

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

Katica Visković

**UTJECAJ KALCIJEVIH IONA NA STABILIZACIJU α -AMILAZE PRI
HIDROLIZI ŠKROBA**

Zagreb, 2009.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu pod vodstvom prof. dr.sc. Đurđe Vasić-Rački uz suradnju dr.sc. Ana Vrsalović Presečki i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2008/2009.

SIMBOLI

ABS - apsorbancija

c_0 – početna molarna koncentracija [mmol dm^3]

c_S – molarna koncentracija supstrata [mmol dm^3]

k_d – konstanta deaktivacije enzima [min^{-1}]

K_i – konstanta inhibicije [mmol dm^{-3}]

K_m – konstanta Michaelis-Menten [mmol dm^{-3}]

q – volumni protok [$\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$]

r – brzina reakcije [U cm^{-3} , U dm^{-3}]

V_m – maksimalna brzina reakcije [U cm^{-3}]

V – volumen [cm^3]

t – vrijeme [min]

T – temperatura [$^{\circ}\text{C}$]

Y – iskorištenje [-, %]

GRČKI SIMBOLI

φ – volumni omjer [$\text{cm}^3 \text{cm}^{-3}$]

SADRŽAJ

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 2 |
| 2.1. UGLJIKOHIDRATI..... | 2 |
| 2.2. BIOETANOL..... | 5 |
| 2.2.1. Proces dobivanja bioetanola..... | 6 |
| 2.3. ENZIMI..... | 7 |
| 2.3.1. Općenito o enzimima..... | 7 |
| 2.3.2. Podjela enzima..... | 9 |
| 2.3.3. Enzimi kao biološki katalizatori – prednosti i nedostaci..... | 10 |
| 2.4. AMILAZE..... | 10 |
| 2.5. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA..... | 12 |
| 2.5.1. Pregled kinetičkih modela..... | 13 |
| 2.5.2. Reaktorski modeli..... | 17 |
| 2.5.2.1. <i>Kotlasti reaktor</i> | 18 |
| 2.5.2.2. <i>Kotlasti reaktor s dotokom</i> | 19 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 20 |
| 3.1. APARATURA..... | 20 |
| 3.1.1. Stakleni kotlasti reaktor..... | 20 |
| 3.1.2. Spektrofotometar..... | 20 |
| 3.1.3. Kapljevinski kromatograf visokog učinka..... | 21 |
| 3.2. ANALITIČKE METODE..... | 21 |
| 3.2.1. Određivanje koncentracije škroba..... | 21 |
| 3.2.2. Određivanje koncentracije glukoze i maltoze..... | 22 |
| 3.2.3. Određivanje aktivnosti α -amilaza..... | 23 |
| 3.2.4. Kinetička karakterizacija α -amilaza..... | 23 |
| 3.3. OPIS PROVEDBE EKSPERIMENTATA U RAZLIČITIM TIPOVIMA REAKTORA..... | 24 |
| 3.3.1. Provedba hidrolize škroba u ponovljivom kotlastom reaktoru..... | 24 |
| 3.3.2. Provedba hidrolize škroba u kotlastom reaktoru sa dotokom supstrata..... | 24 |
| 3.4. OBRADA PODATAKA..... | 25 |
| 4. MATEMATIČKI MODEL | 26 |
| 4.1. KINETIČKI MODEL..... | 26 |
| 4.1.1. Deaktivacija enzima..... | 26 |
| 4.2. REKTORSKI MODEL..... | 27 |
| 4.2.1. Kotlasti reaktor i ponovljivi kotlasti reaktor..... | 27 |
| 4.2.2. Kotlasti reaktor s dotokom..... | 28 |
| 5. REZULTATI RAPRAVA | 29 |
| 5.1. KINETIKA α -AMILAZA..... | 29 |
| 5.2. HIDROLIZA ŠKROBA UZ α -AMILAZE - TERMAMYL I LIQUOZYME U REAKTORIMA..... | 30 |
| 5.2.1. Hidroliza škroba uz α -amilaze - Termamyl i Liquozyme u ponovljivom kotlastom reaktoru..... | 30 |
| 5.2.2. Hidroliza škroba uz α -amilaze - Termamyl i Liquozyme u kotlastom reaktoru s dotokom..... | 33 |
| 6. ZAKLJUČAK | 36 |
| 7. ZAHVALE | 37 |
| 8. POPIS LITERATURE | 38 |
| SAŽETAK | 40 |
| SUMMARY | 41 |
| PRILOZI | 42 |

1. UVOD

Uz svakodnevna bučna upozorenja na prijeteću krizu energije, lako je predvidjeti činjenicu da nam je nadohvat ruke energija dovoljna za sve naše potrebe. Bojazan za budućnost ipak nije nerazuman strah nekolicine pesimističnih umova. Čovječanstvo se, nesumljivo, mora odviknuti ovisnosti o fosilnim gorivima, kao što su nafta, ugljen i prirodni plin, i okrenuti se energiji iz obnovljivih goriva, koja uz to i manje zagađuju okoliš (Prentis,1985).

Sve se više govori o biogorivima, kao gorivima budućnosti, a proizvode se iz obnovljivih prirodnih izvora. Ekološki su prihvatljivija od fosilnih, ali im proizvodnja još uvijek nije sasvim ekonomski opravdana.

Primjer takvog goriva je bioetanol koji se može dobiti u procesima biotransformacija i fermentacijama iz kukuruznog škroba.

Svojstva i sposobnosti enzima kao bioloških katalizatora zaista zapanjuju. U industriju se uvodi, od ranih 1970-tih, sve veći broj procesa za sintezu posebnih i tradicionalnih kemikalija, agrokemijskih i farmaceutskih intermedijera a temelje se upravo na uporabi biokatalizatora i provedbi biotransformacija. Tako se danas u svijetu provodi preko 200 industrijskih procesa u kojima se oni upotrebljavaju.

Već su te činjenice dovoljne da opravdaju veliko zanimanje za razvoj novih tehnologija koje koriste biokatalizatore za proizvodnju nama potrebnih tvari. Osim toga, uporaba biokatalizatora u kemijskoj industriji se ubraja u jednu od čistijih tehnologija, a i njihova primjena se stalno širi jer omogućava provedbu industrijskih procesa uz smanjenje otpada, uporabu obnovljivih sirovina i potpunu konverziju toksičnih sirovina. Bez dvojbe će zbog toga industrijska primjena biokatalizatora i dalje rasti.

Ograničavajući faktor upotrebe enzima u industrijskim procesima jest njihova nestabilnost. Stoga je vrlo važno za daljnje povećanje uporabe enzima u industriji, poboljšati operacijsku stabilnost enzima, odnosno učiniti enzime aktivnima kroz dulji period vremena (Lim et al.2003).

2. OPĆI DIO

2.1. UGLJIKOHIDRATI

Ugljikohidrati predstavljaju jednu od važnih skupina organskih spojeva koji se mogu naći u prirodi. Izolacija, čišćenje i prerada ugljikohidrata osnovna je djelatnost mnogih važnih grana industrije.

Ugljikohidrati su spojevi kojima je molekulska formula $C_m(H_2O)_n$, pa su prema tome hidrati ugljika.

Međutim naziv «ugljikohidrat» u širem smislu se pripisuje tvarima koje su sastavljene od polihidroksialdehida i ketona, te njihovih derivata.

Monosaharidi su ugljikohidrati koji obično imaju 3-9 ugljikovih atoma. Najpoznatiji su D-glukoza, D-fruktoza i D-galaktoza.

D-glukoza je najčešći monosaharid, a vjerojatno i najrašireniji organski spoj u prirodi. Nalazi se u krvi (krvni šećer), u voćnim sokovima (groždani šećer), a također je glavna monosaharidna komponenta mnogih oligosaharida i polisaharida.

Glukoza se dobiva hidrolizom škroba, nakon čega kristalizira iz vodene otopine. Ostatak nakon kristalizacije je melasa koja se sastoji od 65% D-glukoze i 35% disaharida i oligosaharida.

D-fruktoza je monosaharid, izomer glukoze, sastojak voćnih šećera i meda.

Disaharidi su ugljikohidrati koji se sastoje od dvije monosaharidne jedinice povezane glikozidnim vezama. Najpoznatiji su maltoza, laktoza, saharoza i celobioza.

Maltoza se dobiva djelomičnom hidrolizom škroba. Daljna hidroliza pokazuje da se maltoza sastoji iz dviju molekula D-glukoze.

Saharoza, obični stolni šećer, se sastoji od međusobno povezanih monosaharida D-glukoze i D-fruktoze.

Laktoza dolazi u mlijeku sisavaca a sastoji se od D-galaktoze i D-glukoze.

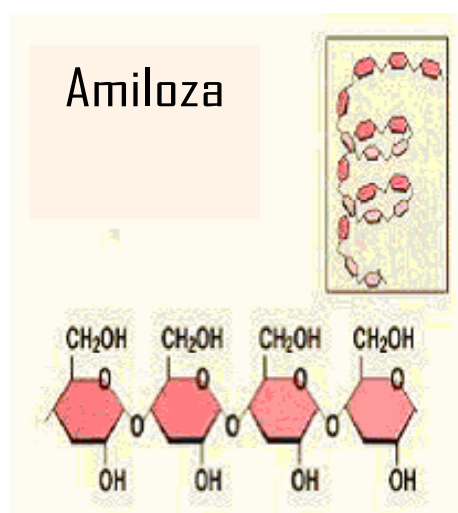
Oligosaharidi su ugljikohidrati koji se sastoje od 3-9 monosaharidnih jedinica. Oni su prijelazna faza kad se iz škroba kao konačni proizvod dobiva glukoza.

Polisaharidi su ugljikohidrati u kojima ima više od 10 monosaharidnih jedinica. Dva najraširenija polisaharida u biljnom svijetu su škrob i celuloza (Pine, 1994).

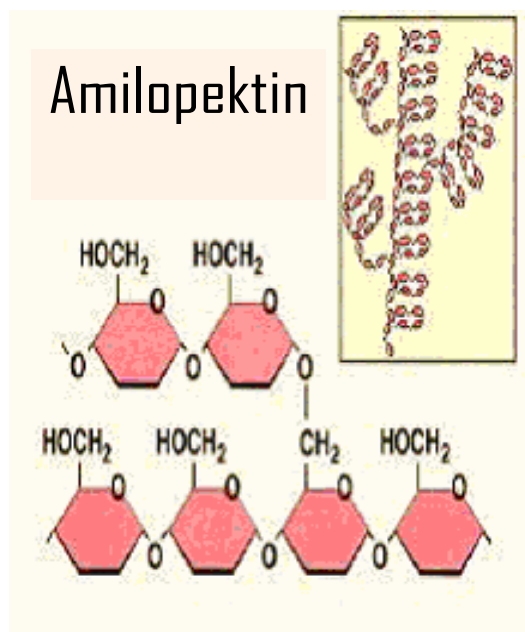
Škrob je biljni rezervni materijal, koji se osobito mnogo nakuplja u sjemenkama (žito) i gomoljima (krumpir) u obliku škrobnih zrnaca (Karlson 1984). Maseni udio škroba u riži je 62-82%, u kukuruzu 65-72%, u pšenici 57 –75% i u gomolju krumpira 12-24%. Škrob se najčešće sastoji od 25 % nerazgranatog polisaharida, amiloze, i 75% razgranatog dijela koji se naziva amilopektin.

Amiloza je linearni polimer. Sastoji se od nerazgranatih lanaca u kojima se molekule α -D-glukoze vežu $\alpha(1,4)$ -glikozidnim vezama. Osnovna jedinica je, prema tome, maltoza, a između maltoznih jedinica nalazi se opet $\alpha(1,4)$ -glikozidna veza. Zbog te veze molekula nije izdužena, već je lanac u obliku uzvojnice (Slika 2.1).

Amiloza je slatkog okusa i netopljiva u vodi, a sadrži prosječno 200 glukoznih jedinica.



Slika 2.1. Nerazgranata struktura amiloze



Slika 2.2. Razgranata struktura amilopektina

Amilopektin ima razgranatu strukturu. Molekule glukoze osim $\alpha(1,4)$ -glikozidnim vezama vežu se još na mjesto grananja $\alpha(1,6)$ -glikozidnim vezama. Lanac se grana u prosjeku nakon svakih 25 jedinica glukoze (slika 2.2), a sadrži prosječno oko 1000 glukoznih jedinica.

Amilopektin je s obzirom na amilozu topljiv u vodi i nije sladak, a sadrži prosječno oko 1000 glukoznih jedinica.

Škrob se upotrebljava kao sirovina za proizvodnju industrijskih produkata.

Sastavne makromolekule škroba su pakirane u kompaktnom obliku, što rezultira inertnim i netopljivim zrnima. Zrnca škroba su dobro komplementirana za ulogu skladištenja. Iako su netopljiva u vodi i zbijeno pakirana, još su uvijek dostupna za biljne metaboličke enzime. Upotreba škroba kao sirovine u industriji obično zahtijeva prethodan raskid inertne strukture zrnca, što uključuje dopunske procesne korake.

Želatiniranje uvelike povećava cijepanje inertne strukture zrnca. Do tog procesa dolazi grijanjem suspenzije škroba iznad kritične temperature pri kojoj zrnca škroba nabubre i počinju se topiti (Christopher G. Oates et al., 1997).

2.2. BIOETANOL

Bioetanol je etanol proizveden iz biomase i/ili biorazgradive frakcije otpada, a koristi se kao biogorivo (Direktiva 2003/30EC-članak 2).

Etanol se može proizvoditi iz tri osnovne vrste biomase:

- šećera (od šećerne trske, melase)
- škroba (od kukuruza)
- celuloze (od drva, poljoprivrednih ostataka)

Kukuruz i riža imaju najveći potencijal u proizvodnji bioetanola zbog najvišeg iskorištenja na etanolu (Nigam & Agrawal, 2004) .

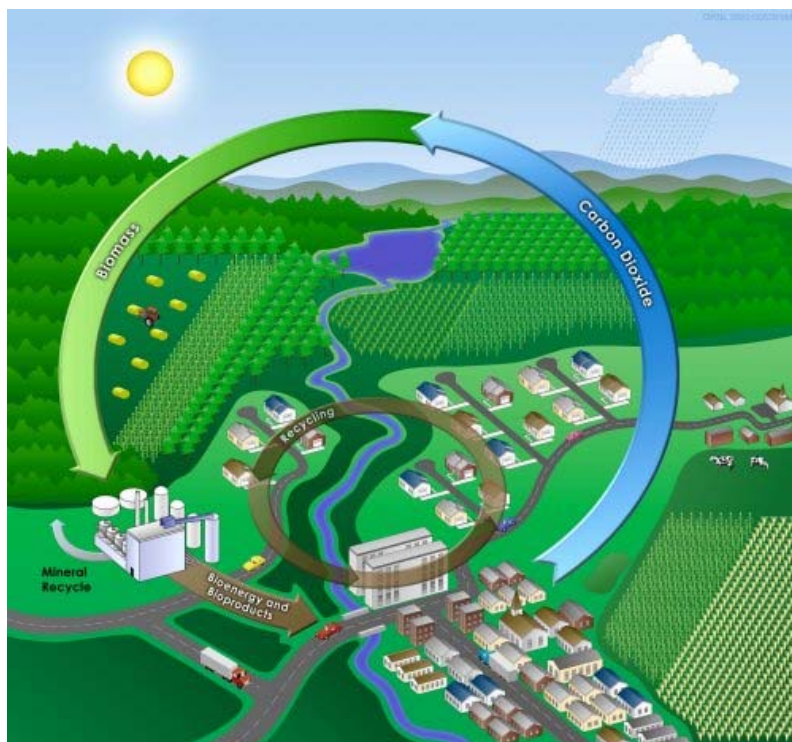
U posljednjih nekoliko godina proizvodnja i potrošnja biogoriva raste i sve više zamjenjuje fosilna goriva. Prednost bioetanola nad konvencionalnim fosilnim gorivom leži u obnovljivosti izvora iz kojih nastaje. Najintenzivnija im je proizvodnja u Brazilu i SAD-u.

Bioetanol predstavlja alternativu benzinu (Slika 2.3), a najčešće se koristi u pet i desetpostotnim mješavinama s benzinom, a može i čisti. Za dodavanje više od 18 posto bioetanola u benzin, te za upotrebu čistog treba napraviti manje preinake na automobilima starijim od deset godina. Motori koji koriste bioetanol imaju bolje izgaranje, sadrže manje krutih čestica, a ispušni plinovi nemaju neugodan miris.



Slika 2.3. Bioetanol kao zamjena za benzin

Korištenje samoobnovljivih goriva može smanjiti atmosferski ugljik dioksid, zato što se više CO₂ apsorbira u biljkama nego što ga nastaje proizvodnjom i upotrebom biogoriva (Slika 2.4.).(<http://www.tportal.hr/automobili/autozona/fset.html>)



Slika 2.4. Zatvoreni krug ispuštanja ugljika u atmosferu i uzimanja ugljika iz atmosfere kod biogoriva

2.2.1. Proces dobivanja bioetanola

Proces proizvodnje bioetanola iz kukuruznog škroba se može podijeliti u nekoliko faza (Slika 2.5.)

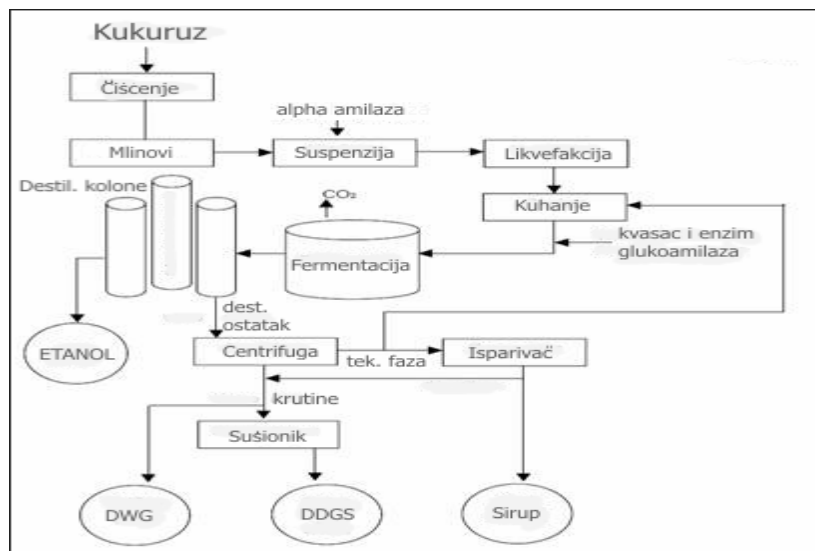
Prva faza je priprema samog kukuruznog zrna, odnosno mljevenje.

Druga faza je proces hidrolize kukuruznog škroba do glukoze. Konvencionalna enzimatska hidroliza uključuje likvefakciju i saharifikaciju škroba, koje uključuju temperaturu iznad 90° C da bi pregrijale i otopile zrnca škroba. (Lim et al. 2003)

Likvefakcija je proces kojim se molekule škroba hidroliziraju do molekula oligosaharida, maltoze, te u manjim koncentracijama glukoze i dekstrina (Paolucci- Jeanjean et al. 2000)

Likvefakcija se provodi uz enzim α -amilazu. Saharifikacija je proces kojim se molekule oligosaharida hidroliziraju do molekula glukoze uz enzime glukoamilazu i pululanazu, a odvija se zasebno ili za vrijeme fermentacije (Marotta et al. 2002). Fermentacija glukoze se provodi uz djelovanje kvasca *Saccharomyces cerevise* (obični pekarski kvasac) u bioreaktorima, te nakon 24-72 sata nastaje 8-10%-tni etanol.

Posljednja faza u proizvodnji bioetanola je destilacija koja se provodi u nekoliko faza nakon kojih nastaje 95% etanol. Da bi se dobio potpuno čisti etanol, kakav se koristi za miješanje s benzinom, dodaje se benzen i nastavlja destilacija te se dobiva 99,8% -tni etanol.



Slika 2.5. Način dobivanja etanola suhim postupkom

2.3. ENZIMI

2.3.1. Općenito o enzimima

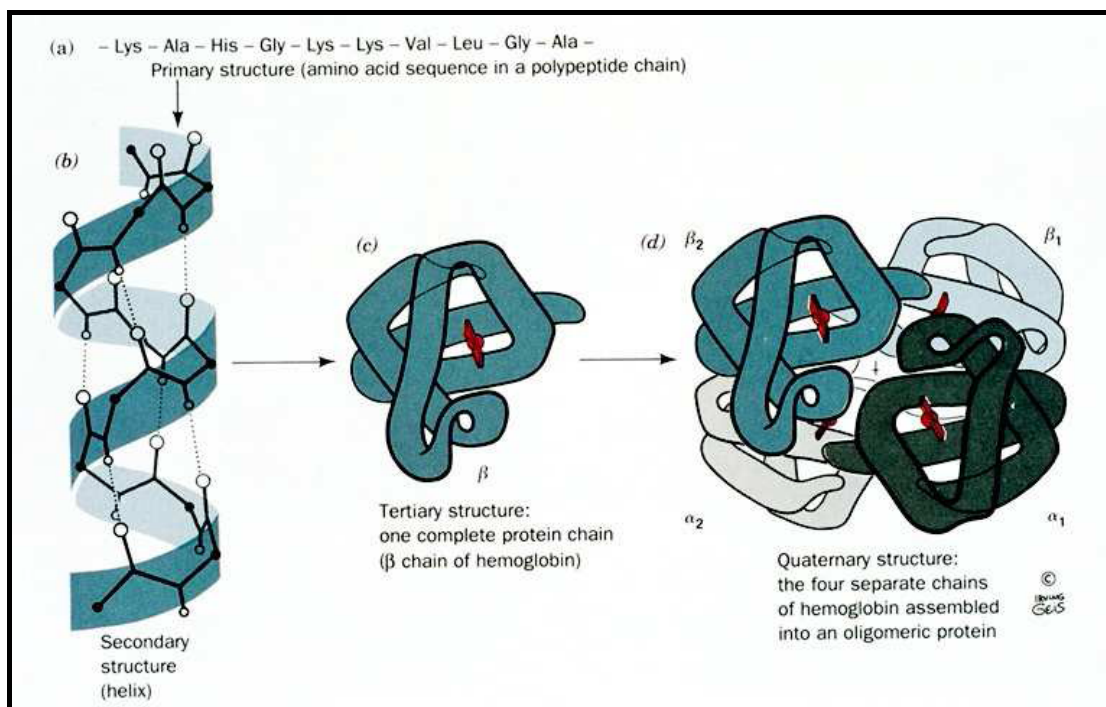
Enzimi ili, kako su se prije zvali, fermenti, biološki su vrlo važna skupina proteina.

Oni su biološki katalizatori (biokatalizatori), povećavaju brzinu reakcije ali ne utječu na kemijsku ravnotežu.

U prvoj polovici 19. stoljeća počela su znanstvena istraživanja enzimskih hidroliza.

Kühne (1878) je predložio da se katalizatori koji djeluju sasvim kemijski nazovu enzimima, prema grčkom *zyme* = kvasac. Otkrićem alkoholnog vrenja in vitro (Buchner, 1897) enzimologija je dobila snažan poticaj. Koristeći se metodom proteinske kemije, dobiveno je dosad mnogo stotina enzima u kristaliziranu stanju, a prvi enzim izoliran u kristalnom obliku bila je ureaza, a izolirao ga je Sumner još davne 1926. godine. Mnogim enzimima određen je redosljed (sekvencija) aminokiselina, odnosno primarna struktura. Pod sekundarnom strukturom podrazumjeva se prostorni raspored samog peptidnog lanca, pod tercijarnom

strukturom prostorni položaj svih atoma. Kvarternom strukturom označava se agregacija od više peptidnih lanaca u definiranu molekulu (Slika 2.6.).



Slika 2.6. Različite strukture enzima

Za katalitičko djelovanje odgovorno je aktivno središte koje nastaje od određenih dijelova polipeptidnog lanca posebnim nabiranjem. Pri denaturaciji razara se konformacija. Zbog toga se gubi katalitičko djelovanje iako je sekvencija aminokiselina ostala očuvana.

Za samu katalizu bitno je snižavanje energije aktivacije, to se postiže uzajamnim djelovanjem proteinskog dijela enzima sa supstratom koji se povezuju u kompleks enzim-supstrat (Karlson, 1984).

Enzimi djeluju vrlo specifično. Ako enzim katalizira reakciju samo sa jednim određenim supstratom, kažemo da pokazuje apsolutnu specifičnost. Ako pak katalizira reakciju u kojoj se pojavljuje supstrat sa određenom atomskom skupinom, kažemo da se radi o grupnoj specifičnosti. Najniži stupanj specifičnosti je opisan reakcijskom specifičnosti koji označava da enzim katalizira određeni tip reakcije bez obzira na grupe atoma koje se nalaze u okolišu. Poznato je da pojedini enzimi kataliziraju reakcije samo sa određenom stereokemijskom formom supstrata. Takvi su enzimi poznati kao stereospecifični.

2.3.2. Podjela enzima

Internacionalna Unija Biokemije i Molekularne Biologije (IUBMB) razlikuje gotovo 4000 enzima i kategorizira ih koristeći enzimsku nomenklaturu. Broj postojećih enzima u prirodi kreće se oko 25000, a do sada ih je izolirano preko 3000. Enzime se može naći u životinjskom i biljnom svijetu, te u vlaknastim gljivama, kvascima i bakterijama. Prirodni ili rekombinantni mikroorganizmi proizvode široki spektar korisnih enzima s razlikama u specifičnosti prema supstratu, brzini reakcije, toplinskoj stabilnosti i optimalnoj pH vrijednosti.

Enzime klasificiramo na osnovu reakcije koju kataliziraju u šest osnovnih skupina (Loughlin, 2000), (Tablica 2.1)

Tablica 2.1. Klasifikacija enzima

| Naziv | Vrsta reakcije |
|-----------------|---|
| oksidoreduktaze | Oksidacija-redukcija |
| transferaze | Prijenos skupina |
| hidrolaze | Reakcije hidrolize |
| liaze | Adicija ili eliminacija skupina radi stvaranja dvostruke veze |
| izomeraze | Izomerizacija (intramolekulski prijenos skupina) |
| ligaze | Vežanje dvaju supstrata na teret hidrolize ATP |

Od svih enzima, hidrolaze se najviše primjenjuju u industrijskim biotransformacijama. Hidrolaze djeluju bez koenzima, a za njihovu aktivnost često su potrebni metalni ioni (Karlson, 1984).

Oksidoreduktaze za svoju aktivnost zahtijevaju koenzim zbog čega industrijske biotransformacije moraju uključivati proces za njegovo učinkovito regeneriranje. Transferaze i ligaze trenutno imaju puno važniju ulogu u prirodi, nego u industriji, dok se liaze i izomeraze, zbog svojih jedinstvenih svojstava, koriste u raznim industrijskim segmentima.

Obzirom na topljivost enzima u radnom mediju razlikujemo one koji su otopljeni u vodi i koriste se jednokratno, te one koji se prevode u oblik u kojem se mogu višekratno koristiti, tzv. imobilizirani enzimi. Prednost imobiliziranih enzima je u mogućnosti višekratne upotrebe, jer su prevedeni u oblik koji nije topljiv u reakcijskom mediju i stoga imaju veću stabilnost, lakše se izdvajaju iz reakcijskog medija, te se koriste u kontinuiranim procesima. Zanimljivi su s ekonomskog, ekološkog i toksikološkog stajališta (Katchalski et al. 2000).

Općenito je pravilo da se jeftini enzimi ne koriste u imobiliziranom obliku jer je to preskupo za industrijsku uporabu (Ashter et al. 1993).

2.3.3. Enzimi kao biološki katalizatori – prednosti i nedostaci

Enzimi imaju mnogo izrazitih prednosti pred konvencionalnim kemijskim katalizatorima. Kataliziraju reakcije u vrlo uskom području reaktanata (supstrata), koje se može sastojati od malog broja komponenata slične grupe, jedne grupe komponenata ili samo jedne komponente. To znači da se katalizira isključivo izabrana reakcija, eliminirajući pri tome mogućnost stvaranja nepoželjnih sporednih produkata. Na taj način povećava se produktivnost. Također, dobiva se vrlo čisti produkt čime se smanjuju troškovi izolacije, a samim time i opterećenje okoliša koje taj postupak uzrokuje. Najčešće je potreban vrlo mali broj koraka da se proizvede konačni željeni produkt. Prema tome enzimi su katalizatori koji su u mogućnosti prihvatiti različite kompleksne molekule kao supstrate i vrlo selektivno katalizirati regio i stereoreakcije. Biokatalizatori se mogu koristiti u jednostavnim i kompleksnim transformacijama bez potrebe za blokirajućim i deblokirajućim koracima koji su osnova u regio i enantiselektivnoj organskoj sintezi. Takva visoka selektivnost omogućava visoku efikasnost prilikom provođenja reakcija sa vrlo malo sporednih produkata što enzime čini ekološki prihvatljivom alternativom kemijskim katalizatorima (Schmid et al. 2001).

Druga, ali i ne manja važna prednost enzima je što za razliku od kemijskih katalizatora kataliziraju reakcije u blagim uvjetima (sobna temperatura, atmosferski tlak i neutralni pH), pa se u većinu enzimatskih procesa ulaže malo energije, što vodi do nižih cijena.

Osim toga, enzimi su prihvatljiviji za okoliš. Naime, enzimi su proteini, te su kao takvi potpuno biorazgradljivi.

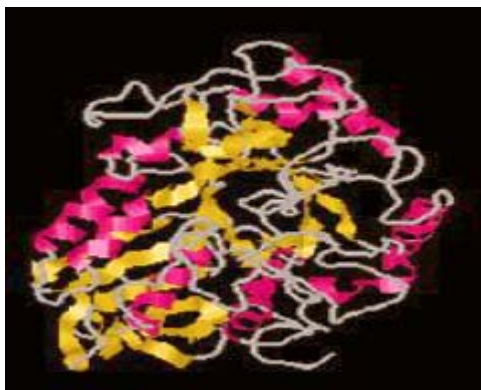
Enzimi pokazuju i visoku katalitičku učinkovitost.

Iako biokemičari i mikrobiolozi već dugo smatraju da je biokataliza obećavajuće područje za kemijsku sintezu, njezina primjena u industriji je ograničena (Schmid et al. 2001). Glavni razlozi su visoka cijena izoliranih enzima, nestabilnost, te dostupnost u malim količinama. Također, enzimi su topljivi u vodi, te ih je teško i skupo separirati iz reakcijske smjese na kraju katalitičkog procesa (D'Souza 1999).

2.4. AMILAZE

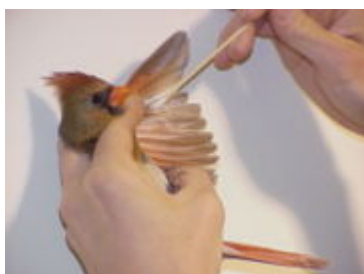
Amilaze su grupa enzima koji su sposobni katalizirati hidrolizu glikozidnih veza nađenih u škrobu. Mogu se dobiti iz različitih izvora jer su prisutne u velikom broju živih organizmima. Amilaze su jedna od najvažnijih grupa enzima u području biotehnologije. Razlikujemo tri

vrste amilaza: α -amilaza, β -amilaza i glukoamilaza. α -amilaze se najviše primjenjuju u industriji (Bravo Rodriguez et al. 2006), (Slika.2.7.).



Slika 2.7. Struktura α -amilaza

α -amilaza (1,4- α -D-glukan glukanohidrolaza EC 3.2.1.1) djeluje na velike polimere škroba na unutrašnjim lancima i cijepa ih na kratke polimere glukoze. α -amilaza katalizira hidrolizu unutrašnjih α -(1,4) glikozidnih veza polisaharida koji sadrže 3 ili više α -(1,4) povezanih D-glukoza, proizvodeći pritom dekstrin, oligosaharide, maltozu i D-glukozu. α -Amilaza izolirana iz bakterija ima široku primjenu u industrijskoj proizvodnji alkohola i glukoznog sirupa iz škroba (Van der Maarel et al. 2002). Pošto je škrob topiv pri višim temperaturama (oko 100° C), od velike je važnosti za industrijsku primjenu da α -amilaza bude termostabilna (Violet et al. 1989). α -amilaza iz *Bacillus licheniformis* (Slika 2.8.) pokazuje najveću stabilnost na visokim temperaturama (Buckow et al. 2006).



Slika 2.8. *Bacillus licheniformis* se obično nalazi na ptičjem perju

α -Amilaze pripadaju grupi mataloenzima koje sadrže očuvan kalcijev ion. Kalcij je zadužen za očuvanje strukturne cjelovitosti enzima (Vallee et al. 1959), na način da pomaže stabiliziranju tercijarne strukture enzima (Lim et al. 2003).

Uklanjanje kalcija iz enzima rezultira promjenama u sekundarnoj i tercijarnoj strukturi (Bush et al. 1989), smanjenjem termostabilnosti (Nielsen et al. 2003) i enzimatske aktivnosti (Bozonnet et al. 2003). Nijedan drugi metalni ion, pa ni supstrat nema tako pozitivan efekt na termostabilnost α -amilaza kao kalcij.

2.5. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA

Modeliranje kao princip reakcijskog inženjerstva pronalazi važnu ulogu u proučavanju enzimskih reakcija (Straathof 2001), te je za očekivati da će se njegova uloga povećati sa povećanom uporabom biokatalize. Sam matematički model sustava se može definirati kao matematički izraz (matematičke jednadžbe, računalni programi) kojima se određuje interakcija okoline (ulazne veličine) i stanja sustava (veličine stanja) sa svrhom upravljanja (izlazne veličine).

Model reaktora se sastoji od kinetičkog modela i reaktorskog modela. Za određivanje kinetičkog modela bilo je potrebno odrediti enzimске kinetičke parametre koji se procijenjuju iz izraza za brzinu reakcije. Procjena se temelji na matematičkoj obradi eksperimentalnih podataka dobivenih provođenjem enzimski katalizirane reakcije. Kinetika enzimski katalizirane reakcije se uobičajeno određuje prateći promjenu početne brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata. Pošto akumulacija produkta, nestajanje supstrata, te promjena pH vrijednosti u vremenu mogu utjecati na kinetiku enzimski katalizirane reakcije, metoda procjene kinetičkih parametara iz serije eksperimentalnih podataka koncentracija-vrijeme nije najbolje rješenje.

Kontinuirani procesi imaju visoku produktivnost kao rezultat dugotrajnog rada bez potrebe za zaustavljanjem, pražnjenjem i ponovnim punjenjem reaktora. Oni također omogućuju dobivanje produkta konstantne kvalitete, a rad u stacionarnom stanju omogućuje olakšanu kontrolu procesa. Protočno kotlasti reaktor je povoljan za reakcijske sustave inhibirane supstratom zato jer radi pri uvjetima izlazne koncentracije kod koje je koncentracija supstrata

kod visokih konverzija niska. Time se smanjuje deaktivacija enzima. Međutim s druge strane ovaj tip reaktora nije povoljan za reakcije inhibirane produktom.

2.5.1. Pregled kinetičkih modela

Kinetički model enzimske reakcije je matematički izraz koji opisuje vezu između brzine enzimske reakcije i veličina stanja reakcijskog sustava: koncentracije, temperature i/ili tlaka. Kinetički model se postavlja na temelju eksperimentalnih kinetičkih istraživanja.

Brzina reakcije katalizirane otopljenim enzimom može se opisati Michaelis-Menteničinim kinetičkim izrazom koji se može opisati jednadžbama 2.1. i 2.2.:



Gdje je E enzim, S supstrat, P produkt, a ES predstavlja kompleks između enzima i supstrata. Brzine reakcije za supstrat S i kompleks enzim-supstrat ES su dane jednadžbama 2.3. i 2.4.

$$\frac{dc_S}{dt} = -k_1 \cdot c_S \cdot c_E + k_2 \cdot c_{ES} \quad (2.3.)$$

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 \cdot c_S \cdot c_E - (k_2 + k_3) \cdot c_{ES} \quad (2.4.)$$

Uz početni uvjet $t=0$ slijedi da je $c_S=c_{S0}$, a $c_{ES}=0$. Koncentracija enzima je obično puno niža od koncentracije supstrata, pa je većina enzima prisutna tijekom reakcije vezana u obliku kompleksa enzim-supstrat. Analitičko rješenje jednadžbi 2.3. i 2.4. je moguće pretpostavivši stacionarno stanje za kompleks enzim-supstrat, odnosno:

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = 0 \quad (2.5.)$$

što vrijedi ako je koncentracija enzima puno manja od početne koncentracije supstrata. Koristeći ukupnu bilancu enzima (jednadžba 2.6.) gornje jednadžbe se mogu riješiti za nepoznate koncentracije enzima i kompleksa enzim-supstrat.

$$c_{E0} = c_E + c_{ES} \quad (2.6.)$$

Kao rezultat se dobiju jednadžbe 2.7. i 2.8.

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot c_S \cdot c_E}{k_2 + k_3} \quad (2.7.)$$

$$c_E = c_{E0} - \frac{k_1 \cdot c_S \cdot c_E}{k_2 + k_3} = c_{E0} \frac{k_2 + k_3}{k_2 + k_3 + k_1 \cdot c_S} \quad (2.8.)$$

Supstitucijom c_S i c_{ES} izraz za brzinu supstrata postaje:

$$-\frac{dc_S}{dt} = \frac{k_3 \cdot c_S \cdot c_{E0}}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + c_S} \quad (2.9.)$$

iz čega slijedi Michaelis-Menteničin kinetički izraz dan jednadžbom 2.10.

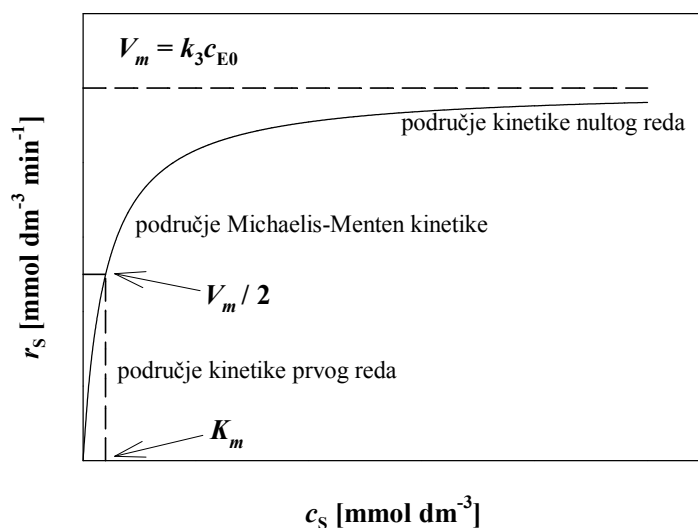
$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S} \quad (2.10.)$$

gdje je r_S brzina potrošnje supstrata, c_S koncentracija supstrata (mmol/dm^3), V_m maksimalna brzina reakcije ($\text{mmol}/\text{dm}^3 \text{ min}$), a K_m^S Michaelis-Menteničina konstanta (mmol/cm^3).

Parametar V_m pokazuje ovisnost o koncentraciji enzima (jednadžba 2.11.), a K_m^S ovisi o konstantama brzina reakcije danih u jednadžbama 1 i 2 .

$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.11.)$$

$$K_m^S = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.12.)$$



Slika 2.9. Ovisnost reakcije brzine o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menteničine kinetike

Michaelis-Menteničina jednadžba pokazuje tri različita područja brzine reakcija (Slika 2.9.):

1. Područje kinetike prvog reda
2. Područje Michaelis-Menteničine kinetike
3. Područje kinetike nultog reda

Pri vrlo niskim i vrlo visokim koncentracijama supstrata ovisnost reakcijske brzine r_s o koncentraciji supstrata c_s je linearna.

Područje niskih koncentracija supstrata ($c_s \ll K_m^S$) se može aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda, a područje visokih koncentracija supstrata ($c_s \gg K_m^S$) se može aproksimirati kinetikom reakcije nultog reda.

Ovaj model ne uključuje postojanje inhibicije supstratom i produktom. Inhibicija je pojava kada pojedini kemijski spoj (inhibitor) svojom prisutnošću smanjuje brzinu enzimski katalizirane reakcije, obično zbog vezanja na aktivno mjesto. Postoje tri tipa inhibicije:

1. kompetitivna inhibicija (2.13.)
2. nekompetitivna inhibicija (2.14.)
3. antikompetitivna inhibicija (2.15.) je kombinacija kompetitivne i nekompetitivne inhibicije

Koncentracija tvari koja je inhibitor je dana sa c_I , pri čemu to može biti i supstrat i produkt.

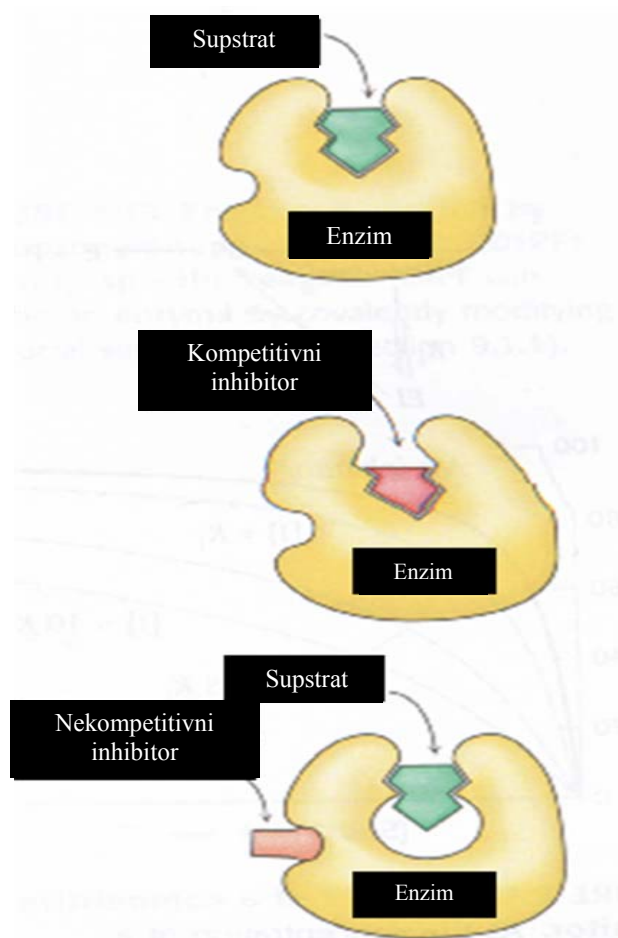
$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S \cdot (1 + c_I/K_i) + c_S} \quad (2.13)$$

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{(1 + c_I/K_i) \cdot (K_m^S + c_S)} \quad (2.14)$$

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S \cdot (1 + c_I/K_i)} \quad (2.15)$$

Kompetitivni inhibitori (Slika 2.10.) su najčešće slični molekuli ili dijelu molekule supstrata te se vežu na aktivno mjesto supstrata. Dakle, kompetitivni inhibitori smanjuju brzinu reakcije, tako da smanjuju udio molekula enzima koje mogu vezati supstrat, što se očituje u „prividnom“ povećanju vrijednosti K_m . Kod nekompetitivne inhibicije (Slika 2.10.) inhibitor se ireverzibilno veže na aktivno mjesto enzima ili može promijeniti oblik enzimu, povezivanjem na mjesto različito od aktivnog mjesta, te na taj način ometati vezanje supstrata za aktivno mjesto (Duraković 1996).

Vrlo često u enzimski kataliziranim sustavima dolazi i do deaktivacije enzima. To je pojava smanjenja enzimске aktivnosti iz poznatog ili nepoznatog razloga. Naime, vrlo često se enzimi deaktiviraju zbog promjene strukture proteinske molekule radi povišenja temperature, nagle promjene pH vrijednosti, visokog tlaka u sustavu, prevelike brzine mješanja ili pak prisustva neke komponente u sustavu koja na enzim djeluje deaktivirajuće.



Slika 2.10. Prikaz kompetitivnog i nekompetitivnog inhibitora

2.5.2. Reaktorski modeli

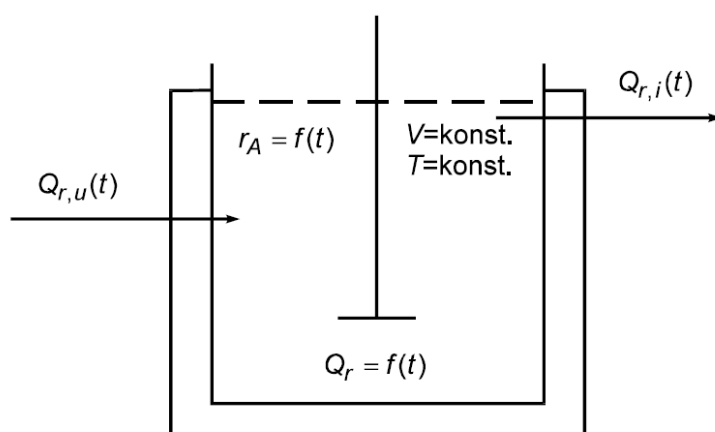
Bioreaktor je procesni uređaj u kojemu se provodi bioproces te se koristi za proizvodnju biomase, bioproducta pomoću mikroorganizama ili animalnih stanica i za biotransformacije pomoću enzima. Danas postoje više različitih izvedbi reaktora za bioprocese, no izbor se može svesti na tri temeljna tipa bioreaktora: kotlasti (šaržni), protočno kotlasti i cijevni reaktor i to najčešće s nepokretnim slojem biokatalizatora.

Kriteriji za izbor bioreaktora su: tip reakcijskog medija, tip kinetike i oblik biokatalizatora. Vrlo važno je da bioreaktor mora biti optimiran da bi se postigla visoka produktivnost tj. da se proizvede što više produkta po jedinici reaktorskog volumena, jedinici enzimske aktivnosti primijenjenog biokatalizatora i jedinici vremena (Vasić-Rački 1990). Pomoću ekonomskih (konačna cijena proizvodnje produkta) ili ekoloških parametara se određuje optimalni tip, veličina i konfiguracija bioreaktora za industrijsku proizvodnju.

2.5.2.1. Kotlasti reaktor

Kotlasti reaktor (Slika 2.11.) se često susreće u industriji za provedbu velikog broja reakcija, pretežno u kapljevitoj fazi. Obično je konstruktivno izveden u obliku kotla snabdjevenog sa miješalicom i plaštom za grijanje ili hlađenje. Osim naziva kotlasti reaktor upotrebljavaju se i izrazi "šaržni reaktor" ili na engleskom jeziku "batch reactor".

Jedna od osnovnih značajki kotlastog reaktora je da se za vrijeme kemijske reakcije ne izmjenjuje sadržaj, odnosno reakcijska smjesa, s okolinom. Drugim riječima to znači da se sva količina reakcijske smjese u kotlastom reaktoru unese na početku reakcije. Reakcija započinje, traje izvjesno vrijeme, završava i tek po završetku, reaktor se prazni. Ta osnovna značajka označuje da je kotlasti reaktor zatvoreni sustav. Energija, uglavnom toplina može se izmjenjivati s okolinom. Također za kotlasti reaktor vrijedi da su veličine stanja (koncentracija, temperatura) zavisne od vremena što proizlazi iz toga da je kemijska reakcija vremenski proces bez obzira na njenu brzinu pa kažemo da je kotlasti reaktor uvijek u nestacionarnom stanju. Sastav reakcijske smjese je u svakoj točki isti (pretpostavka idealnog miješanja), te se bilance mogu postaviti za reaktor kao cijelinu, a ne samo za diferencijalni volumen. Šaržni reaktor je povoljan za reakcijske sustave koji nisu inhibirani niti supstratom niti produktom (Gomzi 1998).



Slika 2.11. Prikaz kotlastog reaktora

Bilanca tvari uz pretpostavku idealnog miješanja za takav tip reaktora glasi:

$$\frac{d(V \cdot c_A)}{dt} = r_A \cdot V \quad (2.16.)$$

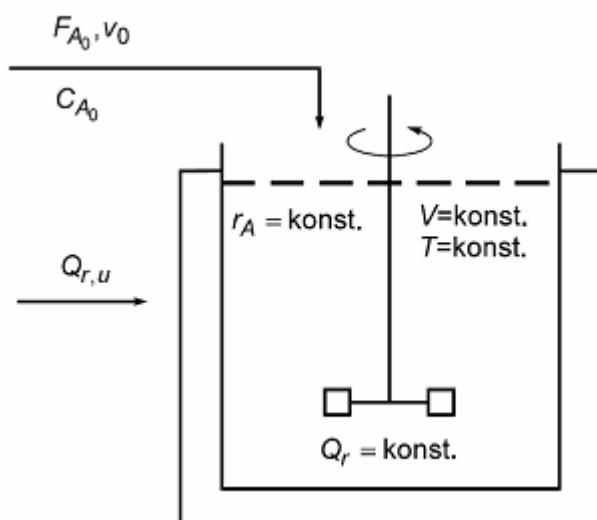
Uz pretpostavku da je volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu te da nema promjene gustoće s vremenom, jednačba 2.17. glasi:

$$\frac{dc_A}{dt} = r_A \quad (2.17.)$$

2.5.2.2. Kotlasti reaktor s dotokom

Reaktor s dotokom (Slika 2.12.) je reaktor u koji se kontinuirano ili povremeno uvodi reakcijska smjesa. Kako se ništa ne uklanja iz sustava, volumen smjese se povećava s vremenom, te je ovaj reaktor stalno u nestacionarnom stanju, odnosno veličine stanja unutar reaktora ovise o vremenu. Uz pretpostavku idealnog miješanja, sastav reakcijske smjese je u svakoj točki jednak.

Ovaj tip reaktora najčešće se upotrebljava kada je supstrat inhibitor ili je toksičan te ga treba postepeno dovesti u reaktor (Vasić-Rački 1990).



Slika 2.12. Prikaz kotlastog reaktora s dotokom

Bilanca tvari komponente A za takav tip reaktora je dana sljedećom jednačbom:

$$\frac{d(V \cdot c_A)}{dt} = c_{A,0} \cdot q + r_A \cdot V \quad (2.18.)$$

gdje q označava volumni protok, a $c_{A,0}$ koncentraciju komponente A u dotoku. Ako se uzme u obzir da je promjena volumena u vremenu jednaka brzini volumnog dotoka:

$$\frac{dV}{dt} = q \quad (2.19.)$$

Jednadžba 2.18. glasi:

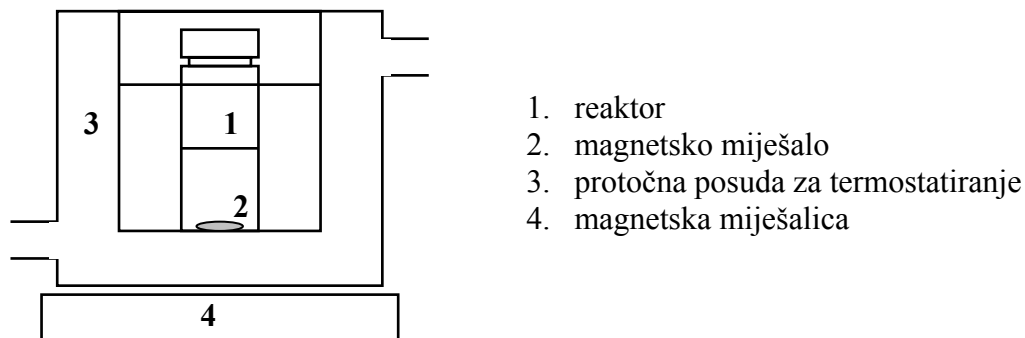
$$\frac{dc_A}{dt} = \frac{(c_{A,0} - c_A) \cdot q}{V} + r_A \quad (2.20.)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. APARATURA

3.1.1. Stakleni kotlasti reaktor

Šaržni i ponovljivi šaržni eksperimenti su provedeni u staklenom kotlastom reaktoru (1) volumena 50 cm³ (Slika 3.1.) s magnetskim miješalom (2). Radni volumen je bio 5 cm³. Za provedbu eksperimenata bilo je potrebno održavati konstantnu temperaturu (80 °C) u reaktoru i da bi se to ostvarilo bilo je potrebno reaktor držati u posudi s dvostrukom stijenkom kroz koju je protjecala voda iz termostata (3). Za miješanje reakcijske smjese korištena je magnetska miješalica (MM-540, TEHTNICA) (4).



Slika 3.1. Aparatura za provođenje eksperimenata u kotlastom reaktoru

3.1.2. Spektrofotometar

Dvoznačni spektrofotometar SHIMADZU UV-1601 (Japan) (Slika 3.2.) se koristi za mjerenje koncentracije otopine škroba .



Slika 3.2. UV spektrofotometar (SHIMADZU UV-1601)

3.1.3. Kapljevinski kromatograf visokog učinka

Kapljevinski kromatograf visokog učinka (Shimadzu, Japan) (Slika 3.3.) sa C₁₈ kolonom i RI detektorom je korišten za određivanje koncentracije maltoze i glukoze. Osnovne komponente sustava su bile HPLC pumpa, otplinjač, termostat za kolonu, UV i RI detektor, jedinica za vođenje, te računalo sa softverom za prikupljanje podataka.



Slika 3.3. Kapljevinski kromatograf visokog učinka (Shimadzu, Japan)

3.2. ANALITIČKE METODE

Analitičke metode korištene u ovom radu se mogu podijeliti na spektrofotometrijske i kromatografske. Spektrofotometrijski su bile mjerene koncentracije otopina škroba.

Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC) s RI detektorom je bila korištena za određivanje koncentracija maltoze i glukoze.

3.2.1. Određivanje koncentracije škroba

Koncentracija škroba tijekom eksperimenta je mjerena jodnim reagensom pomoću spektrofotometra pri valnoj duljini od 580 nm. Jodni reagens je smjesa otopine joda (5 mmol/dm³) i kalijevog jodida koja u prisustvu škroba poprima tamno plavo obojenje. Intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji škroba, a mjeri se pomoću spektrofotometra.

Prije svakog eksperimenta bilo je potrebno napraviti baždarni pravac, kako bi mjerenja bila što točnija. Koncentracije standardnih otopina pripremljene su razrijeđivanjem otopine škroba koncentracije 20 g dm^{-3} . Iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji dobivena je jednadžba pravca potrebna za preračunavanje koncentracije škroba u uzorku. Baždarni pravac se nalazi u Prilogu (Prilog 1).

U kvarcne kivete volumena $1,0 \text{ cm}^3$ (Slika 3.4) potrebno je otpipetirati volumen svake komponente prema Tablici 3.1.

Tablica 3.1. Sastav otopina u kivetu za određivanje koncentracije škroba

| Otopina | Sastav baždarnih otopina [cm ³] | Sastav otopine s uzorkom [cm ³] |
|----------------|--|--|
| Pufer | 0,1-X | - |
| Otopina škroba | X | 0,1 |
| Jodni reagens | 0,9 | 0,9 |



Slika 3.4. Prikaz kiveta

Apsorbancija uzorka u kivetu je preračunata na koncentraciju škroba korištenjem baždarnog pravca.

3.2.2. Određivanje koncentracije glukoze i maltoze

Koncentracija glukoze i maltoze je određivana pomoću HPLC uređaja koji je bio spojen na RI detektor. Analiza je provedena na temperaturi od $80 \text{ }^\circ\text{C}$ s protokom mobilne faze (redestilirana voda) $0,5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ na koloni C₁₈ - Carbohydrate Ca²⁺ (300 x 6.5 mm, CS-Chromatographie service GmbH). Vrijeme zadržavanja za maltozu je bilo 11,6 minuta, dok je za glukozu bilo 13,7 minuta. Baždarni pravci za određivanje koncentracije glukoze i maltoze dani su u prilogu (Prilog 2 i 3). Prije analize uzorka iz reaktora bilo je potrebno profiltrirati uzorke da se izdvoji amilaza i škrob. Za filtriranje se koristio membranski filter veličine pora od $0,2 \text{ }\mu\text{m}$ (Chromfail CA 20-25, Macherey-Nagel) (Slika 3.5.).



Slika 3.5. Prikaz filtera Chromfail CA 20

3.2.3. Određivanje aktivnosti α -amilaza

Aktivnost enzima α -amilaza komercijalnih naziva Termamyl i Liqouzyme u reakciji škroba mjerena je spektrofotometrijski na 580 nm praćenjem koncentracije škroba. Količina potrošenog škroba u jedinici vremena je bila mjera aktivnosti enzima α -amilaza.

Aktivnost je određivana u kotlastom reaktoru volumena 5 cm³ s otopinom škroba koncentracije 2 g/l uz dodatak 50 μ l α -amilaze. Uzorci su uzimani nekoliko puta u vremenskom intervalu od 10 minuta te analizirani spektrofotometrijski.

Na temelju eksperimentalnih podataka promjene absorbancije sa vremenom iz kojih je računata početna brzina (metoda početnih brzina) i nagiba baždarnog pravca odredili smo aktivnost α -amilaza komercijalnih naziva Termamyl i Liqouzyme. Aktivnost navedenih enzima izračunata je pomoću izraza 3.1.

$$A = \frac{\frac{dABS}{dt} \cdot V_{\text{reaktora}}}{\frac{dABS}{dc_{\text{škrob}}} \cdot V_{\text{enzima}}} \quad (3.1.)$$

3.2.4. Kinetička karakterizacija α -amilaza

Za kinetičku karakterizaciju α -amilaza komercijalnih naziva Termamyl i Liqouzyme mjerenja su provedena u kotlastom reaktoru volumena 5 cm³ koji je bio termostatiran na temperaturi od 80 °C. Mjerena je početna brzina reakcije u ovisnosti o koncentraciji škroba, te utjecaji glukoze i maltoze kao produkta na početnu reakcijsku brzinu.

Za mjerenje su korištene slijedeće otopine: 0.1M fosfatni pufer pH 7, otopina škroba koncentracije 20 g dm^{-3} i koncentracije 80 g dm^{-3} , otopine glukoze i maltoze koncentracije 200 g dm^{-3} , te 10x razrijeđena izvorna otopina α -amilaza. Sastav testa je prikazan u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Sastav testa za određivanje aktivnosti α -amilaze u reakciji hidrolize škroba

| Otopine | Ovisnost početne brzine o koncentraciji škroba $V [\text{cm}^3]$ | Inhibicija glukozom $V [\text{cm}^3]$ | Inhibicija maltozom $V [\text{cm}^3]$ |
|-------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| škrob | X | 1,5 | 1,5 |
| glukoza | - | X | - |
| maltoza | - | - | X |
| pufer | 4,95-X | 3,45-X | 3,45-X |
| α -amilaza | 0,05 | 0,05 | 0,05 |

3.3.OPIS PROVEDBE EKSPERIMENATA U RAZLIČITIM TIPOVIMA REAKTORA

3.3.1. Provedba hidrolize škroba u ponovljivom kotlastom reaktoru

Za provedbu hidrolize škroba u ponovljivom kotlastom reaktoru je korišten 50 cm^3 stakleni kotlasti reaktor. Početna koncentracija škroba je bila 20 g dm^{-3} . Na samom početku eksperimenta je dodana α -amilaza (Termamyl i Liquozyme). Na početku su uzorci uzimani češće, a kasnije rijede. Kada je koncentracija supstrata pala otprilike na nulu dodan je novi škrob i tako tri do pet puta tijekom eksperimenta.

3.3.2. Provedba hidrolize škroba u kotlastom reaktoru sa dotokom supstrata

Pokus u kotlastom reaktoru s dotokom proveden je u reaktoru volumena 500 cm^3 . Početni radni volumen je iznosio 100 cm^3 . Početna koncentracija škroba je bila 20 g dm^{-3} . Nakon što je hidrolizirana početna količina škroba reaktor je spojen s pumpom čiji je protok iznosio $0,53 \text{ cm}^3/\text{min}$. Koncentracija otopine škroba u dotoku je bila 50 g dm^{-3} .

3.4. OBRADA PODATAKA

Kinetički modeli enzimatskih reakcija mogu imati velik broj parametara, ovisno o međudjelovanjima komponenti reakcijskog sustava s enzimom. Većina se parametara može procijeniti neovisnim kinetičkim mjerenjima koja se temelje na metodi početnih reakcijskih brzina (Gomzi, 1998). Ovom se metodom ispituje utjecaj samo jedne reakcijske komponente na reakcijsku brzinu, dok se utjecaj preostalih komponenti reakcijskog sustava isključuje, odnosno drži konstantim. Tako se primjerice određuje Michaelis-Menteničina konstanta enzima i konstanta inhibicije za produkt reakcije na enzim. Pri određivanju konstante inhibicije koncentracije supstrata se tijekom svih mjerenja drže konstantnima, dok se mijenja koncentracija produkta. Iz ovako dobivenih eksperimentalnih podataka se procjenjuju vrijednosti parametara nelinearnim ili linearnim regresijskim metodama. U ovom je radu korištena metoda nelinearne regresije koja se nalazi u programskom paketu SCIENTIST (SCIENTIST handbook, 1986-1995). U tu svrhu korištene su dvije metode: metoda najmanjih kvadrata i simpleks metode. Cilj navedenih metoda pri određivanju parametara je pronaći minimalni zbroj kvadrata greške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela.

Na temelju izračunate sume kvadrata greške parametri se ponovno proračunavaju sve dok se ne postigne minimalna pogreška između seta eksperimentalnih i izračunatih vrijednosti (SCIENTIST handbook). Na temelju napisanog modela i procijenjenih parametara provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi određenog modela. SCIENTIST za rješavanje seta diferencijalnih jednadžbi koristi numeričke metode i to Euler-ovu metodu, metodu Runge Kutta IV, Bulirsch-Stoer metodu i Episode algoritam.

4. MATEMATIČKI MODEL

Matematički model hidrolize škroba katalizirane α -amilazama sastoji se od bilancnih i kinetičkih jednadžbi.

4.1. KINETIČKI MODEL

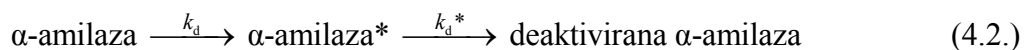
Kinetički model opisan je jednadžbom 4.1. Kinetika reakcije je opisana Michaelis-Menteničinom jednadžbom u koju je uključena antikompetitivna inhibicija glukozom i maltozom.

$$r = \frac{V_m \cdot c_{\text{škroba}}}{K_m + c_{\text{škroba}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{glukoza}}}{K_i^{\text{glukoza}}} + \frac{c_{\text{maltoza}}}{K_i^{\text{maltoza}}}\right)} \quad (4.1.)$$

Kinetički parametri u navedenoj jednadžbi određeni su nezavisnim mjerenjima metodom početnih brzina. Početna reakcijska brzina je određivana iz količine škroba koja je hidrolizirala tijekom prvih pet minuta reakcije. Iz ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentraciji škroba je napravljen Michaelis-Menteničin graf pomoću kojega su zatim nelinearnom regresijom u paket program SCIENTIST procijenjeni kinetički parametri.

4.1.1. Deaktivacija enzima

Deaktivacija α -amilaze uzrokovana je denaturacijom proteina uslijed visoke temperature na kojoj se provodi hidroliza škroba. Opisana je prema dvostupnjevitom modelu na temelju predložene sheme (Violet & Meunier 1989):



Ovaj model pretpostavlja nastajanje modificiranog oblika enzima na putu do njegove potpune deaktivacije. Karakteristika modificiranog oblika je da on isto posjeduje određenu aktivnost ali je ona niža od aktivnosti izvornog oblika enzima. Stoga je maksimalna ukupna aktivnost enzima jednaka zbroju aktivnosti izvorne amilaze i modificirane amilaze:

$$V_m = V_m^{\alpha\text{-amilaza}} \cdot \Phi_{\alpha\text{-amilaza}} + V_m^{\alpha\text{-amilaza}^*} \cdot \Phi_{\alpha\text{-amilaza}^*} \quad (4.3.)$$

Parametar maksimalne aktivnosti izvornog enzima je procijenjen, $V_m^{\alpha\text{-amilaza}}$, nezavisnim mjerenjima metodom početnih brzina uz pretpostavku da tijekom prvih pet minuta reakcije

nije došlo do značajnije promjene aktivnosti uslijed deaktivacije. Maksimalna aktivnost modificiranog oblika amilaze, $V_m^{\alpha\text{-amilaza}^*}$, procijenjena je na temelju eksperimenata provedenih u reaktoru.

4.2. REKTORSKI MODEL

Bilancne jednadžbe za hidrolizu škroba katalizirane s α -amilazama u kotlastom reaktoru i kotlastom reaktoru s dotokom postavljene su na temelju slijedećih pretpostavki:

- reakcijska smjesa je dobro miješana i prema tome njen sastav je isti u svakoj točki reakcijske smjese
- bilance energije nisu razmatrane, obzirom da je temperatura tijekom eksperimenta bila konstantna

4.2.1. Kotlasti reaktor i ponovljivi kotlasti reaktor

Rektorski model hidrolize škroba u kotlastom reaktoru uz α -amilaze komercijalnih naziva Termamyl i Liqouzyme se sastoji od bilancnih jednadžbi za škrob, glukozu i maltozu (Jedn. 4.4- 4.6.)

$$\frac{dc_{\text{škroba}}}{dt} = -r \quad (4.4.)$$

$$\frac{dc_{\text{glukoza}}}{dt} = Y_{\text{glukoza/škrob}} \cdot r \quad (4.5.)$$

$$\frac{dc_{\text{maltoza}}}{dt} = Y_{\text{maltoza/škrob}} \cdot r \quad (4.6.)$$

Iskorištenje glukoze na škrobu ($Y_{\text{glukoza/škrob}}$) i iskorištenje maltoze na škrobu ($Y_{\text{maltoza/škrob}}$) je procijenjivano na temelju podataka koncentracija-vrijeme dobivenih tijekom provedbe eksperimenta u kotlastom reaktoru.

Na temelju sheme deaktivacije enzima (4.3.) izvedene su jednadžbe za promjenu koncentracije izvornog (4.7.), kao i modificiranog oblika amilaze (4.8.)

$$\frac{d\varphi_{\alpha\text{-amilaza}}}{dt} = -k_d^{\alpha\text{-amilaza}} \cdot \varphi_{\alpha\text{-amilaza}} \quad (4.7.)$$

$$\frac{d\varphi_{\alpha\text{-amilaza}^*}}{dt} = k_d^{\alpha\text{-amilaza}} \cdot \varphi_{\alpha\text{-amilaza}} - k_d^{\alpha\text{-amilaza}^*} \cdot \varphi_{\alpha\text{-amilaza}^*} \quad (4.8.)$$

Objektive konstante deaktivacije su procijenjene iz eksperimenta u reaktoru

4.2.2. Kotlasti reaktor s dotokom

Reaktorski model hidrolize škroba u kotlastom reaktoru s dotokom uz α -amilaze komercijalnih naziva Termamyl i Liquozyme se sastoji od bilancnih jednažbi 4.9., 4.10., 4.11., 4.12, 4.13 i 4.14.

Bilancne jednažbe za škrob (4.9.), glukozu (4.10.) maltozu (4.11.) i oba oblika amilaze (4.12. i 4.13.) su za razliku od kotlastog reaktora proširene za konvektivni član. U model je također uključena jednažba za konstantno povećanje volumena reakcijskog medija u reaktoru (4.14.).

$$\frac{dc_{\text{škroba}}}{dt} = \frac{c_{\text{škroba},0} - c_{\text{škroba}}}{V} \cdot q_{c_0} - r \quad (4.9.)$$

$$\frac{dc_{\text{glukoza}}}{dt} = -\frac{c_{\text{glukoza}}}{V} \cdot q_{c_0} + Y_{\text{glukoza/škrob}} \cdot r \quad (4.10.)$$

$$\frac{dc_{\text{maltoza}}}{dt} = -\frac{c_{\text{maltoza}}}{V} \cdot q_{c_0} + Y_{\text{maltoza/škrob}} \cdot r \quad (4.11.)$$

$$\frac{d\varphi_{\alpha\text{-amilaza}}}{dt} = -\frac{\varphi_{\alpha\text{-amilaza}}}{V} \cdot q_{c_0} - k_d^{\alpha\text{-amilaza}} \cdot \varphi_{\alpha\text{-amilaza}} \quad (4.12.)$$

$$\frac{d\varphi_{\alpha\text{-amilaza}^*}}{dt} = -\frac{\varphi_{\alpha\text{-amilaza}^*}}{V} \cdot q_{c_0} + k_d^{\alpha\text{-amilaza}} \cdot \varphi_{\alpha\text{-amilaza}} - k_d^{\alpha\text{-amilaza}^*} \cdot \varphi_{\alpha\text{-amilaza}^*} \quad (4.13.)$$

$$\frac{dV}{dt} = q_{c_0} \quad (4.14.)$$

5. REZULTATI RAPRAVA

α -amilaze su enzimi koji hidroliziraju škrob cijepanjem α -1,4 glikozidne veze. Obzirom da je škrob topljiv na visokim temperaturama, na kojim su enzimi skloni denaturaciji, najveći problem prilikom provođenja ove reakcije predstavlja stabilnost enzima. Poznato je da α -amilaze u svojoj strukturi imaju ione kalcija koji dopinose njegovoj stabilizaciji (Lim et al. 2003). U ovom radu su istraživane dvije α -amilaze komercijalnih naziva Termamyl i Liquozyme u reakciji hidrolize škroba. Određena je njihova kinetika, te je postavljen matematički model koji je validiran u ponovljivom kotlastom reaktoru i reaktoru s dotokom. Također je ispitan utjecaj iona kalcija na stabilnost enzima prilikom provedbe hidrolize škroba.

5.1. KINETIKA α -AMILAZA

Prije ispitivanja kinetike α -amilaza Termamyl i Liquozyme određena je optimalna temperatura i pH enzima u reakciji hidrolize škroba. U tu svrhu je određena aktivnost α -amilaza pri temperaturama u intervalu od 40 - 80 °C, te u pH području 5,5-8. Maksimalna aktivnost za oba enzima je postignuta na temperaturi od 80 °C i pH 7. U daljnjem tijeku istraživanja mjerenja su provedena pri navedenim uvjetima.

Tablica 5.1. Procijenjeni kinetički parametri u reakciji hidrolize škroba katalizirane α -amilazama

| PARAMETAR | VRIJEDNOST |
|--|----------------|
| α -amilaza - Termamyl | |
| $V_m^{\alpha\text{-amilaza}}$ [mg cm ⁻³ min ⁻¹] | 5402,4 ± 464,2 |
| K_m [g dm ⁻³] | 17,1 ± 1,5 |
| K_i^{glukoza} [g dm ⁻³] | 47,2 ± 4,1 |
| K_i^{maltoza} [g dm ⁻³] | 12,2 ± 1,1 |
| α -amilaza - Liquozyme | |
| $V_m^{\alpha\text{-amilaza}}$ [mg cm ⁻³ min ⁻¹] | 6230,4 ± 609,8 |
| K_m [g dm ⁻³] | 18,8 ± 1,4 |
| K_i^{glukoza} [g dm ⁻³] | 101,0 ± 7,5 |
| K_i^{maltoza} [g dm ⁻³] | 34,7 ± 3,3 |

Kinetika α -amilaza određena je metodom početnih brzina. U tu svrhu je je mjerena ovisnost početnih reakcijskih brzina o koncentraciji škroba. Ispitana je inhibicija produktima u reakciji hidrolize škroba, te je mjeren utjecaj glukoze i maltoze na početnu reakcijsku brzinu. Iz rezultata je utvrđeno da oba produkta inhibiraju reakciju kataliziranu s oba ispitivana enzima. U literaturi je pronađeno da se glukoza i maltoza ponašaju kao antikompetitivni inhibitori u reakciji hidrolize škroba koju kataliziraju α -amilaze (Apar & Özbek 2007). Stoga je kinetika hidrolize škroba opisana Michaelis-Menteničinom kinetikom u koju je uključena antikompetitivna inhibicija produktima (Jedn. 4.1.). Parametri modela su procijenjeni nelinearnom regresijom iz eksperimentalnih podataka i prikazani su u Tablici 1. Iz procijenjenih parametara vidljivo je da α -amilaza – Liquozyme pokazuje veću maksimalnu aktivnost u reakciji hidrolize škroba od enzima Termamyl. Dobivene vrijednosti Michealis-Menteničinih konstanti upućuju da je škrob specifičniji supstrat za Termamyl. Procijenjene konstante inhibicije ukazuju da su oba enzima više inhibirana maltozom nego glukozom. Također, obzirom da su procijenjene više vrijednosti konstanti inhibicija u slučaju α -amilaze – Liquozyme, može se zaključiti da je hidroliza škroba katalizirana ovim enzimom manje inhibirana produktom.

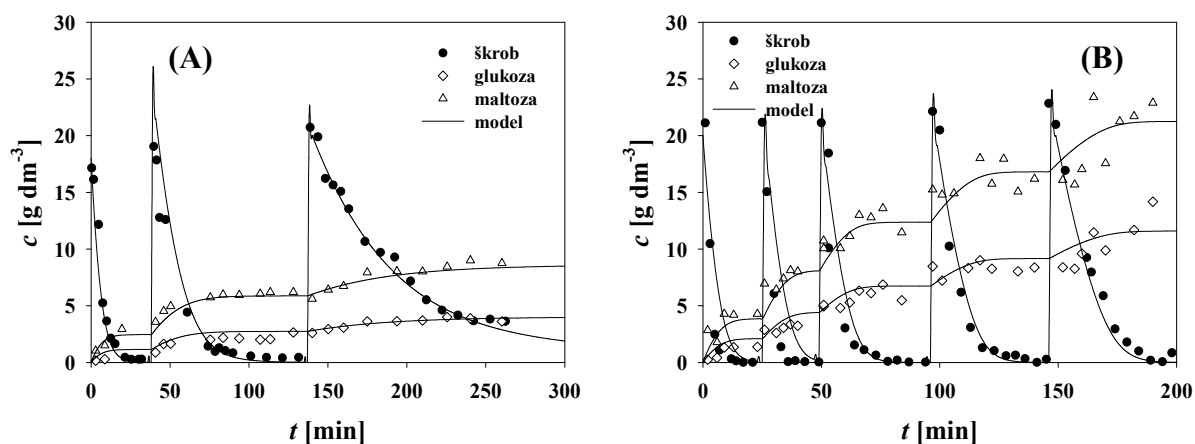
5.2. HIDROLIZA ŠKROBA UZ α -AMILAZE - TERMAMYL I LIQUOZYME U REAKTORIMA

Kinetička mjerenja su pokazala da ispitivana reakcija katalizirana α -amilazama nije jako inhibirana produktima. Stoga je validacija pretpostavljenog modela (poglavlje 4) provedena u ponovljivom kotlastom reaktoru sa više puta dodanim škrobom, a potom u kotlastom reaktoru s dotokom. Za ove reaktore je karakteristično da se produkt ne odvodi iz reaktora. Navedeni reaktori su također vrlo efikasni za procjenjivanje deaktivacije enzima tijekom duge upotrebe. Svi eksperimenti su provedeni s i bez iona kalcija kako bi se odredio utjecaj istih na stabilnost enzima.

5.2.1. Hidroliza škroba uz α -amilaze - Termamyl i Liquozyme u ponovljivom kotlastom reaktoru

Hidroliza škroba katalizirana α -amilazom-Termamyl u ponovljivom kotlastom reaktoru prikazana je na Slici 5.1. Na Slici 5.1.A prikazan je eksperiment bez dodatka iona kalcija, a na

Slici 5.1.B u prisustvu iona kalcija čija je koncentracija bila 5 mM. Navedena koncentracija kalcija je određena prema podacima iz literature (Lim et al 2003.).



Slika 5.1. Hidroliza škroba katalizirana α -amilazom-Termamyl u ponovljivom kotlastom reaktoru ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,1\text{ mol dm}^{-3}$, $V_{\text{reaktor}} = 50\text{ cm}^3$, $\varphi_{\text{Termamyl0}} = 0,001$), (A) $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7, (B) Tris-HCl pufer + 5 mM Ca^{2+}

Može se vidjeti da je tijekom 200 minuta u eksperimentu bez prisustva kalcija (Slika 5.1.A) hidrolizirano otprilike dvostruko manje škroba nego što je to bilo kada je u reakcijskoj smjesi bio prisutan Ca^{2+} -ion (Slika 5.1.B) uz istu početnu koncentraciju katalizatora. Iz toga se može zaključiti da je kalcij vrlo dobar stabilizator korištene amilaze. U oba eksperimenta, s vremenom dolazi do smanjenja brzine reakcije hidrolize škroba. Navedeno je uzrokovano deaktivacijom enzima. Deaktivacija je, kao što je već rečeno u prethodnom poglavlju, opisana dvostupnjevitim modelom (Jedn. 4.2.) koji pretpostavlja nastajanje modificiranog oblika enzima na putu do njegove potpune deaktivacije. Stoga su iz provedenih eksperimenata procijenjene konstante deaktivacije izvornog i modificiranog oblika enzima - Termamyl kao i aktivnost modificiranog enzima (Tablica 5.2.)

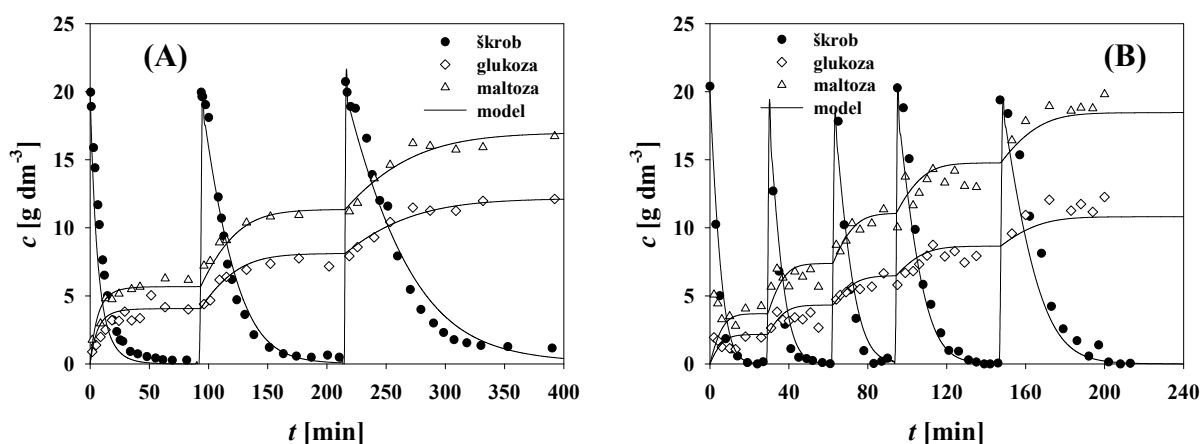
Tablica 5.2. Konstante procijenjene prilikom provedbe hidrolize škroba katalizirana α -amilazom-Termamyl u ponovljivom kotlastom reaktoru

| PARAMETAR | VRIJEDNOST | |
|---|-------------------------------------|---------------------------------------|
| | 0 mM Ca^{2+} | 5 mM Ca^{2+} |
| $V_m^{\text{Term*}} [\text{U cm}^{-3}]$ | $2640,84 \pm 121,35$ | $2934,48 \pm 270,64$ |
| $k_d^{\text{Term}} [\text{min}^{-1}]$ | $0,046 \pm 0,004$ | $0,0038 \pm 0,0004$ |
| $k_d^{\text{Term*}} [\text{min}^{-1}]$ | $0,0097 \pm 0,0008$ | $0,0097 \pm 0,0004$ |
| $Y_{\text{glukoza}/\text{škrob}} [\text{g g}^{-1}]$ | $0,064 \pm 0,002$ | $0,105 \pm 0,004$ |
| $Y_{\text{maltoza}/\text{škrob}} [\text{g g}^{-1}]$ | $0,137 \pm 0,005$ | $0,193 \pm 0,008$ |

Iz dobivenih vrijednosti parametara se može zaključiti da ioni kalcija ne utječu bitno na deaktivaciju modificiranog oblika enzima, kao ni na njegovu aktivnost. Značajan stabilizacijski utjecaj se očituje u izvornom obliku enzima, obzirom da je konstanta deaktivacije istog 12 puta manja u prisutnosti iona kalcija.

Iz eksperimentalnih podataka prikazanih na Slici 5.1. procijenjena su i iskorištenja glukoze i maltoze na škrobu (Tablica 5.2.). U oba eksperimenta dobiveno je veće iskorištenje na maltozi. Također je vidljivo da prisustvo iona kalcija prilikom hidrolize škroba katalizirane Termamylom doprinosi većem iskorištenju glukoze i maltoze na škrobu.

Rezultati eksperimenta hidrolize škroba katalizirane α -amilazom-Liquozyme u ponovljivom kotlastom reaktoru prikazani su na slici 5.2. I uz ovaj enzim je uočen znatan utjecaj kalcijevih iona na stabilnost enzima, te je za isto vrijeme (200 min) i uz istu početnu koncentraciju enzima u eksperimentu uz kalcij hidrolizirano oko 100 g dm⁻³ (Slika 5.2.B) škroba, a bez kalcija 40 g dm⁻³ škroba (Slika 5.2.B).



Slika 5.2. Hidroliza škroba katalizirana α -amilazom-Liquozyme u ponovljivom kotlastom reaktoru ($T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $0,1\text{ mol dm}^{-3}$, $V_{\text{reaktor}} = 50\text{ cm}^3$, $\varphi_{\text{Liquozyme0}} = 0,001$), (A) $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7, (B) Tris-HCl pufer + 5 mM Ca^{2+}

U ovim eksperimentima je također uočena deaktivacija enzima, te su procijenje konstante deaktivacije modificiranog i izvornog oblika enzima kao i maksimalna aktivnost modificiranog oblika koje su dane u Tablici 5.3. Ioni kalcija i kod ove amilaze pokazuju značajan stabilizacijski utjecaj na izvorni oblik enzima. Njegova procijenjena konstanta deaktivacije je oko 13 puta niža u eksperimentu uz ione kalcija.

Ako usporedimo konstante deaktivacije oba enzima možemo vidjeti da su konstante deaktivacije izvornog oblik enzima Termamyl (k_d^{Term}) oko tri puta niže od izvornog oblika Liquozyme (k_d^{Liq}) što upućuje da je Termamyl u izvornom obliku stabilniji. To nije slučaj za modificirani oblika Termamyl kod kojeg je primjećena dvostruko brža deaktivacija ($k_d^{\text{Term*}}$) od istog za Liquozyme ($k_d^{\text{Liq*}}$).

Iz eksperimentalnih podataka prikazanih na slici 5.2. procijenjena su iskorištenja na glukozi i maltozi (Tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Konstante procijenjene prilikom provedbe hidrolize škroba katalizirana α -amilazom-Liquozyme u ponovljivom kotlastom reaktoru

| PARAMETAR | VRIJEDNOST | |
|---|-----------------------|------------------------|
| | 0 mM Ca ²⁺ | 5 mM Ca ²⁺ |
| $V_m^{\text{Liq*}}$ [U cm ⁻³] | 2052,41 ± 131,52 | 2052,41 ± 131,52 |
| k_d^{Liq} [min ⁻¹] | 0,133 ± 0,007 | 0,0098 ± 0,0003 |
| $k_d^{\text{Liq*}}$ [min ⁻¹] | 0,0044 ± 0,0002 | 0,0044 ± 0,0002 |
| $Y_{\text{glukoza/škrob}}$ [g g ⁻¹] | 0,203 ± 0,005 | 0,108 ± 0,004 |
| $Y_{\text{maltoza/škrob}}$ [g g ⁻¹] | 0,284 ± 0,006 | 0,185 ± 0,004 |

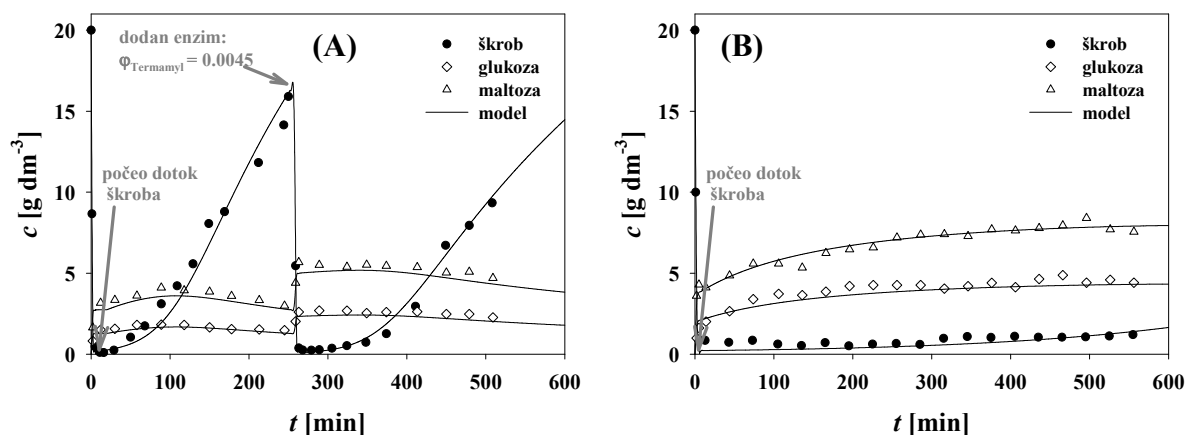
Kao i kod hidrolize škroba katalizirano Termamyl-om i u ovim eksperimentima dobiveno je veće iskorištenje na maltozi. Uz oba enzima u prisutnosti iona kalcija dobivaju se otprilike jednaka iskorištenja na glukozi i maltozi. Najviša iskorištenja su dobivena u eksperimentu kataliziranom α -amilazom-Liquozyme bez iona kalcija.

5.2.2. Hidroliza škroba uz α -amilaze - Termamyl i Liquozyme u kotlastom reaktoru s dotokom

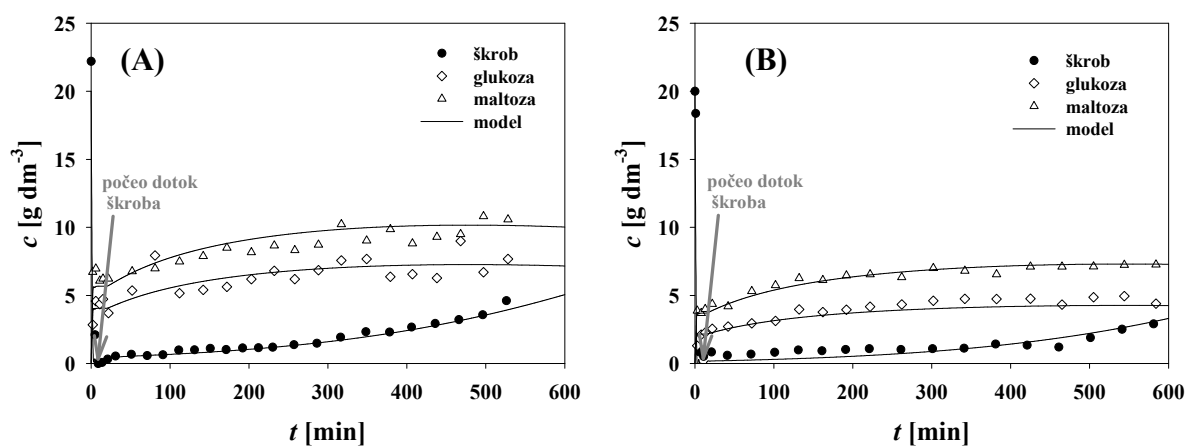
Rezultati hidrolize škroba katalizirane α -amilazom-Termamyl i Liquozyme u kotlastom reaktoru s dotokom prikazani su na slici 5.3. i 5.4. Ovi eksperimenti su započeti kao šaržni, te kada je sva početna količina škroba hidrolizirana uključen je dotok otopine škroba u reaktor.

U eksperimentu s enzimom Termamyl provedenom bez iona kalcija, enzim je vrlo brzo izgubio aktivnost. Stoga je dodana nova količina enzima u 257-oj minuti kako je naznačeno na slici 5.3.A. Nova količina enzima je izgubila aktivnost približno istom brzinom deaktivacije kao što je to bilo prilikom prvog dodavanja. U ovom eksperimentu procijenjena je četiri puta viša konstanta deaktivacije modificiranog oblika enzima Termamyl

($k_d^{\text{Term}^*} = 0,038 \text{ min}^{-1}$) od one procijenjene u ponovljivom kotlastom eksperimentu ($k_d^{\text{Term}^*} = 0,0097 \text{ min}^{-1}$, Tablica 5.2.).



Slika 5.3. Hidroliza škroba katalizirana α -amilazom-Termamyl u kotlastom reaktoru s dotokom ($T= 80 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $V_{\text{reaktora}, 0} = 100 \text{ cm}^3$, $c_{\text{škroba, dotok}} = 50 \text{ g dm}^{-3}$, $q_{\text{dotok}} = 0,51 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\varphi_{\text{Liquozyme}, 0} = 0,005$) (A) $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7, (B) Tris-HCl pufer + 5 mM Ca^{2+}



Slika 5.4. Hidroliza škroba katalizirana α -amilazom-Liquozyme u kotlastom reaktoru s dotokom ($T= 80 \text{ }^\circ\text{C}$, $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $V_{\text{reaktora}, 0} = 100 \text{ cm}^3$, $c_{\text{škroba, dotok}} = 50 \text{ g dm}^{-3}$, $q_{\text{dotok}} = 0,51 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$, $\varphi_{\text{Liquozyme}, 0} = 0,005$) (A) $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ pH 7, (B) Tris-HCl pufer + 5 mM Ca^{2+}

U ostalim eksperimentima tj. u eksperimentu hidrolize škroba kataliziranom amilazom Termamyl u prisustvu kalcija (Slika 5.3. B) kao i uz Liquozyme bez i s ionima kalcija (Slika 5.4.) procijenjene konstante deaktivacije su bile jedanke onim procijenjenim u ponovljivom kotlastom reaktoru (Tablice 5.2. i 5.3). Predloženi matematički model (Jedn. 4.1., 4.9., 4.9.-4.14.) je dobro opisao rezultate eksperimenata provedenih u kotlastom reaktoru s dotokom.

Važno je naglasiti da su izračunata iskorištenja na maltozi i glukozi imala iste vrijednosti kao i u eksperimentima u ponovljivom kotlastom reaktoru (Tablice 5.2. i 5.3).

Konverzija škroba u 500 minuti u eksperimentu u prisutnosti kalcija kataliziranom Termamylom iznosila je 97,4 %, dok je ista u eksperimentu s Liquozyme-om bila 95,4 %. Ako uzmemo u obzir činjenicu da amilaza Liquozyme ima višu maksimalnu aktivnost u reakcije hidrolize škroba (Tablica 5.1) i da su uvjeti provedbe eksperimenta bili jednaki u oba slučaja možemo zaključiti da ioni kalcija ukupno više doprinose stabilnosti amilaze Termamyl.

6. ZAKLJUČAK

Ispitana je kinetika oba enzima u reakciji hidrolize škroba na optimalnoj temperaturi i pH, te su nelinearnom regresijom procijenjeni parametri Michaelis-Menteničinog kinetičkog modela. Na temelju procijenjenih parametara pokazalo se da enzim Liquozyme pokazuje veću aktivnost u reakciji hidrolize škroba, dok je enzim Termamyl specifičniji za škrob.

Ispitivanjem utjecaja glukoze i maltoze na aktivnost enzima utvrđeno je da maltoza jače inhibira oba enzima od glukoze.

Razvijen je matematički model procesa hidrolize škroba uz enzime Termamyl i Liquozyme koji je uključivao temperaturnu deaktivaciju enzima opisanom dvostupnjevitim modelom.

Model je vrlo dobro opisao pokuse provedene u ponovljivom kotlastom reaktoru i kotlastom reaktoru s dotokom.

Navedeni eksperimenti su provedeni sa i bez iona kalcija, te je zaključeno da ioni kalcija značajno stabiliziraju oba enzima.

Iz izračunatih konverzija kod eksperimenata provedenih u kotlastom reaktoru s dotokom zaključeno je da ioni kalcija ukupno više doprinose stabilnosti amilaze Termamyl.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem:

Prof. Dr sc. Đurđi Vasić-Rački koja mi je omogućila realizaciju ovog rada.

Dr. sc. Ani Vrsalović- Presečki na velikoj pomoći pruženoj tijekom izrade ovog rada i na mnogim korisnim savjetima.

Svima na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu na stručnoj i prijateljskoj pomoći.

Svojim roditeljima na pruženoj potpori.

8. POPIS LITERATURE

1. Apar DK, Özbek B, Estimation of kinetic parameters for rice starch hydrolysis inhibited by added materials, *Chem Eng Comm* 194 (2007) 334-344.
2. Ashter M, Meunier JC, Immobilization as a total for the stabilization of lignin produced by *Phanerochaete crysosporum* INA- 12, *Appl Biochem Biotechnol* 38 (1993) 57.
3. Bravo Rodriguez V, Jurado Alameda E, Martinez Gallegos F, Reyes Requena A, Garcia Lopez AI, Enzymatic Hydrolysis of Soluble Starch with an α -Amylase from *Bacillus licheniformis*, *Biotechnol.Prog* 22 (2006) 718-722.
4. Buckow R, Weiss U, Heinz V, Knorr D, Stability and Catalytic Activity of α -Amylase From Barley Malt at Different Pressure-Temperature Conditions, *Biotechnol Bioeng*, 97 (2000) 1-11.
5. D'Souza SF, Microbial biosensors. *Biosens. Bioelektron.* 16 (1999) 337-353
6. Duraković S .Opća mikrobiologija. *Prehrambeno tehnološki inženjering*, Zagreb, (1996) str. 231-232
7. Gomzi Z, Kemijski reaktori *HINUS*, Zagreb, (1998) str.36-55.
8. <http://www.tportal.hr/automobili/autozona/fset.html>
9. Karlson P, Biokemija, *Školska knjiga*, Zagreb, (1984) str.34,53,194.
10. Katchalski- Katzir E, Kraemer DM, Eupergit C, A carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *J Mol Catal B: Enzym* 10 (2000) 157.
11. Lim LH, Macdonald DG, Hill GA, Hydrolysis of starch particles using immobilized barley α -Amylase, *Biochem Eng J* 13 (2003), 53-62.
12. Loughlin WA, Biotransformation in organic synthesis, *Bioresource Technol* 74 (2000) 49.
13. Marotta M, Martiono A, De Rosa A, Farina E, Carteni M, De Rosa M, *Process Biochem.* 38 (2002) 101-108.
14. Nigam RB, Agrawal PK, Proceedings of the international conference on biofuels: prospective & prospects, *Winrock International*, India (2004) 16-17.
15. Oates CG, Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis, *Trends Food Sci Technol* 8 (1997) 375-382.
16. Paolucci- Jeanjean D, Belleville MP, Rios GM, Zakhia N, Kinetics of cassava starch hydrolysis with Termamyl enzyme, *Biotechnol Bioeng* 68 (2000) 71-77.

17. Pine, SH. , *Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb*, (1994) str.758,761,786.
18. Prentis S., *Biotehnologija- nova industrijska revolucija, Školska knjiga*, (1985) str 136.
19. Schmid A, Dordick JS, Hauer B, Kiener A, Wubbolts M, Withoutt B, *Nature* 409 (2001) 258-268.
20. SCIENTIST handbook (1986-1995) *Micromath®*, Salt Lake City, pp. 255-260, 275-278, 300-302.
21. Straathof AJJ, Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting, *J Mol Catal B: Enzym* 11 (2001) 991-998.
22. Valle BL, Stein EA, Sumerwell WN, Fisher EH, Metal content of α -Amylase of various origins., *J Biol Chem* 234 (1959) 2901-2905.
23. Van der Maarel MJ, Van der Veen B, Uitdehaag JCM., Leemhuis H, Dijkhuizen L, Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -Amylase family. *J Biotechnol* 94 (2002) 137-155.
24. Violet M, Meunier JC, Kinetic study of the irreversible thermal denaturation of *Bacillus licheniformis* α -Amylase, *Biochem. J* 263 (1989), 665-670.
25. Vasić- Rački D, Kragel U, Liese A. Benefits of enzyme kinetics modeling, *Chem Biochem Eng Q* 17 (1) (2003) 7
26. Vasić-Rački Đ, Biokemijsko inženjerstvo, *Kem Ind* 39 (1990) 459-467

SAŽETAK**UTJECAJ KALCIJEVIH IONA NA STABILIZACIJU α -AMILAZE PRI HIDROLIZI ŠKROBA***Katica Visković*

Hidroliza škroba je vrlo istraživani kemijski proces koji se obično provodi u dva stupnja: prvi stupanj je likvefakcija katalizirana α -amilazama, a drugi stupanj je proces saharifikacije kataliziran glukoamilazama. Produkt procesa je glukoza koja se koristi dalje kao supstrat u fermentaciji, kao sirovina za kemijsku sintezu (npr. sorbitola) ili za proizvodnju fruktoze izomerizacijom glukoze. U ovom je radu proučavana likvefakcija škroba katalizirana s dvije α -amilaze: Termamyl i Liquozyme. Obzirom da se oba enzima deaktiviraju prilikom dulje upotrebe na povišenoj temperaturi (80 °C), ispitivana je mogućnost njihove stabilizacije ionima kalcija. Eksperimenti su provedeni u ponovljivom šaržnom, te u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata. Razvijeni su matematički modeli za oba tipa reaktora. Deaktivacija enzima je opisana dvostupnjevitim modelom koji pretpostavlja nastajanje modificiranog oblika enzima na putu do njegove potpune deaktivacije. Usporedbom eksperimenata provedenih bez i uz prisustvo kalcija pokazano je da kalcij značajno doprinosi stabilnosti korištenih α -amilaza

Ključne riječi: α -amilaza, hidroliza škroba, modeliranje, deaktivacija enzima

SUMMARY

THE INFLUENCE OF CALCIUM IONS ON α -AMYLASE STABILIZATION DURING STARCH HYDROLYSIS

Katica Visković

Starch hydrolysis is highly investigated chemical process which is usually carried out in two stages: the first step is liquefaction catalyzed by α -amylase, and the second step is the saccharification process catalyzed by glucoamylase. Glucose as the reaction product can be further used as a substrate for ethanol production during fermentation, as raw material for chemical synthesis (sorbitol), or it can be used for the production of fructose by isomerization. Starch liquefaction catalyzed by two α -amylases: Termamyl and Liquozyme was studied in this work. Considering that both enzymes deactivate during the prolonged use at high temperatures (80 °C), the possibility of their stabilization by Ca^{2+} ions was studied. The experiments were carried out in the repetitive batch and fed batch reactors. Mathematical models for both reactor types were developed. Enzyme deactivation was described by two-step model that assumed formation of an intermediate on the pathway between the native and denatured form of enzyme. Comparisons of experiments that were carried out in the presence and in the absence of calcium ions, it was found out that calcium ions significantly contribute to the enhanced α -amylase stability.

Key words: α -amylase, starch hydrolysis, modeling, enzyme deactivation

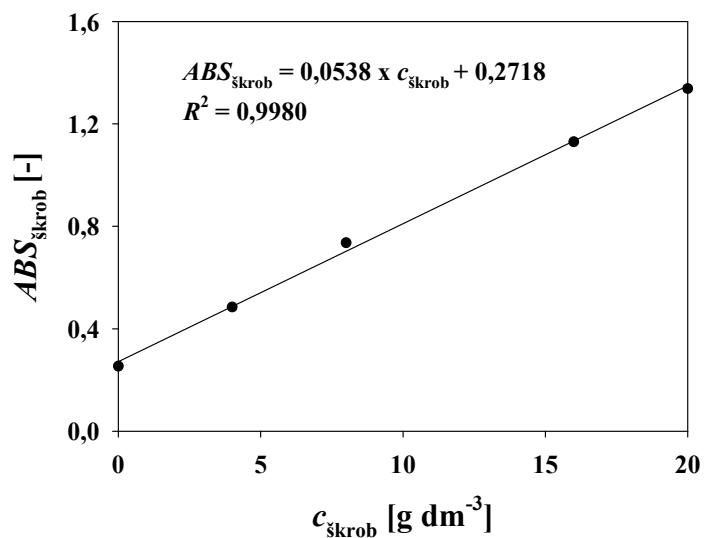
PRILOZI

PRILOG 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije škroba

PRILOG 2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije maltoze

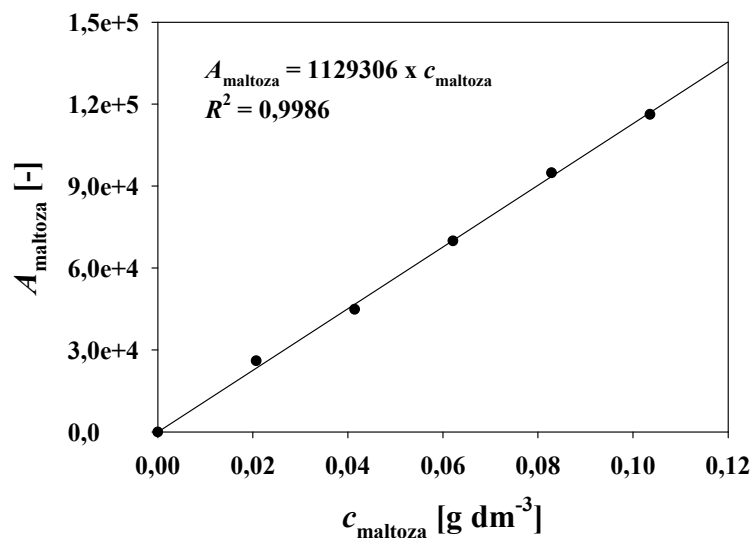
PRILOG 3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze

PRILOG 1



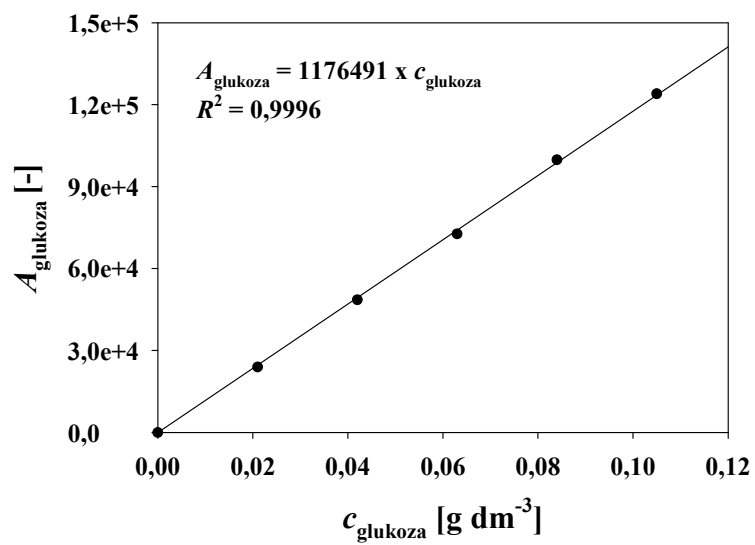
Slika 9.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije škroba

PRILOG 2



Slika 9.2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije maltoze

PRILOG 3



Slika 9.3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze