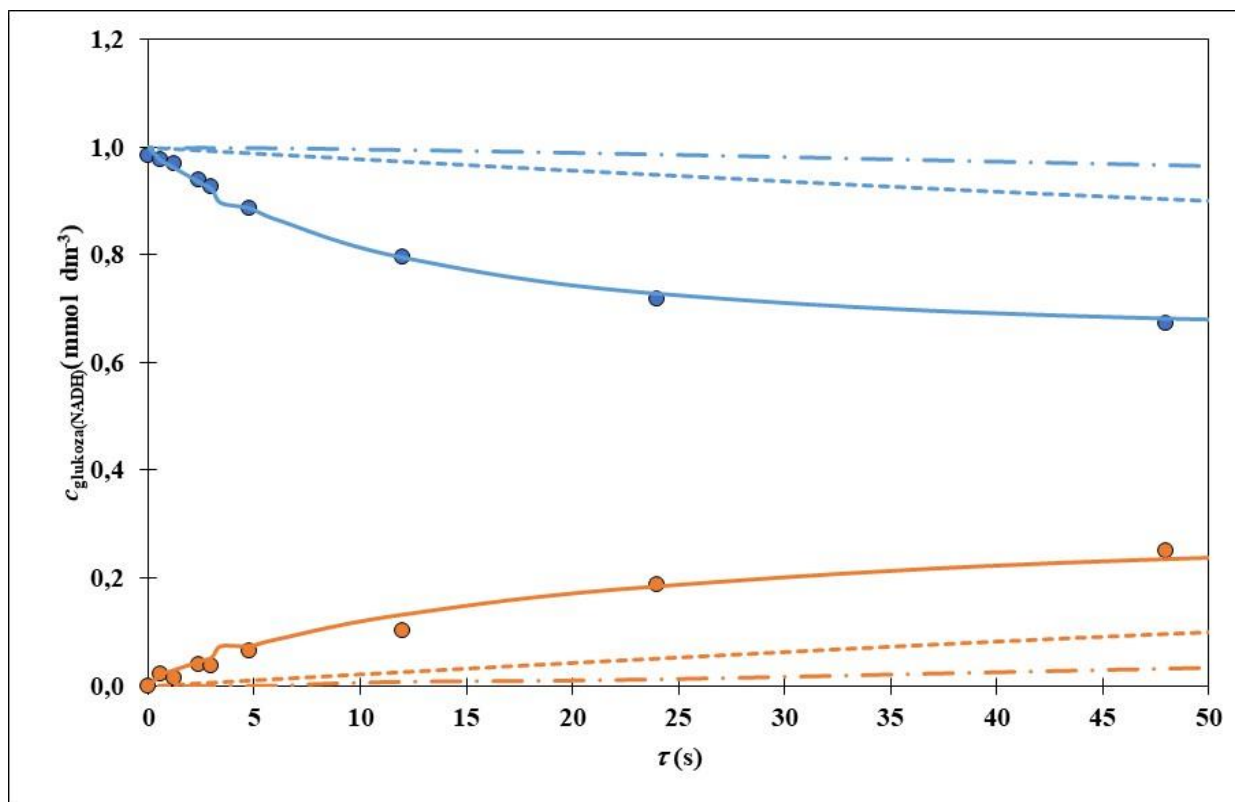
**Slika 30.** Usporedba promjene koncentracije (●) glukoze i (●) NADH o vremenu zadržavanja u mikroreaktoru dobivene eksperimentalno i simulacijom matematičkog modela procesa (---) metodom homogenog cijevnog reaktora, (---) metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora i (—) metodom konačnih razlika ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu$ m,  $c_{\text{glukoza,u}} = 4,7$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 1,1$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$  mg cm<sup>-3</sup>, pH = 7;  $T = 40$  °C)



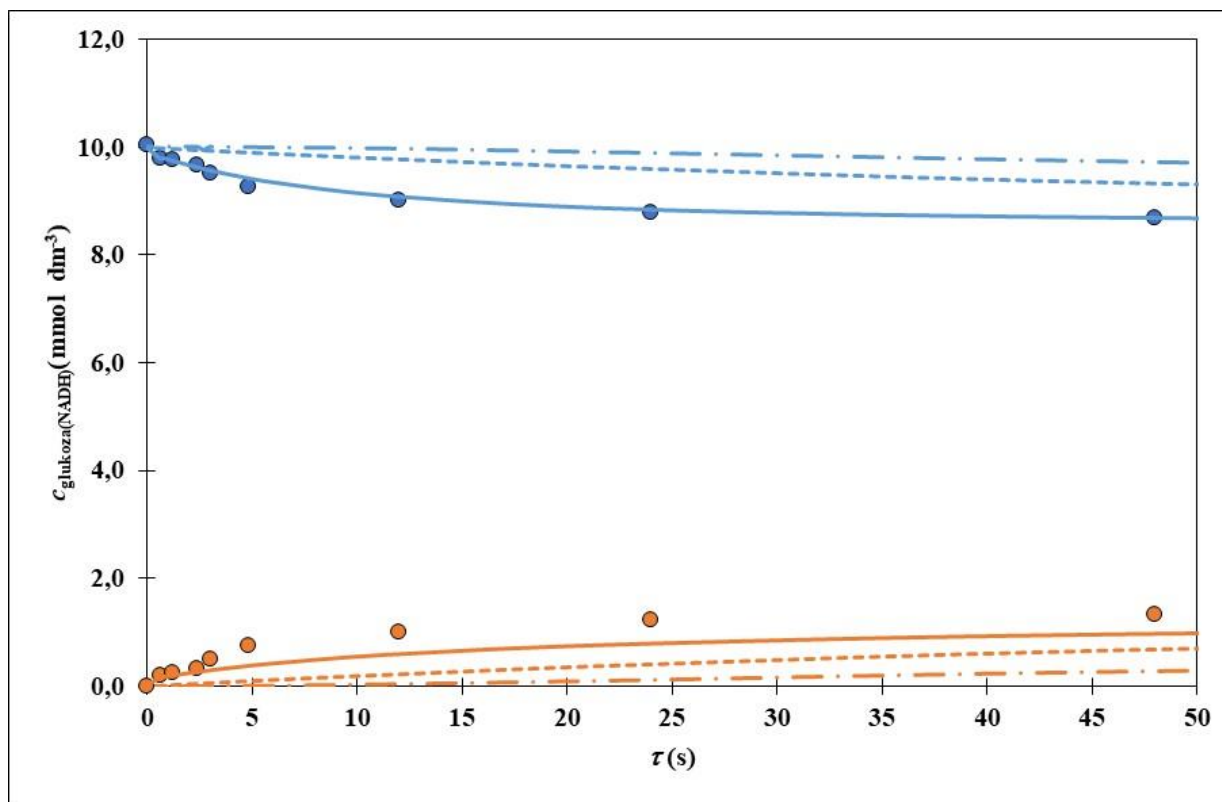
**Slika 31.** Usporedba promjene koncentracije (●) glukoze i (●) NADH o vremenu zadržavanja u mikroreaktoru dobivene eksperimentalno i simulacijom matematičkog modela procesa (---) metodom homogenog cijevnog reaktora, (-·-·-) metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora i (—) metodom konačnih razlika ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu$ m,  $c_{\text{glukoza,u}} = 9,4$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 2,2$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$  mg cm<sup>-3</sup>, pH = 7;  $T = 40$  °C)



**Slika 32.** Usporedba promjene koncentracije (●) glukoze i (●) NADH o vremenu zadržavanja u mikroreaktoru dobivene eksperimentalno i simulacijom matematičkog modela procesa (---) metodom homogenog cijevnog reaktora, (-·-·-) metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora i (—) metodom konačnih razlika ( $L = 332 \text{ mm}$ ,  $W = 250 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ;  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ )



**Slika 33.** Usporedba promjene koncentracije (●) glukoze i (●) NADH o vremenu zadržavanja u mikroreaktoru dobivene eksperimentalno i simulacijom matematičkog modela procesa (---) metodom homogenog cijevnog reaktora, (----) metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora i (—) metodom konačnih razlika ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu\text{m}$ ,  $c_{\text{glukoza,u}} = 1$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$  mg cm<sup>-3</sup>, pH = 7;  $T = 40$  °C)



**Slika 34.** Usporedba promjene koncentracije (●) glukoze i (●) NADH o vremenu zadržavanja u mikroreaktoru dobivene eksperimentalno i simulacijom matematičkog modela procesa (---) metodom homogenog cijevnog reaktora, (----) metodom dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora i (—) metodom konačnih razlika ( $L = 332$  mm,  $W = 250$   $\mu$ m,  $C_{\text{glukoza,u}} = 10$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $C_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $\gamma_{\text{GDH,u}} = 0,001$  mg cm<sup>-3</sup>, pH = 7;  $T = 40$  °C)

**Tablica 9.** Statistički kriteriji za analizu primjenjivosti metode simulacije matematičkog modela biotransformacije glukoze sa suspendiranom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru (HCR-homogeni cijevni reaktor, DPCR-dva paralelna cijevna reaktora, MKR-metoda konačnih razlika)

Ulazne koncentracije	Varijabla modela	Metoda	$R^2$	$R^2_{adj}$	RMSE
$c_{glukoza, u} = 4,7 \text{ mmol dm}^{-3}$ $c_{NAD^+, u} = 1,1 \text{ mmol dm}^{-3}$	$c_{glukoza}$	HCR	0,6686	0,4697	0,2146
		DPCR	0,4972	0,1955	0,2877
		MKR	0,8965	0,8343	0,0712
	$c_{NADH}$	HCR	0,6911	0,5057	0,0856
		DPCR	0,5558	0,2893	0,1309
		MKR	0,9160	0,8656	0,0430
$c_{glukoza, u} = 9,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ $c_{NAD^+, u} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$	$c_{glukoza}$	HCR	0,8267	0,7227	0,3588
		DPCR	0,6363	0,4181	0,5024
		MKR	0,9889	0,9808	0,0573
	$c_{NADH}$	HCR	0,7863	0,6581	0,1612
		DPCR	0,6165	0,3864	0,2713
		MKR	0,9505	0,9207	0,0629
$c_{glukoza, u} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ $c_{NAD^+, u} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$	$c_{glukoza}$	HCR	0,6104	0,3766	0,1201
		DPCR	0,4782	0,1652	0,1419
		MKR	0,8662	0,7859	0,0448
	$c_{NADH}$	HCR	0,9278	0,8845	0,0607
		DPCR	0,8845	0,7232	0,0851
		MKR	0,9954	0,9927	0,0045

**Tablica 9.** Statistički kriteriji za analizu primjenjivosti metode simulacije matematičkog modela biotransformacije glukoze sa suspendiranom glukozom dehidrogenazom u mikroreaktoru (HCR – homogeni cijevni reaktor, DPCR – dva paralelna cijevna reaktora, MKR – metoda konačnih razlika) – nastavak

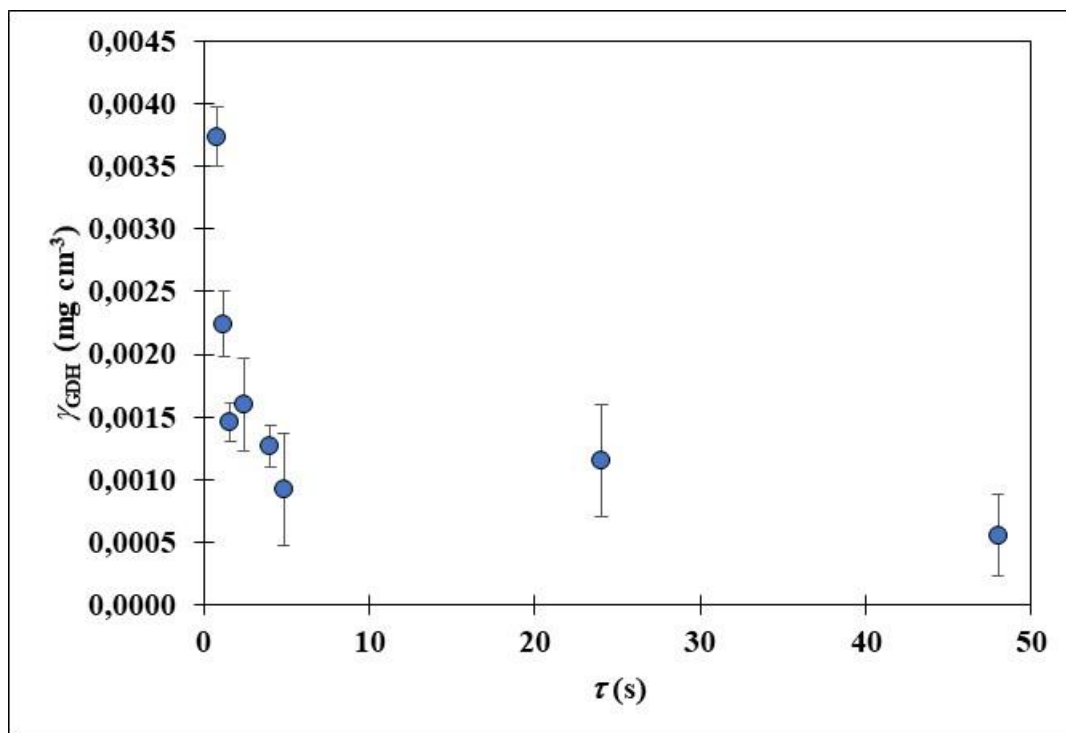
Ulazne koncentracije	Varijabla modela	Metoda	$R^2$	$R^2_{adj}$	RMSE
$c_{glukoza, u} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ $c_{NAD^+, u} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$	$c_{glukoza}$	HCR	0,8692	0,7908	0,1328
		DPCR	0,7345	0,5752	0,1574
		MKR	0,9962	0,9938	0,0078
	$c_{NADH}$	HCR	0,9550	0,9280	0,0776
		DPCR	0,8922	0,8276	0,1029
		MKR	0,9791	0,9666	0,0140
$c_{glukoza, u} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ $c_{NAD^+, u} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$	$c_{glukoza}$	HCR	0,791	0,6667	0,5211
		DPCR	0,6045	0,3673	0,6824
		MKR	0,9835	0,9736	0,069
	$c_{NADH}$	HCR	0,7987	0,6780	0,5210
		DPCR	0,6242	0,3988	0,6817
		MKR	0,9593	0,9349	0,2643

#### **4.4. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom**

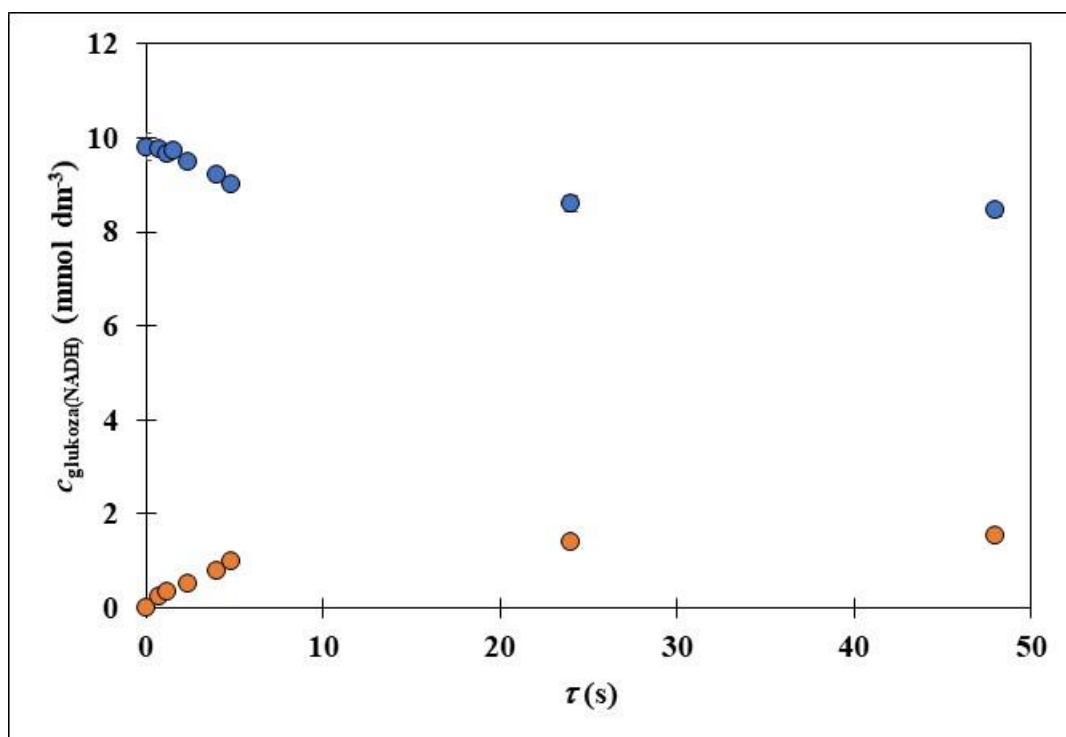
##### 4.4.1. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u staklenom mikroreaktoru

Utjecaj vremena zadržavanja na koncentraciju proteina i glukoze u izlaznoj procesnoj struji za pokuse provedene u staklenom mikroreaktoru 24 h nakon provedene imobilizacije prikazan je na slikama 35 i 36. Na slikama 37 i 38 prikazana je dinamička promjena koncentracije proteina i glukoze za pokus biotransformacije glukoze proveden u staklenom mikroreaktoru s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom.

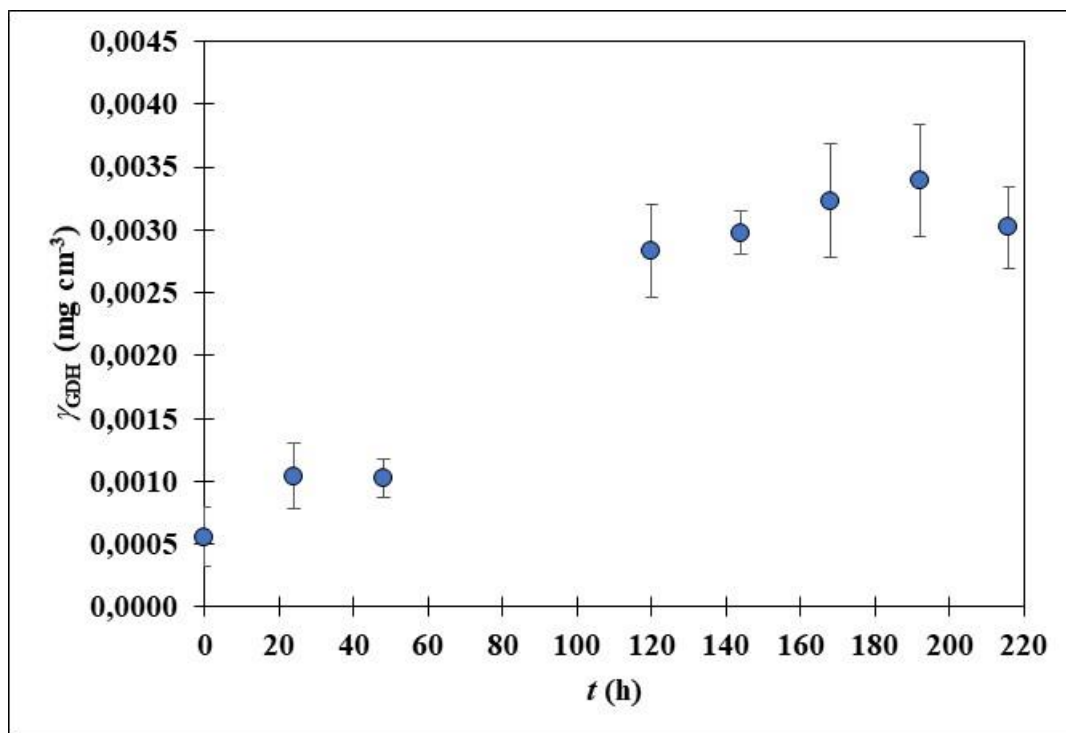




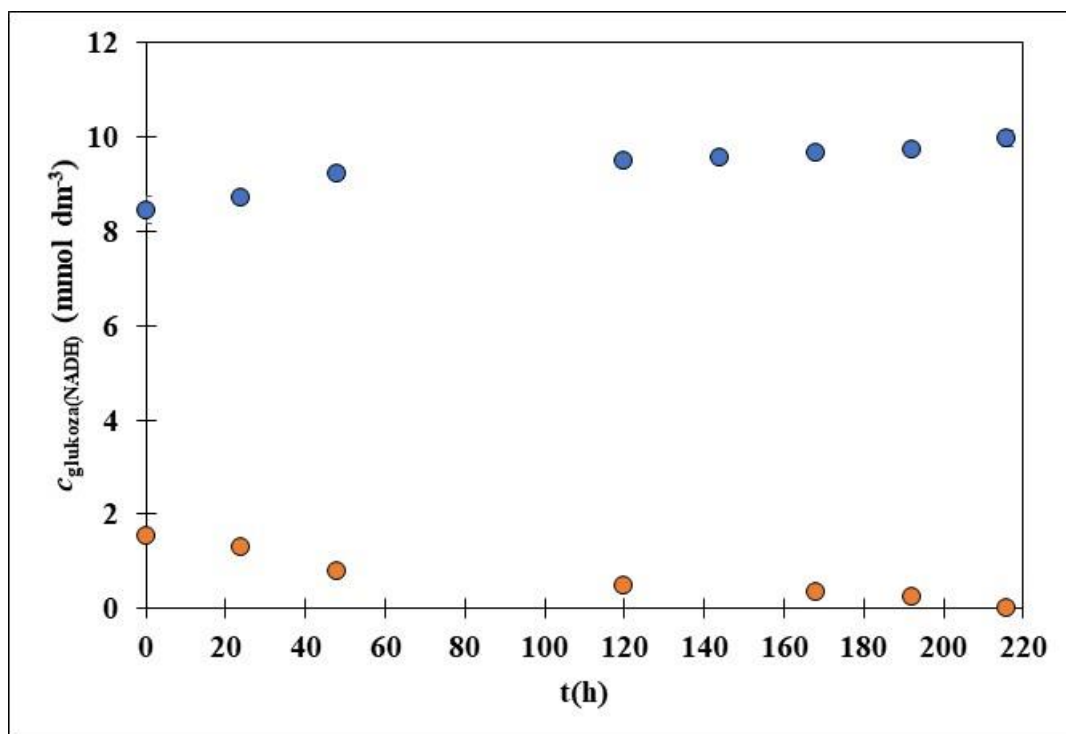
**Slika 35.** Utjecaj vremena zadržavanja na koncentraciju proteina u izlaznoj procesnoj struji staklenog mikoreaktora 24 h nakon provedene imobilizacije ( $c_{\text{glukoza,u}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ;  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ )



**Slika 36.** Utjecaj vremena zadržavanja na koncentraciju glukoze i NADH u izlaznoj procesnoj struji staklenog mikoreaktora 24 h nakon provedene imobilizacije ( $c_{\text{glukoza,u}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NAD,u}} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH} = 7$ ;  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ )



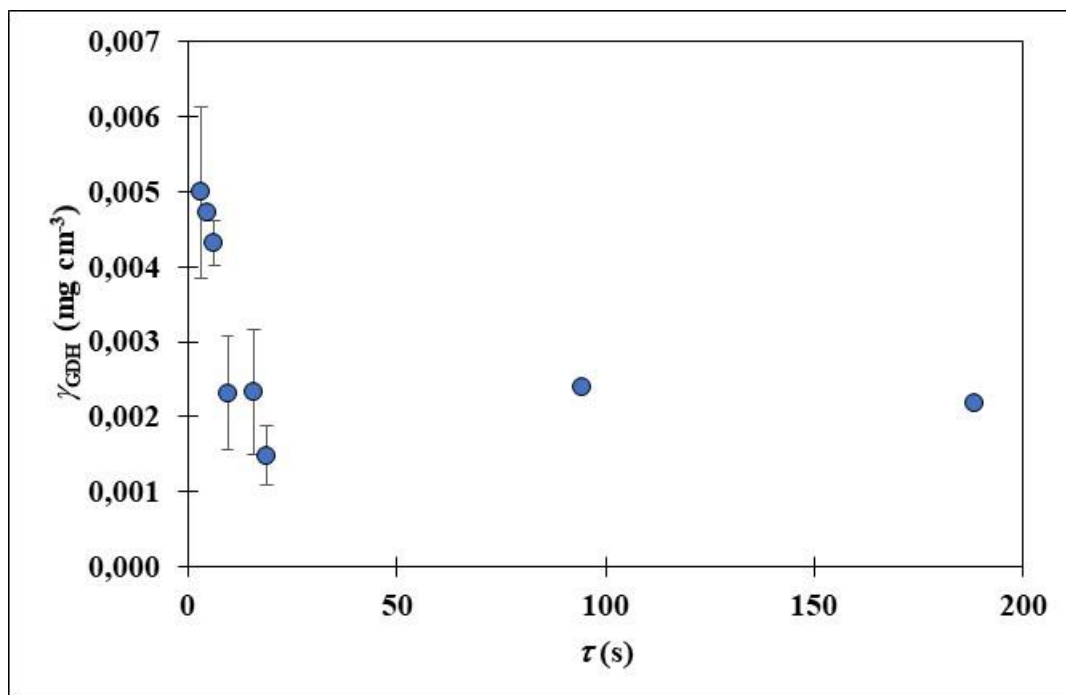
**Slika 37.** Dinamička promjena koncentracije proteina u staklenom mikroreaktoru s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom ( $\tau = 48$  s,  $c_{\text{glukoza,u}} = 10$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$  mmol dm<sup>-3</sup>, pH = 7;  $T = 40$  °C)



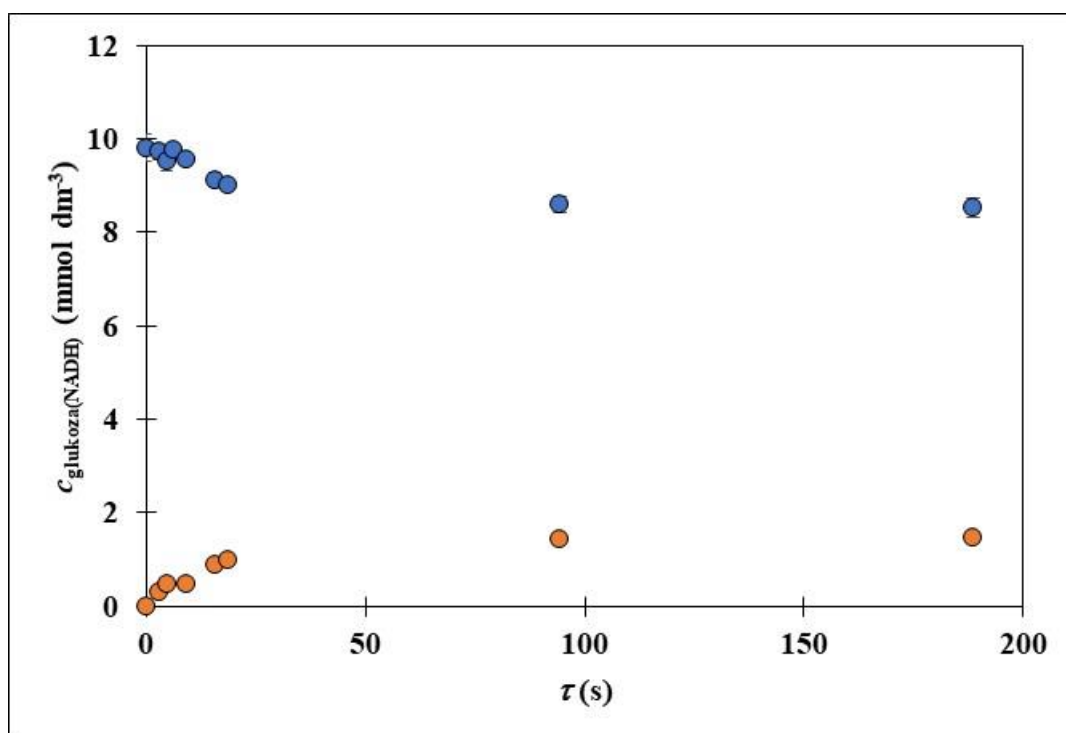
**Slika 38.** Dinamička promjena koncentracije glukoze i NADH u staklenom mikroreaktoru s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom ( $\tau = 48$  s,  $c_{\text{glukoza,u}} = 10$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{NAD}^+,u} = 4,4$  mmol dm<sup>-3</sup>, pH = 7;  $T = 40$  °C)

#### 4.4.2. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u teflonskom cijevnom reaktoru

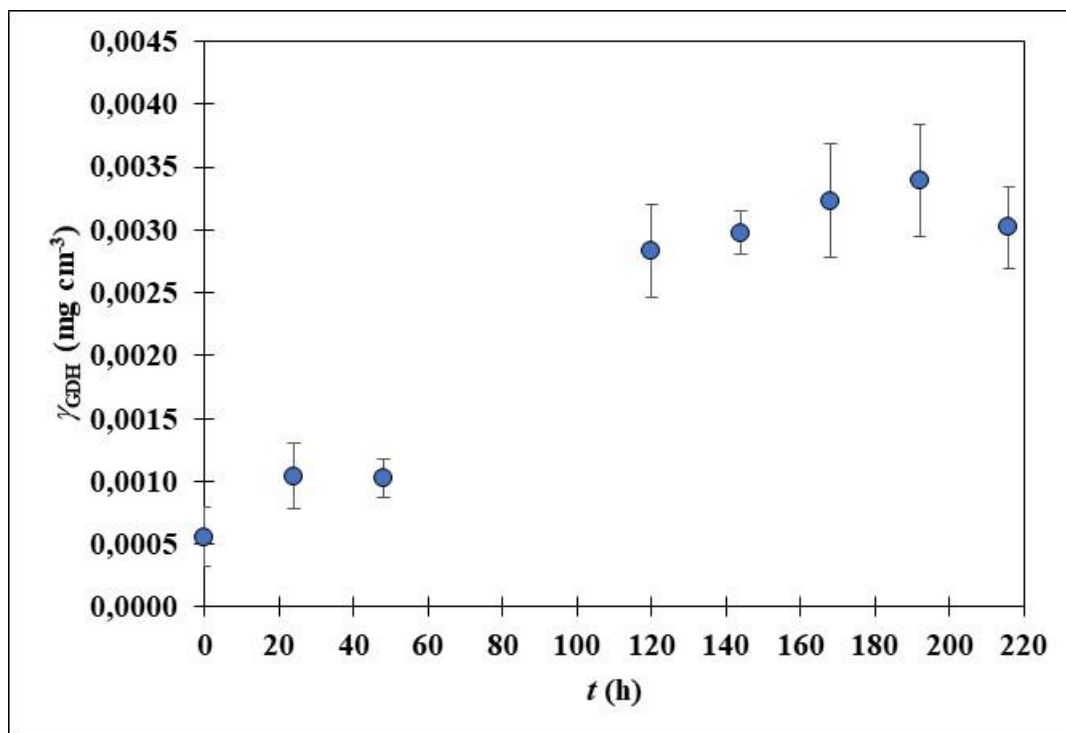
Utjecaj vremena zadržavanja na koncentraciju proteina i glukoze u izlaznoj procesnoj struji za pokuse provedene u teflonskom cijevnom reaktoru 24 h nakon provedene imobilizacije prikazan je na slikama 39 i 40. Na slikama 41 i 42 prikazana je dinamička promjena koncentracije proteina i glukoze za pokus biotransformacije glukoze proveden u teflonskom reaktoru s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom.



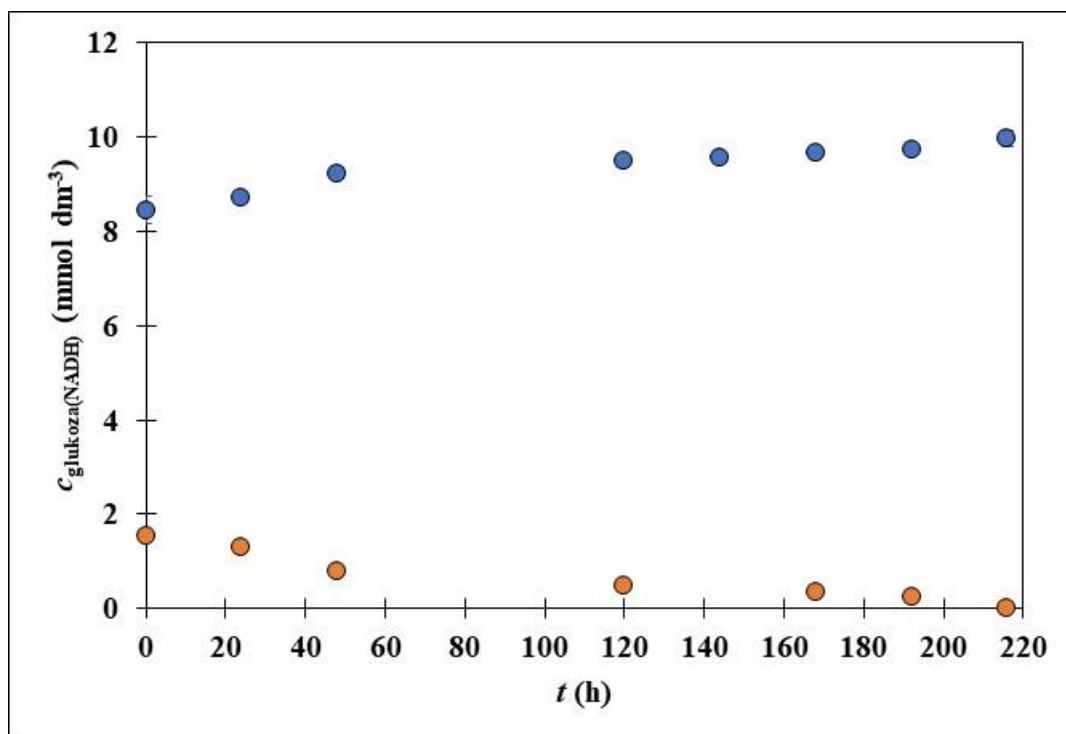
**Slika 39.** Utjecaj vremena zadržavanja na koncentraciju proteina u izlaznoj procesnoj struji teflonskog reaktora 24 h nakon provedene imobilizacije ( $c_{glukoza,u} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{NAD^+,u} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $pH = 7$ ;  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ )



**Slika 40.** Utjecaj vremena zadržavanja na koncentraciju glukoze i NADH u izlaznoj procesnoj struji teflonskog reaktora 24 h nakon provedene imobilizacije ( $c_{glukoza,u} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{NAD^+,u} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $pH = 7$ ;  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ )



**Slika 41.** Dinamička promjena koncentracije proteina u teflonskom reaktoru s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom ( $\tau = 188,5$  s,  $c_{glukoza,u} = 10$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{NAD,u} = 4,4$  mmol dm<sup>-3</sup>, pH = 7;  $T = 40$  °C)



**Slika 42.** Dinamička promjena koncentracije glukoze i NADH u teflonskom reaktoru s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom ( $\tau = 188,5$  s,  $c_{glukoza,u} = 10$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{NAD^+,u} = 4,4$  mmol dm<sup>-3</sup>, pH = 7;  $T = 40$  °C)

## **5. RASPRAVA**

## 5.1. Analiza profila strujanja vodenog dvofaznog sustava u mikroreaktoru

U ovom radu provedena je analiza profila strujanja vodenog dvofaznog sustava u mikroreaktoru volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$  s dva ulaza i dva izlaza. Profili strujanja analizirani su pri različitim volumnim protocima u rasponu od  $q = 2 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  do  $q = 200 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$ . U jednu je vodenu fazu dodana otopina Coomassie Brilliant Blue G-250 radi boljeg međusobnog razlikovanja faza. Profili strujanja fotografirani su na ulazu u reaktor, u središnjem dijelu te na izlazu iz reaktora (slika 12) dok je grafički prikaz ovisnosti Reynoldsove značajke o analiziranim protocima dan na slici 13. Budući da dvije vodene faze imaju jednaku viskoznost, pri ulasku u mikrokanal zauzimaju približno jednaki volumen pa je uočeno formiranje paralelnog profila strujanja. Pomoću mikroskopa su promatrani profili strujanja i napravljene fotografije na tri karakteristične pozicije mikroreaktora: ulazu, središnjem dijelu te izlazu. U ulaznom dijelu mikroreaktora formira se paralelni profil strujanja. Udaljavanjem od ulaznog dijela mikroreaktora, pri protocima manjim od  $20 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  dolazi do narušavanja međufazne površine na granici dviju vodenih faza, tj. dolazi do difuzije boje iz jedne faze u drugu. Kod većih protoka ( $>20 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$ ) međufazna površina ostaje očuvana po čitavoj dužini reaktora. Analiza režima strujanja provedena je također na temelju proračuna Reynoldsove značajke. Za analizirani raspon protoka u definiranoj geometriji mikroreaktora dobivene su vrijednosti Re značajke do 16 (slika 13). Plazl i Lakner (2010) su u svojem radu naveli da se prijelazno područje između laminarnog i turbulentnog strujanja u mikrokanalima postiže za približne vrijednosti Reynoldsove značajke  $Re = 100$  na temelju čega se može zaključiti da su svi pokusi provedeni u laminarnom režimu strujanja.

Prema dostupnoj literaturi, u paralelnom vodenom dvofaznom sustavu, dvije vodene faze koje se ne miješaju, teku jedna pored druge unutar kanala mikroreaktora bez međusobnog miješanja, stvarajući dobro definiranu međufazu (Rodríguez-Llorente i sur., 2023). Ovaj režim protoka održava se pažljivom kontrolom protoka, površinske napetosti i geometrije kanala. Paralelna konfiguracija omogućuje kontinuirani, laminaran protok obje faze, što može biti ključno za različite primjene, osobito u kontroliranom okruženju mikroreaktora (Šalić i Zelić, 2018). Ova postavka pruža platformu na kojoj se reakcije mogu odvijati na granici između dviju faza ili unutar pojedinačnih faza, ovisno o svojstvima topljivosti i difuzije reaktanata (Bojang i Wu, 2020). Jedna od primarnih prednosti strujanja vodenog dvofaznog sustava u mikroreaktorima je poboljšana kontrola koju nudi nad uvjetima reakcije. Precizna kontrola nad brzinama protoka i dimenzijama kanala omogućuje fino podešavanje faznog sučelja, što može biti ključno za optimiranje brzina reakcije i prinosa (Yue, 2018).

## 5.2. Analiza efektivnih difuzivnosti komponenata u mikroreaktoru

Difuznost molekula unutar mikroreaktora temeljni je parametar koji utječe na učinkovitost, sigurnost i povećanje mjerila procesa temeljenih na mikroreaktorima (Swarts i sur., 2010). Na temelju analize mogu se optimirati reakcijski uvjeti, dizajnirati učinkovite geometrije mikroreaktora, osigurati uniformnost u distribuciji reaktanata i kontrolirati kinetika reakcije (Šalić i Zelić, 2018). Ovo razumijevanje ključno je za iskorištavanje punog potencijala mikroreaktora u širokom rasponu primjena, od kemijske sinteze do bioloških testova, osiguravajući da ovi mali sustavi daju konzistentne rezultate visoke kvalitete (Potter i sur., 2017). U ovom radu analiza efektivnih difuzivnosti provedena je u staklenom mikroreaktoru volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$  s dva ulaza i dva izlaza. Analizirane su difuzivnosti glukoze, NADH te enzima glukoza dehidrogenaze (GDH) pri različitim vremenima zadržavanja (slike 14-16). Usporedbom dobivenih koncentracijskih profila uočen je zajednički obrazac za molekule glukoze i NADH. Uočeno je da čak i pri najkraćem analiziranom vremenu zadržavanja od  $\tau = 0,6 \text{ s}$  dolazi do difuzije molekula između faza. Povećanjem vremena zadržavanja na  $\tau = 50 \text{ s}$ , koncentracije tih molekula se izjednačavaju duž širine mikroreaktora, pa su na izlazu koncentracije ovih komponenti gotovo jednake u objema fazama. Pri najduljem analiziranom vremenu zadržavanja od  $\tau = 96 \text{ s}$ , molekule glukoze i NADH imaju dovoljno vremena da difundiraju između faza, tako da se već na polovici duljine reaktora njihove koncentracije izjednačavaju, odnosno postaju praktički jednake u obje faze. S druge strane, enzim glukoza dehidrogenaza sporo difundira između faza, pa pri vremenu zadržavanja od  $\tau = 0,6 \text{ s}$  većina enzima ostaje u fazi u kojoj su ušli u mikroreaktor. Produženo vrijeme zadržavanja od deset puta još uvijek nije dovoljno za značajniju difuziju, a tek pri vremenu zadržavanja od  $\tau = 96 \text{ s}$  primjećuje se prijelaz enzima između faza.

Eksperimentalne vrijednosti koncentracijskih profila glukoze, NADH i enzima uspoređene su s rezultatima simulacije matematičkog modela difuzije u mikroreaktoru. Dvodimenzionalni matematički model procesa difuzije u mikroreaktoru razvijen je na temelju pretpostavki laminarnog strujanja, jednake viskoznosti obje faze i izotermnih uvjeta unutar mikroreaktora (Tišma i sur., 2009). Matematički model difuzije za glukozu, NADH i enzim glukoza dehidrogenazu, zajedno s pripadajućim rubnim i početnim uvjetima, prikazan je jednadžbama 8 – 10. Simulacija matematičkog modela provedena je metodom konačnih razlika, koristeći programski paket WR Mathematica 10.0. Pri numeričkom rješavanju modela, mikrokanal korišten u mikroreaktoru ( $V = 4 \text{ mm}^3$ , širina x visina x duljina =  $250 \text{ }\mu\text{m} \times 50 \text{ }\mu\text{m} \times 330 \text{ mm}$ ) podijeljen je na ekvidistantnu mrežu  $50 \times 50$ . Rezultati simulacije prikazani su kao



koncentracijski profili glukoze (slika 17), NADH (slika 18) i enzima glukoza dehidrogenaze (slika 19). Simulacije su provedene za dva različita vremena zadržavanja:  $\tau = 1,2$  i 96 s. Simulacije matematičkog modela procesa difuzije provedene su korištenjem koeficijenata efektivnih difuzivnosti izračunatih korelacijskim modelima. S obzirom na to da rješavanje parcijalnih diferencijalnih jednadžbi metodom konačnih razlika zahtijeva razvoj složenog algoritma, u ovom radu primijenjena je i aproksimativna metoda za modeliranje procesa difuzije u mikroreaktoru s vodenim dvofaznim sustavom. Ova metoda se temelji na konceptu aproksimacije mikroreaktora s dva idealna paralelna cijevna reaktora između kojih dolazi do prijenosa tvari putem difuzije (Jurinjak Tušek i sur., 2013). Kako bi se potvrdila valjanost predložene metode, uspoređeni su rezultati simulacije matematičkog modela procesa difuzije riješenog metodom konačnih razlika s rezultatima aproksimativnog modela dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora. Usporedba statističkih kriterija primjenjivosti predloženih metoda simulacije matematičkog modela procesa difuzije u mikroreaktoru prikazana je u tablici 8. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je najbolje slaganje između modela i eksperimenta dobiveno za koncentracijski profil NADH. U slučaju koncentracijskog profila NADH dobivene su vrijednosti koeficijenta determinacije  $R^2 > 0,83$  za metodu konačnih razlika i za metodu dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora, na temelju čega se može zaključiti da se predloženi model može učinkovito koristiti za predikciju koncentracija NADH u mikroreaktoru. Prema Henseleru i sur. (2009), matematički model s  $R^2$  vrijednosti od 0,75 smatra se prihvatljivim, model s  $R^2$  vrijednost od 0,50 smatra se umjerenim, dok se model koji karakterizira  $R^2$  vrijednost od 0,26 smatra slabim. S druge pak strane, najlošije slaganje između modela i eksperimenta dobiveno je za koncentracijski profil enzima glukoza dehidrogenaze ( $R^2 < 0,63$ ) pri čemu se aproksimativna metoda pokazala manje učinkovitom od metode konačnih razlika. Najveće je odstupanje aproksimativne metode uočeno za mala vremena zadržavanja. U slučaju enzima glukoza dehidrogenaze pokazano je da, u usporedbi i s rezultatima pokusa i s rezultatima simulacije matematičkog modela procesa difuzije riješenog metodom konačnih razlika, aproksimativna metoda podbacuje za čitav raspon analiziranih vremena zadržavanja. Ovo izrazito odstupanje se može objasniti činjenicom da aproksimativni model opisuje proces difuzije sporijim nego što se on stvarno odvija. Predložena aproksimativna metoda može uvelike olakšati i ubrzati analizu procesa difuzije koji se odvijaju u mikroreaktorima ako se primjenjuje na molekule malih molekularnih masa kao što je glukoza i/ili koenzim NADH.

### 5.3. Biotransformacija glukoze suspendiranim enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru

Nakon analize hidrodinamičkih uvjeta provedeni su eksperimenti biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom porijeklom iz *Pseudomonas spp.* u staklenom mikroreaktoru volumena  $V = 4 \text{ mm}^3$ . Ukupno je provedeno pet eksperimenata primjenom različitih ulaznih koncentracija glukoze i koenzima  $\text{NAD}^+$  ( $c_{\text{glukoza, u}} = 4,7 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 1,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{glukoza, u}} = 9,4 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{glukoza, u}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 2,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{glukoza, u}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{glukoza, u}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NAD}^+, \text{u}} = 4,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). U svim pokusima praćen je utjecaj vremena zadržavanja na promjenu koncentracije glukoze i NADH. Motivacija za predloženo istraživanje temelji se na unapređenju proizvodnje biovodika. Naime, vodik se ističe kao vodeći konkurent među alternativnim energetskim rješenjima, s biološkim procesima dobivaju na privlačnosti kao povoljne alternative kemijskim metodama za njegovu proizvodnju. Ovaj oblik vodika, nazvan biovodik ( $\text{BioH}_2$ ), odavno je poznat po svom potencijalu (Sen i sur., 2019). Međutim, izazov leži u osiguravanju njegove industrijske održivosti, s obzirom na nisku konverziju supstrata, stope proizvodnje i prinose. Ekonomska održivost obično ovisi o postizanju stope konverzije supstrata od 60 do 80 %. Uz konvencionalno uspostavljene putove za proizvodnju  $\text{BioH}_2$ , kao što su fotofermentacija i anaerobna fermentacija (Šalić i Zelić, 2022), također se pojavljuju i nove strategije za rješavanje ograničenja. To uključuje optimiranje korištenja svjetla, genetsko modificiranje mikroorganizama, fino podešavanje parametara procesa, korištenje enzima, pa čak i stvaranje sintetskih enzimskih puteva za sintezu  $\text{BioH}_2$ . Osim toga, istraživanje inovativnih dizajna reaktora i prijelaz procesa s makro na mikro razinu nude obećavajuće puteve za poboljšanje. Među tim naprecima, mikrofluidni sustavi predstavljaju vrhunsku tehnologiju koja je spremna prevladati izazove povezane s trenutnim metodama proizvodnje  $\text{BioH}_2$ . U radu Woodwarda i Orra (1998) autori su predložili jednostavnu enzimsku pretvorbu glukoze u glukonsku kiselinu uz paralelnu proizvodnju molekularnog vodika. Enzim glukoza dehidrogenaza (GDH) katalizira oksidaciju glukoze u glukonolakton, koji se hidrolizira na glukonsku kiselinu, a kofaktor za ovu reakciju je  $\text{NAD}^+$  ili  $\text{NADP}^+$ , koji se reducira. Drugi enzim, hidrogenaza, koristi kofaktor kao donor elektrona, što rezultira molekularnim vodikom i regeneracijom i recikliranje kofaktora. Nažalost, reakcija je rezultirala niskim prinosima. Kako navode autori, značajan nedostatak predloženog sustava je korištenje dvaju različitih enzima, od kojih svaki zahtijeva različite optimalne procesne uvjete. Nadalje, autori su pokazali da glukonska kiselina negativno utječe na aktivnost GDH. Oni predlažu da se eliminiira glukonska

kiselina i održava konstantan pH tijekom reakcija bi se mogla povećati stabilnost i potencijalno proizvesti stehiometrijske količine BioH<sub>2</sub> iz glukoze više koncentracije. Ovo povećanje prinosa BioH<sub>2</sub> također može dovesti do većih stopa proizvodnje. Za rješavanje ovih ograničenja i poboljšanje ukupnog procesa, mikrotehnologija predstavlja održivo rješenje. Prvi korak predloženog sustava, naime oksidacija glukoze pomoću GDH, istražen je u ovom istraživanju.

Proces biotransformacije glukoze suspendiranim enzimom glukoza dehidrogenazom opisan je također 2D matematičkim modelom koji uključuje konvekciju u smjeru strujanja, difuziju u dva smjera te biokemijske reakcije. Sustav parcijalnih diferencijalnih jednadžbi s pripadajućim rubnim i početnim uvjetima prikazan je jednadžbama 22 – 27. Kinetika biokemijskih reakcija analizirana je primjenom nezavisnih eksperimenata u šaržnom reaktoru, a procijenjene vrijednosti kinetičkih parametra prikazane su u tablici 7. Predloženi matematički model riješen je primjenom triju metoda: (i) aproksimacijom sustava homogenim idealnim cijevnim reaktorom (jednadžbe 28-32), (ii) aproksimacijom sustava s dva idealna paralelna cijevna reaktora (jednadžbe 33-44) te (iii) metodom konačnih razlika na ekvidistantnoj mreži. Sve simulacije provedene su primjenom programskog paketa WR Mathematica 10.0. Analizirani su profili koncentracija svih komponenata reakcijske smjese (glukoza dehidrogenaza, glukoza, NAD<sup>+</sup>, NADH, glukonolakton i glukonska kiselina) po dužini i širini mikroreaktora dobivene simulacijama matematičkog modela biotransformacije glukoze glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri vremenima zadržavanja  $\tau = 0,6$  s i  $\tau = 24$  s. Rezultati simulacija prikazani su na slikama 20 – 29. Na temelju prikazanih profila koncentracija može se uočiti da vrijeme zadržavanja ima velik utjecaj na profil koncentracija komponenata reakcijske smjese biotransformacije glukoze suspendiranim enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru. Vidljivo je da kod kratkog vremena zadržavanja ( $\tau = 0,6$  s) nema difuzije enzima iz jedne faze u drugu. Također se može uočiti da kod istog vremena zadržavanja dolazi do niske potrošnje glukoze i posljedično do sinteze malih koncentracija glukonske kiseline. Važno je napomenuti da kod vremena zadržavanja od  $\tau = 0,6$  s simulacije pokazuju da do formiranja produkata dolazi samo na međufaznoj površini gdje dolazi od kontakta enzima sa supstratom i koenzimom. S druge pak strane, produženje vremena zadržavanja na  $\tau = 24$  s ima za posljedicu veću potrošnju glukoze i sintezu viših koncentracija glukonske kiseline. Pri vremenu zadržavanja od  $\tau = 24$  s vidljivo je da je glukonska kiselina distribuirana po čitavoj širini reaktora te da se koncentracija spomenutog produkta povećava po dužini reaktora. Opisani trend uočen je za svih pet kombinacija ulaznih koncentracija glukoze i koenzima NAD<sup>+</sup>.

Eksperimentalne vrijednosti koncentracija glukoze i NADH pri različitim vremenima zadržavanja uspoređene su s rezultatima simulacije modela biotransformacije glukoze suspendiranim enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru. Usporedbe promjene koncentracije glukoze i NADH o vremenu zadržavanja u mikroreaktoru dobivene eksperimentalno i simulacijom matematičkog modela procesa s tri metode: (i) metoda homogenog cijevnog reaktora, (ii) metoda dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora i (iii) metoda konačnih razlika prikazane su na slikama 30 – 34. Usporedba statističkih kriterija primjenjivosti predloženih metoda simulacije matematičkog modela procesa biotransformacije glukoze sa suspendiranom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru prikazana je u tablici 9. Na temelju dobivenih rezultata može se uočiti da je najbolje slaganje između modela i eksperimenata dobiveno rješavanjem sustava parcijalnih diferencijalnih jednadžbi metodom konačnih razlika ( $R^2 > 0,8666$ ). Zanimljivo je uočiti da rezultati pokazuju bolje slaganje eksperimenta i metode aproksimacije sustava parcijalnih diferencijalnih jednadžbi homogenim idealnim cijevnim reaktorom ( $R^2 > 0,6104$ ), nego aproksimativna metoda temeljena na dva idealna paralelna cijevna reaktora ( $R^2 > 0,4782$ ). Također uočeno je da rezultati simulacije dobiveni aproksimativnom metodom više odstupaju od eksperimentalnih vrijednosti za više koncentracije glukoze.

#### 5.4. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru

Kako bi se povećala ekonomičnost procesa biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru, provedena je imobilizacija enzima lakaze na unutarnje stijenke staklenog mikroreaktora volumena 4 mm<sup>3</sup>. Imobilizacijom enzima omogućava se njihova višekratna upotreba, što donosi značajne uštede u usporedbi s kontinuiranim procesima gdje se enzimi ne odvajaju na izlazu iz mikroreaktora. U ovom radu korištena je kovalentna imobilizacija enzima glukoza dehidrogenaza na staklenu površinu mikroreaktora (Stojković i sur., 2011). Ova metoda uključuje kovalentno vezivanje enzima za netopljivi nosač, pri čemu se prvo aktivira površina nosača, a zatim se veže enzim. Iako kovalentno vezivanje može promijeniti strukturu i smanjiti aktivnost enzima zbog agresivnih uvjeta tijekom imobilizacije, prednost metode je stabilnost vezanog enzima, što sprječava njegov gubitak s nosača. Slika 35 prikazuje utjecaj vremena zadržavanja na koncentraciju ispranog proteina prvog dana imobilizacije te je vidljivo kako pri većim protocima kroz mikroreaktor dolazi do intenzivnijeg ispiranja enzima. Najviše enzima je isprano pri najvećem protoku, odnosno pri vremenu zadržavanja  $\tau = 0,6$  s. Pri vremenima zadržavanja  $\tau = 4,8 - 48$  s koncentracija ispranog enzima je bila približno jednaka. Na slici 36 prikazana je promjena koncentracije glukoze i NADH 24 h nakon provedbe imobilizacije. Uočeno je da produženjem vremena zadržavanja dolazi do smanjenja koncentracije glukoze i proporcionalno povećanja koncentracije NADH.

Stabilnost imobilizacije enzima glukoza dehidrogenaze na površini staklenog mikroreaktora praćena je kroz vremenski period od 216 sati. Na slici 37 vidljivo je kako je ispiranje enzima približno jednako do trećeg dana od provedbe imobilizacije iz čega se može zaključiti da je imobilizirani enzim stabilan. Nakon trećeg dana od provedbe imobilizacije uočava se pojačano ispiranje enzima koje može biti posljedica oštećenja imobiliziranog sloja, a koji se daljnjim strujanjem otopine glukoze i NADH odvaja od površine. Kako bi se učinkovitije imobilizirao enzim na površinu potrebno je modificirati i optimirati postupak imobilizacije. Nadalje, promjena koncentracije supstrata u mikroreaktoru s imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom (slika 38) bila je najveća u prva 24 od provođenja imobilizacije. Nakon toga se smanjuje i zadržava približno jednaku vrijednost tijekom 216 sati provedbe pokusa.

### 5.5. Biotransformacija glukoze imobiliziranim enzimom glukoza dehidrogenazom u teflonskom reaktoru

Imobilizacija enzima glukoza dehidrogenaze je također provedena i u teflonskom cijevnom reaktoru promjera  $d = 1$  mm i duljine  $L = 30$  cm. U ovom reakcijskom sustavu također je provedena biotransformacija glukoze pri različitim vremenima zadržavanja, a praćena je i koncentracija ispranog enzima s površine teflonskog cijevnog reaktora. Za provedbu pokusa korištena je ista otopina glukoze kao i u eksperimentu s imobiliziranom glukoza dehidrogenazom u mikrokanalu mikroreaktora.

Na slici 39 prikazano je kako se koncentracija ispranog enzima povećava smanjenjem vremena zadržavanja u teflonskom cijevnom reaktoru tijekom prvog dana imobilizacije, pri čemu se kod manjih vremena zadržavanja ispire više enzima najvjerojatnije zbog djelovanja otopine supstrata na imobilizirani sloj. Promjena koncentracije glukoze i NADH pri različitim vremenima zadržavanja prati isti trend kao i u eksperimentima provedenim u staklenom mikroreaktoru (slika 40). Praćenjem stabilnosti imobiliziranog enzima kroz 216 sati (slika 41) vidljivo je da je enzim stabilan gotovo 5 dana nakon čega dolazi do porasta koncentracije ispranog enzima u izlaznoj procesnoj struji što dovodi do narušavanja stabilnosti imobiliziranog sloja. Uslijed povećanog ispiranja enzima sa stijenke reaktora dolazi do smanjenja promjena koncentracije glukoze i NADH s vremenom provedbe pokusa (slika 42).

## **6. ZAKLJUČCI**

---

Na temelju navedenih rezultata može se zaključiti:

1. Uvođenjem dviju vodenih faza u mikroreaktor pri ukupnim protocima manjim od  $q = 400 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$  formira se paralelno strujanje.
2. Korištenjem korelacijskih modela izračunate su vrijednosti efektivnih difuzivnosti molekula reakcijskog sustava (glukoza, NADH i glukoza dehidrogenaza). Dobiveni rezultati pokazuju da čak i pri najkraćem analiziranom vremenu zadržavanja od  $\tau = 0,6 \text{ s}$  dolazi do difuzije glukoze i NADH između faza. S druge strane, enzim glukoza dehidrogenaza sporo difundira između faza, pa pri vremenu zadržavanja od  $\tau = 0,6 \text{ s}$  većina enzima ostaje u fazi u kojoj su ušli u mikroreaktor. Produženo vrijeme zadržavanja od deset puta još uvijek nije dovoljno za značajniju difuziju, a tek pri vremenu zadržavanja od  $\tau = 96 \text{ s}$  primjećuje se prijelaz enzima između faza.
3. Biotransformacijom glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru postiže se potrošnja glukoze već pri vremenu zadržavanja od  $\tau = 0,6 \text{ s}$ . Produženje vremena zadržavanja iznad  $\tau = 48 \text{ s}$  nema utjecaja na promjenu koncentracije glukoze.
4. Proces biotransformacije glukoze suspendiranim enzimom glukoza dehidrogenazom opisan je 2D matematičkim modelom koji uključuje konvekciju u smjeru strujanja, difuziju u dva smjera te biokemijske reakcije. Sustav parcijalnih diferencijalnih jednadžbi riješen je primjenom triju metoda: (i) aproksimacijom sustava homogenim idealnim cijevnim reaktorom, (ii) aproksimacijom sustava s dvaju idealnih paralelnih cijevnih reaktora te (iii) metodom konačnih razlika na ekvidistantnoj mreži. Na temelju dobivenih rezultata može se uočiti da je najbolje slaganje između modela i eksperimenata dobiveno rješavanjem sustava parcijalnih diferencijalnih jednadžbi metodom konačnih razlika ( $R^2 > 0,8666$ ). Rezultati pokazuju bolje slaganje eksperimenta i metode aproksimacije sustava parcijalnih diferencijalnih jednadžbi homogenim idealnim cijevnim reaktorom ( $R^2 > 0,6104$ ), nego aproksimativna metoda temeljena na dva idealna paralelna cijevna reaktora ( $R^2 > 0,4782$ ).
5. Provedena je kovalentna imobilizacija glukoza dehidrogenaze na stijenku mikrokanala mikroreaktora i na stijenku teflonskog cijevnog reaktora. Potvrđena je stabilnost imobiliziranog enzima i mogućnost njegove višestruke primjene kroz vremenski period od 216 sati.



## **7. ZAHVALA**

*Posebnu zahvalu dugujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Jurinjak Tušek, na pruženoj prilici, predanom vodstvu, strpljenju i konstantnoj podršci tijekom izrade i pisanja ovog rada.*

*Također, zahvaljujem se i doc. dr. sc. Aniti Šalić na prenesenom znanju, nepresušnim idejama te velikoj pristupačnosti i srdačnosti.*

*Zahvaljujem se i svim ostalim djelatnicima Laboratorija za mjerenje, regulaciju i automatizaciju na pruženoj pomoći, susretljivosti i savjetima.*

*Hvala mojoj obitelji na bezuvjetnoj podršci, ljubavi i razumijevanju! Vaša pomoć i vjera u mene znače mi više no što riječi mogu opisati.*

*I na kraju, veliko hvala dragim prijateljima i kolegama koji mi neprestano uljepšavaju i obogaćuju moje studentsko putovanje!*

*Hvala vam!*

## **8. POPIS LITERATURE**

Ahuja SK, Ferreira GM, Moreira AR (2004) Utilization of enzymes for environmental applications. *Crit Rev Biotechnol* **24**, 125-154. <https://doi.org/10.1080/07388550490493726>

Ando Y, Ohta Y, Munetsuna E, Yamada H, Nouchi Y, Kageyama I i sur. (2023) Laboratory analysis of glucose, fructose, and sucrose contents in Japanese common beverages for the exact assessment of beverage-derived sugar intake. *Fujita Medical J* **9**, 126–133. <https://doi.org/10.20407/fmj.2022-009>

Anonymous (2024) <<https://www.chemspider.com/>>. Pristupljeno 15. kolovoza 2024.

Bajić M, Plazl I, Stloukal R, Žnidaršič-Plazl P (2017) Development of a miniaturized packed bed reactor with  $\omega$ -transaminase immobilized in LentiKats®. *Process Biochem* **52**, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.021>

Bertrand E, Pierre G, Delattre C, Gardarin C, Bridiau N, Maugard T i sur. (2014) Dextranase immobilization on epoxy CIM® disk for the production of isomaltooligosaccharides from dextran. *Carbohydr Polym* **111**, 707–713. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.100>

Bilen H, Kilicaslan A, Akcay G, Albayrak F (2007) Performance of glucose dehydrogenase (GDH) based and glucose oxidase (GOX) based blood glucose meter systems at moderately high altitude. *J Med Eng Technol* **31**, 152–156. <https://doi.org/10.1080/03091900600861590>

Bojang AA, Wu HS (2020) Design, fundamental principles of fabrication and applications of microreactors. *Processes* **8**, 891. <https://doi.org/10.3390/pr8080891>

Bolivar JM, Luley-Goedl C, Leitner E, Sawangwan T, Nidetzky B (2017) Production of glucosyl glycerol by immobilized sucrose phosphorylase: Options for enzyme fixation on a solid support and application in microscale flow format. *J Biotechnol* **257**, 131–138. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2017.01.019>

Bollella P, Sharma S, Cass AEG, Antiochia R (2019) Minimally-invasive Microneedle-based Biosensor Array for Simultaneous Lactate and Glucose Monitoring in Artificial Interstitial Fluid. *Electroanal* **31**, 374–382. <https://doi.org/10.1002/elan.201800630>

Boontim N, Yoshimune K, Lumyong S, Moriguchi M (2006) Cloning of D-glucose dehydrogenase with a narrow substrate specificity from *Bacillus thuringiensis* M15. *Ann Microbiol* **56**, 237-240. <https://doi.org/10.1007/BF03175011>

Brandner JJ (2008) Fabrication of microreactors made from metals and ceramics. U: *Microreactors in Organic Synthesis and Catalysis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Njemačka, str. 1-17.

Brocklehurst CE, Lehmann H, La Vecchia L (2011) Nitration chemistry in continuous flow using fuming nitric acid in a commercially available flow reactor. *Org Process Res Dev* **15**, 1447–1453. <https://doi.org/10.1021/op200055r>

Bingcheng L (2011) *Microfluidics: Technologies and applications*. U: Capretto L, Cheng W, Hill M, Zhang X (ured.) *Micromixing Within Microfluidic Devices*, Springer-Verlag, Berlin, Njemačka, str. 28-68.

Chen TY, Hsiao YW, Baker-Fales M, Cameli F, Dimitrakellis P, Vlachos DG (2022) Microflow chemistry and its electrification for sustainable chemical manufacturing. *Chem Sci* **13**, 10644–10685. <https://doi.org/10.1039/D2SC01684B>

Chen X, Lv H (2022) Intelligent control of nanoparticle synthesis on microfluidic chips with machine learning. *NPG Asia Mater* **14**, 69. <http://dx.doi.org/10.1038/s41427-022-00416-1>

Deng Q, Tran NN, Razi Asrami M, Schober L, Gröger H, Hessel V (2020) Ionic liquid/water continuous-flow system with compartmentalized spaces for automatic product purification of biotransformation with enzyme recycling. *Ind Eng Chem Res* **59**, 21001–21011. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c02785>

Ding HT, Du YQ, Liu DF, Li ZL, Chen XJ, Zhao YH (2011) Cloning and expression in *E. coli* of an organic solvent-tolerant and alkali-resistant glucose 1-dehydrogenase from *Lysinibacillus sphaericus* G10. *Bioresource Technol* **102**, 1528–1536. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.018>

Domínguez MI, Centeno MA, Martínez T. M, Bobadilla LF, Laguna ÓH, Odriozola JA (2021) Current scenario and prospects in manufacture strategies for glass, quartz, polymers and metallic microreactors: A comprehensive review. *Chem Eng Res Des* **171**, 13–35. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.05.001>

Dong Z, Udepurkar AP, Kuhn S (2020) Synergistic effects of the alternating application of low and high frequency ultrasound for particle synthesis in microreactors. *Ultrason Sonochem* **60**, 104800. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104800>

Čulo K (2024) Oksidacija glukoze katalizirana enzimom glukoza dehidrogenaza u kotlastom reaktoru (završni rad u pripremi), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Ehrfeld W, Hessel Volker, Löwe Holger (2000) *Microreactors : new technology for modern chemistry*, Wiley-VCH, Njemačka, str. 1-82.

Etminan A, Muzychka YS, Pope K (2021) A review on the hydrodynamics of Taylor flow in microchannels: Experimental and computational studies. *Processes* **9**, 870. <https://doi.org/10.3390/pr9050870>

Furlanović N (2010) Matematički model oksidacije glukoze katalizirane glukoza oksidazom (diplomski rad), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

Gepert M, Moskaluk A (2007) Acoustic and thermodynamic investigations of aqueous solutions of some carbohydrates. *J Phys IV* **28**, 95–100. <http://dx.doi.org/10.1051/jp4:2006137043>

Gkantzou E, Patila M, Stamatis H (2018) Magnetic microreactors with immobilized enzymes- From assemblage to contemporary applications. *Catalysts* **8**, 282. <https://doi.org/10.3390/catal8070282>

Gojun M, Pustahija L, Jurinjak Tušek A, Šalić A, Valinger D, Zelić B (2019) Kinetic parameter estimation and mathematical modelling of lipase catalysed biodiesel synthesis in a microreactor. *Micromachines* **10**, 759. <https://doi.org/10.3390/mi10110759>

Gonidec M, Puigmartí-Luis J (2019) Continuous-versus segmented-flow microfluidic synthesis in materials science. *Crystals* **9**, 12. <https://doi.org/10.3390/cryst9010012>

Gretić ZH, Rahelić T, Vrsatjko D (2017) Materijali za izradu mikroreaktora. *Kem Ind* **66**, 633–640. <https://doi.org/10.15255/KUI.2016.051>

He Y, Kim KJ, Chang CH (2020) Segmented microfluidic flow reactors for nanomaterial synthesis. *Nanomaterials* **10**, 1421. <https://doi.org/10.3390/nano10071421>

Henseler J, Ringle CM, Sinkovics RR (2009) The use of partial least squares path modeling in international marketing. *Adv Int Mar* **20**, 277–319. [https://doi.org/10.1108/S1474-7979\(2009\)0000020014](https://doi.org/10.1108/S1474-7979(2009)0000020014)

Hessel V, Hardt S, Löwe H (2003) Chemical Micro Process Engineering: Fundamentals, Modelling and Reactions, 10. izd., Wiley-VCH, Njemačka, str. 30-128.

Hou X, Ramakrishnan S, Audonnet F, Štrancar A, Christophe G, Traikia M i sur. (2024) Development of an immobilized laccases - CDI CIMmultus® monolithic reactor for ecofriendly producing gallic acid-dextran conjugate. *Process Biochem* **144**, 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2024.06.011>

Hrynevich A, Li Y, Cedillo-Servin G, Malda J, Castilho M (2022) (Bio)fabrication of microfluidic devices and organs-on-a-chip. *Woodh Publ* 273–336. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89831-7.00001-8>

Jeon WY, Lee JH, Dashnyam K, Choi YB, Kim TH, Lee HH i sur. (2019) Performance of a glucose-reactive enzyme-based biofuel cell system for biomedical applications. *Sci Rep* **9**, 10872. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47392-1>

Jovanović J, Rebrov E V., Nijhuis TA, Kreutzer MT, Hessel V, Schouten JC (2012) Liquid-liquid flow in a capillary microreactor: Hydrodynamic flow patterns and extraction performance. *Ind Eng Chem Res* **51**, 1015–1026. <http://dx.doi.org/10.1021/ie200715m>

Karagoz P, Mandair R, Manayil JC, Lad J, Chong K, Kyriakou G i sur. (2020) Purification and immobilization of engineered glucose dehydrogenase: A new approach to producing gluconic acid from breadwaste. *Biotechnol Biofuels* **13**, 100. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01735-7>

Kashid MN, Renken A, Kiwi-Minsker L (2011) Gas-liquid and liquid-liquid mass transfer in microstructured reactors. *Chem Eng Sci* **66**, 3876–3897. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2011.05.015>

Khodaparast S, Mobarez AM, Saberifiroozi M (2019) A two-step approach for diagnosing glutamate dehydrogenase genes by conventional polymerase chain reaction from *Clostridium difficile* isolates. *Middle East J* **11**, 135–140. <https://doi.org/10.15171/mejdd.2019.139>

Kim DM, Kim MY, Reddy SS, Cho J, Cho CH, Jung S i sur. (2013) Electron-transfer mediator for a NAD-glucose dehydrogenase-based glucose sensor. *Anal Chem* **85**, 11643–11649. <https://doi.org/10.1021/ac403217t>

Laurenti E, dos Santos Vianna Jr. A (2016) Enzymatic microreactors in biocatalysis: history, features, and future perspectives. *Biocatalysis* **1**, 148-165. <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0008>

Lee J, Tatsumi A, Tsukakoshi K, Wilson ED, Abe K, Sode K i sur. (2020) Application of a glucose dehydrogenase-fused with zinc finger protein to label dna aptamers for the electrochemical detection of vegf. *Sensors* **20**, 1–10. <https://doi.org/10.3390/s20143878>

Li J, An H, Sasmito AP, Mujumdar AS, Ling X (2020) Performance evaluation of mass transport enhancement in novel dual-channel design of micro-reactors. *Heat Mass Transfer* **56**, 559–574. <https://doi.org/10.1007/s00231-019-02727-6>

Li J, Guo M, Jiao S, Wang Y, Luo G, Yu H (2017) A kinetic study of the biological catalytic hydration of acrylonitrile to acrylamide. *Chem Eng J* **317**, 699–706. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.02.100>

Lin K, Xia A, Huang Y, Zhu X, Cai K, Wei Z i sur. (2022) Efficient production of sugar via continuous enzymatic hydrolysis in a microreactor loaded with cellulase. *Chem Eng J* **445**, 136633. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.136633>

Lisdat F (2020) PQQ-GDH – Structure, function and application in bioelectrochemistry. *Bioelectrochemistry* **134**, 107496 <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107496>

Mei J, Zhao X, Yi Y, Zhang Y, Wang X, Ying G (2020) Preparation of astaxanthin by lipase-catalyzed hydrolysis from its esters in a slug-flow microchannel reactor. *Process Biochem* **98**, 241–246. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.017>

Menegatti T, Žnidaršič-Plazl P (2021) Hydrogel-Based Enzyme and Cofactor Co-Immobilization for Efficient Continuous Transamination in a Microbioreactor. *Front Bioeng Biotechnol* **9**, 752064. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.752064>

Nagy C, Szabo R, Gaspar A (2022) Microfluidic Immobilized Enzymatic Reactors for Proteomic Analyses—Recent Developments and Trends (2017–2021). *Micromachines* **13**, 311. <https://doi.org/10.3390/mi13020311>



Okuda-Shimazaki J, Kakehi N, Yamazaki T, Tomiyama M, Sode K (2008) Biofuel cell system employing thermostable glucose dehydrogenase. *Biotechnol Lett* **30**, 1753–1758. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9749-7>

Pavlović K, Škorić I, Zelić B, Šalić A, Gojun M, Ratković A (2019) Application of tubular meso- and micro-reactors in organic synthesis and photochemistry – Go With the Flow! *Kem ind* **68**, 477–485. <https://doi.org/10.15255/kui.2019.040>

Penkler G, Du Toit F, Adams W, Rautenbach M, Palm DC, Van Niekerk DD i sur. (2015) Construction and validation of a detailed kinetic model of glycolysis in *Plasmodium falciparum*. *FEBS J* **282**, 1481–1511. <https://doi.org/10.1111/febs.13237>

Pire C, Esclapez J, Ferrer J, Bonete M-J (2001) Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS Microbiol Lett* **200**, 221–227. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10719.x>

Plazl I, Lakner M (2010) Modeling and finite difference numerical analysis of reaction-diffusion dynamics in a Microreactor. *Acta Chem Slov* **57**, 100-109.

Pohar A, Plazl I, Žnidaršič-Plazl P (2009) Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl acetate in an ionic liquid/n-heptane two-phase system at the microreactor scale. *Lab Chip* **9**, 3385–3390. <https://doi.org/10.1039/b915151f>

Pongtharangkul T, Chuekitkumchorn P, Suwanampa N, Payongsri P, Honda K, Panbangred W (2015) Kinetic properties and stability of glucose dehydrogenase from *Bacillus amyloliquefaciens* SB5 and its potential for cofactor regeneration. *AMB Express* **5**, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13568-015-0157-9>

Potter ME, O'Malley AJ, Chapman S, Kezina J, Newland SH, Silverwood IP i sur. (2017) Understanding the role of molecular diffusion and catalytic selectivity in liquid-phase beckmann rearrangement. *ACS Catal* **7**, 2926–2934. <https://doi.org/10.1021/acscatal.6b03641>

Roberge DM, Ducry L, Bieler N, Cretton P, Zimmermann B (2005) Microreactor technology: A revolution for the fine chemical and pharmaceutical industries? *Chem Eng Technol* **28**, 318–323. <https://doi.org/10.1002/ceat.200407128>

Robinson PK (2015) Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* **59**, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>

Rodríguez-Llorente D, Liu Y, de Mello JC, García J, Larriba M (2023) Flow-based recovery of acetic acid from aqueous solutions using bio-derived terpenes as extracting solvents. *Sep Purif Technol* **324**, 124524. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2023.124524>

Rozova ON, Ekimova GA, Molochkov N V., Reshetnikov AS, Khmelenina VN, Mustakhimov II (2021) Enzymes of an alternative pathway of glucose metabolism in obligate methanotrophs. *Sci Rep* **11**, 8795. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88202-x>

Sainz F, Torija MJ, Matsutani M, Kataoka N, Yakushi T, Matsushita K i sur. (2016) Determination of dehydrogenase activities involved in D-glucose oxidation in *Gluconobacter* and *Acetobacter* strains. *Front Microbiol* **7**, 1358. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01358>

Šalić A, Tušek A, Kurtanjek Ž, Zelić B (2010) Mikroreaktori. *Kem Ind* **59**, 227-248.

Šalić A, Tušek A, Kurtanjek Ž, Zelić B (2011) Biotransformation in a Microreactor: New method for production of hexanal. *Biotechnol Bioproc Eng* **16**, 495-504. <https://doi.org/10.1007/s12257-010-0381-8>

Šalić A, Faletar P, Zelić B (2013) NAD<sup>+</sup> regeneration in a microreactor using permeabilized baker's yeast cells. *Biochem Eng J* **77**, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.05.007v>

Šalić A, Zelić B (2018) Synergy of microtechnology and biotechnology: Microreactors as an effective tool for biotransformation processes. *Food Technol Biotech* **56**, 464–479. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.04.18.5673>

Šalić A, Zelić B (2014) ADH-catalysed hexanol oxidation with fully integrated NADH regeneration performed in microreactors connected in series. *RSC Adv* **4**, 41714–41721. <https://doi.org/10.1039/c4ra05421k>

Šalić A, Zelić B (2022) A game changer: Microfluidic technology for enhancing biohydrogen production—small size for great performance. *Energies* **15**, 7065. <https://doi.org/10.3390/en15197065>

Sen B, Aravind J, Lin C-Y, Lay C-H, Hsieh P-H (2019) Biohydrogen production perspectives from organic waste with focus on Asia. *Biorefinery*, 413–435. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-10961-5_16)

Shah S, Sunder AV, Singh P, Wangikar PP (2020) Characterization and application of a robust glucose dehydrogenase from *Paenibacillus pini* for cofactor regeneration in biocatalysis. *Indian J Microbiol* **60**, 87–95. <https://doi.org/10.1007/s12088-019-00834-w>

Shrimal P, Jadeja G, Patel S (2020) A review on novel methodologies for drug nanoparticle preparation: Microfluidic approach. *Chem Eng Res Des* **153**, 728–756. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2019.11.031>

Sokač Cvetnić T, Šalić A, Benković M, Jurina T, Valinger D, Gajdoš Kljusurić J i sur. (2023) A Systematic review of enzymatic kinetics in microreactors. *Catalysts* **13**, 708. <https://doi.org/10.3390/catal13040708>

Stojković G, Plazl I, Žnidaršič-Plazl P (2011) L-Malic acid production within a microreactor with surface immobilised fumarase. *Microfluid Nanofluid* **10**, 627–635. <https://doi.org/10.1007/s10404-010-0696-y>

Sonagra AD, Zubair M, Motiani A (2024) Hexokinase Method. *StatPearls*, StatPearls Publishing.

Stredansky M, Redivo L, Magdolen P, Stredansky A, Navarini L (2018) Rapid sucrose monitoring in green coffee samples using multienzymatic biosensor. *Food Chem* **254**, 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.171>

Su Y, Kuijpers K, Hessel V, Noël T (2016) A convenient numbering-up strategy for the scale-up of gas–liquid photoredox catalysis in flow. *React Chem Eng* **1**, 73–81. <https://doi.org/10.1039/C5RE00021A>

Sun L, Sun B, Zhang Y, Chen K (2024) Kinetic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase and inhibition effects of several metal ions on enzymatic activity in vitro and cells. *Sci Rep* **14**, 5806. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56503-6>

Suryawanshi PL, Gumfekar SP, Bhanvase BA, Sonawane SH, Pimplapure MS (2018) A review on microreactors: Reactor fabrication, design, and cutting-edge applications. *Chem Eng Sci* **189**, 431–448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ces.2018.03.026>

Swarts JW, Kolfshoten RC, Jansen MCAA, Janssen AEM, Boom RM (2010) Effect of diffusion on enzyme activity in a microreactor. *Chem Eng J* **162**, 301–306. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2010.04.040>

Tang L, Chang SJ, Chen CJ, Liu JT (2020) Non-invasive blood glucose monitoring technology: A review. *Sensors-Basel* **20**, 1–32. <https://doi.org/10.3390/s20236925>

Tišma M, Zelić B, Vasić-Rački D, Žnidaršič-Plazl P, Plazl I (2009) Modelling of laccase-catalyzed L-DOPA oxidation in a microreactor. *Chem Eng J* **149**, 383–388. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.01.025>

Jurinjak Tušek A, Šalić A, Zelić B (2017) Catechol Removal from Aqueous Media Using Laccase Immobilized in Different Macro- and Microreactor Systems. *Appl Biochem Biotech* **182**, 1575–1590. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2419-2>

Jurinjak Tušek A, Tišma M, Bregović V, Ptičar A, Kurtanjek Ž, Zelić B (2013) Enhancement of phenolic compounds oxidation using laccase from *Trametes versicolor* in a microreactor. *Biotechnology and Bioprocess Eng* **18**, 686–696. <https://doi.org/10.1007/s12257-012-0688-8>

Jurinjak Tušek A, Valinger D, Šalić A, Gojun M, Zelić B (2019) Mathematical models for description of hydrodynamics, mass and heat transfer in microreactor systems. *Eng Power* **14**, 20-24.

Valinger D, Vrsalović Presečki A, Kurtanjek Ž, Pohl M, Findrik Blažević Z, Vasić-Rački D (2014) Continuous enzymatic carbonylation of benzaldehyde and acetaldehyde in an enzyme ultrafiltration membrane reactor and laminar flow microreactors. *J Mol Catal B Enzym* **102**, 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.02.003>

Van Der Helm MP, Bracco P, Busch H, Szymańska K, Jarzębski AB, Hanefeld U (2019) Hydroxynitrile lyases covalently immobilized in continuous flow microreactors. *Catal Sci Technol* **9**, 1189–1200. <https://doi.org/10.1039/c8cy02192a>

Vasić K, Knez Ž, Leitgeb M (2020) Immobilization of alcohol dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* onto carboxymethyl dextran-coated magnetic nanoparticles: a novel route for biocatalyst improvement via epoxy activation. *Sci Rep* **10**, 19478. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76463-x>

Vasilarou AMG, Constantinou AG (2000) Enzymatic spectrophotometric reaction rate determination of glucose in fruit drinks and carbonated beverages. An analytical chemistry laboratory experiment for food science-oriented students. *J Chem Educ* **77**, 1327-1329. <https://doi.org/10.1021/ed077p1327>

Verdnik A, Pintarič ZN, Kravanja Z (2022) Process intensification with microprocess engineering. *Chem Eng Trans* **94**, 589–594. <https://doi.org/10.3303/CET2294098>

Wang K, Li L, Xie P, Luo G (2017) Liquid–liquid microflow reaction engineering. *React Chem Eng* **2**, 611–627. <https://doi.org/10.1039/C7RE00082K>

Wang X, Wang Y, Li F, Li L, Ge X, Zhang S i sur. (2020) Scale-up of microreactor: Effects of hydrodynamic diameter on liquid–liquid flow and mass transfer. *Chem Eng Sci* **226**, 115838. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2020.115838>

Wang X, Xie Y, Wang Z, Zhang K, Wang H, Wei D (2022) Efficient synthesis of (*S*)-1-Boc-3-aminopiperidine in a continuous flow system using  $\omega$ -transaminase-immobilized amino-ethylenediamine-modified epoxide supports. *Org Process Res Dev* **26**, 1351-1359. <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.1c00217>

Weckbecker A, Hummel W (2005) Glucose dehydrogenase for the regeneration of NADPH and NADH. U: *Microbial Enzymes and Biotransformations*, Humana press, Totowa, New Jersey, str. 225-237.

Wijayanti SD, Tsvik L, Haltrich D (2023) Recent Advances in Electrochemical Enzyme-Based Biosensors for Food and Beverage Analysis. *Foods* **12**, 3355. <https://doi.org/10.3390/foods12183355>

Woodward J, Orr M (1998) Enzymatic conversion of sucrose to hydrogen. *Biotechnol Prog* **14**, 897–902. <https://doi.org/10.1021/bp980100x>

Xie N, Zhang L, Gao W, Huang C, Huber PE, Zhou X i sur. (2020) NAD<sup>+</sup> metabolism: pathophysiological mechanisms and therapeutic potential. *Sig Transduct Target Ther* **5**, 227. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00311-7>

Xie P, Lan J, Zhou J, Hu Z, Cui J, Qu G i sur. (2024) Co-immobilization of amine dehydrogenase and glucose dehydrogenase for the biosynthesis of (S)-2-aminobutan-1-ol in continuous flow. *Bioresour Bioprocess* **11**, 70. <https://doi.org/10.1186/s40643-024-00786-0>

Yan Q, Zhang X, Chen Y, Guo B, Zhou P, Chen B i sur. (2022) From semirational to rational design: Developing a substrate-coupled system of glucose dehydrogenase for asymmetric synthesis. *ACS Catalysis* **12**, 6746-6755. <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c00705>

Yoshida H, Sakai G, Mori K, Kojima K, Kamitori S, Sode K (2015) Structural analysis of fungus-derived FAD glucose dehydrogenase. *Sci Rep* **5**, 13498. <https://doi.org/10.1038/srep13498>

Young ME, Carroad PA, Bell RL (1980) Estimation of diffusion coefficients of proteins. *Biotechnol Bioeng* **22**, 947-955. <https://doi.org/10.1002/bit.260220504>

Yue J (2018) Multiphase flow processing in microreactors combined with heterogeneous catalysis for efficient and sustainable chemical synthesis. *Catal Today* **308**, 3–19. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2017.09.041>

Zanella A, Biral A (2013) Introducing purely hydrodynamic networking functionalities into microfluidic systems. *Nano Commun Netw* **4**, 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.nancom.2013.09.001>

Zhang SY, Fu GN, Du LH, Lin H, Zhang AY, Xie HJ i sur. (2024) Continuous flow biocatalysis: synthesis of purine nucleoside esters catalyzed by lipase TL IM from *Thermomyces lanuginosus*. *RSC Adv* **14**, 10953–10961. <https://doi.org/10.1039/d4ra00097h>

Zhang X, Zhao J, Wang C, Zhu L, Pan X, Liu Y i sur. (2023) Measurement of sucrose in beverages using a blood glucose meter with cascade-catalysis enzyme particle. *Food Chem* **398**, 133951. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133951>

Zhao S, Guo D, Zhu Q, Dou W, Guan W (2021) Display of microbial glucose dehydrogenase and cholesterol oxidase on the yeast cell surface for the detection of blood biochemical parameters. *Biosensors* **11**, 13. <https://doi.org/10.3390/bios11010013>

Zhu Y, Chen Q, Shao L, Jia Y, Zhang X (2020) Microfluidic immobilized enzyme reactors for continuous biocatalysis. *React Chem Eng* **5**, 9-32. <https://doi.org/10.1039/c9re00217k>

Zong J, Yue J (2022) Continuous solid particle flow in microreactors for efficient chemical conversion. *Ind Eng Chem Res* **61**, 6269-6291. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.2c00473>

## Sažetak

### Biotransformacija glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru

*Ana Stanić*

U okviru ovog rada provedeno je istraživanje biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru. Enzim glukoza dehidrogenaza (GDH) katalizira oksidaciju glukoze u glukonolakton, koji se hidrolizira u glukonsku kiselinu, a kofaktor za ovu reakciju je  $\text{NAD}^+$  ili  $\text{NADP}^+$ , koji se reducira. Drugi enzim, hidrogenaza, koristi kofaktor kao donor elektrona, što rezultira molekularnim vodikom i regeneracijom i recikliranje kofaktora. Svi eksperimenti u ovom radu provedeni su u laminarnom režimu strujanja ( $\text{Re} < 16$ ) primjenom vodenog dvofaznog sustava. Analiza efektivne difuzivnosti komponenta reakcijske smjese (glukoza,  $\text{NADH}$  i glukoza dehidrogenaza) pokazala je da glukoza i  $\text{NADH}$  difundiraju iz jedne u drugu fazu već pri vremenu zadržavanja od  $\tau = 0,6$  s, dok glukoza dehidrogenaza većinom ostaje u fazi u koji se uvodi i kod dužih vremena zadržavanja. Eksperimenti biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom u mikroreaktoru pri različitim ulaznim koncentracijama glukoze i koenzima  $\text{NAD}^+$  uspješno su provedeni, a rezultati su pokazali da promjena koncentracije glukoze ovisi o ulaznoj koncentraciji koenzima i vremenu zadržavanja u mikroreaktoru. Proces biotransformacije glukoze suspendiranim enzimom glukoza dehidrogenazom opisan je 2D matematičkim modelom koji uključuje konvekciju u smjeru strujanja, difuziju u dva smjera te biokemijske reakcije. Sustav parcijalnih diferencijalnih jednačbi riješen je primjenom triju metoda: (i) aproksimacijom sustava homogenim idealnim cijevnim reaktorom, (ii) aproksimacijom sustava s dva idealna paralelna cijevna reaktora te (iii) metodom konačnih razlika na ekvidistantnoj mreži. Na temelju dobivenih rezultata može se učiti da je najbolje slaganje između modela i eksperimenata dobiveno rješavanjem sustava parcijalnih diferencijalnih jednačbi metodom konačnih razlika ( $R^2 > 0,8666$ ). Rezultati pokazuju bolje slaganje eksperimenta i metode aproksimacije sustava parcijalnih diferencijalnih jednačbi homogenim idealnim cijevnim reaktorom ( $R^2 > 0,6104$ ), nego aproksimativna metoda temeljena na dvama idealnim paralelnim cijevnim reaktorima ( $R^2 > 0,4782$ ). Provedena je također kovalentna imobilizacija glukoza dehidrogenaze na stijenku mikrokanala mikroreaktora i na stijenku teflonskog cijevnog reaktora. Potvrđena je stabilnost imobiliziranog enzima i mogućnost njegove višestruke primjene kroz vremenski period od 216 sati. Dobiveni rezultati pokazuju značajan potencijal primjene mikroreaktora za provedbu procesa biotransformacije glukoze enzimom glukoza dehidrogenazom.

**Ključne riječi:** glukoza dehidrogenaza, biotransformacija glukoze, mikroreaktor, matematičko modeliranje



## Abstract

### Glucose dehydrogenase catalysed biotransformation of glucose in a microreactor

*Ana Stanić*

This study investigates the biotransformation of glucose by the enzyme glucose dehydrogenase (GDH) within a microreactor. GDH catalyzes the oxidation of glucose to gluconolactone, which subsequently hydrolyzes to gluconic acid. The cofactor for this reaction, either  $\text{NAD}^+$  or  $\text{NADP}^+$ , is reduced in the process. Another enzyme, hydrogenase, utilizes the reduced cofactor as an electron donor, leading to the production of molecular hydrogen and the regeneration of the cofactor. All experiments were conducted under laminar flow conditions ( $\text{Re} < 16$ ) using an aqueous two-phase system. The study includes an analysis of the effective diffusivity of the reaction components—glucose, NADH, and GDH. The findings demonstrate that glucose and NADH diffuse between phases at a retention time of  $\tau = 0.6$  s, while GDH largely remains in the phase into which it is initially introduced, especially at longer retention times. The biotransformation experiments were successfully performed at various input concentrations of glucose and the coenzyme  $\text{NAD}^+$  within the microreactor. The results indicated that glucose concentration changes are dependent on both the input concentration of the coenzyme and the retention time within the microreactor. A two-dimensional mathematical model was developed to describe the process of glucose biotransformation by the suspended GDH. This model incorporates convection in the flow direction, diffusion in two directions, and the biochemical reactions involved. The system of partial differential equations (PDEs) was solved using three methods: (i) approximation with a homogeneous ideal tubular reactor, (ii) approximation with two ideal parallel tubular reactors, and (iii) the finite difference method on an equidistant grid. The best agreement between the model and the experimental data was achieved using the finite difference method ( $R^2 > 0.8666$ ). The homogeneous ideal tubular reactor approximation also showed good agreement ( $R^2 > 0.6104$ ), outperforming the two parallel tubular reactors approximation ( $R^2 > 0.4782$ ). Additionally, covalent immobilization of GDH was performed on the microchannel walls of the microreactor and on the walls of a Teflon tube reactor. The immobilized enzyme demonstrated stability and reusability over a period of 216 hours. The results highlight the significant potential of microreactors in facilitating the biotransformation of glucose by GDH.

**Key words:** glucose dehydrogenase, glucose biotransformation, microreactor, mathematical modeling