

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
ZAVOD ZA REAKCIJSKO INŽENJERSTVO I KATALIZU

MARKO TUSIĆ

**ISPITIVANJE STABILNOSTI GLUKOAMILAZE U PROTOČNO
KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU**

Zagreb, 2010.

Ovaj rad izrađen je u Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije pod vodstvom doc. dr. sc. Zvezdane Findrik i predan je na Natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2009./2010.

POPIS SIMBOLA:

r_s – brzina potrošnje supstrata, $\text{g dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$

c_s – koncentracija supstrata, g dm^{-3}

V_m – maksimalna brzina reakcije hidrolize maltoze, $\text{g dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$

K_m^S – Michaelisova konstanta, g dm^{-3}

c_P – koncentracija produkta, g dm^{-3}

K_i^P – konstanta inhibicije produktom, g dm^{-3}

k_d – konstanta deaktivacije enzima Dextrozyme, min^{-1}

F_{A0} – ulazni molarni protok reakcijske smjese, mol h^{-1}

F_A – izlazni molarni protok reakcijske smjese, mol h^{-1}

r_A – reakcijska brzina, $\text{g dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$

c_A – koncentracija reaktanta A, g dm^{-3}

q_V – volumni protok reakcijske smjese, $\text{dm}^3 \text{ h}^{-1}$

τ – prostorno vrijeme zadržavanja, h

γ_M – koncentracija maltoze, g dm^{-3}

γ_G – koncentracija glukoze, g dm^{-3}

K_m^M – Michaelisova konstanta maltoze za reakciju hidrolize maltoze, g dm^{-3}

$V_{reaktor}$ – volumen reaktora, cm^3

r – brzina reakcije hidrolize maltoze, $\text{g dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$

$V.A.$ – volumna aktivnost enzima, $\text{g dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$

$V.A.0$ – početna volumna aktivnost enzima, $\text{g dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$

n – broj okretaja mješala, o min^{-1}

f – faktor razrjeđenja enzima, -

$c_{\text{maltoza monohidrat}}$ – koncentracija maltoze monohidrata, g dm^{-3}

φ_{enzima} – volumni udio enzima, -

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. BIOTRANSFORMACIJE.....	2
2.2. ENZIMI.....	3
2.2.1. GLUKOAMILAZA.....	4
2.3. STABILNOST I DEAKTIVACIJA ENZIMA.....	5
2.4. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA.....	6
2.4.1. KINETIČKI MODELI.....	6
2.5. ENZIMSKI MEMBRANSKI REAKTOR.....	9
2.6. MATEMATIČKI MODEL ULTRAFILTRACIJSKOG MEMBRANSKOG REAKTORA.....	10
3. MATERIJALI I METODE	12
3.1. APARATURA.....	12
3.1.1. ULTRAFILTRACIJSKI MEMBRANSKI ENZIMSKI REAKTOR.....	12
3.1.2. KAPLJEVINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKOG UČINKA (HPLC).....	13
3.1.3. SPEKTROFOTOMETAR.....	13
3.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MALTOZE I GLUKOZE.....	14
3.3. MJERENJE KONCENTRACIJE PROTEINA.....	14
3.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA U REAKTORU.....	15
3.5. OPIS PROVEDBE REKTORSKIH EKSPERIMENATA.....	16
3.6. MATEMATIČKI MODEL HIDROLIZE MALTOZE U GLUKOZU U ULTRAFILTRACIJSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU.....	17
3.7. OBRADA PODATAKA.....	18
4. REZULTATI	19
4.1. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 40 °C.....	19
4.2. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 45 °C.....	20
4.3. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 60 °C.....	21
4.4. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 70 °C.....	22
4.5. DEAKTIVACIJA ENZIMA U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU BEZ PRISUSTVA SUPSTRATA PRI 60 °C.....	23
4.6. KONSTANTE DEAKTIVACIJE ENZIMA U ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU.....	24
5. RASPRAVA	25
5.1. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 40 °C.....	25
5.2. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 45 °C.....	28
5.3. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 60 °C.....	29
5.4. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 70 °C.....	29
5.5. DEAKTIVACIJA ENZIMA U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU BEZ PRISUSTVA SUPSTRATA PRI 60 °C.....	30
5.6. KONSTANTE DEAKTIVACIJE ENZIMA U ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU.....	30
6. ZAKLJUČCI	32
7. ZAHVALE	33
8. LITERATURA	34
9. SAŽETAK	37
10. SUMMARY	38
11. PRILOZI	39

1. UVOD

U današnje vrijeme se sve više pažnje poklanja zaštiti čovjekovog okoliša, te se u svrhu njegovog očuvanja prelazi na "čistije tehnologije" u proizvodnji kemikalija i farmaceutskih pripravaka. Jedna od "čistijih tehnologija" je i upotreba biokatalize u kemijskoj industriji. Povećan interes za upotrebom biokatalize u industriji proizlazi iz smanjenja količine otpadnih tvari u postupku proizvodnje¹, te također iz specifičnosti, stereospecifičnosti i selektivnosti biokatalizatora. Usprkos brojnim prednostima biokatalizatora pred klasičnim katalizatorima treba spomenuti i nedostatke poput podložnosti deaktivaciji i inhibiciji.

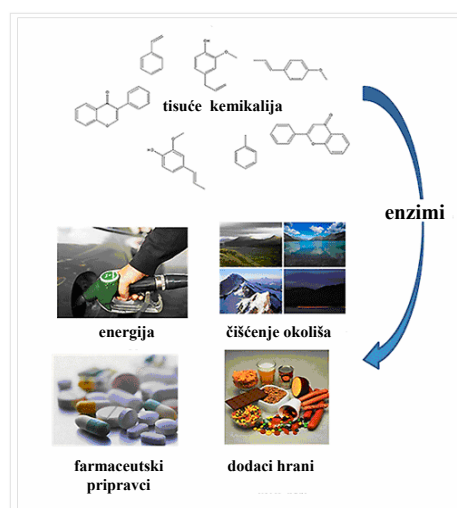
Različitošću prirodnih spojeva ukazuje na postojanost još mnogih neistraženih, neotkrivenih i neiskorištenih funkcionalnih grupa i biokatalizatora.² Otkrivanje i primjena novih enzima koji mogu katalizirati reakcije s komercijalnim potencijalom znatno će proširiti spektar industrijske biokatalize. Biokatalizatori se za sada najčešće upotrebljavaju u farmaceutskoj industriji.³ Međutim, da bi se biokatalizator mogao upotrijebiti u industrijskom mjerilu mora imati određene kvalitete: mora biti dovoljno stabilan i aktivan, mora se moći višestruko koristiti i upotrebljavati u kontinuiranim procesima, te se mora lako izdvajati iz reakcijske smjese. Stoga je svaki novi biokatalizator potrebno ispitati u realnim reaktorskim uvjetima, kinetički ga karakterizirati, procijeniti njegovu stabilnost, te pronaći metodu njegove stabilizacije.

Kako bi se odabrao adekvatan reaktor za provedbu biokatalitičke reakcije, nužno je razviti matematički model procesa koji se sastoji od kinetičkog i reaktorskog modela.⁴ Posebnu pažnju pri odabiru reaktora treba posvetiti značajkama biokatalizatora (aktivnost, stabilnost, mehanička čvrstoća, molekulska masa), značajkama reakcije (termodinamičke i kinetičke konstante), značajkama reakcijskog sustava (temperatura, koncentracija supstrata, produkata i enzima, pH) i njihovoj međusobnoj zavisnosti, te utjecaju na proces.

2. OPĆI DIO

2.1. BIOTRANSFORMACIJE

Biotransformacije su reakcije pretvorbe reaktanata u jednom ili dva reakcijska koraka u strukturno slične produkte. Ove reakcije kataliziraju biokatalizatori: pročišćeni enzimi ili enzimi u cijelim stanicama mikroorganizama.⁵ U usporedbi s tradicionalnim fermentacijskim procesima, pri provedbi biotransformacija nastaje manje nusprodukata, nisu potrebni skupi energetski zahtjevni fermentori, aeracija, miješanje i sterilnost pri istovremenoj proizvodnji velikih količina biomase. Pročišćeni enzimi su posebno korisni ako je reakcija koju kataliziraju potpuna, ako nisu inhibirani produktom te ako su aktivni i pri niskim koncentracijama reaktanta (npr. pri detoksifikacijskim reakcijama gdje su onečišćivači prisutni u otpadnim tokovima). Enzimske reakcije su daleko pogodnije od reakcija pri ekstremnim uvjetima temperature i tlaka i u prisustvu opasnih kemikalija. Biotransformacije pri blagim uvjetima sa selektivnim biokatalizatorima su ekološka i ekonomska alternativa u kemijskoj, farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji jer selektivne biotransformacije mogu pojednostaviti proizvodne procese i učiniti ih ekonomski atraktivnijim i prihvatljivim za okoliš. Pri tome je potrebno voditi računa o povećanju stabilnosti biokatalizatora i produktivnosti biokatalitičkog procesa, pronalasku jeftinog načina regeneracije koenzima i smanjenju troškova izolacije i pročišćavanja bioprodukta.⁵ Primjeri upotrebe biotransformacija prikazani su slikom 1.1.



Slika 1.1. Primjeri upotrebe biotransformacija

2.2. ENZIMI

Enzimi su proteinske molekule koje proizvode živi organizmi, a ujedno mogu biti aktivni i izvan žive stanice. Važni su za ubrzavanje kemijskih reakcija koje bi se bez njih odvijale znatno sporije, trebale višu temperaturu, jake kisele ili lužnate uvjete koji su nespojivi s opstankom živih organizama. Ovi biokatalizatori iz reakcije izlaze kemijski nepromijenjeni.⁶ Važno svojstvo enzima je aktivnost koja ovisi o nizu čimbenika kao što su: pH vrijednost, temperatura, koncentracija supstrata i produkta, ionska jakost, itd. Svaki enzim katalizira najčešće samo jednu reakciju što je uzrok specifične strukture proteinske molekule jer se na aktivno mjesto enzima može vezati samo reaktant određene prostorne strukture.⁴ Pojedini enzimi trebaju kofaktor ili koenzim za katalitičko djelovanje. Kofaktor ili koenzim je neproteinska tvar koja se veže na enzim pri čemu nastaje „holoenzim“ koji djeluje katalitički. Razlikujemo nekoliko struktura proteina, a to su: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura.⁷ Primarna struktura obuhvaća niz aminokiselina u proteinu, dok sekundarna uključuje prostorne oblike koje će aminokiseline zauzeti u prostoru. Razlikuju se tri oblika sekundarnih struktura, a to su: α -helix – oblik uzvojnice, β -sheet – oblik ploče i β -turn – oblik zavoja. Tercijarna struktura određuje oblik koji će lanac poprimiti u prostoru odnosno prikaz načina na koji će se navedeni elementi sekundarne strukture pod utjecajem veza i interakcija posložiti u prostoru. Kvartarna struktura obuhvaća prostornu konformaciju lanca proteina, te za razliku od tercijarne uključuje interakciju ili slaganje više lanaca.⁷

Enzimi imaju određene prednosti i nedostatke u odnosu na klasične katalizatore koje ne treba zanemariti. Prednosti enzima pred klasičnim katalizatorima su: ubrzavanje reakcije do 10^{20} puta, djeluju u malim količinama, reakcije ne zahtijevaju primjenu visokih temperatura i tlakova, ne zahtijevaju ekstremne pH vrijednosti niti materijale štetne za okoliš, specifični su katalizatori, imaju sposobnost provedbe kompleksne biotransformacije u jednom koraku, biorazgradivi su i ne zagađuju okoliš jer potječu iz bioloških izvora.⁸

Osnovni nedostaci enzima kao biokatalizatora su relativno visoka cijena, te sklonost deaktivaciji i inhibiciji, zbog koje se često imobiliziraju na kruti nosilac. Imobilizacija enzima omogućava njegovu višekratnu upotrebu. Tim se postupkom homogeni biokatalizator prevodi u heterogeni, a takvi biokatalizatori nazivaju se imobilizirani enzimi.⁸ Imobilizirati se mogu i cijele stanice. Na taj se način može provesti regeneracija enzima unutar cijele imobilizirane stanice inkubacijom na hranjivoj podlozi, što otvara mogućnost provedbe višestupnjevitih procesa

obzirom na činjenicu da stanica može sadržavati nekoliko enzima. Ovakav oblik biokatalizatora je jeftiniji.⁸

2.2.1. GLUKOAMILAZA

Enzim glukoamilaza, još poznat kao amiloglukozidaza i γ -amilaza, može hidrolizirati α -1,4 glikozidnu vezu škroba i oligosaharida, čime nastaje β -glukoza. Također polako hidrolizira i α -1,6 glikozidnu vezu škroba,⁹ ali joj je specifična aktivnost naspram α -1,6 glikozidne veze samo 0,2 % od aktivnosti naspram α -1,4 glikozidne veze.¹⁰ Industrijski je enzim koji se koristi za proizvodnju kristalične glukoze ili glukoznog sirupa.

Glukoamilaza se najčešće proizvodi iz gljiva, a može se izolirati iz: *Curvularia lunata*¹¹, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus terreus*, *Neurospora crassa*, *Arthrotrrys amerospora*, *Rhizopus niveus* i *Rhizopus oryzae*.¹² Molekulska masa glukoamilaza izoliranih iz raznih vrsta gljiva kreće se između 48 i 90 kDa, a iznimku čini glukoamilaza iz *Aspergillus niger*, čija molekulska masa iznosi 125 kDa. Sadržaj ugljikovodika u glukoamilazama uglavnom se kreće u rasponu od 10-20 % njihove molekulske mase.¹² Tako glukoamilaza iz *Rhizopus niveus* sadrži 14,9 % ugljikovodika, dok glukoamilaza iz *Neurospora crassa* sadrži samo 5,1 % ugljikovodika. Glukoamilaze su katalitički najaktivnije pri temperaturi između 50 i 60 °C i pH između 4 i 6.¹²

U ovom radu za reakciju hidrolize maltoze korišten je komercijalni enzim **Dextrozyme**. Dextrozyme^{13,14} je mješavina glukoamilaze i pululanaze. Dakle, glukoamilaza razgrađuje škrob i oligosaharide do glukoze, ali u isto vrijeme katalizira reakciju kondenzacije glukoze do maltoze i izomaltoze bez nastajanja drugih oligosaharida. Zato je u korištenom pripravku prisutna i pululanaza, koja sprječava povratnu reakciju kondenzacije glukoze,¹⁵ pa je moguće postići potpunu konverziju polisaharida u glukozu.

2.3. STABILNOST I DEAKTIVACIJA ENZIMA

Kako bi industrijska primjena biotehnologije bila moguća, potrebno je prilagoditi svojstva enzima zahtjevima procesa.¹⁶ Stoga je poboljšavanje željenih svojstava enzima, kao što su aktivnost i stabilnost, jedna od glavnih zadaća enzimske tehnologije. Aktivnost enzima je mjera sposobnosti enzima da katalizira određeni proces, a stabilnost enzima je preostala aktivnost nakon što je proces deaktivacije dosegao vrhunac.

Stabilnost se može podijeliti na stabilnost čuvanja i operacijsku stabilnost.¹⁷ Stabilnost čuvanja ovisi o fizikalnom stanju preparata, sredini čuvanja, dodatku supstrata, aktivatora, inhibitora, stabilizatora i temperaturi čuvanja. Operacijska stabilnost funkcija je tipa procesa (cijevni reaktor, kotlasti reaktor, kontinuirani ili diskontinuirani proces, analitička primjena), koncentracije supstrata i produkta u reaktoru, konverzije, reakcijskog medija, radne temperature, pH i vremena trajanja reakcije.¹⁷

Dakle, ispitivanje ovisnosti enzimskih svojstava o radnim uvjetima procesa od ključne je važnosti za primjenu biotehnologije u industriji. Često su aktivnost i stabilnost obrnuto proporcionalne, pa se traži optimalno rješenje.¹⁸ Najbolji enzim za neki proces uglavnom se određuje empirijski. Deaktivacija enzima igra važnu ulogu u biotehnološkim procesima jer može smanjiti djelotvornost procesa. Stoga je potrebno prikupiti potrebne podatke o ponašanju enzima u različitim uvjetima i odrediti kinetiku deaktivacije.

Deaktivacija većine enzima uglavnom slijedi kinetiku prvog reda.¹⁹ Obzirom da je deaktivacija kompleksan proces, čiji se mehanizmi uglavnom razmatraju na teorijskoj osnovi, ovaj model uglavnom dovoljno dobro opisuje pad aktivnosti enzima unutar promatranog procesa. Kod deaktivacije može doći do reakcija disocijacije, dekompozicije, agregacije i koagulacije. Disocijacija i denaturacija predstavljaju reverzibilnu deaktivaciju, dok dekompozicija, agregacija i koagulacija vode k ireverzibilnoj deaktivaciji enzima.²⁰

2.4. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA

Modeliranje kao princip reakcijskog inženjerstva pronalazi važnu ulogu u proučavanju enzimskih reakcija, kao i deaktivacije biokatalizatora.²¹ Velik je broj parametara koji mogu imati utjecaja na reakcijski tijek. Primjerice, tu su kemijska i fizikalna svojstva supstrata i produkata, karakteristike biokatalizatora, reakcijska ravnoteža, koncentracije supstrata, produkata i katalizatora. Pomoću matematičkog modela procesa u reaktoru, uz određeni tip enzimske kinetike i procijenjene kinetičke parametre, moguće je predvidjeti tijek reakcije, potrebnu koncentraciju biokatalizatora, poželjnu koncentraciju supstrata, najpovoljniji tip reaktora itd.²¹

Enzimski kinetički parametri se procjenjuju iz izraza za brzinu reakcije koji se temelje na matematičkoj obradi eksperimentalnih podataka dobivenih provođenjem reakcije. Kinetika enzimski katalizirane reakcije se određuje prateći promjenu početne brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata.²¹

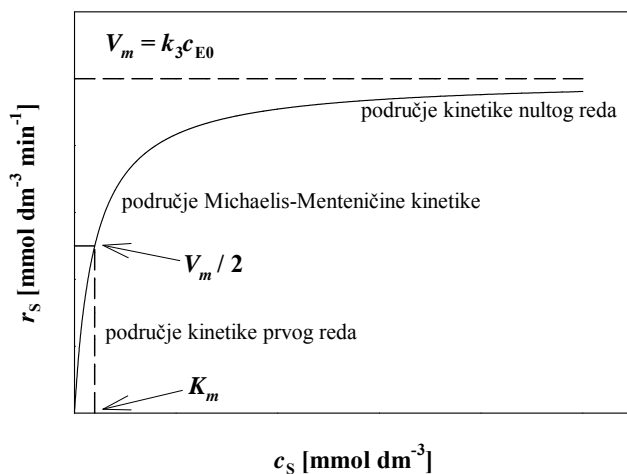
2.4.1. KINETIČKI MODELI

Matematičko modeliranje enzimskih reakcija omogućuje bolje razumijevanje kompleksnih ovisnosti reakcijskih brzina o reakcijskim parametrima i pomaže pri dizajnu eksperimenta. Modeli se mogu koristiti za dizajn i vođenje procesa, te za optimiranje uvjeta procesa.

Osnovni kinetički model kojim se opisuje brzina enzimski katalizirane reakcije je Michaelis-Menteničina jednadžba:

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s} \quad (2.1.)$$

Radi se o kinetičkom modelu koji opisuje jednosupstratnu reakciju, odnosno reakciju u kojoj reakcijska brzina ovisi o koncentraciji jednog supstrata, pri čemu je r_s brzina potrošnje supstrata, c_s je koncentracija supstrata (g dm^{-3} ili mmol dm^{-3}), V_m je maksimalna brzina reakcije ($\text{g dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ili $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$), a K_m^s je Michaelisova konstanta (g dm^{-3} ili mmol dm^{-3}).



Slika 2.1. Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji supstrata za Michaelis-Menteničinu kinetiku

Michaelis-Menteničina kinetika prikazuje tri različita područja brzine reakcije (Slika 2.1.). 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 ($c_s \gg K_m^s$) može se aproksimirati kinetikom reakcije nultog reda²².

Mehanizam enzimske katalize može biti vrlo kompleksan, što ima za posljedicu kompleksan kinetički izraz. Jedna od jednostavnijih jednadžbi je i Michaelis-Menteničina jednadžba za dvosupstratnu kinetiku prikazana jednadžbom 2.2.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) \cdot (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (2.2.)$$

Vrlo često u enzimski kataliziranim sustavima dolazi do inhibicije i deaktivacije enzima. Inhibicija enzima je uzrokovana vezanjem neželjene komponente na aktivno mjesto enzima ili jednostavno vezanjem nepoželjne komponente na enzim na način koji onemogućava daljnje vezanje supstrata na aktivno mjesto. Time je reakcija potpuno ili djelomično onemogućena. Razlikujemo tri tipa inhibicije: kompetitivnu, nekompetitivnu i antikompetitivnu inhibiciju. Za antikompetitivnu inhibiciju se vrlo često kaže da je to mješavina kompetitivne i nekompetitivne inhibicije²³. Navedeni se tipovi inhibicija opisuju kinetičkim modelima koji su prikazani jednadžbama 2.3., 2.4. i 2.5.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S \cdot \left(1 + \frac{c_p}{K_i^P}\right) + c_s} \quad (2.3.)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(K_m^S + c_s) \cdot \left(1 + \frac{c_p}{K_i^P}\right)} \quad (2.4.)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_p}{K_i^P}\right)} \quad (2.5.)$$

Kompetitivna inhibicija (Jed 2.3.) uključuje natjecanje kemijskog spoja sa supstratom za aktivno mjesto enzima. Kod nekompetitivne inhibicije (Jed 2.4.) inhibitor se reverzibilno 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 mjesto⁷.

Drugi spomenuti pojam vezan uz ponašanje enzima u reakcijskom sustavu je deaktivacija. To je pojava smanjenja enzimске aktivnosti radi povišenja temperature, promjene pH vrijednosti, visokog tlaka u sustavu, prevelike brzine miješanja ili pak prisustva neke komponente u sustavu koja na enzim djeluje deaktivirajuće. U današnje se vrijeme poboljšanje enzimskih svojstava postiže genetskim inženjeringom, te pronalaženjem i uklanjanjem uzroka deaktivacije. Poboljšanje stabilnosti enzima je također moguće postići postupkom imobilizacije.

Brzina enzimске deaktivacije se najčešće opisuje kinetičkim modelima vremenske deaktivacije prvog (Jed 2.6.) ili drugog reda (Jed 2.7.).

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \Rightarrow V_m = V_{m0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (2.6.)$$

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m^2 \Rightarrow V_m = \frac{V_{m0}}{1 + V_{m0} \cdot k_d \cdot t} \quad (2.7.)$$

Konstante deaktivacije enzima se mogu procijeniti iz reaktorskih eksperimenata, odnosno praćenjem aktivnosti enzima tijekom provođenja eksperimenta nezavisnim mjerenjima.

2.5. ENZIMSKI MEMBRANSKI REAKTOR

U ovom su radu mjerenja provedena u ultrafiltracijskom membranskom reaktoru, koji pripada u skupinu enzimskih membranskih reaktora, te će stoga o njima biti nešto više riječi u nastavku teksta.

Enzimski membranski reaktor je reaktor koji se koristi za provedbu biokatalitičkih reakcija. Razlikujemo dva tipa ovog reaktora:

- a) reaktor u kojem je biokatalizator homogeno raspodijeljen, odnosno topljivo imobiliziran i kvantitativno zadržan pomoću ultrafiltracijske membrane, a koji se naziva ultrafiltracijski membranski reaktor, i
- b) reaktor u kojem je enzim uklopljen odnosno imobiliziran u poroznu membranu, tj. netopljivo imobilizirani enzim, a koji se naziva membranski reaktor.

Za ultrafiltracijski membranski reaktor¹⁷ je karakteristično da ne postoje ograničenja prijenosu tvari, ili su ona minimalna, pa se stoga mogu i zanemariti. Kaže se da se u njemu provodi homogena biokataliza. Prijenos tvari kroz membranu se odvija prisilnom konvekcijom, pod djelovanjem tlaka. Idealnim miješanjem pomoću magnetske mješalice moguće je postići režim rada protočnog kotlastog reaktora. Za razliku od ultrafiltracijskog membranskog reaktora, u membranskom reaktoru se provodi heterogena biokataliza i postoji otpor prijenosu tvari difuzijom.

Prednost ultrafiltracijskog membranskog reaktora je u mogućnosti provedbe kontinuirane biotransformacije u homogeno biokatalitičkom sustavu. Na taj način je omogućena višekratna upotreba katalizatora, koja je neophodna za ekonomičnu industrijsku primjenu. Zadržavanje biokatalizatora unutar reaktora omogućava ultrafiltracijska membrana koja veličinom svojih pora osigurava kontinuiran protok za reaktante i produkte ali ne i za enzim, koji zbog veličine svojih molekula biva zadržan unutar reaktora.¹⁷ Iz toga se može zaključiti da se ovaj tip reaktora ne može koristiti za reakcije u kojima nastaju produkti velike molekulske mase jer bi oni tada ostali zadržani unutar reaktora. U slučaju deaktivacije enzima jednostavno se dodaje nova količina biokatalizatora koja dopijeva u reaktor zajedno s ulaznom strujom reaktanata.²⁴ Ultrafiltracijski membranski reaktor posebno je pogodan za sustave u kojima se koristi više enzima jer zbog dobrog miješanja i kontinuiranog protoka nema ograničenja prijenosu tvari.¹⁷

Uspješnost rada ultrafiltracijskog membranskog reaktora ovisi o značajkama reakcijskog sustava i o značajkama reaktora.²⁴ Tako je ovaj reaktor pogodan za reakcije koje su inhibirane supstratom, a nepogodan za reakcije inhibirane produktom jer radi pri uvjetima izlazne koncentracije produkta.

2.6. MATEMATIČKI MODEL ULTRAFILTRACIJSKOG MEMBRANSKOG REAKTORA

Matematički model ultrafiltracijskog membranskog reaktora moguće je razviti uz određene pretpostavke²⁵:

- reaktor radi izotermno
- protok kroz membranu je konvekcijski
- reakcijski volumen je konstantan i reakcijska smjesa je dobro miješana, pa je njen sastav isti u svakoj točki reakcijske smjese
- reaktor radi u stacionarnom stanju
- nema gubitka aktivnosti enzima tijekom provedbe eksperimenta
- membrana je selektivna za enzim, tj. cjelokupna količina enzima tijekom eksperimenta ostaje u reakcijskom volumenu

S obzirom na te pretpostavke matematički model reaktora²⁵ dan je sljedećim izrazom:

$$F_{A0} - F_A = r_A \cdot V \quad (2.8.)$$

gdje je F_{A0} ulazni molarni protok reakcijske smjese, F_A izlazni molarni protok reakcijske smjese, r_A je reakcijska brzina, odnosno količina tvari nastala u reaktorskom volumenu u jedinici vremena. Molarni protok računa se iz sljedeće izraza:

$$F_A = c_A \cdot q_V \quad (2.9.)$$

gdje je c_A koncentracija reaktanta A, a q_V volumni protok reakcijske smjese. Ako definiramo prostorno vrijeme zadržavanja $\tau = \frac{V}{q_V}$ (2.10.) i zajedno s izrazom 2.9. uvrstimo u izraz za matematički model reaktora, dobit ćemo izraz za izračunavanje reakcijske brzine:

$$r_A = \frac{c_{A0} - c_A}{\tau} \quad (2.11.)$$

Konverziju definiramo izrazom:

$$X_A = \frac{c_{A0} - c_A}{c_{A0}} \quad (2.12.)$$

Ako uvrstimo jednađbu 2.12. u jednađbu 2.11. dobit ćemo jednađbu za računanje reakcijske brzine preko konverzije:

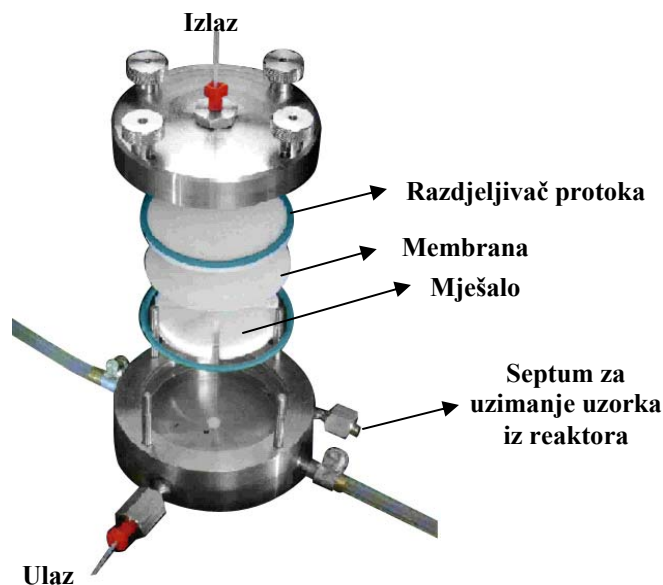
$$r_A = \frac{c_{A0} \cdot X_A}{\tau} \quad (2.13)$$

Ova jednađba omogućava računanje reakcijske brzine direktno iz ekperimentalnih podataka, te je stoga ovaj reaktor pogodan za istraživanje kinetike reakcije. Međutim, jedan od osnovnih uvjeta za to je i pretpostavka modela – stabilnost enzima.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. APARATURA

3.1.1. ULTRAFILTRACIJSKI MEMBRANSKI ENZIMSKI REAKTOR

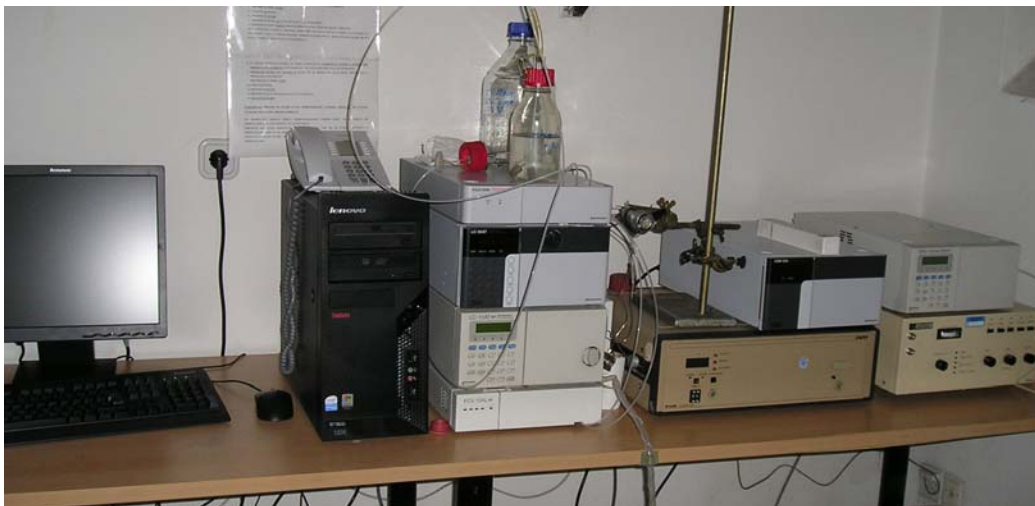


Slika 3.1. Ultrafiltracijski membranski enzimski reaktor

Kontinuirani eksperimenti hidrolize maltoze su provedeni u ultrafiltracijskom membranskom enzimskom reaktoru (UMER) koji je prikazan na slici 3.1. Reaktor je izrađen od nehrđajućeg čelika, a volumen mu je 10 cm^3 . U unutrašnjosti je smješteno magnetsko miješalo koje osigurava homogenost otopine tijekom provođenja eksperimenta. Dvostruka stjenka omogućava termostatanje reaktora na željenu temperaturu. Iznad magnetskog miješala je smješten razdjeljivač protoka kojim se ostvaruje jednolik dotok otopine na membranu. Membrana je polimernog sastava (poliaramid, UF-PA-20H, Hoechst-Celanese, Frankfurt, Njemačka) koji osigurava određenu željenu veličinu pora (20 kDa). Na taj se način biokatalizator zadržava unutar reaktorskog volumena tijekom eksperimenta, dok otopina reaktanta i produkta nesmetano prolazi kroz membranu zbog svoje manje molekulske mase. Konstantni protok, odnosno željeno prostorno vrijeme zadržavanja u reaktoru se održava korištenjem klipne pumpe (RTC – Präzisiondosier pumpe M 160, Reichelt Chemietechnik GmbH Heideiberg, Njemačka). Protok pumpe je redovito kontroliran pomoću zaporne ure i menzure.

3.1.2. KAPLJEVINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKOG UČINKA (HPLC)

Koncentracije supstrata i produkata određivane su pomoću HPLC-a sa RI detektorom. Uređaj proizvođača Shimadzu (Japan) je prikazan na slici 3.2.



Slika 3.2. Kapljevinska kromatografija visokog učinka

3.1.3. SPEKTROFOTOMETAR

Određivanje koncentracije proteina u uzorcima enzima provedeno je upotrebom spektrofotometrijske metode na dvozračnom spektrofotometru SHIMADZU UV-1601 (Japan) koji je prikazan na slici 3.3.



Slika 3.3. UV spektrofotometar (SHIMADZU UV-1601)

3.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE MALTOZE I GLUKOZE

Koncentracije glukoze i maltoze određivane su pomoću kapljevinske kromatografije visokog učinka (SHIMADZU) sa RI detektorom na temperaturi od 80°C. Korištena je kolona C₁₈ (Carbohydrate Ca²⁺, 300 x 6,5 mm, CS-Chromatographie service GmbH). Korištena mobilna faza je bila redestilirana voda čiji je protok iznosio 0,9 cm³ min⁻¹. Standardne otopine priređene su otapanjem određenih količina maltoze i glukoze u redestiliranoj vodi. Retencijska vremena za maltozu i glukozu iznosila su 11,5 i 13,5 minuta. Baždarni pravci za maltozu i glukozu se nalaze u prilogu: baždarni pravac za maltozu – Prilog 1. i baždarni pravac za glukozu – Prilog 2.

3.3. MJERENJE KONCENTRACIJE PROTEINA

Koncentraciju proteina bilo je potrebno odrediti kako bi se utvrdilo da li se gluoamilaza imobilizirala na membranu tijekom provedbe kontinuirane hidrolize maltoze u enzimskom membranskom reaktoru i time eventualno doprinijela stabilizaciji enzima. Nakon provedenog eksperimenta membrana je izvađena iz reaktora i stavljena u 10 cm³ 0,1 M fosfatnog pufera pH 5,5. Nakon što su se nataloženi proteini s membrane otopili u puferu, izmjerena je koncentracija proteina pri čemu je korištena spektrofotometrijska metoda po Bradfordu.²⁶

Za određivanje proteina je korišteno 0,8 cm³ otopine enzima potrebnog razrijeđenja. Reagens za određivanje proteina pripremljen je miješanjem 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 reagensa proizvođača Fluka s 50 cm³ etanola, 100 cm³ H₃PO₄ (85 %-tna) i 850 cm³ redestilirane vode. Tako dobiveni reagens je korišten za određivanje apsorpcijskog maksimuma na $\lambda = 595$ nm.

Prije samog određivanja koncentracije proteina u uzorcima enzima potrebno je napraviti baždarni pravac mjerenjem apsorbanacije otopina albumina iz govedeg seruma (BSA) poznate koncentracije na valnoj duljini od 595 nm. Koncentracije standardnih otopina BSA su slijedeće: 1 $\mu\text{g cm}^{-3}$; 2,5 $\mu\text{g cm}^{-3}$; 5 $\mu\text{g cm}^{-3}$; 7,5 $\mu\text{g cm}^{-3}$; 10 $\mu\text{g cm}^{-3}$, a pripremaju se razrjeđenjem otopine BSA koncentracije 0,1 mg cm⁻³. Iz ovisnosti apsorbanacije o koncentraciji dobivena je jednadžba pravca potrebna za preračunavanje apsorbanacije nepoznatog uzorka u koncentraciju proteina.

Koncentracija proteina je određena na slijedeći način: 0,8 cm³ uzorka enzima se pomiješa sa 0,2 cm³ reagensa, te se nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi pojavljuje plava

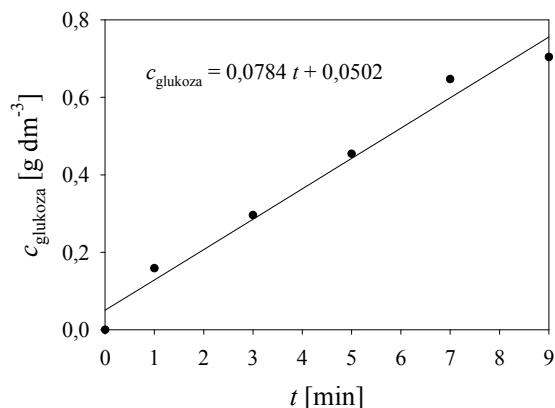
boja. Na valnoj duljini od 595 nm se mjeri apsorbancija uzoraka, a uz pomoć ranije određenog baždarnog pravca izračuna se koncentracija proteina u uzorku. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina nalazi se u prilogu – Prilog 3.

3.4. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA U REAKTORU

Aktivnost enzima u reaktoru je određivana pri temperaturi od 40 °C nezavisnim mjerenjima praćenjem koncentracije nastale glukoze metodom početnih brzina reakcije (Slika 3.4.). U određenim vremenskim intervalima su iz enzimskog membranskog reaktora uzimani uzorci enzima volumena 10 µl, te su razrijeđeni 100 puta. Ovako razrijeđen enzim je korišten za određivanje aktivnosti u reaktoru koristeći pri tome kao supstrat otopinu maltoze monohidrata koncentracije 25 g/l. Dakle, za određivanje aktivnosti enzima u ultrafiltracijskom membranskom reaktoru bilo je potrebno provesti zasebni šaržni eksperiment hidrolize maltoze. Eksperimenti su provedeni u reaktoru radnog volumena 5 cm³, a reakcija je započela dodatkom uzorka enzima iz reaktora. Prvi uzorak za analizu glukoze je uzet prije dodatka enzima, a zatim su preostali uzimani u određenim vremenskim razmacima. Prije analize na HPLC-u uzorci su razrijeđeni i profiltrirani (filtrar pora 0,2 µm) kako bi se zaustavila reakcija uklanjanjem enzima. Konverzija supstrata je u ovim eksperimentima bila manja od 10 %. Aktivnost je određivana pri različitim razrijeđenjima uzorka enzima kako bi enzim zbog pada aktivnosti još uvijek bio dovoljno aktivan za reakciju. Postupak je ponavljan 3 puta. 1 jedinica aktivnosti enzima glukoamilaze definirana je kao količina enzima koja oslobađa 1 µmol glukoze u minuti. Koncentracija glukoze mjerena je pomoću HPLC-a prema metodi opisanoj ranije. Početna reakcijska brzina izračunata je prema jednadžbi 3.1.:

$$V \cdot A = \frac{dc_G}{dt} \cdot \frac{V_{reaktor}}{V_{enzim}} \cdot f \quad (3.1.)$$

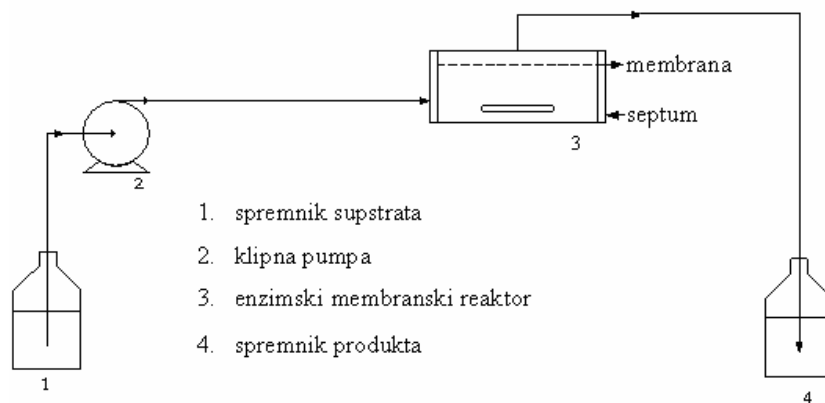
gdje je $\frac{dc_G}{dt}$ nagib pravca (Slika 3.4.) iz promjene koncentracije glukoze u vremenu, $V_{reaktor}$ predstavlja volumen reaktora korištenog za određivanje aktivnosti (5 cm³), V_{enzim} predstavlja volumen dodanog enzima (razrijeđenog 100 x) – 50, 100 i 200 µl, a f predstavlja faktor razrjeđenja enzima (100 x) uzetog uzorka iz reaktora.



Slika 3.4. Primjer određivanja aktivnosti enzima

3.5. OPIS PROVEDBE REAKTORSKIH EKSPERIMENATA

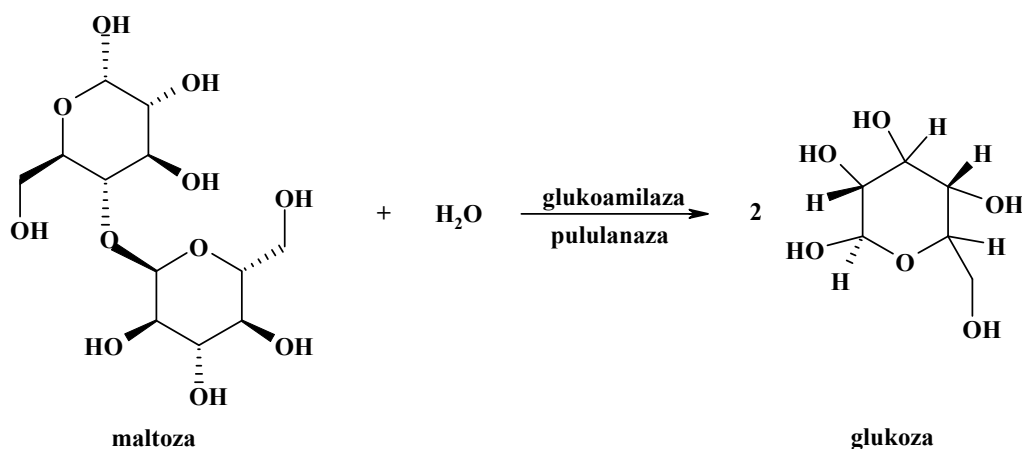
Kontinuirana hidroliza maltoze u enzimskom membranskom reaktoru volumena 10 cm³ provedena je pri 45, 60 i 70 °C u aparaturi koja je shematski prikazana na slici 3.5. Kao supstrat je korištena otopina maltoze monohidrata koncentracije 25 g dm⁻³ koja je pripravljena otapanjem supstrata u 0,1 M fosfatnom puferu pH 5,5. Klipna pumpa osiguravala je željeni protok reakcijske smjese od 3,4 ml h⁻¹. Proveden je i eksperiment bez supstrata pri 60 °C kako bi se utvrdio eventualni utjecaj supstrata na stabilnost enzima. Također je proveden eksperiment pri 40 °C, pri čemu je variran protok reakcijske smjese, s ciljem određivanja reakcijske kinetike procesa hidrolize maltoze. Reakcija je započela injektiranjem enzima u reaktor kroz injekcijski septum. Tijekom eksperimenata je praćena aktivnost enzima, te koncentracije maltoze i glukoze.



Slika 3.5. Shema aparature za provedbu eksperimenta u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru

3.6. MATEMATIČKI MODEL HIDROLIZE MALTOZE U GLUKOZU U ULTRAFILTRACIJSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU

U ultrafiltracijskom membranskom reaktoru provedena je hidroliza maltoze u glukozu katalizirana enzimom Dextrozyme, a shematski prikaz te reakcije nalazi se na slici 3.6.



Slika 3.6. Shematski prikaz reakcije hidrolize maltoze u glukozu katalizirane enzimom Dextrozyme

Kinetički model reakcije je određen na temelju eksperimentalnih istraživanja provedenih metodom početnih reakcijskih brzina²⁸, te je opisan Michaelis Menteničinom kinetikom:

$$r = \frac{V_m \cdot \gamma_M}{K_m^M + \gamma_M} \quad (3.2.)$$

gdje je V_m maksimalna brzina reakcije hidrolize maltoze, γ_M masena koncentracija maltoze, γ_G masena koncentracija glukoze, a K_m^M Michaelisova konstanta za maltozu.

Obzirom da je u ovom radu ispitivana brzina deaktivacije biokatalizatora, te nije ispunjen uvjet stabilnosti enzima unutar reaktora, izvedene su bilancne jednadžbe za ovaj reaktor u nestacionarnom stanju (Jed. 3.3. i 3.4.):

$$\frac{d\gamma_M}{dt} = \frac{\gamma_{M,0} - \gamma_M}{\tau} - r \quad (3.3.)$$

$$\frac{d\gamma_G}{dt} = \frac{\gamma_{G,0} - \gamma_G}{\tau} + 1,05 \cdot r \quad (3.4.)$$

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \quad (3.5.)$$

Pretpostavljeno je, ukoliko dođe do deaktivacije enzima glukoamilaze, da će se ona odvijati po modelu prvog reda¹⁹, što je prikazano jednadžbom 3.5.

Koncentracija u jednadžbama 3.3. i 3.4. je dana kao masena koncentracija, te je stoga u jednadžbi 3.4. koeficijent uz r 1,05. Naime, iz 1 g maltoze nastaje 1,05 g glukoze u reakciji hidrolize jer se u molekulu glukoze ugrađuje voda.

3.7. OBRADA PODATAKA

Za procjenu konstante deaktivacije enzima pri različitim temperaturama te za simulaciju eksperimenta u reaktoru je korišten programski paket SCIENTIST²⁷ koji u sebi sadrži metodu najmanjih kvadrata i simpleks metodu za procjenu parametara. Kinetički parametri, V_m i K_m^M , korišteni u ovoj simulaciji procijenjeni su iz nezavisnih mjerenja, tj. iz ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, i preuzeti su iz prijašnjih eksperimentalnih istraživanja.²⁶

Konstante deaktivacije enzima kod eksperimenata provedenih pri 45, 60 i 70 °C, te kod eksperimenta pri 60 °C bez supstrata procijenjene su iz rezultata nezavisnih mjerenja u kotlastom reaktoru praćenjem koncentracije nastale glukoze metodom početnih brzina reakcije pri temperaturi od 40 °C, tj. iz ovisnosti aktivnosti enzima o vremenu (opisano u poglavlju 3.4.). Konstante deaktivacije enzima procijenjene su metodom nelinearne regresije. Tako dobivene konstante deaktivacije, uz kinetičke parametre V_m i K_m^M i matematički model dan jednadžbama 3.2. – 3.5., korištene su za simulaciju eksperimenata u reaktoru.

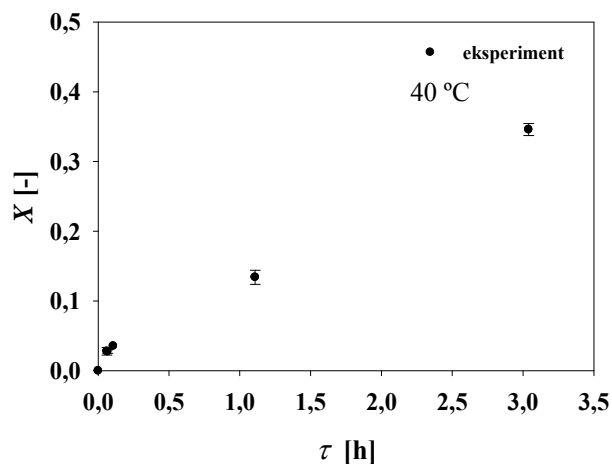
Odstupanje matematičkog modela od eksperimentalnih podataka dana je kao suma kvadrata razlike između eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih pomoću modela. Optimiranje parametara se provodi dok se ne postigne minimalna suma kvadrata razlike između eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih pomoću modela koja je zadana programom od strane korisnika. Za simulacije je korišten “Episode” algoritam ugrađen u programski paket SCIENTIST.

4. REZULTATI

U ovom radu je provedeno ispitivanje aktivnosti i stabilnost komercijalnog enzima Dextrozyme u reakciji hidrolize maltoze u glukozu u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru. Dextrozyme je smjesa dvaju enzima: glukoamilaze i pululanaze.

4.1. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 40 °C

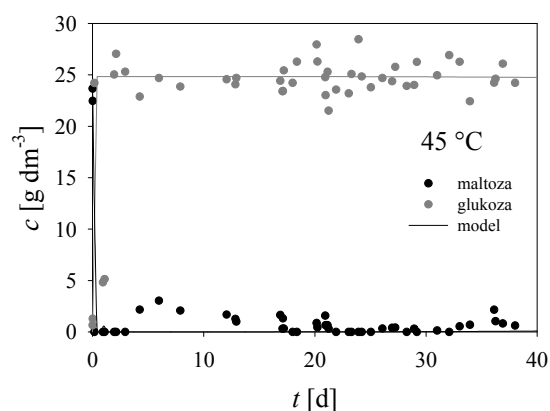
Eksperiment hidrolize maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru proveden je pri 40 °C pri različitim protocima reakcijske otopine, odnosno različitim prostornim vremenima zadržavanja. Rezultati su prikazani na slici 4.1. Eksperiment je proveden pri niskoj koncentraciji enzima kako bi se promjenom prostornog vremena zadržavanja postigle različite konverzije supstrata. Praćene su koncentracije glukoze i maltoze i na temelju eksperimentalnih podataka je izračunata konverzija.



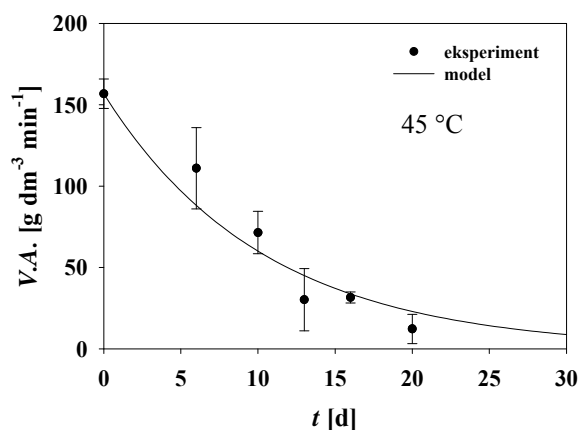
Slika 4.1. Hidroliza maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru ($T = 40$ °C, $V_{reaktor} = 10$ cm³, $0,1$ mol dm⁻³ fosfatni pufer, pH 5,5, $n = 350$ o min⁻¹, $c_{maltoza\ monohidrat} = 25$ g dm⁻³, $\varphi_{enzima} = 0,0001$, $V.A.\theta = 0,0156$ g dm⁻³ min⁻¹)

4.2. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 45 °C

Hidroliza maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru je provedena pri 45 °C i konstantnom protoku reakcijske otopine koji je iznosio 3,4 ml h⁻¹. Rezultati su prikazani na slici 4.2. Tijekom eksperimenta je praćena aktivnost enzima uzimanjem uzoraka direktno iz reaktora kroz septum s iglom i špricom, a rezultati su prikazani na slici 4.3. Važno je naglasiti da se radi o nezavisnim mjerenjima aktivnosti enzima provedenim u kotlastom reaktoru.



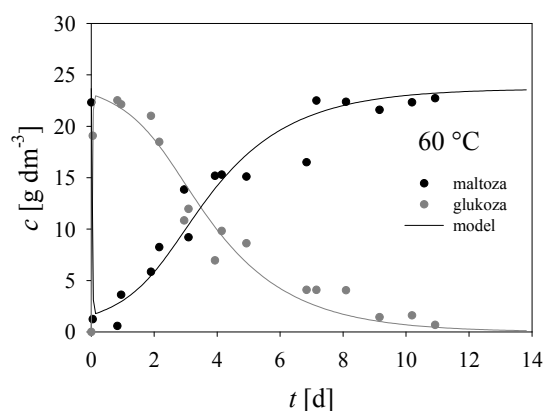
Slika 4.2. Hidroliza maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru ($T = 45\text{ °C}$, $V_{reaktor} = 10\text{ cm}^3$, $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ fosfatni pufer, pH 5,5, $n = 350\text{ o min}^{-1}$, $q_V = 3,4\text{ ml h}^{-1}$, $c_{maltoza\ monohidrat} = 25\text{ g dm}^{-3}$, $\varphi_{enzima} = 0,01$, $V.A._0 = 156,8\text{ g dm}^{-3}\text{ min}^{-1}$)



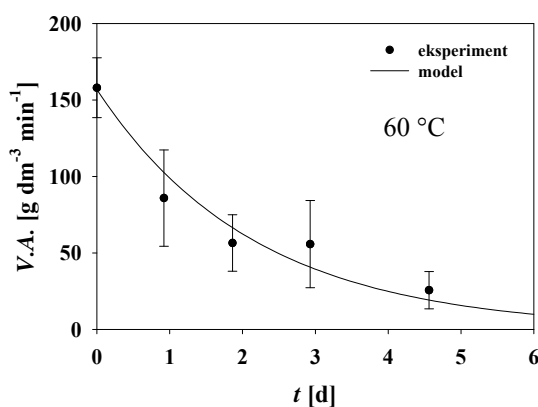
Slika 4.3. Aktivnost enzima (dextrozime) tijekom hidrolize maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru ($T = 40\text{ °C}$, $V_{reaktor} = 5\text{ cm}^3$, $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ fosfatni pufer, pH 5,5, $n = 350\text{ o min}^{-1}$, $c_{maltoza\ monohidrat} = 25\text{ g dm}^{-3}$, uzorak enzima iz ultrafiltracijskog membranskog reaktora razrijeđen 100 x za mjerenje aktivnosti)

4.3. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 60 °C

Eksperiment hidrolize maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru proveden je i pri 60 °C. Praćene su koncentracije maltoze i glukoze tijekom provođenja eksperimenta uzimanjem uzoraka na izlazu iz reaktora i analizom na HPLC-u. Rezultati su prikazani na slici 4.4. Tijekom eksperimenta je također praćena aktivnost enzima i rezultati su prikazani na slici 4.5.



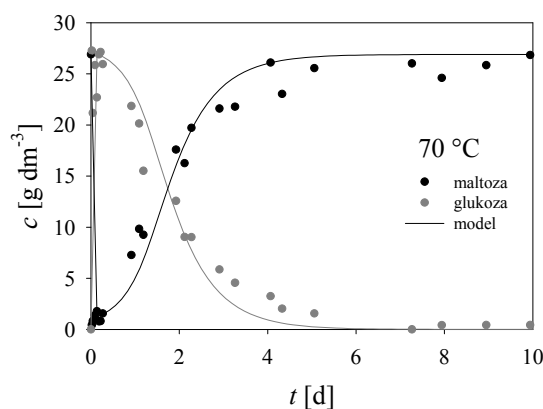
Slika 4.4. Hidroliza maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru ($T = 60\text{ °C}$, $V_{reaktor} = 10\text{ cm}^3$, $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ fosfatni pufer, pH 5,5, $n = 350\text{ o min}^{-1}$, $q_V = 3,4\text{ ml h}^{-1}$, $c_{maltoza\ monohidrat} = 22,5\text{ g dm}^{-3}$, $\varphi_{enzima} = 0,01$, $V.A._0 = 156,8\text{ g dm}^{-3}\text{ min}^{-1}$)



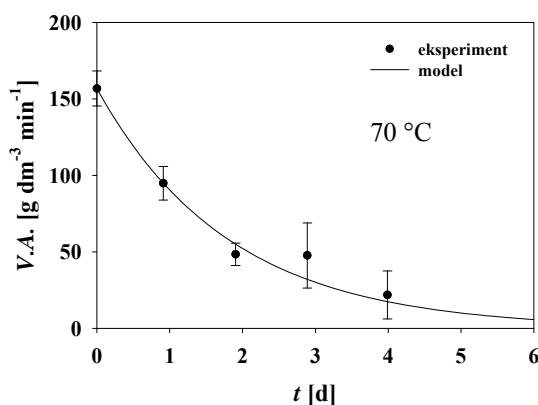
Slika 4.5. Aktivnost enzima (dextrozime) tijekom hidrolize maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru ($T = 40\text{ °C}$, $V_{reaktor} = 5\text{ cm}^3$, $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ fosfatni pufer, pH 5,5, $n = 350\text{ o min}^{-1}$, $c_{maltoza\ monohidrat} = 25\text{ g dm}^{-3}$, uzorak enzima iz ultrafiltracijskog membranskog reaktora razrijeđen 100 x za mjerenje aktivnosti)

4.4. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 70 °C

Hidroliza maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru je provedena na 70 °C. Kao i u prethodnim slučajevima tijekom eksperimenta su mjerene koncentracije supstrata i produkta; maltoze i glukoze. Rezultati su prikazani na slici 4.6. Tijekom eksperimenta je praćena aktivnost enzima, te su rezultati prikazani na slici 4.7.



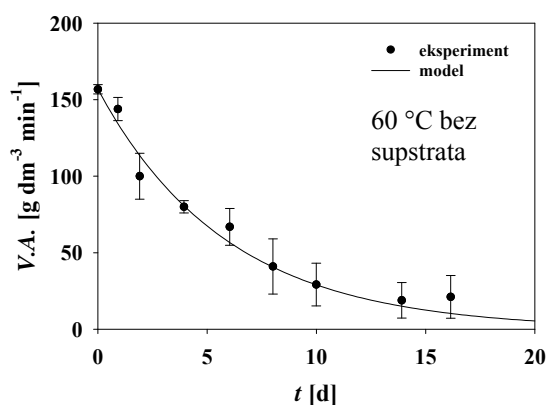
Slika 4.6. Hidroliza maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru ($T = 70\text{ °C}$, $V_{reaktor} = 10\text{ cm}^3$, $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ fosfatni pufer, pH 5,5, $n = 350\text{ o min}^{-1}$, $q_V = 3,4\text{ ml h}^{-1}$, $c_{maltoza\ monohidrat} = 27\text{ g dm}^{-3}$, $\varphi_{enzima} = 0,01$, $V.A.0 = 156,8\text{ g dm}^{-3}\text{ min}^{-1}$)



Slika 4.7. Aktivnost enzima (dextrozyme) tijekom hidrolize maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru ($T = 40\text{ °C}$, $V_{reaktor} = 5\text{ cm}^3$, $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ fosfatni pufer, pH 5,5, $n = 350\text{ o min}^{-1}$, $c_{maltoza\ monohidrat} = 25\text{ g dm}^{-3}$, uzorak enzima iz ultrafiltracijskog membranskog reaktora razrijeđen 100 x za mjerenje aktivnosti)

4.5. DEAKTIVACIJA ENZIMA U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU BEZ PRISUSTVA SUPSTRATA PRI 60 °C

Na slici 4.8. su prikazani rezultati eksperimenta provedenog bez prisustva supstrata u enzimskom membranskom reaktoru. Kroz reaktor je protjecao fosfatni pufer, te je u reaktor injektiran enzim. Tijekom vremena su mjerene aktivnosti enzima u reaktoru, te su rezultati dani na Slici 4.8. Protok u reaktoru je bio konstantan tijekom eksperimenta i iznosio je $3,4 \text{ ml h}^{-1}$.



Slika 4.8. Aktivnost enzima (dextrozyme) u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru bez supstrata ($T = 40 \text{ °C}$, $V = 5 \text{ cm}^3$, $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ fosfatni pufer, $\text{pH } 5,5$, $n = 350 \text{ o min}^{-1}$, $c_{\text{maltoza monohidrat}} = 25 \text{ g dm}^{-3}$, $\varphi_{\text{enzima}} = 0,01$, uzorak enzima iz ultrafiltracijskog membranskog reaktora razrjeđen $100 \times$ za mjerenje aktivnosti)

4.6. KONSTANTE DEAKTIVACIJE ENZIMA U ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU

U tablici 4.1. su prikazani rezultati procjene konstante deaktivacije enzima pri različitim temperaturama. Iz konstanti deaktivacije su izračunata vremena poluraspada enzima.

Tablica 4.1. Konstante deaktivacije enzima u enzimskom membranskom reaktoru

$T / ^\circ\text{C}$	$k_d [\text{d}^{-1}]$	$t_{1/2} [\text{d}]$
45	$0,0960 \pm 0,0136$	7,22
60	$0,4604 \pm 0,0345$	1,51
60 bez supstrata	$0,1609 \pm 0,0197$	4,31
70	$0,5501 \pm 0,0456$	1,26

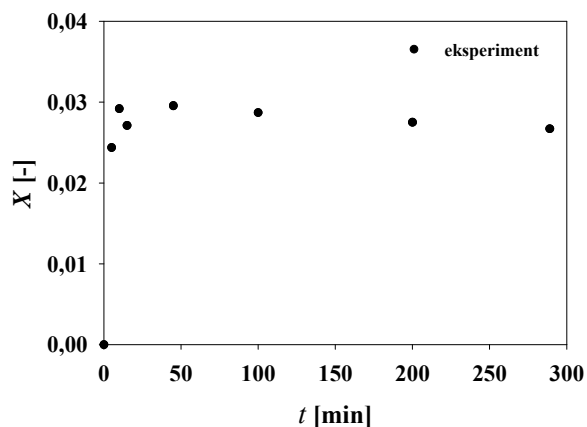
5. RASPRAVA

5.1. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 40 °C

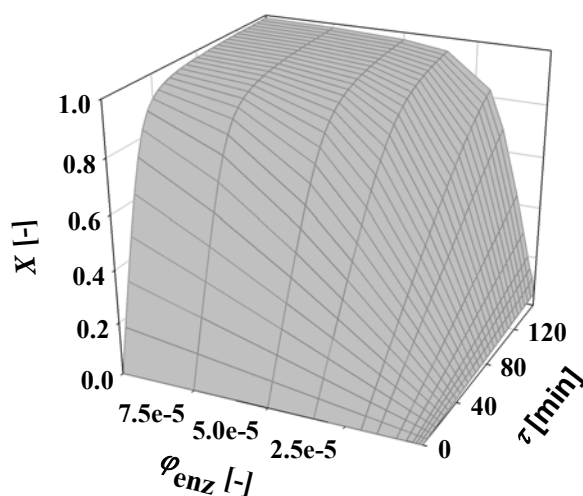
Hidroliza maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru pri 40 °C je provedena s ciljem određivanja kinetike reakcije. Naime, kinetika hidrolize maltoze je već određena u prethodnim istraživanjima^{10,28}, ali ne u enzimskom membranskom reaktoru. Kao što je u eksperimentalnom dijelu već navedeno, protočno kotlasti enzimski membranski reaktor je idealan za određivanje kinetike enzimski katalizirane reakcije, no uz uvjet da ostanu zadovoljeni uvjeti idealnosti navedeni u poglavlju 2.6. , tj. da ovaj reaktor radi kao idealni protočno kotlasti reaktor. Prethodna istraživanja na enzimu Dextrozyme²⁸ su pokazala da je enzim sklon deaktivaciji na povišenim temperaturama, no ne i na 40 °C. Stoga je proveden eksperiment u kojem je pri različitim protocima, odnosno različitim prostornim vremenima zadržavanja u reaktoru mjerena koncentracija maltoze i glukoze. Eksperiment je proveden pri niskoj koncentraciji enzima kako bi se promjenom protoka mijenjala i konverzija supstrata. Rezultati su prikazani na slici 4.1. kao ovisnost konverzije o vremenu zadržavanja. Prema očekivanjima porastom prostornog vremena zadržavanja u reaktoru raste i koncentracija produkta, odnosno konverzija supstrata. Međutim, usprkos ovim rezultatima kinetika reakcije nije mogla biti određena na ovaj način radi pada aktivnosti enzima kroz produljenu upotrebu u reaktoru. Dakle, nakon uspostavljanja stacionarnog stanja u reaktoru, s vremenom dolazi do pada aktivnosti enzima koje se vidi kao pad koncentracije produkta, odnosno konverzije supstrata. Stoga se stacionarna konverzija nije mogla zadržati kroz duži vremenski period. Primjer takvog eksperimentalnog rezultata je dan na slici 5.1. Možemo zaključiti da nije zadovoljen uvjet idealnosti reaktora jer aktivnost enzima nije konstantna.

Obzirom na prethodno opisane rezultate provedeni su drugi eksperimenti u kojima je praćena aktivnost enzima u reaktoru, kao i koncentracija reaktanta i produkta tijekom provedbe eksperimenta. Na konverziju u protočno kotlastom reaktoru utječu koncentracija enzima i prostorno vrijeme zadržavanja (Slika 5.2.). Dakle, ukoliko se jedno od tih parametara promijeni, posljedica će biti promjena koncentracije produkta, tj. konverzije supstrata u reaktoru. Ukoliko je

umnožak vremena zadržavanja i koncentracije enzima konstantan, neće doći do promjene konverzije supstrata u reaktoru. Iz toga slijedi da se pad konverzije supstrata u protočno kotlastom reaktoru uzrokovan padom aktivnosti enzima može kompenzirati povećanjem prostornog vremena zadržavanja.



Slika 5.1. Pad konverzije supstrata s vremenom u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru pri konstantnom protoku otopine supstrata



Slika 5.2. Utjecaj koncentracije enzima i prostornog vremena zadržavanja na konverziju supstrata u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru.

Ukoliko se u protočno kotlastom reaktoru upotrijebi veća koncentracija enzima, to može rezultirati visokom koncentracijom produkta u reaktoru (Slika 5.2.), te prikriti pad aktivnosti enzima. Ova pojava je u prethodim istraživanjima²⁸ pogrešno interpretirana, te je zaključeno da je

pri 40 °C enzim stabilan, no u stvarnosti je polako gubio aktivnost, a obzirom da ga je u reaktoru bilo puno, gubitak aktivnosti nije bio dovoljan da se odrazi na pad konverzije u reaktoru.

Levenspiel²⁹ je predložio dvije metode za određivanje operacijske stabilnosti katalizatora u kontinuiranom procesu. Prva od predloženih metoda se sastoji u održavanju konstantne konverzije u protočno kotlastom reaktoru smanjivanjem protoka reakcijske otopine, odnosno povećavanjem prostornog vremena zadržavanja. Ova metoda zahtjeva brzu i efikasnu metodu analize reakcijske otopine, kako bi se odmah moglo reagirati na promjene konverzije supstrata. Obzirom na sustav koji je proučavan u ovom radu, te na način analize reaktanata i produkata (koji je bio poprilično spor), ovdje je korištena druga metoda, koju je također predložio Levenspiel, a sastoji se u držanju konstantnog protoka reakcijske smjese, te praćenja konverzije supstrata u reaktoru. Na taj način, pad konverzije u reaktoru upućuje na pad aktivnosti enzima, odnosno na njegovu deaktivaciju.²⁹ Nedostatak ove metode je vidljiv u prethodnim istraživanjima na ovdje promatranom sustavu²⁸ jer kod visokih koncentracija enzima u reaktoru, deaktivacija ne mora biti vidljiva čak niti kroz duži vremenski period. Stoga je Levenspielova metoda modificirana na način da je u daljnjim eksperimentima, osim konverzije supstrata, praćena i aktivnost enzima u reaktoru nezavisnim mjerenjima.

Kako bi bilo potvrđeno da membrana ultrafiltracijskog membranskog reaktora doista zadržava enzim unutar svog volumena, mjerena je aktivnost enzima na izlazu iz reaktora. Pokazalo da u izlaznoj otopini aktivnosti nema, odnosno da je enzim kvantitativno zadržan u reaktoru.

5.2. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 45 °C

U svim sljedećim eksperimentima je korištena nešto veća koncentracija enzima, kako bi se aktivnost mogla pratiti kroz duži vremenski period. U prethodnim istraživanjima²⁶ je reakcija pri 40 °C praćena kroz 40 dana, te je konverzija bila gotovo 100 % cijelo vrijeme. Eksperiment proveden pri 45 °C (Slika 4.2.) je također vođen blizu 40 dana, te bi se iz praćenja koncentracije maltoze i glukoze dalo zaključiti da je enzim stabilan. Naime, konverzija maltoze je tijekom tog vremena bila skoro 100 %. Bez obzira na konverziju maltoze u reaktoru, praćenjem aktivnosti enzima u reaktoru tijekom provođenja ovog eksperimenta (Slika 4.3.) se pokazalo da aktivnost enzima relativno brzo opada. Ovaj pad aktivnosti bi se očitovao i iz ovisnosti koncentracije supstrata i produkta o vremenu da je korištena niža koncentracija enzima u reaktoru. To se vidi iz simulacije na slici 5.2. gdje je kod nižih koncentracija enzima, a istih prostornih vremena zadržavanja u reaktoru postignuta niža konverzija supstrata.

Iz eksperimentalnih rezultata na slici 4.3. je procijenjena konstanta deaktivacije prvog reda (pretpostavljeno je da se radi o deaktivaciji prvog reda)¹⁹, koja je prikazana u Tablici 4.1. Navedena je konstanta deaktivacije korištena prilikom simulacije eksperimenta u reaktoru (Slika 4.2.) uz matematički model dan jednadžbama 3.2. - 3.5.

Kinetički parametri korišteni u ovoj simulaciji su preuzeti iz prijašnjih eksperimentalnih istraživanja (neobjavljeni podaci), a iznosili su:

- maksimalna brzina reakcija, $V_m = 10164,2 \text{ g dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$
- Michaelisova konstanta, $K_m^M = 1,8 \text{ g dm}^{-3}$

Nakon što je eksperiment zaustavljen, mjerena je koncentracija enzima na membrani. Membrana je izvađena iz reaktora te je isprana s malim volumenom pufera (10 cm^3) kako bi se eventualni proteini koji su se mogli zaljepiti za membranu otopili. U puferu je zatim mjerena koncentracija proteina metodom po Bradfordu opisanom u eksperimentalnom dijelu rada. Pokazalo se da je na membrani ostalo imobilizirano 0,6 mg proteina što predstavlja otprilike 82 % proteina injektiranih u reaktor. Ukoliko se enzim nataloži na membranu u više slojeva, može doći do prekrivanja aktivnih mjesta enzima, te samim time i do deaktivacije enzima.

5.3. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 60 °C

Eksperiment proveden pri 60 °C je pokazao da podizanjem temperature u reaktoru brže pada aktivnost enzima, te se iz prikaza ovisnosti koncentracije maltoze i glukoze o vremenu (Slika 4.4.) može vidjeti da nije bilo moguće postići stacionarno stanje u protočnom kotlastom reaktoru. Nakon što u početnom dijelu eksperimenta koncentracija glukoze naraste (gotovo 100 % konverzije maltoze), ona naglo pada već u prvim satima eksperimenta. Deaktivacija je potpuna nakon otprilike 2 tjedna kada koncentracija glukoze pada na nulu. Ako se uspoređi pad aktivnosti enzima u eksperimentima pri 45 °C (Slika 4.3.) i 60 °C (Slika 4.5.) vidi se da je u eksperimentu pri 60 °C pad aktivnosti znatniji već nakon nekoliko dana. Navedeni podaci ovisnosti aktivnosti o vremenu (Slika 4.5.) su korišteni za procjenu konstante deaktivacije enzima pri 60 °C (Tablica 4.1.), te je konstanta deaktivacije korištena prilikom simulacije eksperimenta u reaktoru (Slika 4.4.) Preostali kinetički parametri su određeni u ranijim istraživanjima (neobjavljeni podaci) nezavisnim mjerenjima metodom početne reakcijske brzine, te su iznosili:

- maksimalna brzina reakcije, $V_m = 12487,3 \text{ g dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$
- Michaelisova konstanta, $K_m^M = 3,2 \text{ g dm}^{-3}$

Matematički model dan jednadžbama 3.2. - 3.5. dobro opisuje eksperimentalne rezultate.

5.4. HIDROLIZA MALTOZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU PRI 70 °C

Poslijednji eksperiment hidrolize maltoze u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru je proveden pri 70 °C. Pri navedenoj temperaturi je nastupila najbrža deaktivacija enzima, što se vidi iz ovisnosti koncentracije reaktanta i produkta o vremenu (Slika 4.6.), kao i iz rezultata ovisnosti aktivnosti enzima o vremenu (Slika 4.7.). Nakon prvog sata eksperimenta je postignuta maksimalna konverzija u reaktoru (Slika 4.6.), no ubrzo koncentracija produkta pada, te je već oko šestog dana pala na nulu, što je dvostruko brže nego u prethodnom eksperimentu. Ovdje valja napomenuti da su eksperimenti pri 45, 60 i 70 °C provedeni pri istim uvjetima koncentracije supstrata i enzima, te ih je zbog toga moguće na ovaj način uspoređivati.

Konstante deaktivacije enzima procijenjene na temelju eksperimentalnih rezultata prikazanih na slici 4.7. je dana u Tablici 4.1. i korištena uz kinetičke parametre V_m i K_m^M za simulaciju eksperimenta prikazanog na slici 4.6. Na 70 °C maksimalna reakcijska brzina, V_m je izosila 11325,7 g dm⁻³ min⁻¹, a Michaelisova konstanta, K_m^M 4,25 g dm⁻³. Može se zaključiti da matematički model (Jed 3.2. - Jed 3.5.) dobro opisuje eksperimentalne podatke.

5.5. DEAKTIVACIJA ENZIMA U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU BEZ PRISUSTVA SUPSTRATA PRI 60 °C

Obzirom da se u literaturi često spominje da supstrat može stabilizirati enzim³⁰, proveden je eksperiment bez supstrata kako bi se vidjelo da li će se to potvrditi i u ovom slučaju. Kroz reaktor je protjecao samo pufer, a u reaktoru se nalazio enzim čija je aktivnost praćena u određenim vremenskim razmacima (Slika 4.8.). Rezultati su pokazali da bez obzira na odsutnost supstrata aktivnost enzima pada, ali sporije nego u slučaju eksperimenta sa supstratom pri istoj temperaturi (Slika 4.5.). Konstanta deaktivacije procjenjena u ovom eksperimentu je dana u Tablici 4.1.

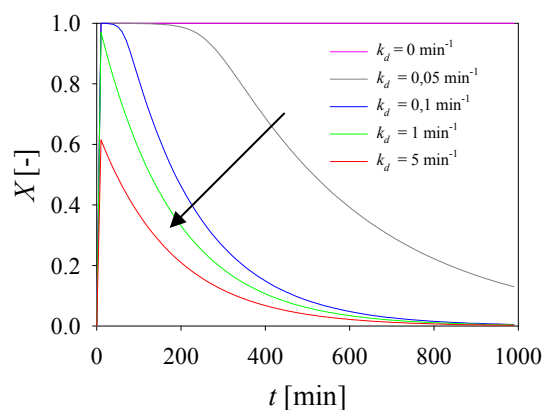
5.6. KONSTANTE DEAKTIVACIJE ENZIMA U ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU

U tablici 4.1. su prikazane konstante deaktivacije u eksperimentima provedenim pri različitim temperaturama. Na temelju konstanti deaktivacije je izračunato vrijeme poluraspada enzima u reaktoru, također prikazano u navedenoj tablici. Obzirom da je pretpostavljeno da se enzim deaktivira prema kinetici 1. reda, izvedeno je da se vrijeme poluraspada enzima može izračunati prema izrazu:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 0,5}{-k_d} \quad (5.1.)$$

Vrijednosti procjenjenih konstanti deaktivacije pri različitim temperaturama koje su prikazane u tablici 4.1. pokazuju da s porastom temperature na kojoj je provedena reakcija hidrolize maltoze raste i konstanta deaktivacije enzima. Samim time, s porastom temperature opada i vrijeme poluraspada enzima. Usporedimo li vrijednosti procjenjenih konstanti deaktivacije eksperimenata na 60 °C sa i bez supstrata, možemo uočiti da je kod eksperimenta bez supstrata konstanta deaktivacije manja, odnosno da je deaktivacija enzima sporija. Ovaj je rezultat u suprotnostima s pojedinim istraživanjima u kojima autori pokazuju da prisustvo supstrata djeluje stabilizirajuće na enzim.²⁹

Slika 5.3. prikazuje utjecaj konstante deaktivacije enzima na konverziju u reaktoru. Simulacija je provedena u programskom paketu SCIENTIST koristeći matematički model dan jednadžbama 3.2. – 3.5. Porastom konstante deaktivacije enzima dolazi do bržeg pada konverzije supstrata.



Slika 5.3. Pad konverzije supstrata pri različitim konstantama deaktivacije enzima

6. ZAKLJUČCI

Rezultati eksperimenta provedenog pri 40 °C pokazuju da porastom prostornog vremena zadržavanja u reaktoru raste i koncentracija produkta, odnosno konverzija supstrata. Nakon uspostavljanja stacionarnog stanja u reaktoru dolazi do pada aktivnosti enzima. Iz praćenja koncentracije maltoze i glukoze kod eksperimenta pri 45 °C tijekom 40 dana može se zaključiti da je enzim stabilan. Međutim, praćenjem aktivnosti enzima u reaktoru tijekom ovog eksperimenta se pokazalo da aktivnost enzima relativno brzo pada. Kod eksperimenta pri 60 °C iz prikaza ovisnosti koncentracije maltoze i glukoze o vremenu može se vidjeti da nije bilo moguće postići stacionarno stanje u protočnom kotlastom reaktoru. Deaktivacija je potpuna nakon otprilike 2 tjedna. Pri 70 °C je nastupila najbrža deaktivacija enzima u protočno kotlastom reaktoru. Nakon prvog sata eksperimenta je postignuta maksimalna konverzija u reaktoru, no ubrzo koncentracija produkta pada, te je već oko šestog dana pala na nulu, što je dvostruko brže nego pri 60 °C.

Rezultati eksperimenta pri 60 °C bez supstrata su pokazali da bez obzira na odsutnost supstrata aktivnost enzima pada, ali sporije nego u slučaju eksperimenta sa supstratom pri istoj temperaturi. Usporedimo li vrijednosti procijenjenih konstanti deaktivacije eksperimenata pri 60 °C sa i bez supstrata, možemo zaključiti da je kod eksperimenta bez supstrata konstanta deaktivacije manja, odnosno da je deaktivacija enzima gotovo trostruko sporija.

Porastom temperature na kojoj je provedena reakcija hidrolize maltoze raste konstanta deaktivacije enzima, te opada vrijeme poluraspada enzima. Kako bi se enzim stabilizirao pri višim temperaturama potrebno je razmotriti mogućnosti kemijskih i/ili fizikalnih metoda imobilizacije. Pri tome valja voditi računa o cijeni enzima, koja je u ovom slučaju niska, pa je isplativo koristiti isključivo jeftinu metodu imobilizacije.

Matematički model dobro opisuje eksperimentalne podatke. Iako su eksperimenti provedeni u laboratorijskom mjerilu, predstavljaju vrijedne rezultate za ovaj komercijalni enzim.

7. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Zvezdani Findrik koja mi je stručnim znanjem omogućila izradu ovog rada i nesebično pomagala tijekom njegove izrade.

8. LITERATURA

1. Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J., Ballesteros, A.: Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends in Biotechnology*, 24, 6-7 (2006)
2. Fernandez-Lafuente, R., Rodriguez, V., Guisan, J.M.: The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into α -keto acids (phenylpyruvic acid), *Enzyme and Microbial Technology*, 23-24 (1998)
3. Pollard, D.J., Woodley, J.M.: Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *Trends in Biotechnology*, 25, 2-3 (2006)
4. Findrik, Z.: Studij reakcija kataliziranih oksidazama aminokiselina, Doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 31-36 (2006)
5. Vasić-Rački, Đ.: History of Industrial Biotransformations-Dreams and Realities, *Industrial Biotransformations*, Weinheim VCH, 3-29 (2006)
6. Medicinska enciklopedija, Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb, 444-449 (1967)
7. Duraković, S.: Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 50-215 (1996)
8. Štorek, H.: Optimiranje biosinteze oksido-redukcijskih biokatalizatora, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 7-9 (2002)
9. Weil, C.E., Burch, R.J., Van Dyk, J.W.: An α -amylglucosidase that produces β -glucose, *Cereal Chemistry*, 31, 150-158 (1954)
10. Hiromi, K., Hamazu, Z., Takahashi, K., Ono, S.: Kinetic studies on glucoamylase II, competition between two types of substrate having α -1,4 and α -1,6 glucosidic linkages, *Journal of Biochemistry (Tokyo)*, 59, 411-418 (1966)
11. Feng, B., Hu, W., Ma, B., Wang, Y., Huang, H., Wang, S., Qian, X.: Purification, characterization, and substrate specificity of a glucoamylase with steroidal saponin-rhamnosidase activity from *Curvularia lunata*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1329–1338 (2007)

12. Norouzzian, D., Akbarzadeh, A., Scharer, J. M., Young, M. M.: Fungal Glucoamylases, *Biotechnology Advances*, 24, 80-85 (2006)
13. Ma, Y., Cai C., Wang, J.: Enzymatic hydrolysis of corn starch for producing fat mimetics, *Journal of Food Engineering*, 73, 297-303 (2006)
14. Gill, R.K., Kaur, J.: A thermostable glucoamylase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and thermostability, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 540-543 (2004)
15. Roy, I., Gupta, M.N.: Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 26-32 (2004)
16. Chitnis, A., Sadana, A.: pH-Dependent Enzyme Deactivation Models, *Chemical Engineering Department, University of Mississippi, Mississippi*, 1-3 (1988)
17. Kragl, U., Vasić-Rački, Đ., Wandrey, C.: Continuous processes with soluble enzymes, *Indian Journal of Chemistry*, 32B, 103-117 (1993)
18. Wiseman, A.: *Biochemical Society Transactions*, 11, 18-19 (1983)
19. Laidler, K. J., Bunting, P. S.: *The chemical kinetics of enzyme action*, 2nd edition, Clarendon, Oxford (1973)
20. Lencki, R.W., Arul, J., Neufeld, R. J.: Effect of subunit dissociation, denaturation, aggregation, coagulation and decomposition on enzyme inactivation kinetics: I. First-order behaviour, *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1421-1426 (1992)
21. Straathof, A.J.J.: Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 991-995 (2001)
22. Mioč, I., Nežić, I.: Enzimatsko uklanjanje niskih koncentracija L-aminokiselina iz pripravka D-aminokiselina, *Kemijsko inženjerske vježbe, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb* (2006)
23. Dunn, I.J., Heinle, E., Ingham, J., Prenosil, J.E.: *Biological Reaction Engineering, Weinheim VCH*, 4-5 (1992)
24. Vasić-Rački, Đ.: Razvoj kemijskog (biokemijskog) procesa, *Zbornik: Inženjerski pristup u kemijskoj i farmaceutskoj industrijskoj praksi*, 5, 1-4 (1995)
25. Roy, I., Gupta, M.N.: Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads, *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 26-32 (2004)

26. Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 (1976)
27. SCIENTIST handbook, Micromath[®], Salt Lake City (1986–1995)
28. Findrik, Z., Vrsalović Presečki, A., Vasić-Rački, Đ.: Mathematical modeling of maltose hidrolysis in different types of reactor, *Bioprocesses and Biosystems Engineering*, 33, 299-307 (2010)
29. van't Riet, K., Tramper, J.: *Basic Bioreactor Design*, Marcel Dekker Inc., New York, 342-343 (1992)
30. Shenoy, B. C., Appu Rao, A. G., Raghavendra Rao, M. R.: Structure and stability of glucoamylase II from *Aspergillus niger*, A circular dichroism study *Journal of Bioscience*, Vol 6, Number 5, 601-611 (1984)

9. SAŽETAK

MARKO TUSIĆ:

ISPITIVANJE STABILNOSTI GLUKOAMILAZE U PROTOČNO KOTLASTOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU

U ovom radu je provedeno ispitivanje stabilnosti komercijalnog enzima Dextrozyme, koji je smjesa dvaju enzima, glukoamilaze i pululanaze, u reakciji hidrolize maltoze u glukozu u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru. Kontinuirana hidroliza maltoze u enzimskom membranskom reaktoru volumena 10 cm³ provedena je pri 45, 60 i 70 °C pri konstantnom prostornom vremenu zadržavanja (176,5 min). Proveden je i eksperiment bez supstrata pri 60 °C kako bi se utvrdio eventualni utjecaj supstrata na stabilnost enzima. Također je proveden eksperiment pri 40 °C, pri čemu je variran protok reakcijske smjese u cilju određivanja kinetike reakcije. Međutim, enzim nije bio stabilan pri ovoj temperaturi, te kinetika reakcije nije određena na ovaj način. Tijekom eksperimenata su praćene koncentracije maltoze i glukoze, te aktivnost enzima, koja je određivana nezavisnim mjerenjima u kotlastom reaktoru pri temperaturi od 40 °C praćenjem koncentracije nastale glukoze metodom početnih brzina reakcije. Dobiveni podaci ovisnosti aktivnosti o vremenu su korišteni za procjenu konstante deaktivacije enzima pri 45, 60 i 70 °C, te pri 60 °C bez supstrata korištenjem programskog paketa SCIENTIST. Konstanta deaktivacije enzima i kinetički parametri V_m i K_m^M korišteni su za simulaciju eksperimenata u reaktoru pri navedenim temperaturama. Kako bi bilo potvrđeno da membrana ultrafiltracijskog membranskog reaktora zadržava enzim unutar svog volumena, mjerena je aktivnost enzima na izlazu iz reaktora. Osim toga, nakon što je eksperiment zaustavljen, mjerena je koncentracija proteina na membrani metodom po Bradfordu.

Eksperiment pri 40 °C pokazao je da porastom prostornog vremena zadržavanja u reaktoru raste i konverzija supstrata. Porastom temperature u reaktoru dolazi do bržeg pada aktivnosti enzima, tj. brže deaktivacija enzima. Također, kod eksperimenta bez supstrata aktivnost enzima pada, ali sporije nego u slučaju eksperimenta sa supstratom pri istoj temperaturi (60 °C). Razvijeni matematički model dobro je opisao eksperimentalne podatke.

Ključne riječi: biotransformacija, Dextrozyme, enzimski membranski reaktor, aktivnost enzima, deaktivacija enzima

10. SUMMARY

MARKO TUSIĆ:

STABILITY OF GLUCOAMYLASE IN CONTINUOUSLY OPERATED ENZYME MEMBRANE REACTOR

The stability of Dextrozyme (a mixture of glucoamylase and pullulanase) was investigated in this work in the reaction of maltose hydrolysis. The experiments were carried out in the continuously operated enzyme membrane reactor at different temperatures: 45, 60 and 70 °C. The first experiment was carried out at 40 °C and at different residence times in the reactor to investigate the enzyme kinetics. However, the enzyme stability was not satisfactory for that purpose. The experiments at 45, 60 and 70 °C were carried out at constant residence time (176,5 min) in the continuously operated enzyme membrane reactor. During these experiments maltose and glucose concentrations were followed, as well as the enzyme activity. Enzyme activity was followed by independent experiments carried out in the batch reactor at 40 °C. The initial reaction rate method was used for that purpose.

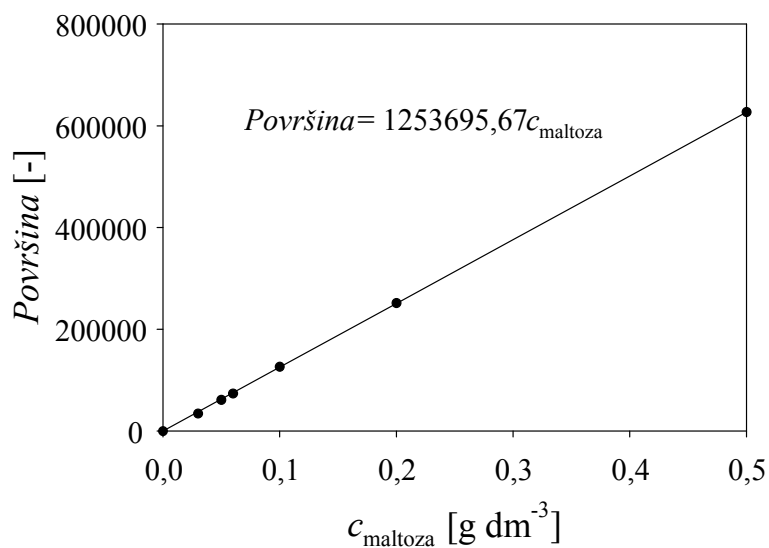
Obtained data of enzyme activity *vs* time were used to estimate enzyme operational stability decay rate constants at 45, 60 and 70 °C, and at 60 °C without substrate using SCIENTIST. Enzyme operational stability decay rate constant and kinetic parameters V_m and K_m^M were used to simulate experiments in reactor at temperatures above mentioned. Enzyme activity at the reactor outlet was measured to ensure that ultrafiltration membrane retained the enzyme within its volume. At the end of the experiment carried out at 40 °C protein concentration on membrane was measured using the Bradford method in order to see if the enzyme was immobilized on the membrane.

Experiment at 40 °C showed that the increase of the residence time in the reactor has led to the increase of substrate conversion. Higher temperature in reactor caused faster enzyme activity drop, i.e. faster enzyme operational stability decay. Enzyme activity also reduces in experiment without substrate, but slower than in case of experiment with substrate at the same temperature (60 °C). The developed mathematical model described the experimental data well.

Key words: biotransformation, Dextrozyme, enzyme membrane reactor, enzyme activity, enzyme operational stability decay

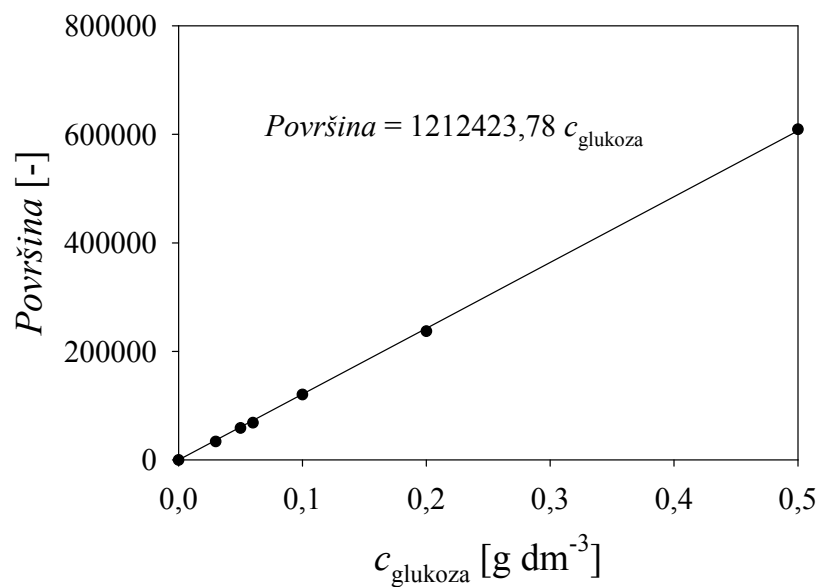
11. PRILOZI

Prilog 1. Baždarni pravac za maltozu

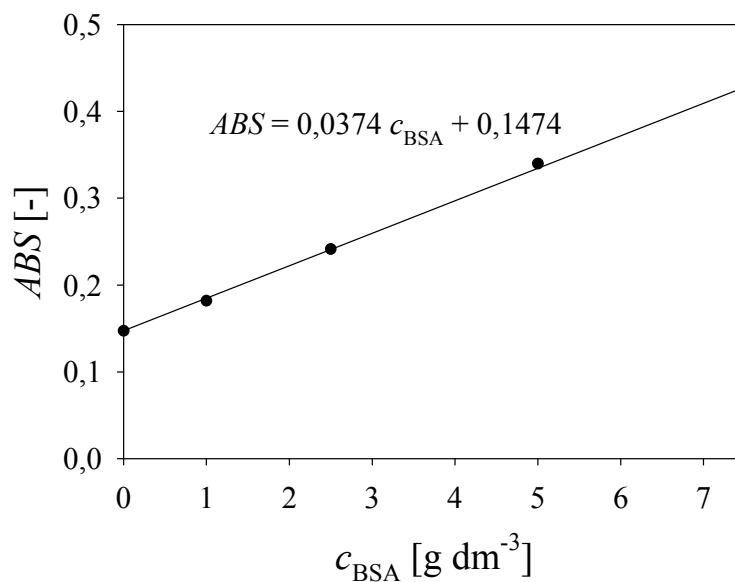


Slika 11.1. Baždarni pravac za maltozu

Prilog 2. Baždarni pravac za glukozu



Slika 11.2. Baždarni pravac za glukozu

Prilog 3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina**Slika 11.3.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina**Prilog 4.** Program u SCIENTIST-u

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t
DepVars: c, cp
Params: Km, Vm, cenz, Tau, kd
r=Vm*c*cenz*exp(-kd*t)/(Km+c)
c'=(c0-c)/Tau-r
cp'=(cp0-cp)/Tau+1.05*r
t=0
c=26.9
c0=26.9
cp=0
cp0=0
Vm=9389.5
Km=1.24
Tau=176.5
cenz=0.01
kd=3.82e-4
***
```