Matematičko modeliranje enzimske oksidacije amino alkohola u različitim tipovima reaktora

Zmijanac, Tanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:955091

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tanja Zmijanac

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tanja Zmijanac

Matematičko modeliranje enzimske oksidacije amino alkohola u različitim tipovima reaktora

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Prof. dr.sc. Đurđa Vasić-Rački

Članovi ispitne komisije: Prof.dr.sc. Đurđa Vasić-Rački

Izv.prof.dr.sc. Ana Vrsalović Presečki

Izv.prof.dr.sc. Irena Škorić

Zagreb, rujan 2015.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu pod mentorstvom prof. dr.sc. Đurđe Vasić-Rački.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr.sc. Đurđi Vasić-Rački koja je svojim stručnim vodstvom omogučila izradu ovoga rada. Zahvaljujem joj se na velikoj pomoći i strpljivosti tijekom izrade ovog završnog rada. Hvala i svim njezinim suradnicima koji su mi ustupili podatke bez kojih nebi bilo moguće izraditi ovaj rad.

Zahvljujem svojim kolegama na pomoći prilikom studranja.

Na kraju, ali meni najvažnije, veliko hvala mojim roditeljima na razumjevanju i velikoj podršci koju su mi pružili tokom studiranja.

SAŽETAK

U ovom radu razvijen je matematički model oksidacije amino alkohola katalizirane enzimom alkohol dehidrogenazom (ADH) i matematičkog modela kaskadne reakcije u kojoj je oksidacija spojena s aldolnom adicijom.

Reakcija oksidacije amino alkohola u amino aldehid provodi se uz koenzim NAD(H), a reakcija je katalizirana enzimom ADH. Koenzim NAD(H) je skup i nije ga ekonomično dodavati u proces u stehiometrijskim količinama već je potrebna njegova učinkovita regeneracija. U ovoj reakciji provedena je njegova regeneracija koju katalizira enzim NADH oksidaza. U kaskadnoj reakciji proizveden amino aldehid, u reakciji oksidacije amino alkohola, odmah se troši u reakciji aldolne adicije koju katalizira enzim FSA.

U ovom radu provedene su simulacije reakcija oksidacije amino alkohola u amino aldehid i kaskadne reakcije u kotlastom, protočnom kotlastom reaktoru i reaktoru s dotokom. Za implementaciju modela korišten je program napisan u programskom paketu SCIENTIST. Provedeno je više simulacija svake reakcije pri čemu su mijenjani početni uvjeti reakcije, količine enzima, te procesni parametri kao vrijeme zadržavanja u kotlastom protočnom reaktoru i dotok u reaktoru s dotokom.

Rezultati su pokazali da u šaržnom reaktoru konverzija mjerodavnog reaktanta u reakciji oksidacije amino alkohola ovisi o omjeru glavnog i regeneracijskog enzima, te o vremenu provedbe reakcije. U protočno kotlastom reaktoru je konverzija reaktanta ovisna o vremenu zadržavanja, a u reaktoru s dotokom o dotoku reaktanta.

Kod kaskadne reakcije u kotlastom reaktoru iskorištenje na produktu – aldolu ovisi o FSA enzimu koji katalizira aldolnu adiciju, u protočno kotlastom reaktoru o vremenu zadržavanja, te stabilnosti enzima, a u reaktoru s dotokom o brzini dotoka i stabilnosti enzima.

Ključne riječi: matematički model, enzim alkohol dehidrogenaza, amino alkohol, amino aldehid, koenzim NAD(H), enzim NADH, enzim FSA

ABSTRACT

In this work mathematical model of the oxidation of the amino alcohol catalyzed by the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) and mathematical model of cascade reaction in which the oxidation is connected with the aldol addition were developed.

The reaction oxidation of the amino alcohol to the amino aldehyde is carried out with the coenzyme NAD(H), and the reaction is catalyzed by the enzyme ADH. It is not economical to add in the process coenzyme NAD(H) in a stoichiometric amount and therefore it efficient regeneration is needed. In this work the regeneration reaction, which is catalyzed with NADH oxidase was carried out. In the cascade reaction, produced amino aldehyde in the oxidation reaction of the amino alcohol, is immediately consumed in aldol addition reaction catalyzed by the enzyme FSA.

In this work, the simulations of oxidation reaction of the amino alcohol in aldehyde and cascade reaction were conducted for batch, fed batch and continuous stirred reactors. For the implementation of the model, the program written in a programming package SCIENTIST was used. Simulations of each reaction at various initial reaction conditions, enzyme concentrations with various process parameters such as residence time in continuous stirred tank reactor or inflow rate in reactor with inflow were performed.

Results are shown that the conversion of limited reactant in reaction oxidation depends on ration between main and regeneration enzyme, and reaction time in batch reactor as well. The conversion of reactant depends on residence time in continuous stirred tank reactor or on inflow rate in reactor with inflow.

The yield on product – aldol in cascade reaction depends on FSA enzyme which catalyzes aldol addition in batch reactor or residence time in continuous stirred tank reactor. In continuous stirred tank reactor the yield of product depends on residence time and enzyme operational stability and in reactor with inflow on inflow rate and enzyme operational stability as well.

Key words: mathematical model, enzyme alcohol dehydrogenase, amino alcohol, amino aldehyde, coenzyme NAD(H), enzyme NADH, enzyme FSA

SADRŽAJ

POPIS SIMBOLA 1

1. UVOD 3

2. OPĆI DIO 4

2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE 4

2.2. ENZIMI 6

2.3. IZOLACIJA ENZIMA 7

2.4. ENZIM ALKOHOL DEHIDROGENAZA (ADH) 8

2.5. ENZIM NIKOTINAMID ADENIN DINUKLEOTID OKSIDAZA (NADH OKSIDAZA) 9

2.6. KOENZIM NIKOTINAMID ADENIN DINUKLEOTID (NAD(H)) 10

2.8. KASKADNE REAKCIJE 12

2.9. KEMIJSKI REAKTORI 13

2.9.1. KOTLASTI REAKTOR 14

2.9.2. PROTOČNI KOTLASTI REAKTOR 16

2.9.3. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM 18

3. EKSPERIMENTALNI DIO 19

3.1. MATEMATIČKI MODELI 19

3.2. MATEMATIČKO MODELIRANJE 20

3.2.1. MATEMATIČKO MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA 20

3.3. KINETIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM 24

3.4. KINETIČKI MODEL REAKCIJE REGENERACIJE KOENZIMA 24

3.4. KINETIČKI MODEL DOBAVE KISIKA IZ PLINSKE U KAPLJEVITU FAZU 24

3.5. KINETIČKI MODEL ZA KASKADNU REAKCIJU 25

3.6. REAKTORSKI MODELI ZA OKSIDACIJU AMINO ALKOHOLA 25

KATALIZIRANU S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM 25

3.6.1. REAKTORSKI MODEL KOTLASTOG REAKTORA, BEZ REGENERACIJE KOENZIMA NAD(H) 25

3.6.2. MODEL KOTLASTOG REAKTORA, SA REGENERACIJOM KOENZIMA NAD(H) 26

3.6.3. MODEL PROTOČNOG KOTLASTOG REAKTORA, SA REGENERACIJOM 27

KOENZIMA NAD(H) 27
3.6.4. MODEL REAKTORA S DOTOKOM, SA REGENERACIJOM 28
KOENZIMA NAD(H) 28
3.7. REAKTORSKI MODELI ZA KASKADNU REAKCIJU 29
3.7.1 MODEL KOTLASTOG REAKTORA ZA KASKADNU REAKCIJU 29
3.7.2 MODEL PROTOČNOG KOTLASTOG REAKTORA ZA KASKADNU 30
REAKCIJU 30
3.7.3. MODEL REAKTORA S DOTOKOM ZA KASKADNU REAKCIJU 30

4. REZULTATI 32
4.1. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM 32
4.1.1. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA BEZ REGENERACIJE 32
KOENZIMA NAD(H), KOTLASTI REAKTOR 32
4.1.2. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA, SA REGENERACIJOM 37
KOENZIMA NAD(H), KOTLASTI REAKTOR 37
4.1.3. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA, SA REGENERACIJOM 38
KOENZIMA NAD(H), PROTOČNO KOTLASTI REAKTOR 38
4.1.4. REZULTATI MATEMATIČKOG MODEL, SA REGENERACIJOM 41
KOENZIMA NAD(H), REAKTOR S DOTOKOM 41
4.2. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE 43
4.2.1. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE U 43
KOTLASTOM REAKTORU 43
4.2.2. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE U 45
PROTOČNOM KOTLASTOM REAKTORU 45
4.2.3. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE U 47
REAKTORU S DOTOKOM 47
4.3. KINETIČKI PARAMETRI ZA SIMULACIJE 49

5. RASPRAVA 50
5.1. RASPRAVA REZULTATA MATEMATIČKOG MODELA OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE ALKOHOL DEHIDROGENAZOM 50
5.1.1. UTJECAJ NA KONVERZIJU U KOTLASTOM REAKTORU 50
5.1.2. UTJECAJ NA KONVERZIJU U PROTOČNOM KOTLASTOM REAKTORU 53
5.1.3. USPOREDBA KONVERZIJE U KOTLASTOM I PROTOČNOM KOTLASTOM REAKTORU 54
5.1.4. UTJECAJ NA KONVERZIJU U REAKTORU S DOTOKOM 55

5.2. RASPRAVA REZULTATA KASKADNE REAKCIJE 56
5.2.1. OVISNOST ISKORIŠTENJA NA ALDOLU U KOTLASTOM REAKTORU, PROTOČNOM KOTLASTOM REAKTORU I REAKTORU S DOTOKOM O PROCESNIM PARAMETRIMA 56

5. ZAKLJUČAK 59

6. LITERATURA 60

7. PRILOZI 63
7.1. MATEMATIČKI MODELI OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM 63
7.1. MATEMATIČKI MODELI KASKADNE REAKCIJE 72

ŽIVOTOPIS 78

POPIS SIMBOLA

V	- volumen reakcijske smjese [cm^3]
F_A	- izlazni molarni protok reakcijske smjese [mmol/h]
$F_{A,0}$	- ulazni molarni protok reakcijske smjese [mmol/h]
q	- volumni protok reakcijske smjese [dm^3/h]
r_A, r_1, r_2, r_3, r_4	- brzine reakcija [mmol/(dm^3min)]
t	- vrijeme [min, h]
T	- temperatura [K]
τ	- vrijeme zadržavanja [min, h]
c_A	- množinska koncentracija na kraju reakcije [mmol/dm^3]
$c_{A,0}$	- množinska koncentracija na početku reakcije [mmol/dm^3]
c_{ADH}, c_{ALK}	- množinska koncentracija enzima ADH i alkohola na kraju reakcije [mmol/dm^3]
c_{NAD}, c_{NADH}	- množinska koncentracija NAD i NADH na kraju reakcije [mmol/dm^3]
$c_{NADH,OKS}$, c_{FSA}	- množinska koncentracija enzima NADH oksidze i enzima FSA na kraju reakcije [mmol/dm^3]
c_O, $c_{O,Z}$	- množinska koncentracija otopljenog kisika i množinska koncentracija zasičenja kisikom [mmol/dm^3]
c_{DHA}, c_{ALD}	- množinska koncentracija DHA i aldehida na kraju reakcije [mmol/dm^3]
c_{ALDOL}	- množinska koncentracija aldola na kraju reakcije [mmol/dm^3]
c_I	- množinska koncentracija inhibitora [mmol/dm^3]
$c_{ALK,0}$, $c_{NADH,0}$	- množinska koncentracija alkohola i NADH na početku reakcije [mmol/dm^3]
$c_{NAD,0}$, $c_{DHA,0}$	- množinska koncentracija NAD i DHA na početku reakcije [mmol/dm^3]
$c_{ALD,0}$, $c_{ALDOL,0}$	- množinska koncentracija aldehida i aldolana početku reakcije [mmol/dm^3]
$c_{O,0}$	- množinska koncentracija kisika na početku reakcije [mmol/dm^3]
X_A, X_{STAC}	- konverzija tvari A i stacionarna konverzija [-]
X_{50min}, X_{500min}	- konverzije nakon 50 min i 500 min [-]
$X_{1000min}$, $X_{1500min}$	- konverzije nakom 1000 min i 1500 min [-]
k_1, k_2, k_3	- konstante brzina reakcija [h^{-1}]
c_S	- množinska koncentracija supstrata [mmol/dm^3]
V_m,V_{m1}, V_{m2}, V_{m3}	- maksimalne brzine reakcija [U/mg]

K_m^S - Michaelis – Menteničina konstanta [mmol/dm^3]

K_I, K_{INADH}, K_{INAD} - konstante inhibicije [mmol/dm^3]

K_{ALK}, K_{NAD} - Michaelis – Menteničina konstanta alkohola i NAD-a [mmol/dm^3]

K_{NADH}, K_O - Michaelis – Menteničina konstanta NADH i kisika [mmol/dm^3]

K_{ALD}, K_{DHA} - Michaelis – Menteničina konstanta ALD i DHA [mmol/dm^3]

K_L - ukupni volumni koeficijent prijenosa kisika [h^{-1}]

kd_1, kd_2, kd_3 - konstante deaktivacije enzima [h^{-1}]

I_{ALK}, $I_{max,ALK}$ - iskorištenje alkohola i maksimalno iskorištenje alkohola [-]

E_0 - početna koncentracija enzima [mmol/dm^3]

S - supstrat

E - enzim

ES - kompleks enzim – supstrat

P - produkt

1. UVOD

Enzimi su dijelovi bioloških sustava koji kataliziraju kemijske reakcije, a proizvode ih živi organizmi. Razlikujemo intracelularne i ekstracelularne enzime. Intracelularni se nalaze unutar stanice, vezani za staničnu stijenku ili u citoplazmi. Vrlo su nestabilni kada su izvan stanice. Ekstracelularni su metaboliti stanica, pa ih one izbacuju nakon sinteze. Broj ekstracelularnih enzima je daleko manji, ali su stabilniji pri uporabi. Enzimi imaju prednosti pred klasičnim katalizatorima. Jako su aktivni te ubrzavaju reakcije 10^{20} puta. Reakcije katalizirane enzimima ne zahtijevaju primjenu visokih temperatura i tlakova te ekstremne pH vrijednosti. Enzimi su stereospecifični i enantioselektivni katalizatori. Oni nisu uvijek idealni za upotrebu jer su nestabilni, te ih nije moguće koristiti na povišenim temperaturama, a samo neki se mogu koristiti u otopinama organskih otapala [Vrsalović-Presečki A., 2004].

Kao izvor enzima za katalizu različitih reakcija se uglavnom koriste mikroorganizmi. Tako se stanice *Lactococcus lactis, Lactobacillus sanfranciscencis, Lactobacillus rahmnosus* uzgajaju radi izolacije enzima NADH oksidaze koji se koristi za regeneraciju koenzima NAD(H).

U današnje se vrijeme sve više pažnje poklanja zaštiti čovjekovog okoliša, te se u svrhu njegovog očuvanja prelazi na "čistije tehnologije". U "čistiju tehnologiju" se ubraja i primjena enzima u industriji. Najčešće se koriste u prehrambenoj industriji, farmaceutskoj industriji, u analitičke svrhe, te u mnogim drugim industrijama (tekstila, kože, detergenata i sl.). Njihova primjena uglavnom se nalazi u područjima proizvodnje organskih spojeva, lijekova, kemikalija, sredstava za čišćenje i plastičnih materijala [Siveri J., 2006]. Da bi bili primjenjivi u industriji moraju imati visoku aktivnost, stabilnost i mora postojati mogućnost njihove višekratne primjene jer im je u protivnom previsoka cijena [Vrsalović-Presečki A., 2003].

Udio enzima kao katalizatora koji se koriste u industriji nije velik. Glavni uzroci tome su visoka cijena izolacije enzima. Reakcije katalizirane enzimima su često inhibirane supstratom ili produktom, a i enzimi su vrlo nestabilni u otopljenom obliku kada su najaktivniji, pa se moraju često imobilizirati (nanositi) na čvrsti nosilac, što izaziva daljnja poskupljenja njihove uporabe [Siveri J., 2006].

2. OPĆI DIO

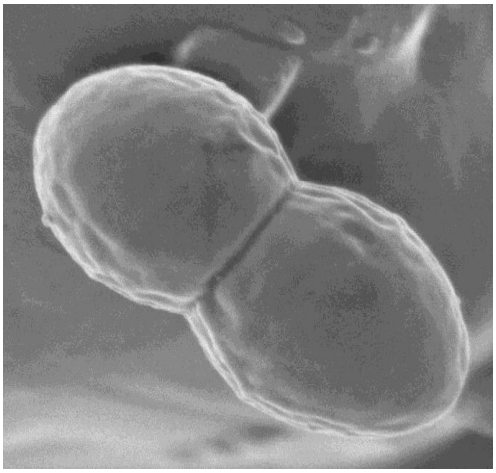
2.1. BAKTERIJE MLIJEČNE KISELINE

Lactococcus lactis, Lactobacillus sanfranciscencis i Lactobacillus rahmnosus pripadaju bakterijama mliječne kiseline. Bakterije mliječne kiseline obuhvačaju 20 rodova: *Lactobacillus, Streptococcus, Lactococcus, Pediococcus, Enterococcus* itd., a najbrojniji rod je rod *Lactobacillus* s oko 80 vrsta. Bakterije mliječne kiseline su gram pozitivni mikroorganizmi koji ne stvaraju spore. Rastu u mikroaerofilnim ili samo u anaerobnim uvjetima i samo na kompleksnim hranjivim podlogama. U prirodi naseljavaju staništa bogata aminokiselinama, peptidima, nukleotidima, masnim kiselinama, vitaminima B grupe, mineralima i drugim neophodnim faktorima rasta, kao što je na primjer probavni trakt ljudi i životinja. Bakterije mliječne kiseline energiju dobivaju fermentacijom ugljikohidrata. Kao krajnji proizvod metabolizma proizvode mliječnu kiselinu [Dukić Mario, et al. 2009].

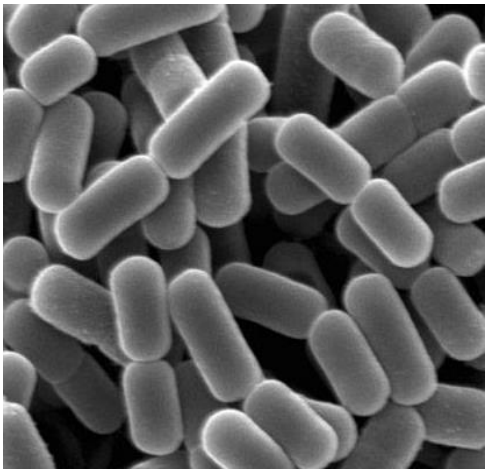
Bakterije mliječne kiseline imaju široko rasprostranjenu upotrebu. Mogu se koristiti kao inhibitori bakterijskog kvarenja hrane, za proizvodnju različitih fermentativnih mliječnih produkata iz mlijeka, kvalitetnih mesnih proizvoda i kiselog povrća. Mogu se koristiti i kao puferi u bezalkoholnim pićima, džemovima, želeima, te slatkišima. U nešto manjoj mjeri koriste se i u kozmetici i lijekovima [Venema G. et al. 1996].

Lactococcus lactis pripada rodu *Lactococcus. Lactococcus* je rod iz porodice *Streptococcaceae.* Bakterije su obično kružne ili ovalne dimenzija 0,5 – 1,2 μm sa 0,5 – 1,5 μm, a nalazimo ih u parovima ili kraćim lancima (Slika 1.) [http://hr.wikipedia.org/wiki/Lactococcus].

Lactobacillus sanfranciscencis i Lactobacillus rahmnosus pripadaju rodu *Lactobacillus. Lactobacillus* je rod iz porodice *Lactobacillaceae* Bakterije su štapićastog oblika i povezane u kraćim lancima (Slika 2.) [http://www.vasezdravlje.com/printable/izdanje/clanak/2809].



Slika 1. *Lactoccocus lactis*



Slika 2. *Lactobacillus rahmnosus*

2.2. ENZIMI

1897. su Hans i Eduard Buehner koristili ekstrakte kvasca kako bi fermentirali šećer bez prisustva živih stanica kvasca. Jedan od načina čuvanja je bio dodavanje velike količine šećera u ekstrakte. Otkrili se da je šećer fermentiran, iako u cijeloj smjesi nije bilo živih stanica kvasca. Termin enzim je tada bio prvi put upotrijebljen, pri opisu tvari koju su pronašli u ekstraktu kvasca, a koja je ubrzala fermentaciju šećera
[http://hr.wikipedia.org/wiki/Enzim].

Enzimi su biološki katalizatori i neophodni za život kakav poznajemo. Funkcioniraju na način da reakciju provode reakcijskim putem na kojemu je niža energija aktivacije (Ea) pojedine reakcije, te na taj način ubrzavaju reakciju i do nekoliko milijuna puta. Enzim ostaje na kraju reakcije nepromijenjen iako sudjeluje u reakciji. To omogućava da se, kad se jedna reakcija privede kraju, uključi u drugu potpuno nepromijenjen
[http://hr.wikipedia.org/wiki/Enzim].

Energija aktivacije (Ea) je minimalna energija koju je potrebno dovesti molekulama da međusobno reagiraju. Da bi molekule kemijski reagirale, moraju se sudariti, ali međusobno mogu reagirati samo one molekule koje imaju veću energiju od energije aktivacije. Što je energija aktivacije veća, to je manji broj molekula koje mogu prijeći energijsku barijeru, a posljedica je da je reakcija sporija [http://hr.wikipedia.org/wiki/Energija_aktivacije].

Prema strukturi enzimi mogu biti: monomeri – sadrže samo jedan polipeptidni lanac, kojega čini sto ili više aminokiselina ili oligomeri – sadrže veći broj polipeptidnih lanaca, koji mogu biti jednaki ili se mogu međusobno razlikovati [http://hr.wikipedia.org].

Prema vrsti reakcije koju kataliziraju enzimi se dijele na: oksidoreduktaze – kataliziraju reakcije oksido-redukcije, pripadaju im dehidrogenaze, oksidaze, peroksidaze, hidroksilaze, oksigenaze; transferaze – kataliziraju prenošenje funkcionalnih grupa aldehidnih ili keto ostatka; hidrolaze – vrše hidrolizu različitih veza; liaze – cijepaju C-C, C-N, C-O i druge veze ostavljajući dvostruke veze, a pripadaju im dekarboksilaze, aldolaze, hidrataze, dehidrataze, sintetaze, liaze; izomeraze – mijenjaju geometrijski raspored u molekuli, pripadaju im izomeraze, mutaze; ligaze – spajaju dvije molekule nakon čega slijedi hidroliza molekule, a pripadaju im sintetaze, karboksilaze [Janeš K., et al. 2009].

Na aktivnost enzima utječu razni čimbenici: pH, temperatura, koncentracija enzima i supstrata. Pri nižim temperaturama aktivnost enzima je manja, dok pri višim dolazi do denaturacije enzima, pa svaki enzim ima svoj temperaturni maksimum. Iz toga slijedi da su enzimi katalitički aktivni pri određenoj pH vrijednosti i temperaturi [Eijsink V. G. H., 2004]. Na aktivnost enzima mogu utjecati i inhibitori – smanjuju aktivnost enzima odnosno usporavaju kemijsku reakciju.

Enzimi imaju prednost pred klasičnim katalizatorima zbog toga što ubrzavaju reakcije i do 10^{20} puta. Reakcije katalizirane enzimima ne zahtijevaju primjenu visokih temperatura i tlakova te ekstremne pH vrijednosti. Oni su stereospecifični i enantioselektivni. Enzimi nisu uvijek idealni za upotrebu jer su nestabilni izvan stanice proizvođača. [Vrsalović-Presečki A., 2003].

2.3. IZOLACIJA ENZIMA

Izvori iz kojih se enzimi izoliraju su stanice organa životinja, biljnog materijala i mikroorganizama. Kao izvor enzima najčešće se koriste stanice različitih mikroorganizama. Mikroorganizmi obuhvaćaju taksonomsku skalu od eukariota kao što su kvasci i gljive do prokariota, gram – pozitivnih i gram – negativnih bakterija [Aehle W., 2004]. Svaka stanica sintetizira velik broj različitih enzima za održavanje metaboličkih reakcija i opremljena je mehanizmom koji regulira sintezu i aktivnost enzima kako bi mogla adekvatno odgovoriti na promjene u okolini [Alberts B. et al., 2002].

Izbor postupaka za pročišćavanje enzima ovisi o lokaciji enzima, odnosno o tome dali su ekstracelularni ili intracelularni. Prvi korak u izolaciji ekstracelularnih enzima je izdvajanje stanica iz otopine enzima, a u izolaciji intracelularnih enzima razbijanje stanične stjenke. Za razbijanje stjenke se koriste mehaničke metode (visokotlačna preša, razbijanje u kugličnom mlinu, ultrazvuk) i ne mehaničke metode (sušenje, smrzavanje, osmotski šok, enzimi, antitijela, antibiotici) [Brewer J. S. et al., 1985].

Nakon razbijanja stjenke ona se ukloni, te se dobije bez stanični ekstrakt s unutar staničnim produktima, a zatim se enzim iz ekstrakta izolira upotrebom različitih separacijskih

tehnika kao što su ionska izmjena, ultrafiltracija i gel filtracijska kromatografija. Alkohol dehidrogenaza je jedan od prvih izoliranih i pročišćenih enzima [Siveri J., 2006].

Stupanj čistoće komercijalnih enzima kreće se u rasponu od djelomično pročišćenih do vrlo pročišćenih enzima i ovisi o njihovoj primjeni. Enzimi su vrlo složeni proteini i visok stupanj specifičnosti koji posjeduju kao katalizatori očituje se u njihovoj prirodnoj konformaciji koja se održava pri određenim uvjetima (pH, temperature, ionske jakosti). Zbog toga za izolaciju enzima mogu biti korištene samo metode koje se provode u blagim uvjetima [Aehle W., 2004].

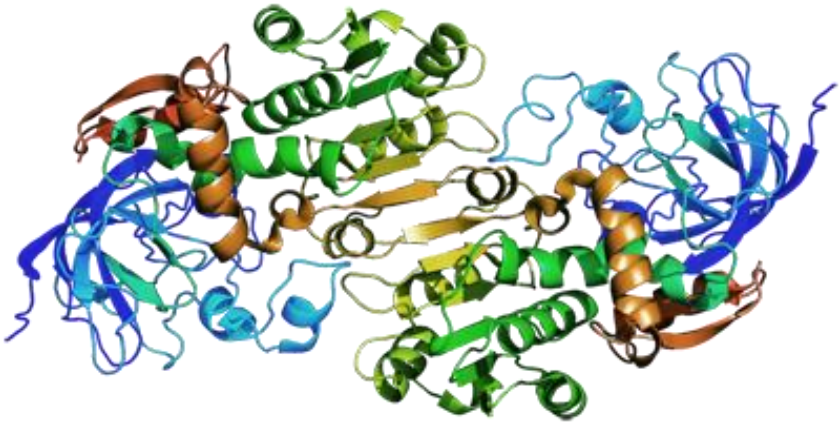
2.4. ENZIM ALKOHOL DEHIDROGENAZA (ADH)

Enzim alkohol dehidrogenaza (slika 3.) spada u skupinu oksidoreduktaza. Jedan je od prvih izoliranih i pročišćenih enzima Prvi puta je izoliran 1937. iz pekarskog kvasca, odakle se i najčešće dobiva. Osim u kvascu može se pronaći i u drugim živim bićima, pa tako i u ljudskom organizmu, koji ga koristi kao osnovnu obranu od toksičnog djelovanja alkohola.

Postoji više metoda njegove izolacije. Obično se provode tako da se nakon razbijanja stanične stjenke, ona ukloni, te se dobije bez stanični ekstrakt s unutar staničnim produktima. Stanica se može razbiti upotrebom mlina ili ultrazvučnih igala, dok se enzim iz ekstrakta izolira upotrebom različitih separacijskih tehnika kao što su ionska izmjena, ultrafiltracija i gel filtracijska kromatografija.

Izoliran enzim ima molekularnu masu 140 000 i kvartarnu strukturu, stabiliziranu ionima cinka te time spada u skupinu metalo – enzima. Svaka molekula enzima ADH sadrži četiri iona Zn^{+} koji su vrlo bitni za katalitičku aktivnost enzima ADH i veže četiri molekule koenzima; oksidirani oblik NAD^{+} i reducirani oblik NADH koji se međusobno natječu za četiri aktivna mjesta identične aktivnosti. Enzim ADH spada u skupinu tiolenzima jer u svom aktivnom centru sadrži tiolne -SH grupe.

Enzim ADH oksidira sve primarne alkohole, ali isto tako može reducirati aldehide, kao npr. acetaldehid i gliceraldehid. Aktivnost mu opada kako raste duljina lanca [Siveri J., 2006].



Slika 3. Enzim alkohol dehidrogenaza (ADH)

2.5. ENZIM NIKOTINAMID ADENIN DINUKLEOTID OKSIDAZA (NADH OKSIDAZA)

NADH oksidaza (NOX) je intracelularni enzim relativne molekulske mase 110000. Katalizira oksidaciju koenzima NAD(H) [Tomašković I. et al., 2012]. Može se naći u anaerobnim bakterijama jer je njegova fiziološka funkcija uklanjanje kisika i uspostavljanje anaerobnih uvjeta. Prema tome NADH oksidaza je dio njihova obrambenog sustava od kisika [Lopez de Felipe F. et al., 2011].

U prirodi postoje dvije vrste NADH oksidaza ovisno o njihovom katalitičkom mehanizmu: enzimi koji oksidiraju NADH redukcijom dva elektrona vodika pri čemu nastaju dvije molekule vode i enzimi koji kataliziraju oksidaciju NADH reduciranjem molekularnog kisika na vodikov peroksid. Obje vrste NADH oksidaze, uz dobivanje vodikovog peroksida ili vode, mogu katalizirati redukciju kisika, koja je nereverzibilna reakcija [Lopez de Felipe F. et al., 2011].

NADH oksidaza se može dobiti uzgojem određenih kultura mikroorganizama kao što su *Lactococcus lactis, Lactobacillus sanfranciscencis, Lactobacillus rahmnosus, Lactobacillus brevis* itd. Na kraju eksponencijalne faze rasta mikroorganizama nastaje najveća količina enzima. Svaki od mikroorganizama zahtijeva točno definirane uvijete za dobivanje ovog enzima.

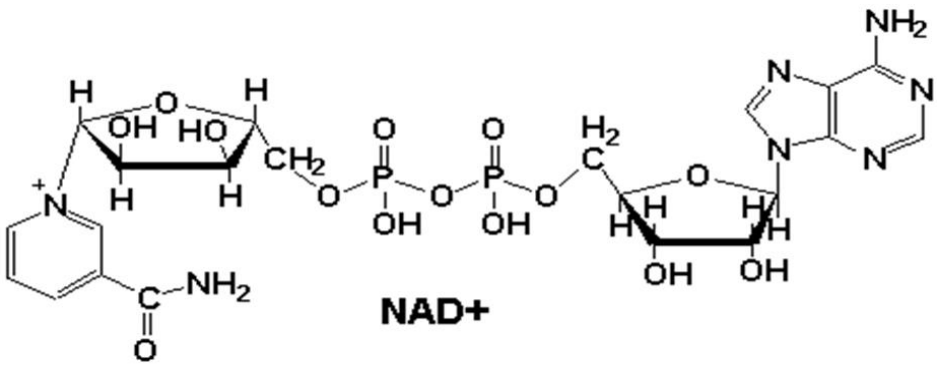
Za provođenje uzgoja bitno je kontrolirati koncentraciju kisika i pH jer oni imaju veliki utjecaj na sintezu željenog enzima u stanicama mikroorganizama.

Aktivnost NADH oksidaze se ispituje dodatkom NADH tako da se u otopinu pročišćene NADH oksidaze na kraju dodaje NADH, koji se troši ako postoji aktivnost enzima tj. ako je uzgojem sintetiziran željeni enzim [Tomašković I. et al., 2012].

2.6. KOENZIM NIKOTINAMID ADENIN DINUKLEOTID (NAD(H))

Koenzim NAD(H) je transportni metabolit, a zadatak mu je prijenos elektrona u oksido-redukcijskim reakcijama. Nestabilan je, skup i kompleksan. On je esencijalni spoj stanice kojega ona sama može sintetizirati i regenerirati. Koristi se u reakcijama kataliziranim dehidrogenazama za proizvodnju kiralnih spojeva (aminokiseline, steroidi, alkoholi…) [Tomašković I. et al., 2012].

Budući da je nestabilan i skup nije ga isplativo koristiti u stehiometrijskim količinama, nego ga je potrebno regenerirati. Poznate su različite metode regeneracije koenzima NAD(H). Najučinkovitija metoda je ona koja koristi NADH oksidazu [Lopez de Felipe F. et al., 2011].



Slika 4. Koenzim NAD(H)

2.7. REGENERACIJA KOENZIMA

Koenzimi kao transportni metaboliti, prenose vodik, kisik ili elektrone s jedne strane na drugu, kao i atome ili molekule između različitih paralelnih reakcija. Među najvažnijim koenzimima je i NAD(H) koji se koristi u različitim područjima posebno za proizvodnju raznih vrijednih kiralnih spojeva kao što su aminokiseline i alkoholi [Tomašković I. et al., 2012].

NAD(H) je izuzetno skup i nije ga ekonomično dodavati u proces prema stehiometrijskoj količini već je nužna njegova učinkovita i ekonomična regeneracija [Vrsalović-Presečki A., 2006]. Unutar stanice koenzimi su sintetizirani i regenerirani kao dio staničnog metabolizma, dok u procesima koji koriste izolirane enzime za kataliziranje sintetske reakcije mora postojati drugi reakcijski sustav za regeneraciju koenzima [Tomašković I. et al., 2012] . Regeneracija koenzima NAD(H) može se provesti različitim metodama, ali sve moraju biti regioselektivne, kompatibilne s glavnom enzimskom reakcijom, praktične, jeftine, te moraju regenerirati koenzim od 10^2 do više od 10^5 puta [Faleter P., 2012].

Enzimske metode su najpovoljnije i najučinkovitije za regeneraciju koenzima. Enzimska regeneracija se može podijeliti u dvije grupe: sustav uz dodatak kosupstrata i sustav u kojem se dodaje drugi enzim. U sustavu u koji se dodaje kosupstrat, jedan enzim katalizira i glavnu reakciju i reakciju regeneracije. U sustavu u kojem se dodaje drugi enzim, taj drugi enzim mora imati svoj supstrat. [Jazvo K., 2013].

Najčešće korišten postupak za regeneraciju koenzima NAD(H), koji se koristi i u industriji, je onaj s formijat dehidrogenazom koji katalizira redukciju NADH s formijatom kao svojim supstratom. Različiti enzimi kao što su npr. alkohol dehidrogenaza, laktat dehidrogenaza i glutamat dehidrogenaza se isto tako koriste za regeneraciju koenzima NADH. NADH oksidaza katalizira reakciju oksidacije NADH kisikom, pri čemu su produkti reakcije NAD^+, voda ili vodikov peroksid (ovisno o izvoru enzima) (Slika 5.) [Vasić-Rački Đ. et al., 2009]. Prema tome enzim NADH oksidaza je vrlo pogodan za regeneraciju koenzima NADH kad se primjenjuju dehidrogenaze, na primjer za razdvajanje racemata alkohola [Tomašković I. et al., 2012].

Dehidrogenaze su najveća grupa oksidoreduktaza koje kataliziraju biološke oksidacijsko-redukcijske reakcije. Primjena oksidoreduktaza, kao dehidrogenaza, u izoliranom obliku je ekonomski pogodna samo ako su troškovi regeneracije koenzima niski. Ti troškovi mogu biti drastično smanjeni ako se postigne visok ukupan broj prevođenja za željeni koenzim. Ukupni broj prevođenja se definira kao omjer količine sintetiziranog produkta i količine potrošenog koenzima. Bitno je postići što veći ukupni broj prevođenja za određeni koenzim jer se time poveća produktivnost samog procesa [Wichman R. et al., 2005].

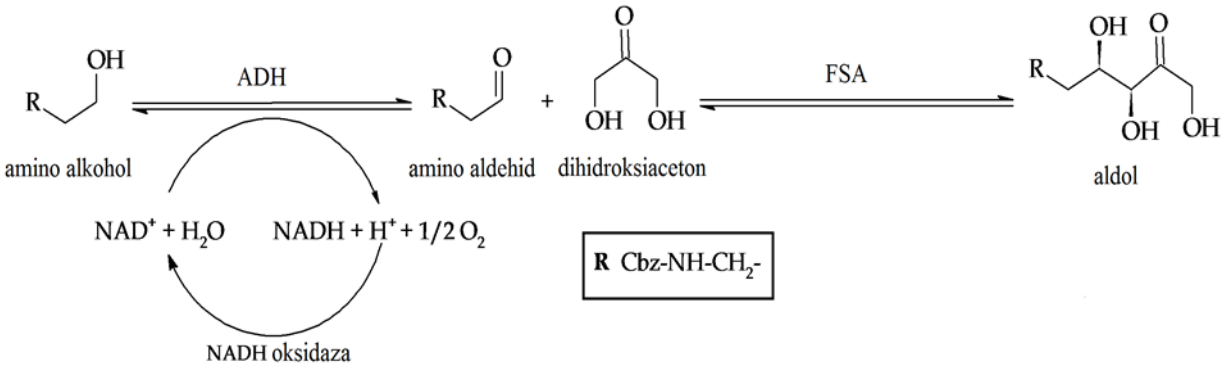
$$2\ NADH + O_2 + 2\ H^+ \xrightarrow{\text{NADH oksidaza}} 2\ NAD^+ + 2\ H_2O$$

Slika 5. Regeneracija koenzima NAD(H) pomoću NADH oksidaze

2.8. KASKADNE REAKCIJE

Kaskadne reakcije (Slika 6.) omogućuju određene ekonomske uštede, smanjuju potrošnju resursa i vremena, te smanjuju proizvodnju otpada u industrijskoj proizvodnji te su zbog toga predmet intenzivnih istraživanja u posljednjih nekoliko godina, jer su jedna od učinkovitijih metoda za upravljanje Zemljinim dragocjenim resursima [Nicolaou K.C. et al., 2006].

Enzimski katalizirane reakcije unutar žive stanice vrsta su kaskadnih reakcija. Jednu od prvih definicija takvih reakcija dao je Hemker koji ih je shvaćao kao sekvencijalni niz enzimskih reakcija u kojima produkt jedne reakcije služi kao supstrat u slijedećoj. Do danas je razvijeno nekoliko definicija koje su manje ili više slične jedna drugoj [Findrik Z. et al., 2009].



Slika 6. Kaskadna reakcija oksidacije amino alkohola u amino aldehid uz regeneraciju koenzima NAD(H) i aldolna adicija u aldol

Na slici 6. je prikazana kaskadna reakcija u kojoj se iz amino alkohola proizvodi amino aldehid koji se odmah iza toga troši u reakciji aldolne adicije. Prednost ove kaskadne reakcije je što nije potrebno izolirati aldehid koji je jako nestabilan i iskorištenje na aldehidu bi zbog toga bilo veoma nisko.

2.9. KEMIJSKI REAKTORI

Kemijski reaktor je mjesto ili prostor u kojem se odigrava neka kemijska reakcija. Takav ograničeni dio prostora općenito se naziva procesnim prostorom. Sa stajališta kemijskog inženjerstva kao tehničke znanosti, kemijski reaktor je procesni aparat u kojem se svrhovito odigrava i provodi kemijska reakcija u cilju dobivanja određenog korisnog produkta [Gomzi Z., 1998].

Osnovna podjela kemijskih reaktora:

1) Reaktori koji su zatvoreni sustavi (Kotlasti reaktori)
2) Reaktori koji su otvoreni sustavi (Cijevni i protočno kotlasti reaktor)

Podjela reaktora s obzirom na vremensku zavisnost parametra i veličina stanja: 1) Reaktori koji rade u stacionarnom stanju (Protočno kotlasti reaktori, Cijevni reaktori) 2) Reaktori koji rade u nestacionarnom stanju (Kotlasti reaktori, Protočno kotlasti reaktori u nestacionarnom stanju

Unutar reaktora veličine stanja mogu imati, s obzirom na položaj, različite ili iste vrijednosti. Na osnovi tog kriterija svi tipovi reaktora se mogu podijeliti na: 1) Reaktore s dobrim ili idealnim miješanjem (Kotlasti reaktor, Protočno kotlasti reaktori) 2) Reaktore s idealnim strujanjem (Cijevni reaktori) [Gomzi Z., 1998].

2.9.1. KOTLASTI REAKTOR

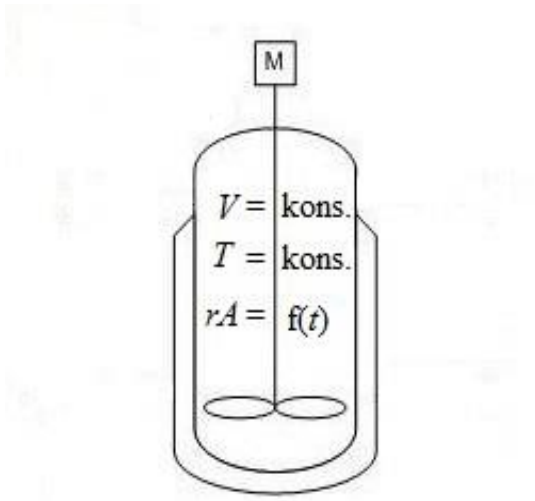
Sastav reakcijske smjese je u svakoj točki isti, reaktorski prostor je homogen. To se odnosi i na heterogene sustave proširujući pojam točke na elementarni (dovoljno mali) volumen. Prema tome, bilance se mogu postaviti za reaktor kao cjelinu, a ne samo za diferencijalni volumen.

U kotlastom reaktoru sve veličine stanja zavise o vremenu. Prema tome sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije i količina oslobođene (utrošene) topline uslijed kemijske reakcije su vremenski promjenljive veličine. Kod idealnog kotlastog reaktora jedino se temperatura u reaktoru ne mijenja s vremenom jer se pretpostavlja izotermni rad.

Model "idealnog" kotlastog reaktora sadrži također pretpostavku da je volumen reakcijske smjese stalan i nezavisan o vremenu tj., nema promjene gustoće [Gomzi Z., 1998].

Kotlasti reaktor 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 plaštem za grijanje ili hlađenje. Osim naziva kotlasti reaktor upotrebljavaju se i izrazi "šaržni reaktor" ili na engleskom jeziku "batch reactor" [Visković K., 2009].

Na slici 7. je shematski prikazan idealni kotlasti reaktor koji je snabdjeven s miješalicom.



Slika 7. Idealni kotlasti reaktor

Na slici 8. je prikazan opći oblik bilance tvari u kotlastom reaktoru. Kako u reaktor tijekom provedbe reakcije nema dotoka reaktanata niti odtoka produkata onda se bilanca tvari sastoji samo od dva člana:

Količina tvari A nestala kemijskom reakcijom	=	Akumulacija tvari A u reaktorskom volumenu

Slika 8. Bilanca tvari A u idealnom kotlastom reaktoru

Matematički napisana bilanca tvari A je prikazana jednadžbom (1.):

$$\frac{d(V\,c_A)}{dt} = r_A\,V \qquad (1.)$$

Uz pretpostavku da je volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu te da nema promjene gustoće s vremenom jednadžba 1. glasi (jednadža 2.):

$$\frac{dc_A}{dt} = r_A \qquad (2.)$$

Iz matematičkog prikaza bilance tvari A se mogu izvesti jednadžbe (3.) i (4.) kojima je prikazano vrijeme potrebno za provedbu reakcije

$$t = -\frac{1}{V}\int_{n_{A_0}}^{n_A}\frac{dn_A}{r_A} \qquad (3.)$$

$$t = c_{A_0}\int_{X_{A_0}}^{X_A}\frac{dX_A}{r_A} \qquad (4.)$$

2.9.2. PROTOČNI KOTLASTI REAKTOR

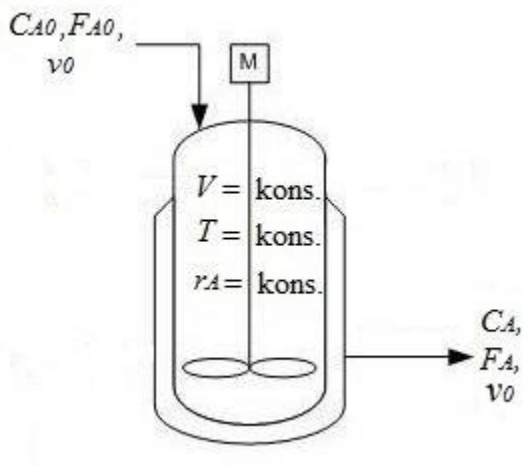
Reakcijska smjesa je dobro miješana i prema tome je njen sastav u svakoj točki reakcijske smjese isti. Bilance množine tvari i topline mogu se postaviti za čitav volumen reaktora.

Reaktor radi u stacionarnom stanju, odnosno nema promjena njegovih svojstava s vremenom, kada je protok na ulazu u reaktor jednak protoku na izlazu iz reaktora.

Reaktor radi izotermno. Izotermnost se odnosi na jednakost temperature i po reaktorskom prostoru i po vremenu, što je posljedica idealnog miješanja i stacionarnog rada.

Za vrijeme rada ne dolazi do promjene gustoće reakcijske smjese i prema tome volumen reakcijske smjese ostaje stalan [Gomzi Z., 1998].

Na slici 9. je shematski prikazan idealni protočno kotlasti reaktor koji je snabdjeven s miješalicom.



Slika 9. Idealni protočni kotlasti reaktor

Na slici 10. je prikazan opći oblik bilance tvari u protočno-kotlastom reaktoru. Kako u reaktor tijekom provedbe reakcije dotiče reaktant a odtiče produkt onda se bilanca tvari sastoji od tri člana kada je ulazni protok jednak izlaznom, a reaktor radi u tzv. stacionarnim uvjetima pri kojima je brzina akumulacije jednaka nuli.

Množina tvari A unijeta u reaktorski volumen u jediničnom vremenu	-	Množina tvari A iznijeta iz reaktorskog volumena u jediničnom vremenu	=	Množina tvari A nestala kemijskom reakcijom u reaktorskom volumenu i jediničnom vremenu

Slika 10. Bilanca tvari A u idealnom protočnom kotlastom reaktoru

Matematički napisana bilanca tvari A je prikazana jednadžbom 5., iz koje je izveden izraz za vrijeme zadržavanja τ (jednadžba 6.):

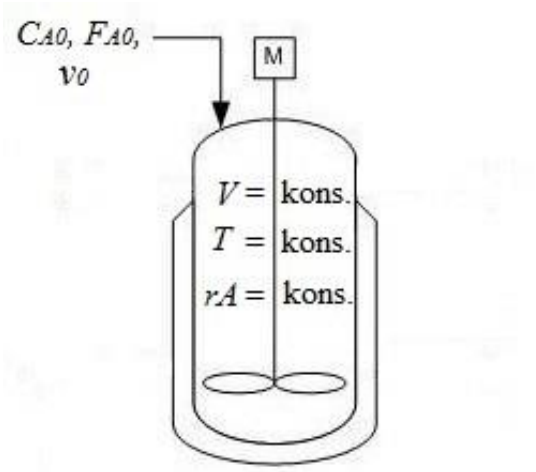
$$F_{A_0} - F_A = r_A V \tag{5.}$$

$$\tau = \frac{V}{v_o} = \frac{X_A C_{A_0}}{r_A} \tag{6.}$$

2.9.3. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM

Kotlasti reaktor s dotokom (Slika 11.) 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 dovoditi u reaktor [Visković K., 2009].



Slika 11. Kotlasti reaktor s dotokom

Bilanca tvari A je prikazana jednadžbom 7.:

$$\frac{d(V\,c_A)}{dt} = c_{A,0} + r_A V \qquad (7.)$$

Ako se uzme u obzir da je promjena volumena u vremenu jednaka brzini volumnog dotoka jednadžba 7. glasi (jednadžba 8.):

$$\frac{dc_A}{dt} = \frac{(c_{A,0} - c_A)q}{V} + r_A \qquad (8.)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATEMATIČKI MODELI

Matematički model opisuje sustav pomoću skupova varijabli i jednadžbi, koje opisuju odnose među varijablama. Varijable u modelu predstavljaju neka svojstva sustava. U modelu mogu postojati različiti tipovi varijabli, pa tako one mogu biti: ulazne i izlazne, zavisne i nezavisne, varijable stanja i slučajne varijable

Matematički modeli mogu biti:

1) Linearni i nelinearni - ako grafovi promjene varijable pokazuju linearnost, modele smatramo linearnim, i obrnuto. Nelinearne modele radi pojednostavljenog prikazivanja možemo linearizirati. Tada oni gube na točnosti, ali na jednostavan način prikazuju promjene i međusobne zavisnosti među varijablama.

2) Deterministički i stohastički - deterministički su oni modeli u kojima je svaki skup varijabli točno određen parametrima u modelu i skupovima prethodnih stanja ovih varijabli. Za jedan skup vrijednosti rezultat je uvijek isti. Stohastički modeli sadrža u sebi slučajnosti, a stanja varijabli nisu opisana točno određenim jedinstvenim vrijednostima nego raspodjelom vjerojatnosti.

3) Statički i dinamički - statički su modeli matematički opisi sustava u stacionarnom stanju, gdje su vrijednosti ulaznih i izlaznih varijabli konstantne, ali ne nužno i jednake jedne drugima. Budući da nema promjena varijabli njihova je derivacija jednaka nuli i one ne zavise o vremenu. Dinamički modeli, za razliku od statičkih, ovise o vremenu pa su promjene varijabli prikazane kao derivacije po vremenu odnosno kao diferencijalne jednadžbe.

4) Diskretni/diskontinuirani i kontinuirani - diskretni modeli ne uzimaju u obzir vrijeme, a promjene veličina prikazujemo histogramom jer su vrijednosti varijable međusobno nepovezane i nezavisne (npr. mjerenje visine u populaciji slučajnim redoslijedom, po abecedi, starosti, itd.). Kontinuirani modeli prikazuju se kao funkcija vremena, f(t) i varijable se mijenjaju tijekom vremena.

5) Deduktivni, induktivni i tzv. 'plivajući' - deduktivni model čini logična struktura utemeljena na teoriji i zaključivanju. Induktivni modeli izrastaju iz mjerenja i dokaza. Plivajući modeli se temelje na prizivanju ili procjeni očekivanih odnosa među varijablama.

Što je više varijabli i veza među njima obuhvaćeno modelom, to je model složeniji i njegova uporaba je manje jednostavna. Složeniji modeli su često precizniji od jednostavnih i zato je potrebno odrediti željenu točnost modela i tako odabrati prikladnu razinu složenosti [http://www.ptfos.unios.hr/joomla/modeli/images/files/prezentacije/Uvod%20u%20matematicko%20modeliranje.pdf].

3.2. MATEMATIČKO MODELIRANJE

Matematičko modeliranje je postupak opisivanja realnog sustava matematičkim jednadžbama s ciljem razvoja i uporabe matematičkog modela za kasnije analize, projektiranja i optimiranja sustava za koji je model izrađen [http://www.ptfos.unios.hr/joomla/modeli/images/files/prezentacije/Uvod%20u%20matematicko%20modeliranje.pdf].

3.2.1. MATEMATIČKO MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA

Matematičko modeliranje ima važnu ulogu u proučavanju enzimskih reakcija. Veliki broj parametara mogu imati utjecaj 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. Modeli se mogu koristiti za dizajn i vođenje procesa, te za optimiranje uvjeta procesa [Tusić M., 2010].

Kod jednosupstratnih reakcija brzina enzimske reakcije opisuje se Michaelis – Menteničinom kinetičkom jednadžbom (jednadžba ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata i enzima. L. Michaelis i M. L. Menten su predložili da se prvo vežu enzim (E) i supstrat (S), dajući pri tom kompleks enzim – supstrat (ES) (jednadžba 9.), uz pretpostavku da je to brza i reverzibilna reakcija. Taj kompleks se pri tom kemijski mijenja što rezultira stvaranjem produkta (P) i njegovim odvajanjem od enzima (jednadžba 10.)

$$S + E \underset{k2}{\overset{k1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (9.)$$

$$ES \xrightarrow{k3} P + E \qquad (10.)$$

Početna brzina reakcije tj. početna brzina potrošnje supstrata (r_S) može se odrediti iz Michaelis – Menteničinog izraza (jednadžba 11.), koji se temelji na pretpostavci da je koncentracija supstrata dovoljno visoka da ne dolazi do bitne promjene u njenoj početnoj vrijednosti tijekom perioda u kojem se eksperimentalno određuje početna brzina reakcije.

$$r_s = \frac{V_m\, c_S}{K_m^S + c_S} \qquad (11.)$$

Parametar V_m ovisan je o koncentraciji enzima (jednadžba 12.), a K_m^S o konstantama brzina reakcija danih u jednadžbama 9. i 10. (jednadžba 14.)

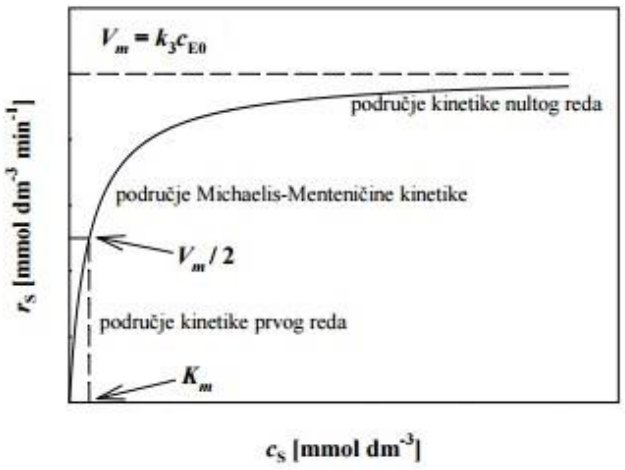
$$V_m = k_3\, E_0 \qquad (12.)$$

$$K_m^S = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \qquad (13.)$$

Michaelis – Menteničina jednadžba pokazuje tri različita područja brzine reakcija (slika 12.):

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

Pri vrlo niskim koncentracijama supstrata ovisnost reakcijske brzine r_s o koncentraciji supstrata c_s je linearna.
Područje niskih koncentracija supstrata ($c_s << K_m^S$) može se aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda, a područje visokih koncentracija supstrata ($c_s >> K_m^S$) kinetikom nultog reda.



Slika 12. Ovisnost reakcijske brzine o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis – Menteničine kinetike

Michaelis – Menteničin 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 enzima.

Postoje tri tipa inhibicije:

1. kompetitivna inhibicija (jednadžba 14.)
2. nekompetitivna inhibicija (jednadžba 15.)
3. antikompetitivna inhibicija (jednadžba 16.)

Koncentracija inhibitora dana je sa c_I, pri čemu to može biti i supstrat i produkt.

$$r_S = \frac{V_m\, C_S}{K_m^S \left(1 + {C_I}/{K_I}\right) + C_S} \tag{14.}$$

$$r_S = \frac{V_m\, C_S}{\left(1 + {C_I}/{K_I}\right)\left(K_m^S + C_S\right)} \tag{15.}$$

$$r_s = \frac{V_m\, C_S}{K_m^S + C_S \left(1 + {C_I}/{K_I}\right)} \tag{16.}$$

Kompetitivni inhibitori su najčešće slični molekuli ili dijelu molekule supstrata, te se vežu na aktivno mjesto supstrata. Kompetitivni inhibitori smanjuju brzinu reakcije tako da smanjuju udio molekula enzima koje mogu vezati supstrat, što se očituje na "prividnom" povećanju vrijednosti K_m^S.

Kod nekompetitivne inhibicije 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 [Crnić L. et al., 2013].

3.3. KINETIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM

Kinetički model oksidacije amino alkohola katalizirane s ezimom alkohol dehidrogenazom (ADH) prikazan je jednadžbom 17.

$$r_1 = \frac{(V_{m1}\ C_{ADH}\ C_{ALK}\ C_{NAD})}{\left((K_{ALK} + C_{ALK})\left(K_{NAD}\left(1+\frac{C_{NADH}}{K_{INADH}}\right)+ C_{NAD}\right)\right)} \quad (17.)$$

3.4. KINETIČKI MODEL REAKCIJE REGENERACIJE KOENZIMA

Kinetički model reakcije regeneracije koenzima NAD(H) enzimom NADH oksidazom prikazan je jednadžbom 18.

$$r_2 = \frac{(V_{m2}\ C_{NADH,OKS}\ C_{NADH}\ C_O)}{\left(K_{NADH}\left(1+\frac{C_{NAD}}{K_{INAD}}\right)(K_O+ C_O)\right)} \quad (18.)$$

3.4. KINETIČKI MODEL DOBAVE KISIKA IZ PLINSKE U KAPLJEVITU FAZU

$$r_3 = K_L\ (c_{O,Z} - c_O) \quad (19.)$$

Jednadžba 19. prikazuje kinetički model dobave kisika.

3.5. KINETIČKI MODEL ZA KASKADNU REAKCIJU

Uz jednadžbe 17., 18., 19., za model kaskadne reakcije koristi se i jednadžba 20. koja prikazuje kinetički model aldolne adicije.

$$r_4 = \frac{(V_{m3}\, C_{FSA}\, C_{ALD}\, C_{DHA})}{((K_{ALD} + C_{ALD})\,(K_{DHA} + C_{DHA})} \qquad (20.)$$

3.6. REAKTORSKI MODELI ZA OKSIDACIJU AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANU S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM

3.6.1. REAKTORSKI MODEL KOTLASTOG REAKTORA, BEZ REGENERACIJE KOENZIMA NAD(H)

Bilanca tvari za alkohol (jednadžba 21.):

$$\frac{dc_{ALK}}{dt} = -r_1 \qquad (21.)$$

Bilanca tvari za NAD (jednadžba 22.):

$$\frac{dc_{NAD}}{dt} = -r_1 \qquad (22.)$$

Bilanca tvari za NADH (jednadžba 23.):

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = r_1 \tag{23.}$$

Bilanca tvari za aldehid (jednadžba 24.):

$$\frac{dc_{ALD}}{dt} = r_1 \tag{24.}$$

3.6.2. MODEL KOTLASTOG REAKTORA, SA REGENERACIJOM KOENZIMA NAD(H)

Bilanca tvari za alkohol (jednadžba 25.):

$$\frac{dc_{ALK}}{dt} = -r_1 \tag{25.}$$

Bilanca tvari za NAD (jednadžba 26.):

$$\frac{dc_{NAD}}{dt} = -r_1 + r_2 \tag{26.}$$

Bilanca tvari za NADH (jednadžba 27.):

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = r_1 - r_2 \tag{27.}$$

Bilanca tvari za aldehid (jednadžba 28.):

$$\frac{dc_{ALD}}{dt} = r_1 \tag{28.}$$

Bilanca tvari za kisik (jednadžba 29.):

$$\frac{dc_O}{dt} = -r_2 + r_3 \tag{29.}$$

3.6.3. MODEL PROTOČNOG KOTLASTOG REAKTORA, SA REGENERACIJOM KOENZIMA NAD(H)

Bilanca tvari za alkohol (jednadžba 30.):

$$\frac{dc_{ALK}}{dt} = \frac{(c_{ALK,0} - c_{ALK})}{\tau} - r_1 \tag{30.}$$

Bilanca tvari za NAD (jednadžba 31.):

$$\frac{dc_{NAD}}{dt} = \frac{(c_{NAD,0} - c_{NAD})}{\tau} - r_1 + r_2 \tag{31.}$$

Bilanca tvari za NADH (jednadžba 32.):

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = \frac{(c_{NADH,0} - c_{NADH})}{\tau} + r_1 - r_2 \tag{32.}$$

Bilanca tvari za aldehid (jednadžba 33.):

$$\frac{dc_{ALD}}{dt} = \frac{(c_{ALD,0} - c_{ALD})}{\tau} + r_1 \quad (33.)$$

Bilanca tvari za kisik (jednadžba 34.):

$$\frac{dc_O}{dt} = \frac{(c_{O,0} - c_O)}{\tau} - r_2 + r_3 \quad (34.)$$

3.6.4. MODEL REAKTORA S DOTOKOM, SA REGENERACIJOM KOENZIMA NAD(H)

Bilanca tvari za alkohol (jednadžba 35.):

$$\frac{dc_{ALK}}{dt} = \frac{(c_{ALK,0} - c_{ALK})\, q}{V} - r_1 \quad (35.)$$

Bilanca tvari za NAD (jednadžba 36.):

$$\frac{dc_{NAD}}{dt} = \frac{(c_{NAD,0} - c_{NAD})\, q}{V} - r_1 + r_2 \quad (36.)$$

Bilanca tvari za NADH (jednadžba 37.):

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = \frac{(c_{NADH,0} - c_{NADH})\, q}{V} + r_1 - r_2 \quad (37.)$$

Bilanca tvari za aldehid (jednadžba 38.):

$$\frac{dc_{ALD}}{dt} = \frac{(c_{ALD,0} - c_{ALD})\, q}{V} + r_1 \tag{38.}$$

Bilanca tvari za kisik (jednadžba 39.):

$$\frac{dc_O}{dt} = \frac{(c_{O,0} - c_O)\, q}{V} - r_2 + r_3 \tag{39.}$$

3.7. REAKTORSKI MODELI ZA KASKADNU REAKCIJU

3.7.1 MODEL KOTLASTOG REAKTORA ZA KASKADNU REAKCIJU

Uz već navedene bilance za alkohol (jednadžba 25.), NAD (jednadžba 26.), NADH (jednadžba 27.) i kisik (jednadžba 29.) u modelu za kaskadnu reakciju koriste se i bilanca za dihidroksiaceton (jednadžba 40.), bilanca za aldol (jednadžba 41.) i bilanca za aldehid (jednadžba 42.) koja se razlikuje od već navedene bilance u jednadžbi 28.

$$\frac{dc_{DHA}}{dt} = -r_4 \tag{40.}$$

$$\frac{dc_{ALDOL}}{dt} = r_4 \tag{41.}$$

$$\frac{dc_{ALD}}{dt} = r_1 - r_4 \tag{42.}$$

3.7.2 MODEL PROTOČNOG KOTLASTOG REAKTORA ZA KASKADNU REAKCIJU

Uz već navedene bilance za alkohol (jednadžba 30.), NAD (jednadžba 31.), NADH (jednadžba 32.) i kisik (jednadžba 34.) u modelu za kaskadnu reakciju koriste se i bilanca za dihidroksiaceton (jednadžba 43.), bilanca za aldol (jednadžba 44.) i bilanca za aldehid (jednadžba 45.) koja se razlikuje od već navedene bilance u jednadžbi 33.

$$\frac{dc_{DHA}}{dt} = \frac{(c_{DHA,0} - c_{DHA})}{\tau} - r_4 \quad (43.)$$

$$\frac{dc_{ALDOL}}{dt} = \frac{(c_{ALDOL,0} - c_{ALDOL})}{\tau} + r_4 \quad (44.)$$

$$\frac{dc_{ALD}}{dt} = \frac{(c_{ALD,0} - c_{ALD})}{\tau} + r_1 - r_4 \quad (45.)$$

3.7.3. MODEL REAKTORA S DOTOKOM ZA KASKADNU REAKCIJU

Uz već navedene bilance za alkohol (jednadžba 35.), NAD (jednadžba 36.), NADH (jednadžba 37.) i kisik (jednadžba 39.) u modelu za kaskadnu reakciju koriste se i bilanca za dihidroksiaceton (jednadžba 46.), bilanca za aldol (jednadžba 47.) i bilanca za aldehid (jednadžba 48.) koja se razlikuje od već navedene bilance u jednadžbi 38.

$$\frac{dc_{DHA}}{dt} = \frac{(c_{DHA,0} - c_{DHA})\, q}{V} - r_4 \quad (46.)$$

$$\frac{dc_{ALDOL}}{dt} = \frac{(c_{ALDOL,0} - c_{ALDOL})\, q}{V} + r_4 \qquad (47.)$$

$$\frac{dc_{ALD}}{dt} = \frac{(c_{ALD,0} - c_{ALD})\, q}{V} + r_1 - r_4 \qquad (48.)$$

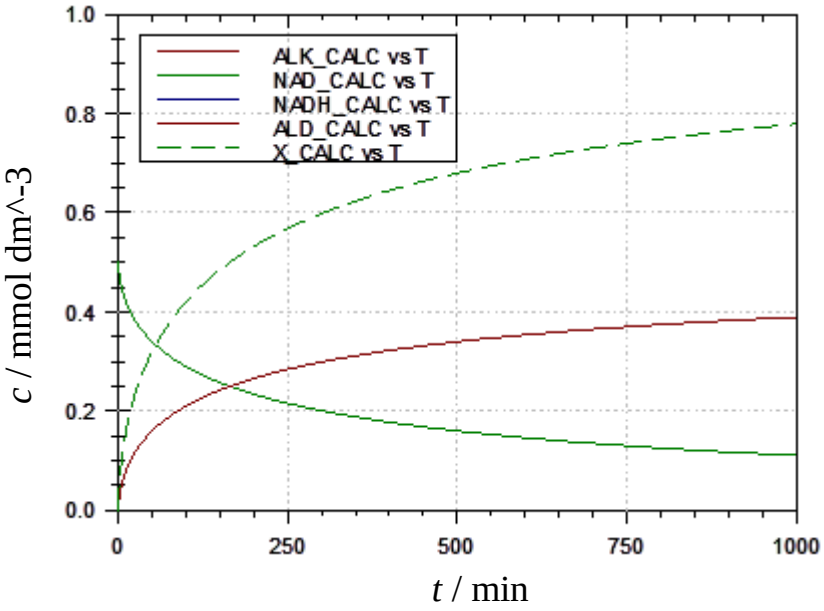
4. REZULTATI

4.1. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM

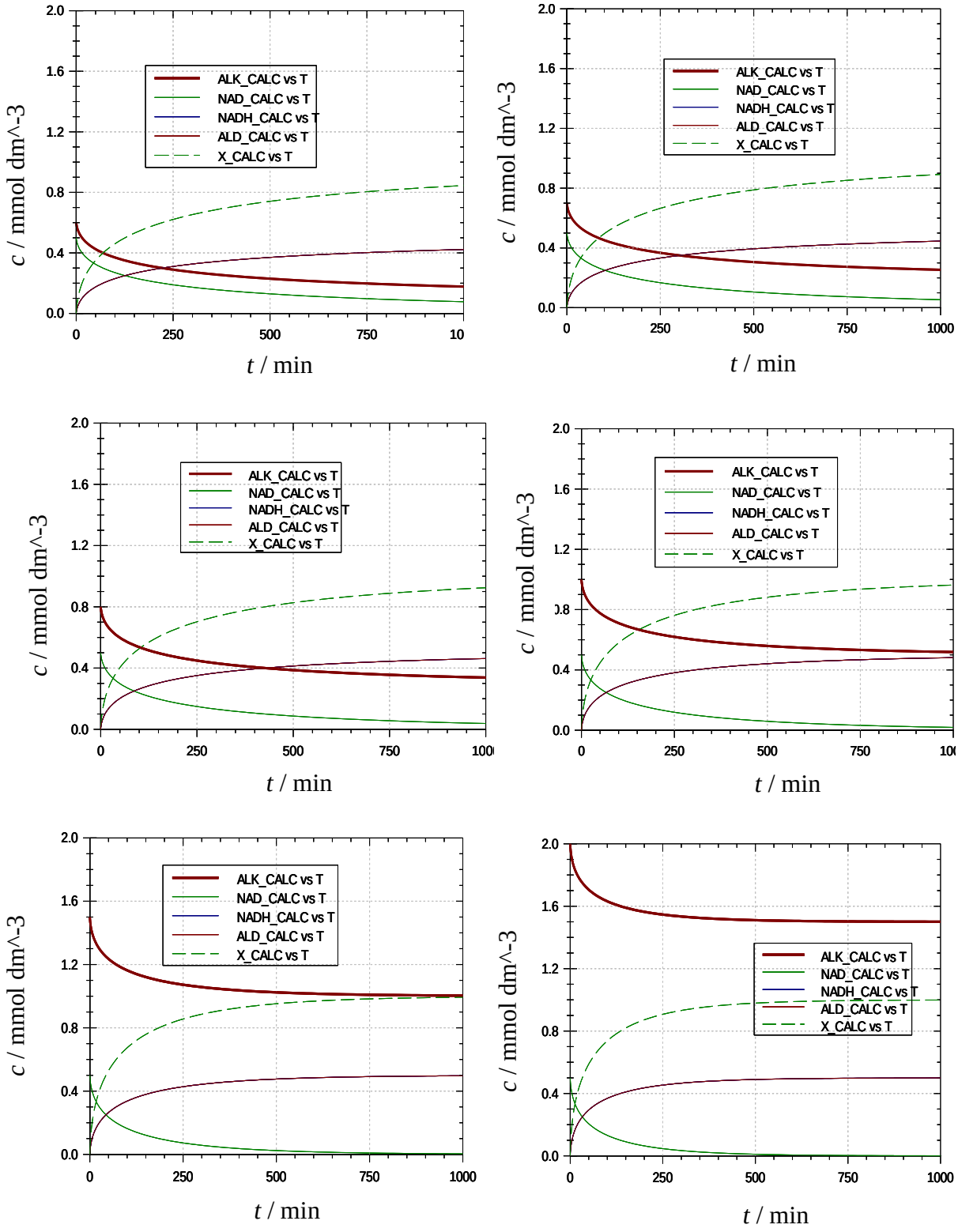
4.1.1. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA BEZ REGENERACIJE KOENZIMA NAD(H), KOTLASTI REAKTOR

Tablica 1. Ovisnost konverzije o promjenama koncentracija alkohola, NAD i enzima ADH u kotlastom reaktoru, bez regeneracije koenzima NAD(H)

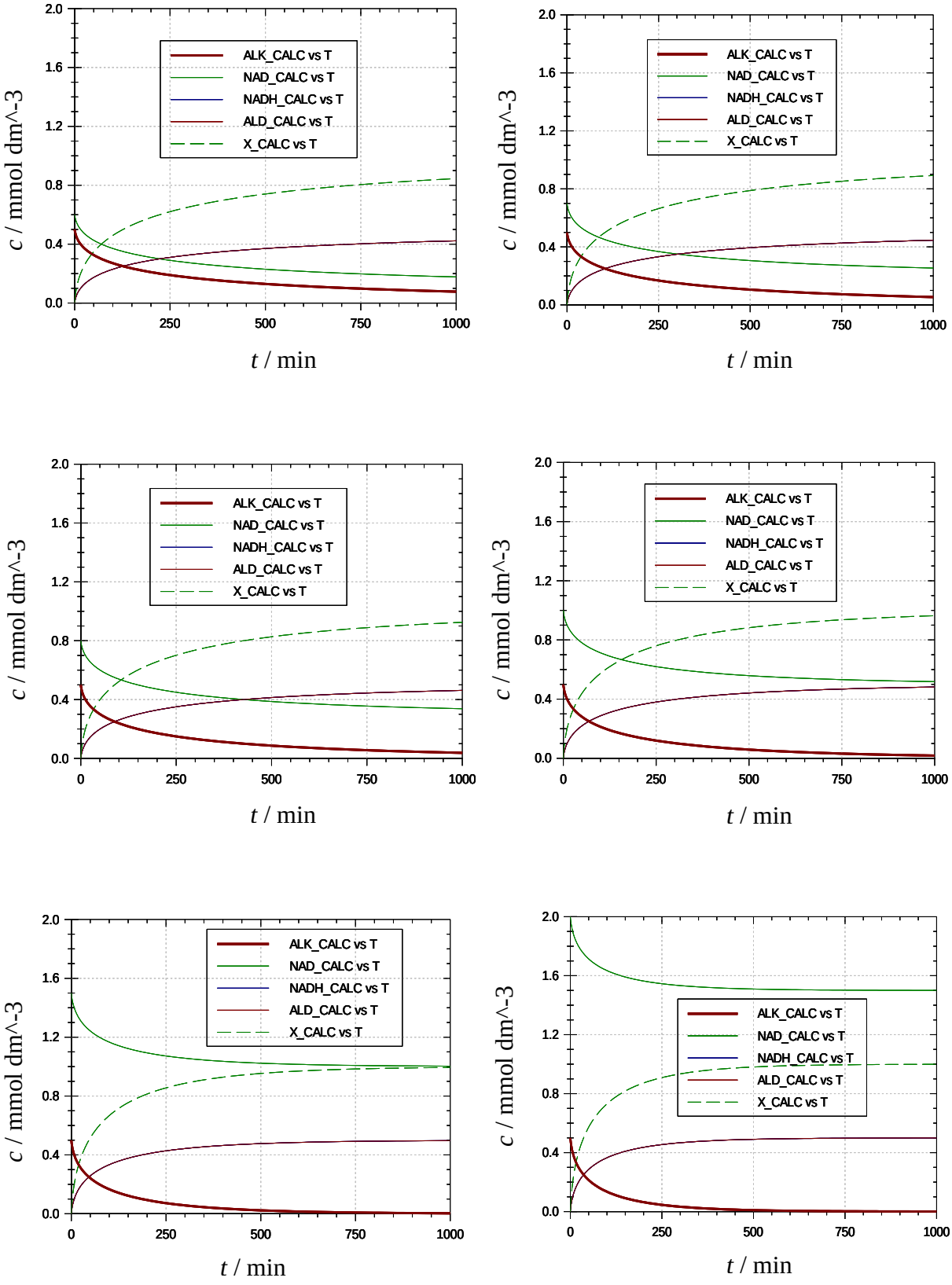
C_{ALK} [mmol/dm^3]	C_{NAD} [mmol/dm^3]	C_{ADH} [mmol/dm^3]	$X_{1000min}$ [-]
0,50	0,50	2,50	0,7792
0,60	0,50	2,50	0,8453
0,70	0,50	2,50	0,8919
0,80	0,50	2,50	0,9245
1,00	0,50	2,50	0,9631
1,50	0,50	2,50	0,9936
2,00	0,50	2,50	0,9988
0,50	0,60	2,50	0,8454
0,50	0,70	2,50	0,8922
0,50	0,80	2,50	0,9250
0,50	1,00	2,50	0,9639
0,50	1,50	2,50	0,9942
0,50	2,00	2,50	0,9990
0,50	0,50	3,00	0,8021
0,50	0,50	7,00	0,8886
0,50	0,50	15,00	0,9388
0,50	0,50	25,00	0,9604
0,50	0,50	40,00	0,9740
0,50	0,50	60,00	0,9821



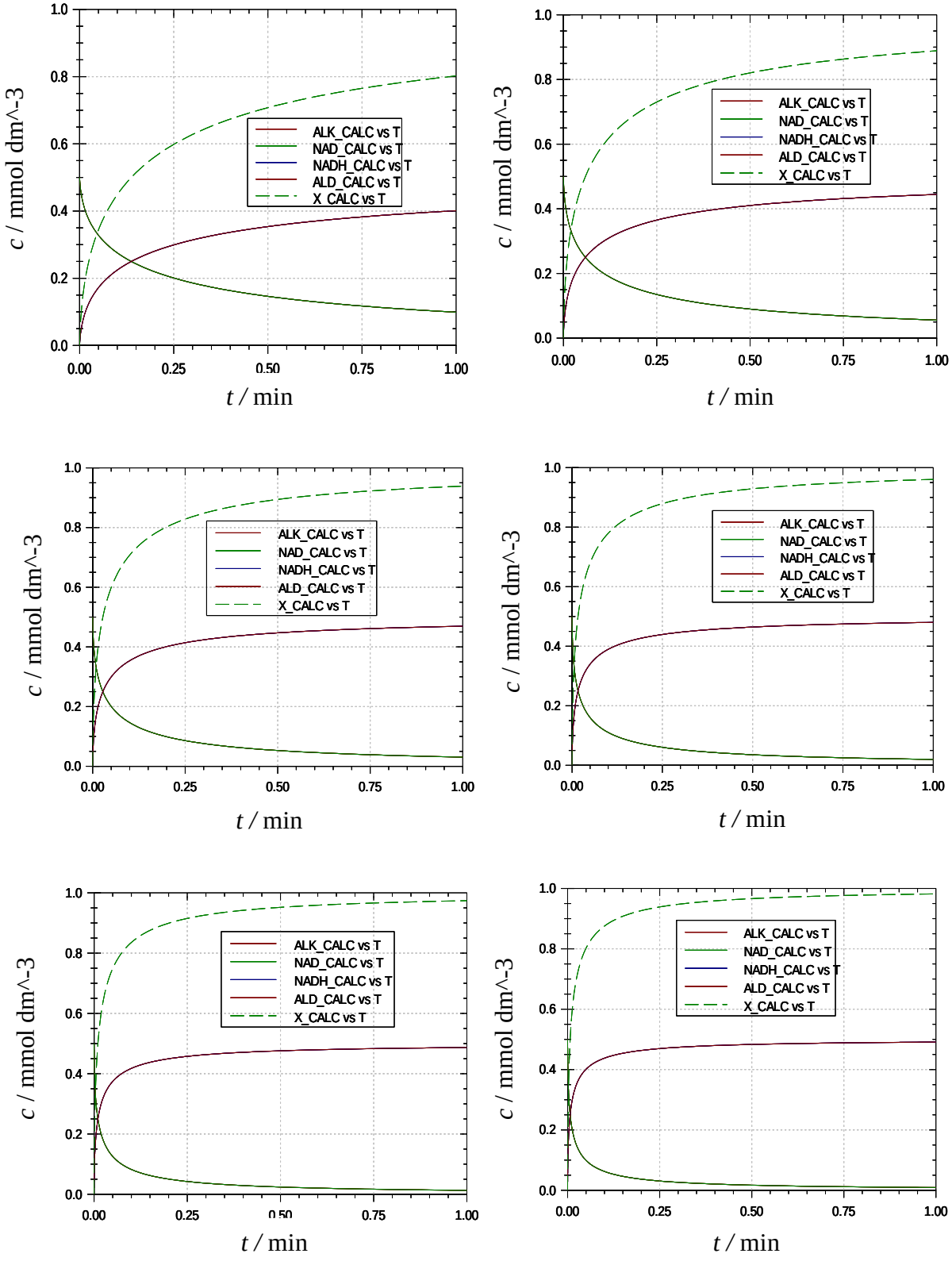
Slika 13. Grafički rezultat za kotlasti reaktor bez regeneracije koenzima NAD(H) pri C_{ALK} = 0,50 mmol/dm^3, C_{NAD} = 0,50 mmol/dm^3 i C_{ADH} = 2,50 mmol/dm^3



Slika 14. Grafički prikazi ovisnosti konverzije o koncentraciji alkohola u kotlastom reaktoru, pri stalnoj C_{NAD} = 0,50 mmol/dm^3 i C_{ADH} = 2,50 mmol/dm^3, bez regeneracije koenzima



Slika 15. Grafički prikazi ovisnosti konverzije o koncentraciji NAD u kotlastom reaktoru, pri stalnoj C_{ALK} = 0,50 mmol/dm^3 i C_{ADH} = 2,50 mmol/dm^3, bez regeneracije koenzima



Slika 16. Grafički prikazi ovisnosti konverzije o koncentraciji ADH u kotlastom reaktoru, pri stalnoj C_{ALK} = 0,50 mmol/dm^3 i C_{NAD} = 0,50 mmol/dm^3, bez regeneracije koenzima

4.1.2. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA, SA REGENERACIJOM KOENZIMA NAD(H), KOTLASTI REAKTOR

Tablica 2. Ovisnost konverzije, nakon 50 min, 500 min, 1000 min i 1500 min rada, o promjenama koncentracija enzima ADH i NAD, uz stalan zbroj $C_{ADH} + C_{NADH,OKS}$ (2,515 mmol/dm^3), stalnu koncentraciju NAD (0,5 mmol/dm^3) i stalnu koncentraciju alkohola (0,5 mmol/dm^3)

C_{ADH} [mmol/dm^3]	$C_{NADH,OKS}$ [mmol/dm^3]	OMJER [-]	X_{50min} [-]	X_{500min} [-]	$X_{1000min}$ [-]	$X_{1500min}$ [-]
0	2,515	1	0	0	0	0
0,000008	2,514992	0,99999	6,71E-06	6,71E-05	1,34E-04	2,01E-04
0,000015	2,514985	0,99999	1,26E-05	1,26E-04	2,51E-04	3,77E-04
0,015	2,5	0,99404	0.012501	0,11847	0,22338	0,31619
0,1	2,415	0,96024	0,080559	0,57282	0,82023	0,92484
0,5	2,015	0,80119	0,34464	0,98695	0,99984	1
0,8	1,715	0,68191	0,49275	0,99906	1	1
1	1,515	0,60239	0,57247	0,99984	1	1
1,5	1,015	0,40358	0,7224	1	1	1
2	0,515	0,20477	0,81993	1	1	1
2,3	0,215	0,08548	0,86087	1	1	1
2,4	0,115	0,04572	0,87187	1	1	1
2,45	0,065	0,02584	0,87638	1	1	1
2,5	0,015	0,00596	0,87472	1	1	1
2,515	0	0	0,3195	0,6809	0,77994	0,8288

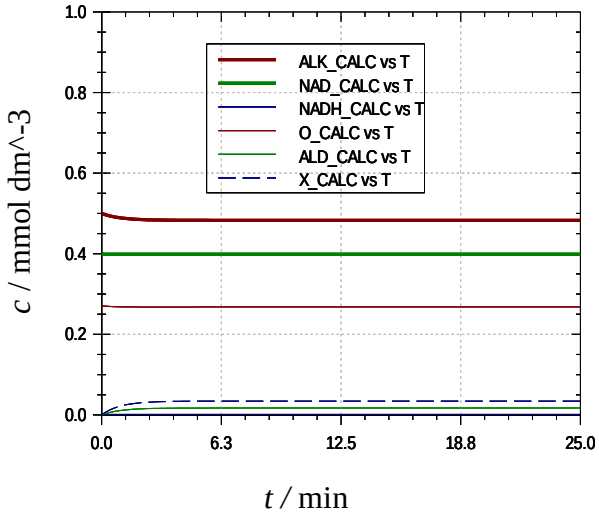
Omjer enzima (jednadžba 40.):

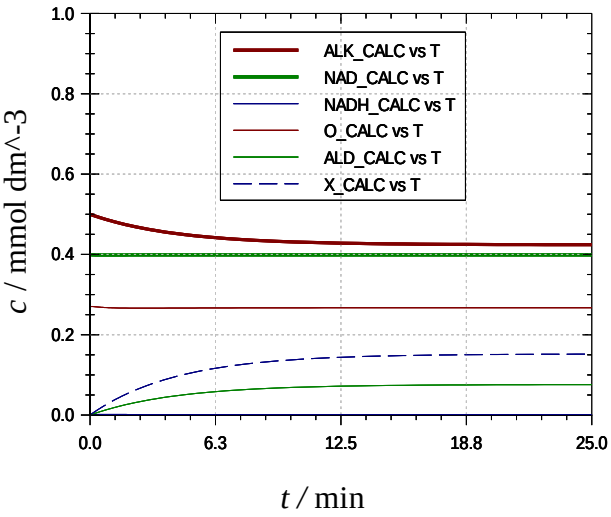
$$\text{OMJER} = C_{NADH,OKS} / (C_{ADH} + C_{NADH,OKS}) \quad (40.)$$

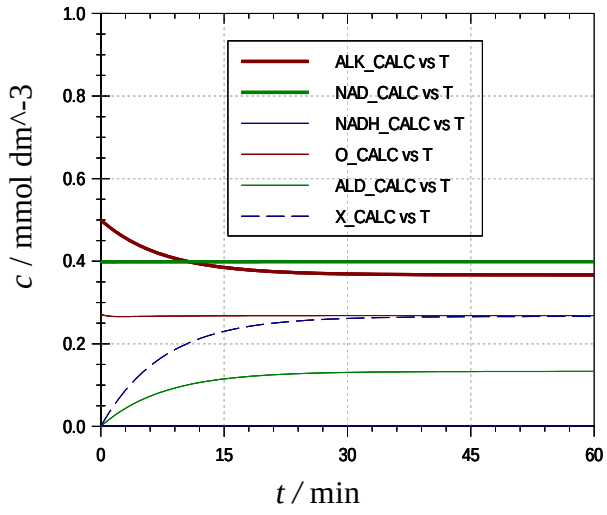
4.1.3. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA, SA REGENERACIJOM KOENZIMA NAD(H), PROTOČNO KOTLASTI REAKTOR

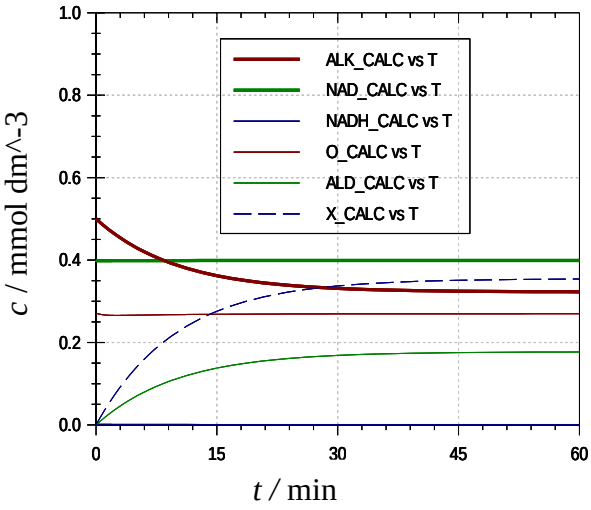
Tablica 3. Ovisnost konverzije o promjeni vremena zadržavanja pri istim koncentracijama enzima ADH, NADH oksidaze, alkohola i NAD-a u protočnom kotlastom reaktoru, sa regeneracijom koenzima NAD(H)

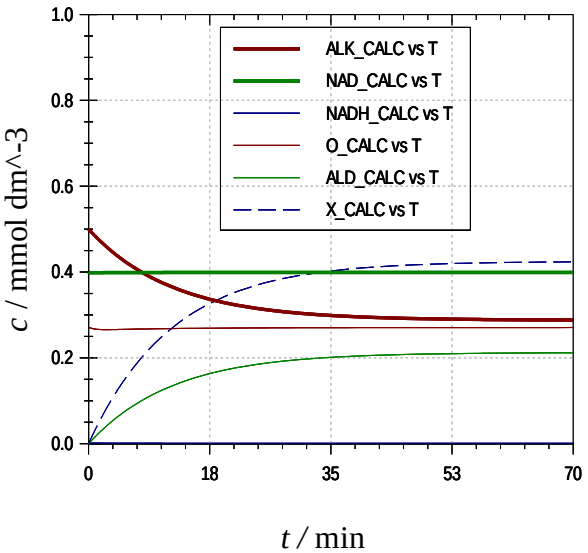
C_{ADH} [mmol/dm^3]	$C_{NADH,OKS}$ [mmol/dm^3]	C_{ALK} [mmol/dm^3]	C_{NAD} [mmol/dm^3]	τ [min]	X_{STAC} [-]
2,50	0,015	0,50	0,40	1,00	0,1517
2,50	0,015	0,50	0.40	5,00	0,2663
2,50	0,015	0,50	0,40	10,00	0,3440
2,50	0,015	0,50	0,40	15,00	0,3539
2,50	0,015	0,50	0,40	20,00	0,4237
2,50	0,015	0,50	0,40	25,00	0,4790
2,50	0,015	0,50	0,40	30,00	0,5284
2,50	0,015	0,50	0,40	50,00	0,6543
2,50	0,015	0,50	0,40	150,00	0,8532
2,50	0,015	0,50	0,40	200,00	0,8860
2,50	0,015	0,50	0,40	500,00	0,9512
2,50	0,015	0,50	0,40	700,00	0,9646

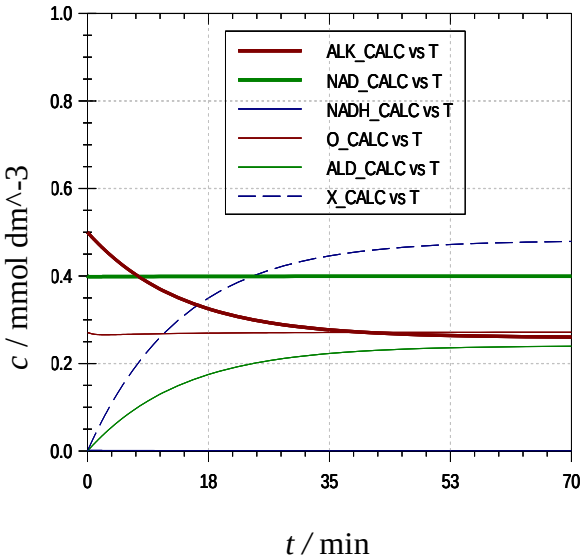

ALK_CALC vs T
NAD_CALC vs T
NADH_CALC vs T
O_CALC vs T
ALD_CALC vs T
X_CALC vs T
c / mmol dm^-3
t / min
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0.0
6.3
12.5
18.8
25.0

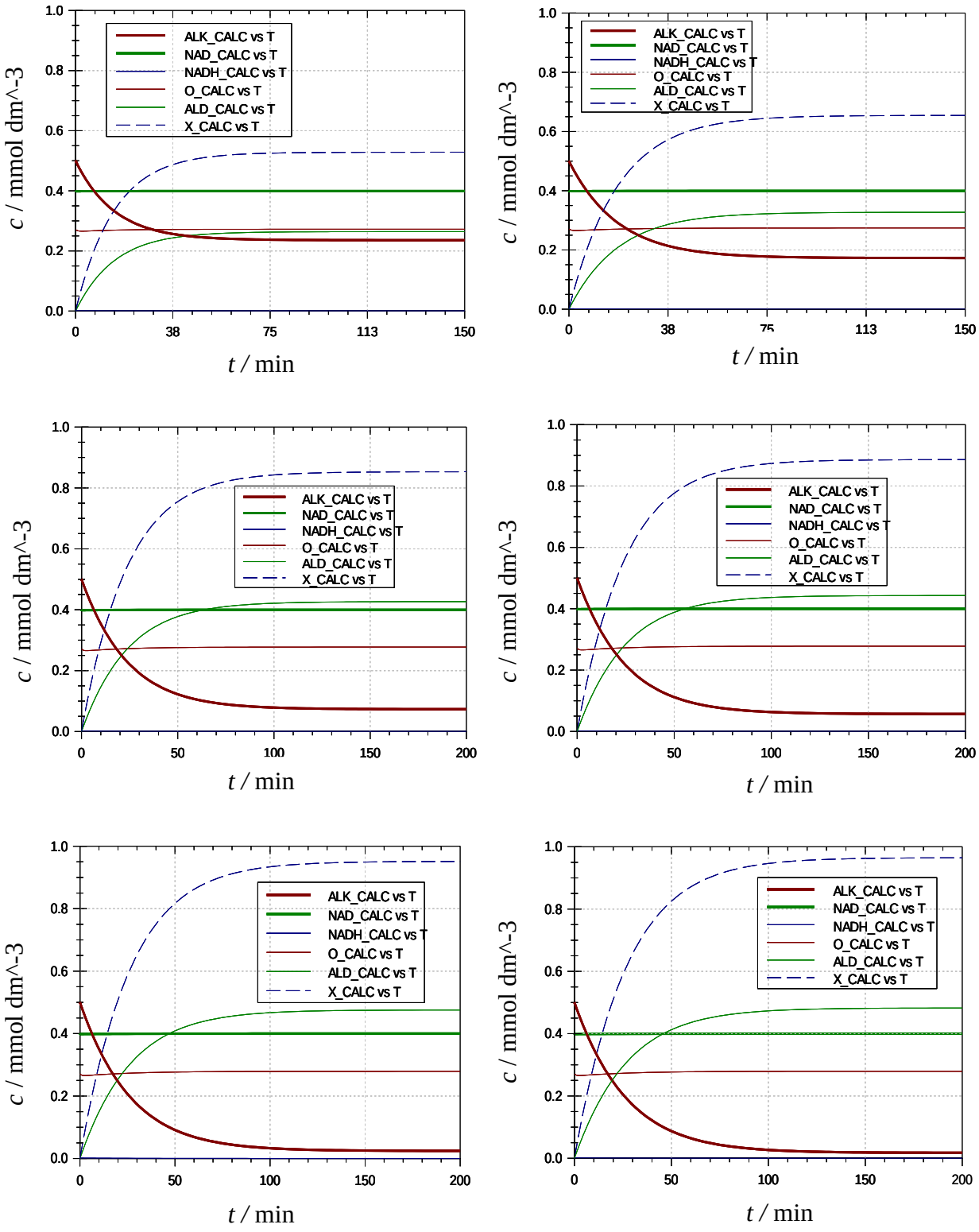

ALK_CALC vs T
NAD_CALC vs T
NADH_CALC vs T
O_CALC vs T
ALD_CALC vs T
X_CALC vs T
c / mmol dm^-3
t / min
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0.0
6.3
12.5
18.8
25.0


ALK_CALC vs T
NAD_CALC vs T
NADH_CALC vs T
O_CALC vs T
ALD_CALC vs T
X_CALC vs T
c / mmol dm^-3
t / min
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
15
30
45
60


ALK_CALC vs T
NAD_CALC vs T
NADH_CALC vs T
O_CALC vs T
ALD_CALC vs T
X_CALC vs T
c / mmol dm^-3
t / min
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
15
30
45
60


ALK_CALC vs T
NAD_CALC vs T
NADH_CALC vs T
O_CALC vs T
ALD_CALC vs T
X_CALC vs T
c / mmol dm^-3
t / min
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
18
35
53
70


ALK_CALC vs T
NAD_CALC vs T
NADH_CALC vs T
O_CALC vs T
ALD_CALC vs T
X_CALC vs T
c / mmol dm^-3
t / min
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
0
18
35
53
70

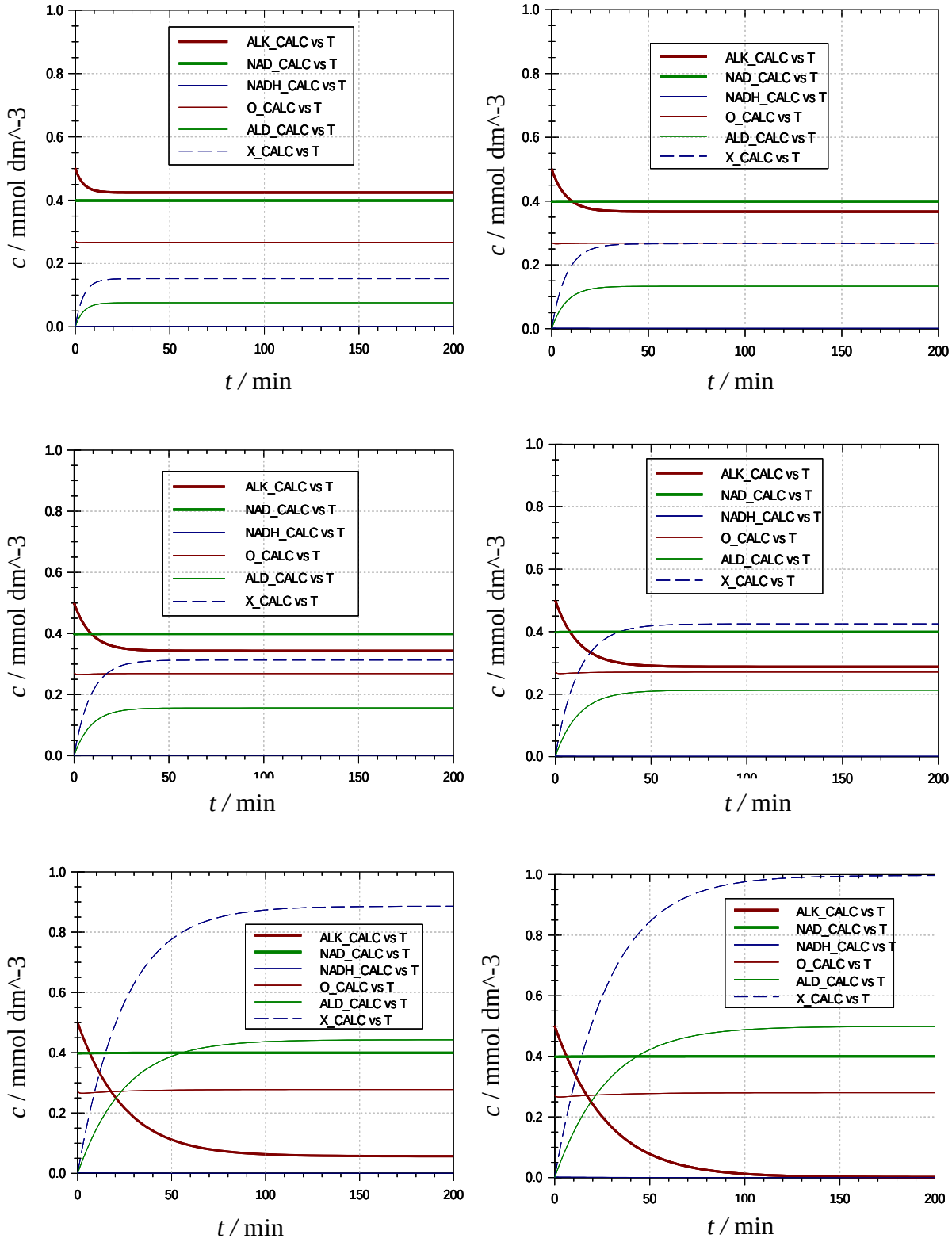


Slika 17. Grafički prikazi ovisnosti konverzije o vremenu zadržavanja pri stalnim C_{ADH} = 2,50 mmol/dm^3, $C_{NADH,OKS}$ = 0,015 mmol/dm^3, C_{ALK} = 0,50 mmol/dm^3 i C_{NAD} = 0,40 mmol/dm^3 u protočnom kotlastom reaktoru

4.1.4. REZULTATI MATEMATIČKOG MODEL, SA REGENERACIJOM KOENZIMA NAD(H), REAKTOR S DOTOKOM

Tablica 4. Ovisnost konverzije o dotoku, pri istim koncentracijama enzima ADH, NADH oksidaze, alkohola, NAD i pri istom volumenu u reaktoru s dotokom, sa regeneracijom koenzima NAD(H)

C_{ADH} [mmol/dm^3]	$C_{NADH,OKS}$ [mmol/dm^3]	C_{ALK} [mmol/dm^3]	C_{NAD} [mmol/dm^3]	V [dm^3]	q [dm^3/min]	X_{STAC} [-]
2,50	0,015	0,50	0,4	10	2,0	0,1521
2,50	0,015	0,50	0.4	10	1,0	0,2664
2,50	0,015	0,50	0,4	10	0,8	0,3132
2,50	0,015	0,50	0,4	10	0,5	0,4248
2,50	0,015	0,50	0,4	10	0,05	0,8860
2,50	0,015	0,50	0,4	10	0,001	0,9971



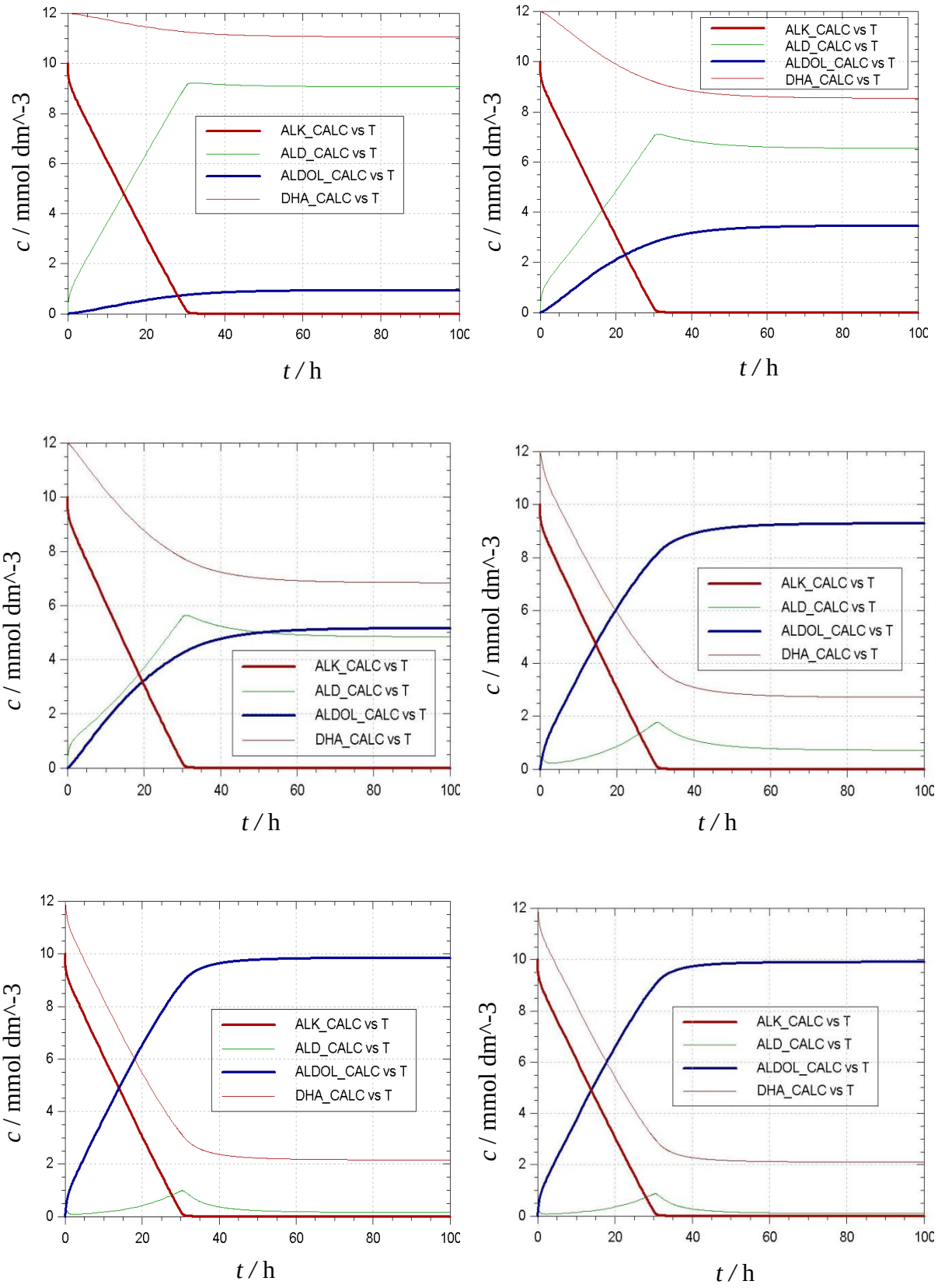
Slika 18. Grafički prikazi ovisnosti konverzije o dotoku pri stalnim C_{ADH} = 2,50 mmol/dm^3, $C_{NADH,OKS}$ = 0,015 mmol/dm^3, C_{ALK} = 0,50 mmol/dm^3 i C_{NAD} = 0,40 mmol/dm^3 u reaktoru s dotokom

4.2. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE

4.2.1. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE U KOTLASTOM REAKTORU

Tablica 5. Ovisnost iskorištenja na aldolu o promijeni koncentracije enzima FSA pri istim koncentracijama enzima ADH, enzima NADH OKD., alkohola (10,00 mmol/dm^3), NAD (0,50 mmol/dm^3) i DHA (12,00 mmol/dm^3)

C_{ADH} [mmol/dm^3]	$C_{NADH,OKS}$ [mmol/dm^3]	C_{FSA} [mmol/dm^3]	I [-]
1,50	1,015	0,010	0,0937
1,50	1,015	0,050	0,3456
1,50	1,015	0,100	0,5156
1,50	1,015	1,000	0,9284
1,50	1,015	2,500	0,9847
1,50	1,015	3,000	0,9901

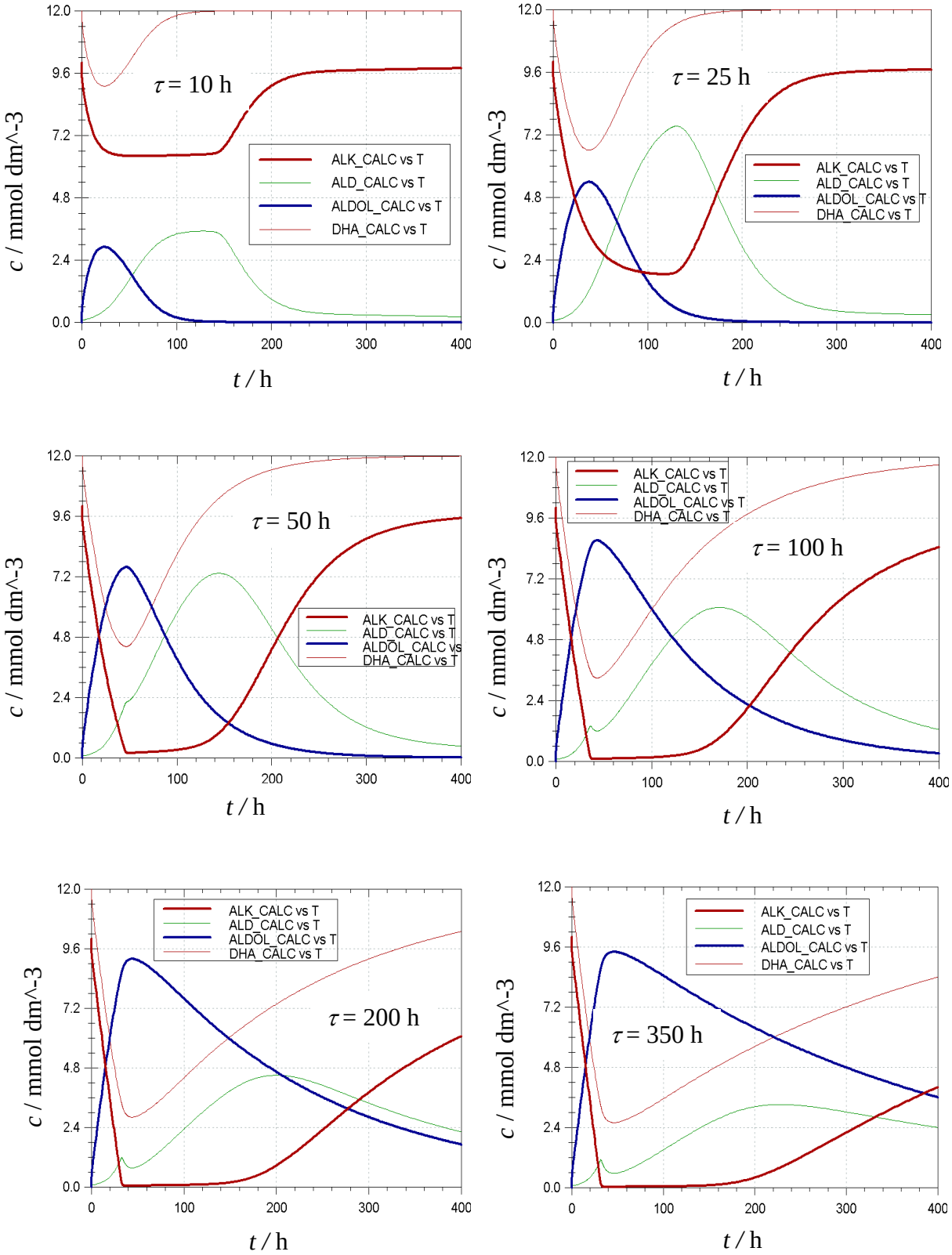


Slika 19. Grafički prikazi ovisnosti nastale količine aldola o koncentraciji enzima FSA, pri stalnim C_{ADH} = 1,50 mmol/dm^3 i $C_{NADH,OKS}$ = 1,015 mmol/dm^3

4.2.2. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE U PROTOČNOM KOTLASTOM REAKTORU

Tablica 6. Ovisnost maksimalnog iskorištenja na aldolu o promijeni vremena zadržavanja pri istim koncentracijama enzima ADH, enzima NADH OKD., enzima FSA, alkohola (10,00 mmol/dm3), NAD (0,50 mmol/dm^3) i DHA (12,00 mmol/dm^3)

C_{ADH} [mmol/dm^3]	$C_{NADH,OKS}$ [mmol/dm^3]	C_{FSA} [mmol/dm^3]	τ [h]	I_{max} [-]
1,50	1,015	2,50	10,00	0,2870
1,50	1,015	2,50	25,00	0,5378
1,50	1,015	2,50	50,00	0,7438
1,50	1,015	2,50	100,00	0,8677
1,50	1,015	2,50	200,00	0,9156
1,50	1,015	2,50	350,00	0,9353

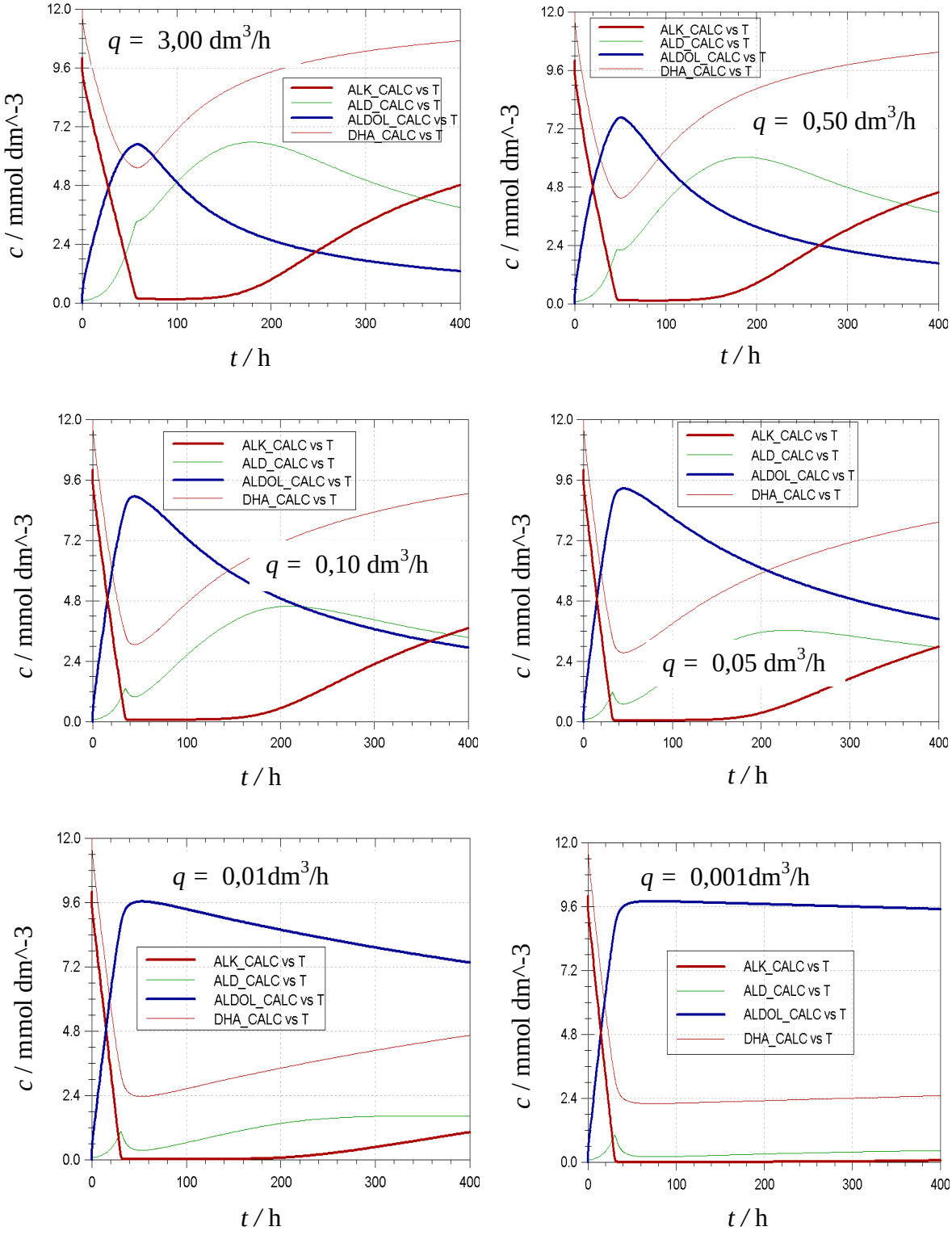


Slika 20. Grafički prikazi ovisnosti količine aldola, u protočnom kotlastom reaktoru, vremenu zadržavanja, pri stalnim C_{ADH} = 1,50 mmol/dm^3, $C_{NADH,OKS}$ = 1,015 mmol/dm^3 i C_{FSA} = 2,50 mmol/dm^3

4.2.3. REZULTATI MATEMATIČKOG MODELA KASKADNE REAKCIJE U REAKTORU S DOTOKOM

Tablica 7. Ovisnost maksimalnog iskorištenja na aldolu o promijeni dotoka pri istim koncentracijama enzima ADH, enzima NADH OKD., enzima FSA, alkohola (10,00 mmol/dm3), NAD (0,50 mmol/dm^3) i DHA (12,00 mmol/dm^3) i istom volumenu reaktora s dotokom (10 dm^3)

C_{ADH} [mmol/dm^3]	$C_{NADH,OKS}$ [mmol/dm^3]	C_{FSA} [mmol/dm^3]	q [dm^3/h]	I_{max} [-]
1,50	1,015	2,50	3,00	0,6408
1,50	1,015	2,50	0,50	0,7461
1,50	1,015	2,50	0,10	0,8894
1,50	1,015	2,50	0,05	0,9215
1,50	1,015	2,50	0,01	0,9527
1,50	1,015	2,50	0,001	0,9799



Slika 21. Grafički prikazi ovisnosti količine aldola, u protočnom reaktoru s dotokom, o dotoku, pri stalnim C_{ADH} = 1,50 mmol/dm^3, $C_{NADH,OKS}$ = 1,015 mmol/dm^3 i C_{FSA} = 2,50 mmol/dm^3

4.3. KINETIČKI PARAMETRI ZA SIMULACIJE

Simulacije su provedene uz kinetičke parametre prikazane u tablici 8.

Tablica 8. Kinetički parametri

K_{ALK} * [mmol/dm^3]	10,910
K_{NAD} * [mmol/dm^3]	0,399
K_{NADH} ** [mmol/dm^3]	0,005
K_O ** [mmol/dm^3]	0,0045
K_{INAD} ** [mmol/dm^3]	0,132
K_{INADH} * [mmol/dm^3]	0,011
V_{m1} * [U/cm^3]	0,344
V_{m2} ** [U/mg]	16,400
V_{m3} *** [U/mg]	10,200
K_{DHA} *** [mmol/dm^3]	11,011
K_{ALD} *** [mmol/dm^3]	167,340
kd1 **** [h^{-1}]	0,008
kd2 **** [h^{-1}]	0,066
kd3 **** [h^{-1}]	0,078

* Podaci iz [Sudar M., 2012]

** Podaci iz [Sudar M. et al., 2014]

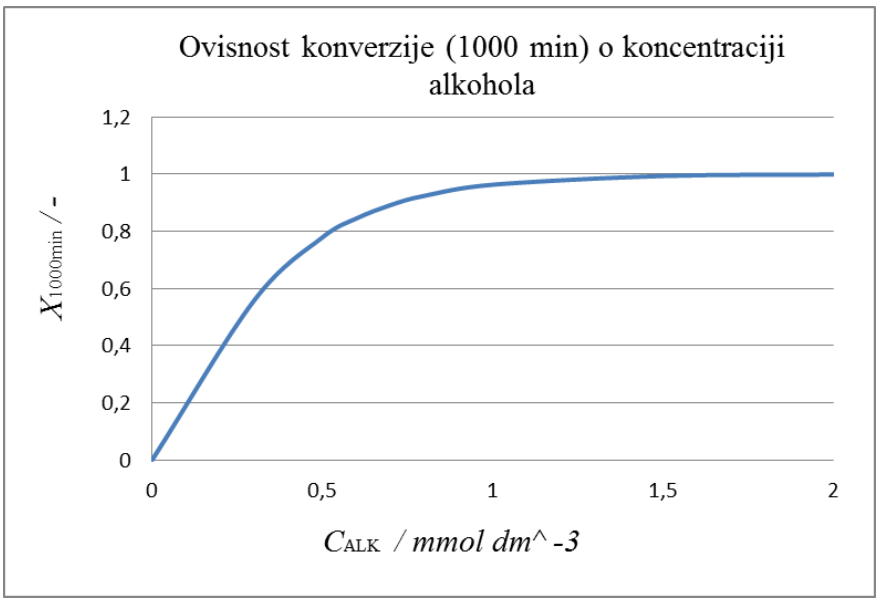
*** Podaci iz [Sudar M. et al., 2013]

**** Podaci iz [Sudar M. et al., rad prihvaćen za objavu]

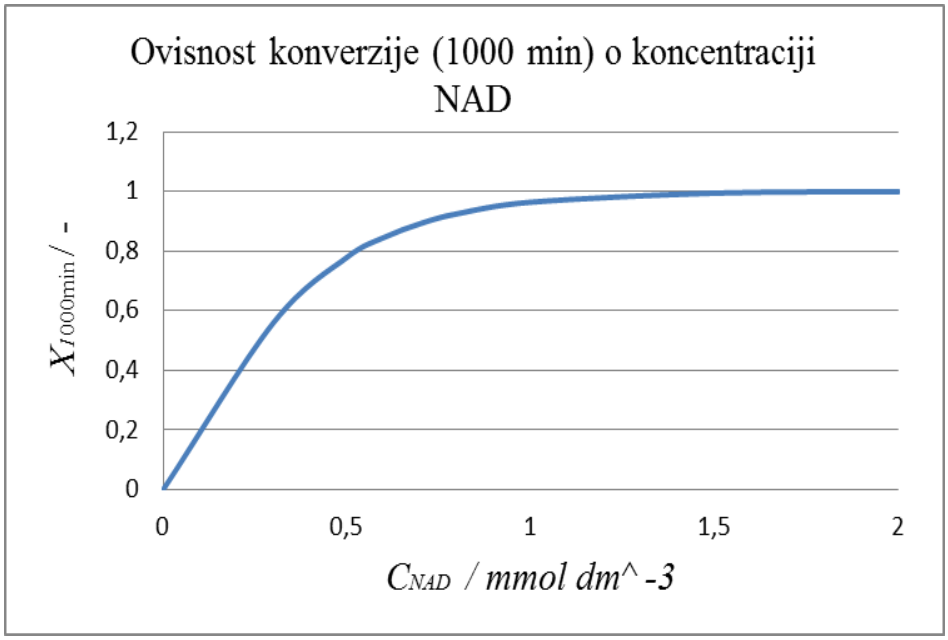
5. RASPRAVA

5.1. RASPRAVA REZULTATA MATEMATIČKOG MODELA OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE ALKOHOL DEHIDROGENAZOM

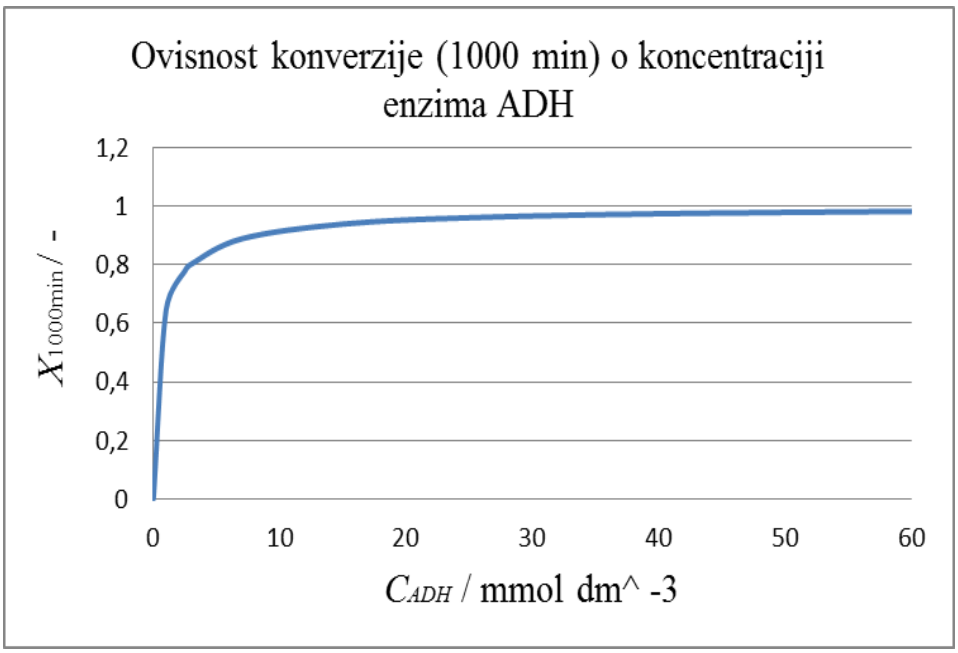
5.1.1. UTJECAJ NA KONVERZIJU U KOTLASTOM REAKTORU



Slika 22. Grafički prikaz ovisnosti konverzije nakon 1000 min. o koncentraciji alkohola u kotlastom reaktoru, bez regeneracije koenzima NAD(H)

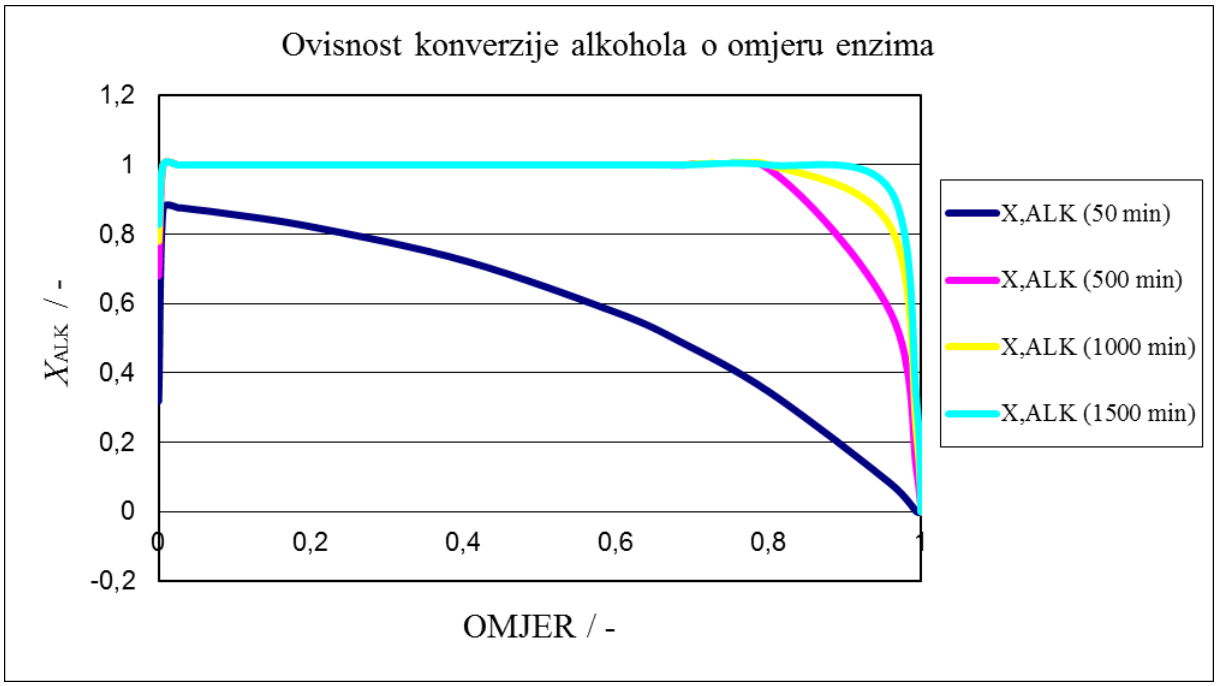


Slika 23. Grafički prikaz ovisnosti konverzije nakon 1000 min. o koncentraciji NAD u kotlastom reaktoru, bez regeneracije koenzima NAD(H)



Slika 24. Grafički prikaz ovisnosti konverzije nakon 1000 min. o koncentraciji NAD u kotlastom reaktoru, bez regeneracije koenzima NAD(H)

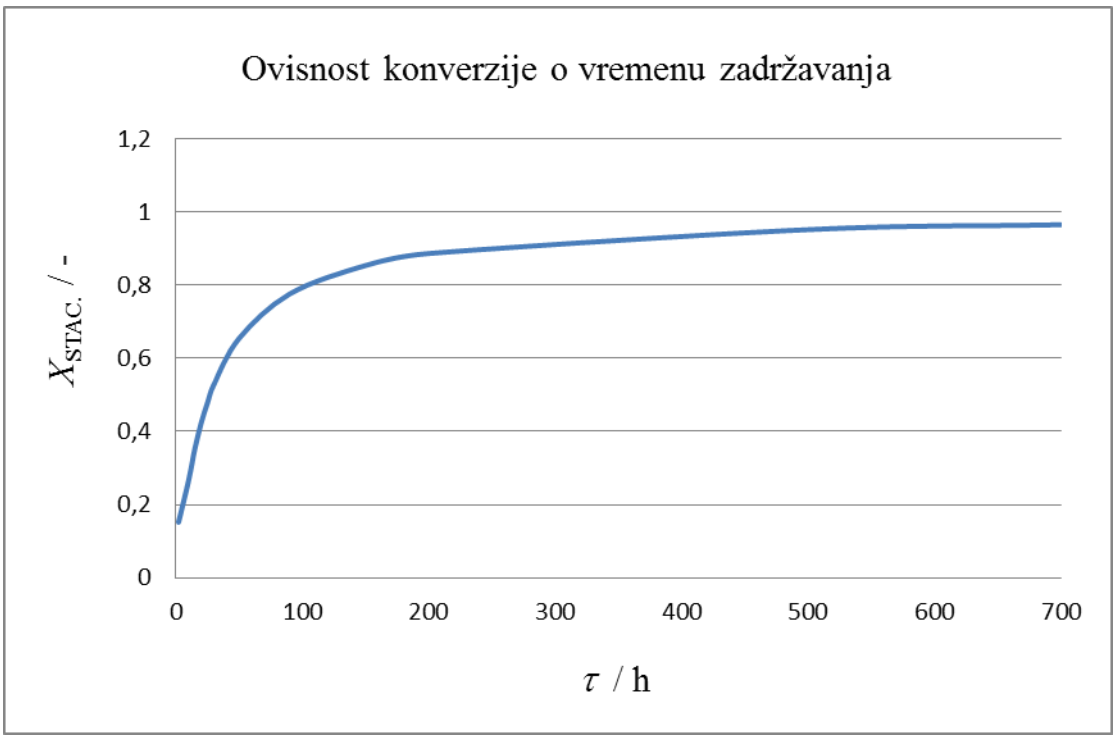
Iz slike 22., 23. i 24. vidimo da porastom koncentracije alkohola, koncentracije NAD i koncentracije enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) u reakciji oksidacije amino alkohola katalizirane enzimom ADH provedene u kotlastom reaktoru, raste konverzija. Porast koncentracije alkohola ima gotovo jednaki utjecaj na konverziju kao i porast koncentracije enzima ADH, dok je za mali porast konverzije potreban veliki porast enzima ADH. Zbog toga je povećanje konverzije ove reakcije u kotlastom reaktoru bolje provesti povećanjem koncentracije alkohola i koncentracije NAD nego povećanjem koncentracije enzima ADH.



Slika 25. Grafički prikaz ovisnosti konverzije alkohola, nakon 50 min, 500 min, 1000 min i 1500 min, o omjeru enzima ADH i NADH OKS. u kotlastom reaktoru, sa regeneracijom koenzima NAD(H)

Iz slike 25. vidimo da se najbolja konverzija, iznosa 1, nakon 500 min, 1000 min i 1500 min, postiže pri određenim omjerima enzima ADH i NADH OKS. Konverzija nakon 50 min ne može ni pri kojem omjeru dostignuti vrijednost 1. Najmanja konverzija se postiže pri omjeru enzima iznosa 1 (C_{ADH} = 0 mmol/dm^3, $C_{NADH,OKS}$ = 2,515 mmol/dm^3) i poprima vrijednost 0. Pri jednakom omjeru enzima najveća konverzija se postiže nakon 1500 min.

5.1.2. UTJECAJ NA KONVERZIJU U PROTOČNOM KOTLASTOM REAKTORU



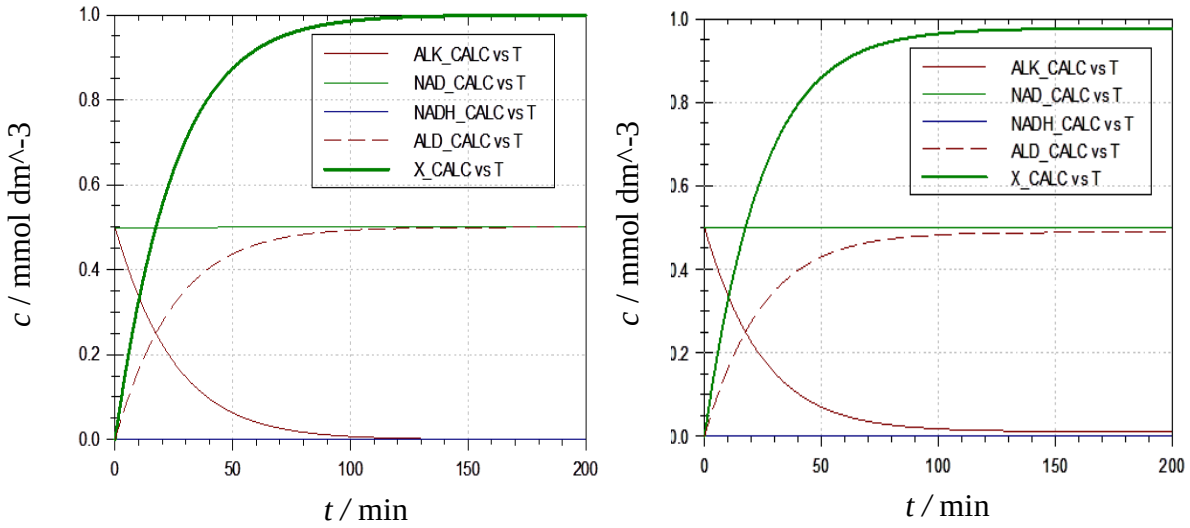
Slika 26. Grafički prikaz ovisnosti stacionarne konverzije o vremenu zadržavanja u protočnom kotlastom reaktoru

Iz slike 26. vidimo da porastom vremena zadržavanju u protočnom kotlastom reaktoru u kojem se odvija reakcija oksidacije amino alkohola katalizirane enzimom ADH, sa regeneracijom koenzima NAD(H) konverzija raste.

5.1.3. USPOREDBA KONVERZIJE U KOTLASTOM I PROTOČNOM KOTLASTOM REAKTORU

Tablica 9. Vrijednosti u kotlastom i protočnom kotlastom reaktoru

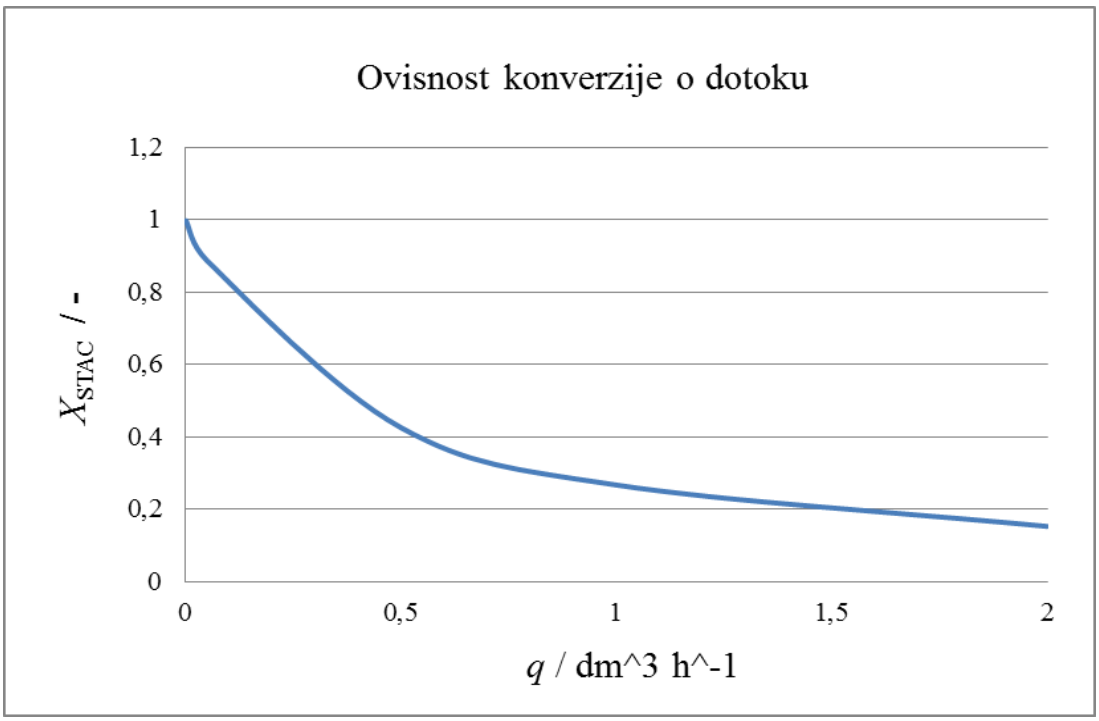
	KR	**PKR**
C_{ALK} [mmol/dm3]	0,50	0,50
C_{NAD} [mmol/dm3]	0,50	0,50
C_{ADH} [mmol/dm3]	2,50	2,50
$C_{NADH,OKS}$ [mmol/dm3]	0,015	0,015
τ [min]	/	1000
X_{ALK} [-]	0,9998	0,9929



Slika 27. Grafički prikaz usporedbe konverzije alkohola u kotlastom reaktoru i protočnom kotlastom reaktoru pri velikom vremenu zadržavanja.

Iz slike 27. vidimo da se u protočnom kotlastom reaktoru pri velikom vremenu zadržavanja (1000 min) dobiva gotovo jednaka konverzija kao i u kotlastom reaktoru. Međutim tako veliko vrijeme zadržavanja nema ekonomsko opravdanje.

5.1.4. UTJECAJ NA KONVERZIJU U REAKTORU S DOTOKOM

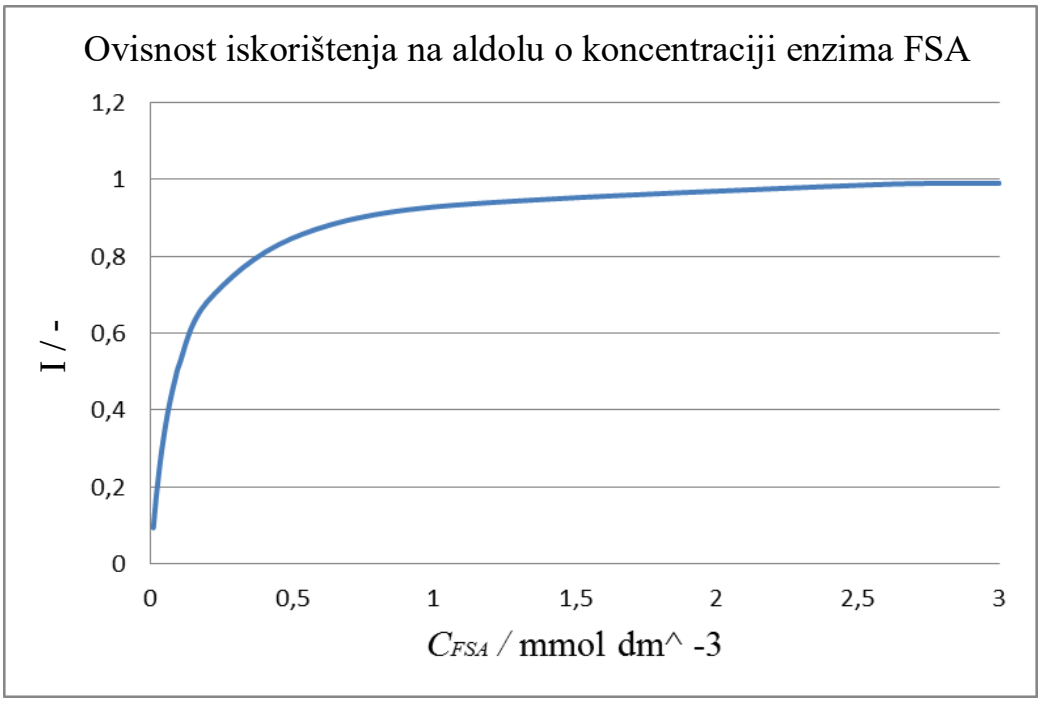


Slika 28. Grafički prikaz ovisnosti stacionarne konverzije o dotoku u reaktoru s dotokom

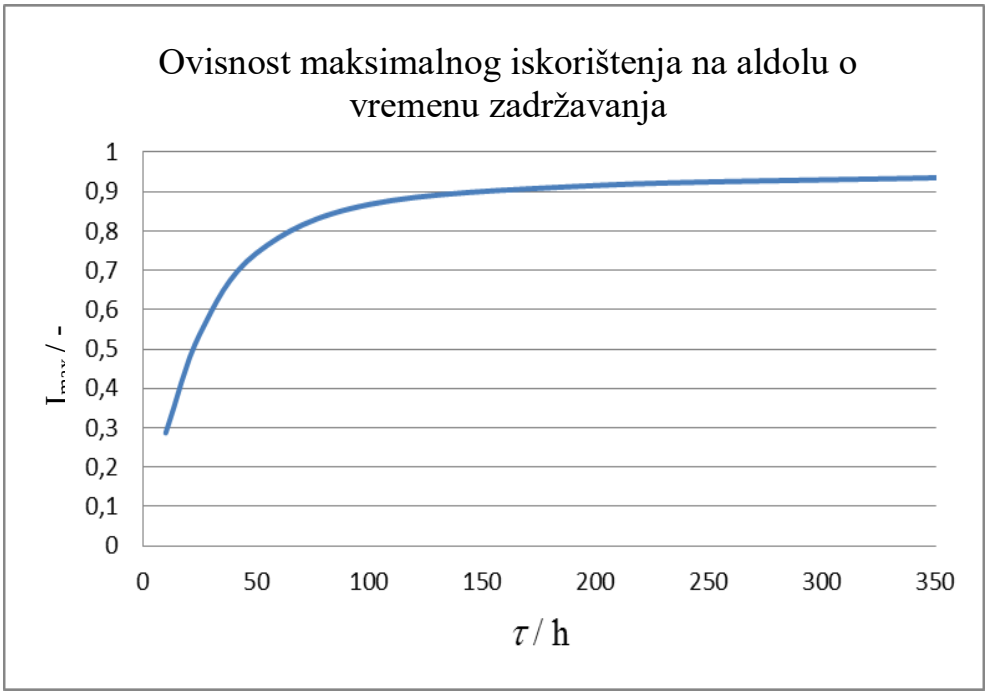
Iz slike 28. vidimo da porastom dotoka reakcijske smjese, u reaktoru s dotokom u kojem se odvija reakcija oksidacije amino alkohola katalizirane enzimom ADH, sa regeneracijom koenzima NAD(H), konverzija opada.

5.2. RASPRAVA REZULTATA KASKADNE REAKCIJE

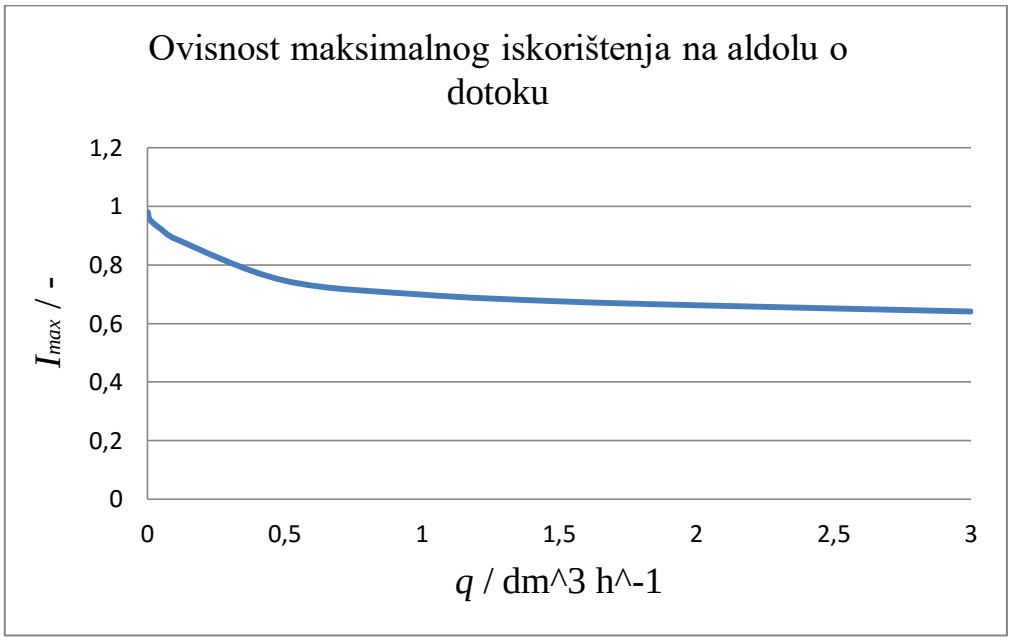
5.2.1. OVISNOST ISKORIŠTENJA NA ALDOLU U KOTLASTOM REAKTORU, PROTOČNOM KOTLASTOM REAKTORU I REAKTORU S DOTOKOM O PROCESNIM PARAMETRIMA



Slika 29. Grafički prikaz ovisnosti iskorištenja na aldolu o koncentraciji FSA u kotlastom reaktoru



Slika 30. Grafički prikaz ovisnosti maksimalnog iskorištenja na aldolu o vremenu zadržavanja u protočnom kotlastom reaktoru



Slika 31. Grafički prikaz ovisnosti maksimalnog iskorištenja na aldolu o dotoku u reaktoru s dotokom

Iz slike 29. vidimo da porastom koncentracije enzima FSA u kaskadnoj reakciji, u kotlastom reaktoru, iskorištenje na aldolu raste, a iz slike 30. vidimo da iskorištenje na aldolu također raste porastom vremena zadržavanja reakcijske smjese u protočnom kotlastom reaktoru. Iz slike 31. vidimo da porastom dotoka reakcijske smjese, u reaktoru s dotokom, iskorištenje na aldolu opada.

5. ZAKLJUČAK

Pri reakciji oksidacije amino alkohola u kotlastom reaktoru konverzija ovisi o vremenu provedbe reakcije, te o početnoj koncentraciji alkohola, koncentraciji koenzima, koncentraciji enzima ADH u glavnoj reakciji te o omjeru glavnog enzima (ADH) i regeneracijskog enzima (NADH OKS.) Porastom koncentracije alkohola, koncentracije koenzima i enzima ADH konverzija raste.

Provođenjem reakcije oksidacije u protočnom kotlastom reaktoru konverzija ovisi o vremenu zadržavanja reakcijske smjese u reaktoru, te njegovim porastom raste.

Pri jednakim početnim koncentracijama alkohola, koenzima, enzima ADH i enzima NADH OKSIDAZE u kotlastom reaktoru i protočnom kotlastom reaktoru s vrlo velikim vremenom zadržavanja dobiva se gotovo ista konverzija.

Provođenjem ove reakcije u reaktoru s dotokom konverzija ovisi o dotoku reakcijske smjese, te što je on veći konverzija je manja.

Pri kaskadnoj reakciji u kotlastom reaktoru iskorištenje na aldolu ovisi o koncentraciji enzima FSA, u protočnom kotlastom reaktoru o vremenu zadržavanja, te u reaktoru s dotokom o dotoku reakcijske smjese. Porastom koncentracije enzima FSA u kotlastom reaktoru i porastom vremena zadržavanja u protočnom kotlastom reaktoru iskorištenje na produktu raste, a povećanjem dotoka reakcijske smjese u reaktoru s dotokom iskorištenje opada.

6. LITERATURA

1. Aehle W.,Enzymes in industry, 3rd edition, Wiley-vch, Weiheim (2004) 61-74

2. Alberts B., Bray D., Lewis J.,Raff M., Roberts K., Walter P., Molecular biology of the cell, 4th edition, Garland Publication, New York (2002) 30-45

3. Brewer J.S., Sassenfeld H.M., The purification of recombinant proteins using C–terminal polyarginine fusions, Trends in Biotechnology 3 (1985) 119-122

4. Crnić L., Kruljac A., Lješčinin A., Stabilizacija enzima NADH oksidaze dodatkom aditiva, Studentski rad, Zagreb (2013) 8-10

5. Dukić Mario, Utjecaj liofilizacije i mikroinkapsulacije na funkcionalnost probiotički bakterija kao živih lijekova, Studentski rad za Rektorovu nagradu, Zagreb, 2009, str. 3.

6. Eijsink V. G. H., Gaseidnes S., Borchert T. V., van den Burg B., Direct evolution of enzyme stability, Department of chemistry, Biotechnology and food science, Agricultural Universitiy of Norway (2004) 22-28

7. Faleter P., Regeneracija koenzima NAD^+ u mikroreaktoru cijelim permeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2012) 8

8. Findrik Z.,Vasić-Rački Đ., Overview on reactions with multi – enzyme systems, Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 23 (2009) 545-553

9. Gomzi Z., Kemijski reaktori, Hinus, Zagreb, 1998, str. 27-35,48-61

10. http://hr.wikipedia.org/wiki/Energija_aktivacije (pristup 25. Veljače 2015.)

11. http://hr.wikipedia.org/wiki/Enzim (pristup 25. Veljače 2015.)

12. http://hr.wikipedia.org/wiki/Lactococcus (pristup 25. Veljače 2015.)

13. http://www.ptfos.unios.hr/joomla/modeli/images/files/prezentacije/Uvod%20u%20matematicko%20modeliranje.pdf (pristup 11. Travnja 2015.)

14. http://www.vasezdravlje.com/printable/izdanje/clanak/2809 (pristup 25. Veljače 2015.)

15. Janeš K., Rast *Tramates versicolor* u uvjetima submerznog uzgoja, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2009) 19

16. Jazvo K., Uzgoj stanica Lactococcus lactis radi dobivanja enzima NADH oksidaze, Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2013) 7

17. Lopez de Felipe F., Hugenholtz J., Purification and characterisation of the water forming NADH – oxidase from *Lactococcus lactis*, International Dairy Journal 11 (2001) 37-44

18. Nicolaou K.C., Edmonds D.J., Bulger P.G., Cascade reactions in total synthesis, Angewandte Chemie International Edition 45 (2006) 7134-7186

19. Siveri J., Optimiranje procesa proizvodnje enzima EVOP metodom, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2006) 7

20. Sudar M., 3rd Consortium Meeting – project ERA-IB – MICROTECHENZ, Graz, April 12, 2012

21. Sudar M.,Findrik Z.,Vasić – Rački Đ., Mathematical model for aldol addition catalyzed by two D-fructose-6-phosphate aldolases variants overexpresses in E.coli, Journal of Biotechnology 167 (2013) 191 – 200

22. Sudar M., Findrik Z., Vasić – Rački Đ.,Soler A., Clapés P., A new concept for production of (3S,4R)-&-[(benzyloxycarbonyl)amino]-5,6-dideoxyhex-2-ulose,a precursor of D-fagomine, Rad prihvačen za objavu

23. Sudar M., Findri Z., Vuković Domanovac M., Vasić-Rački Đ., Coenzyme regeneration Catalyzed by NADH oxidase from *Lactoccocus lactis,* Biochemical Engineering Journal, 88 (2014) 12-18

24. Tomašković I., Martinec N., Lactoccocus lactis kao izvor biokatalizatora, Studentski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2012) 4-6

25. Tusić M., Ispitivanje stabilnosti glukoamilaze u protočno kotlastom enzimskom Membranskom reaktoru, Studentski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2010) 6,7

26. Vasić-Rački Đ., Presečki A.V., Mathematical modelling of the dehydrogenase catalyzed hexanol oxidation with coenzyme regeneration by NADH oxidase, Process Biochemistry 44 (2009) 54-61

27. Venema G., Huis in't Veld J. H. J., Hugenzoltz J., Lastic acid bacteria, genetics, Metabolism and applications, 70 (1996) 2-4

28. Visković K., Utjecaj kalcijevih iona na stabilizaciiju α – amilaze pri hidrolizi škroba, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2009) 19-20

29. Vrsalović-Presečki A., Studij procesa pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2003) 26

30. Wichman R., Vasić-Rački Đ., Cofactor Regeneration at the Lab - Scale, Advances Biochemical Engineering/Biotechnology 92 (2005) 225-260

7. PRILOZI

7.1. MATEMATIČKI MODELI OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM

// MATEMATIČKI MODELI OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM – BEZ REGENERACIJE, KOTLASTI REAKTOR
IndVars: T
DepVars: ALK, NAD, NADH, ALD, X
Params: KALK, KNAD, KNADH, KINAD, KINADH, VM1

R1 = VM1 *E1 * ALK * NAD / ((KALK + ALK) * (KNAD * (1 + NADH / KINADH) + NAD))

ALK' = - R1
NAD' = - R1
NADH' = R1
ALD' = R1

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
VM1 = 0.344
VM2 = 16.4
E1 = 2.5

X = (NAD0-NAD) / NAD0

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 0.5
NAD0 = 0.5
NAD = 0.5
NADH = 0
ALD = 0

***

// MATEMATIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM – PROMJENA KONCENTRACIJE ALKOHOLA (0,6 mmol/dm^3; 0,7 mmol/dm^3; 0,8 mmol/dm^3; 1,0 mmol/dm^3; 1,5 mmol/dm^3; 2,0 mmol/dm^3), BEZ REGENERACIJE, KOTLASTI REAKTOR
IndVars: T
DepVars: ALK, NAD, NADH, ALD, X
Params: KALK, KNAD, KNADH, KINAD, KINADH, VM1
R1 = VM1 *E1 * ALK * NAD / ((KALK + ALK) * (KNAD * (1 + NADH / KINADH) + NAD))
ALK' = - R1
NAD' = - R1
NADH' = R1
ALD' = R1

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
VM1 = 0.344
E1 = 2.5

X = (NAD0-NAD) / NAD0

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 0.6
// ALK = 0.7
// ALK = 0.8
// ALK = 1.0
// ALK = 1.5
// ALK = 2.0
NAD0 = 0.5
NAD = 0.5
NADH = 0
ALD = 0

***

// MATEMATIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM – PROMJENA KONCENTRACIJE NAD (0,6 mmol/dm^3; 0,7 mmol/dm^3; 0,8 mmol/dm^3; 1,0 mmol/dm^3; 1,5 mmol/dm^3; 2,0 mmol/dm^3), BEZ REGENERACIJE, KOTLASTI REAKTOR
IndVars: T
DepVars: ALK, NAD, NADH, ALD, X
Params: KALK, KNAD, KNADH, KINAD, KINADH, VM1

R1 = VM1 *E1 * ALK * NAD / ((KALK + ALK) * (KNAD * (1 + NADH / KINADH) + NAD))
ALK' = - R1
NAD' = - R1
NADH' = R1
ALD' = R1

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
VM1 = 0.344
E1 = 2.5

X = (ALK0-ALK) / ALK0

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 0.5
ALK0 = 0.5
NAD = 0.6
// NAD = 0.7
// NAD = 0.8
// NAD = 1.0
// NAD = 1.5
// NAD = 2.0
NADH = 0
ALD = 0

***

// MATEMATIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM – PROMJENA KONCENTRACIJE ENZIMA ADH (3,0 mmol/dm^3; 7,0 mmol/dm^3; 15,0 mmol/dm^3; 25,0 mmol/dm^3; 40,0 mmol/dm^3; 60,0 mmol/dm^3), BEZ REGENERACIJE, KOTLASTI REAKTOR
IndVars: T
DepVars: ALK, NAD, NADH, ALD, X
Params: KALK, KNAD, KNADH, KINAD, KINADH, VM1

R1 = VM1 * E1 * ALK * NAD / ((KALK + ALK) * (KNAD * (1 + NADH / KINADH) + NAD))
ALK' = - R1
NAD' = - R1
NADH' = R1
ALD' = R1

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
VM1 = 0.344
E1 = 3.0
// E1 = 7.0
// E1 = 15.0
// E1 = 25.0
// E1 = 40.0
// E1 = 60.0

X = (NAD0-NAD) / NAD0

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 0.5
NAD0 = 0.5
NAD = 0.5
NADH = 0
ALD = 0

***

// MATEMATIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM – SA REGENERACIJOM, KOTLASTI REAKTOR
IndVars: T
DepVars: ALK, NAD, NADH, O, ALD
Params: KALK, KNAD, KNADH, KO, KINAD, KINADH, VM1, VM2, kL, OZ
R1 = VM1 * E1 * ALK * NAD / ((KALK + ALK) * (KNAD * (1+NADH / KINADH) + NAD))
R2=VM2 * E2 * NADH * O / (KNADH * (1 + (NAD / KINAD)) * (KO + O))
R3 = kL * (OZ - O)
ALK' = - R1
NAD' = - R1 + R2
NADH' = R1 - R2
O' = - R2 + R3
ALD' = R1

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KO = 0.0045
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
VM1 = 0.344
VM2 = 16.4
E1 = 2.5
E2 = 0.015
kL= 1.134
OZ = 0.28

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 0.5
NAD = 0.5
NADH = 0
O = 0.27
ALD = 0

***

// MATEMATIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM – PROMJENA KONCENTRACIJE ENZIMA ADH I ENZIMA NADH OKS. UZ NJIHOV STALAN ZBROJ (2,515 mmol/dm^3), SA REGENERACIJOM, KOTLASTI REATOR
IndVars: T
DepVars: ALK, NAD, NADH, O, ALD, X, OM
Params: KALK, KNAD, KNADH, KO, KINAD, KINADH, VM1, VM2, kL, OZ
R1 = VM1 * E1 * ALK * NAD / ((KALK + ALK) * (KNAD * (1+ NADH / KINADH) + NAD))
R2 = VM2 * E2 * NADH * O / ((KNADH * (1 + NAD / KINAD)) * (KO + O))
R3 = Kl * (OZ - O)
ALK' = - R1
NAD' = - R1 + R2
NADH' = R1 - R2
O' = - R2 + R3
ALD' = R1

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KO = 0.0045
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
VM1 = 0.344
VM2 = 16.4

E1 = 0
// E1 = 0.000008
// E1 = 0.000015
// E1 = 0.015
// E1 = 0.1
// E1 = 0.5
// E1 = 0.8
// E1 = 1.0
// E1 = 1.5
// E1 = 2.0
// E1 = 2.3
// E1 = 2.4
// E1 = 2.45
// E1 = 2.5
// E1 = 2.515

E2 = 2.515
// E2 = 2.514992
// E2 = 2.514985
// E2 = 2.5
// E2 = 2.415
// E2 = 2.015
// E2 = 1.715
// E2 = 1.515
// E2 = 1.015
// E2 = 0.515
// E2 = 0.215
// E2 = 0.115
// E2 = 0.065
// E2 = 0.015
// E2 = 0

kL = 1.134
OZ=0.28

OM = E2 / (E1+E2)

X = (ALK0 - ALK) / ALK0

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 0.5
ALK0 = 0.5
NAD = 0.5
NADH = 0
O = 0.27
ALD=0

***

// MATEMATIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM – PROMJENA VREMENA ZADRŽAVANJA (1 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 50 min, 150 min, 200 min), SA REGENERACIJOM, PROTOČNI KOTLASTI REAKTOR
IndVars: T
DepVars: ALK, NAD, NADH, O, ALD, X
Params: KALK, KNAD, KNADH, KO, KINAD, KINADH, VM1, VM2, kL, OZ
R1 = VM1 * E1 * ALK * NAD / ((KALK + ALK) * (KNAD * (1 + NADH / KINADH) + NAD))
R2 = VM2 * E2 * NADH * O / ((KNADH * (1 + NAD / KINAD)) * (KO + O))
R3 = kL * (OZ - O)
ALK' = (ALK0 - ALK) / tau - R1
NAD' = (NAD0 - NAD) / tau - R1 + R2
NADH' = (NADH0 - NADH) / tau + R1 - R2
O' = (O0-O) / tau - R2 + R3
ALD' = (ALD0 - ALD) / tau + R1

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KO = 0.0045
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
VM1 = 0.344
VM2 = 16.4
E1 = 2.5
E2 = 0.015
kL = 1.134
OZ = 0.28
tau = 1
// tau = 5
// tau = 10
// tau = 15
// tau = 20
// tau = 25
// tau = 30
// tau = 50
// tau = 150
// tau = 200
X = (ALK0 – ALK) / ALK0

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 0.5
ALK0 = 0.5
NAD = 0.4
NAD0 = 0.4
NADH = 0
NADH0 = 0
O = 0.27
O0 = 0.27
ALD = 0
ALD0 = 0

***

```
// MATEMATIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM – PROMJENA DOTOKA (2,0 dm^3/min; 1,0 dm^3/min; 0,8 dm^3/min; 0,5 dm^3/min; 0,05 dm^3/min; 0,001 dm^3/min), SA REGENERACIJOM, REAKTOR S DOTOKOM
IndVars: T
DepVars: ALK, NAD, NADH, O, ALD, X
Params: KALK, KNAD, KNADH, KO, KINAD, KINADH, VM1, VM2, kL, OZ
R1 = VM1 * E1 * ALK * NAD / ((KALK + ALK) * (KNAD * (1 + NADH / KINADH) + NAD))
R2 = VM2 * E2 * NADH* O / ((KNADH * (1 + NAD / KINAD)) * (KO + O))
R3 = kL *(OZ - O)

ALK'= ( (ALK0-ALK) * F )/V - R1
NAD' = ( (NAD0-NAD) * F )/V - R1 + R2
NADH' = ( (NADH0-NADH) * F )/V + R1 - R2
O'=( (O0-O) * F )/V - R2 + R3
ALD'=( (ALD0-ALD) * F)/V + R1

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KO = 0.0045
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
VM1 = 0.344
VM2 = 16.4
E1 = 2.5
E2 = 0.015
kL = 1.134
OZ = 0.28
V = 10
F = 2.0
// F = 1.0
// F = 0.8
// F = 0.5
// F = 0.05
// F = 0.001

X = (ALK0-ALK) / ALK0

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 0.5
ALK0 = 0.5
NAD = 0.4
NAD0 = 0.4
NADH = 0
NADH0 = 0
O = 0.27
O0 = 0.27
ALD = 0
ALD0 = 0

***
```

7.1. MATEMATIČKI MODELI KASKADNE REAKCIJE

// MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE U KOTLASTOM REAKTORU, PROMJENA KONCENTRACIJE ENZIMA FSA (0,01 mmol/dm^3; 0,05 mmol/dm^3; 0,1 mmol/dm^3; 1,0 mmol/dm^3; 2,5 mmol/dm^3; 3.0 mmol/dm^3)
IndVars: T
DepVars: ALK, NAD, NADH, O, ALD, ALDOL, DHA
Params: KALK, KNAD, KNADH, KO, KINAD, KINADH, VM1, VM2, VM3, KALD, KDHA, kd1, kd2, kd3, kL, OZ

R1 = VM1 * E1 * ALK * NAD / ((KALK + ALK) * (KNAD * (1 + NADH / KINADH) + NAD))
R2 = VM2 * E2 * NADH * O / ((KNADH * (1 + NAD / KINAD)) * (KO + O))
R3 = (VM3 * E3 * ALD * DHA) / ((KALD + ALD) * (KDHA + DHA))
R4 = Kl * (OZ-O)
ALK' = - R1
NAD' = - R1 + R2
NADH' = R1 - R2
O' = - R2 + R4
ALD' = R1 - R3
DHA' = - R3
ALDOL' = R3
E1' = - kd1 * E1
E2' = - kd2*E2
E3' = - kd3*E3

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KO = 0.0045
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
KALD = 167.34
KDHA = 11.01
VM1 = 0.344*60
VM2 = 16.4*60
VM3 = 10.2*60
kd1 = 0.008
kd2 = 0.066
kd3 = 0.078
kL = 1.134
OZ = 0.28

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 10
ALK0 = 10
NAD = 0.5
NAD0 = 0.5
NADH = 0
NADH0 = 0
O = 0.27
O0 = 0.27
ALD = 0
ALD0 = 0
DHA = 12
DHA0 = 12
ALDOL = 0

```
ALDOL0 = 0
E1 = 1.5
E2 = 1.015
E3 = 0.01
//  E3 = 0.05
//  E3 = 0.1
//  E3 = 1.0
//  E3 = 2.5
//  E3 = 3.0

***
```

// MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE U PROTOČNOM KOTLASTOM REAKTORU, PROMJENA VREMENA ZADRŽAVANJA (10,00 h; 25,00 h; 50,00 h; 100,00 h; 200,00 h; 350,00 h)
DepVars: ALK, ALD,ALDOL,DHA
Params: KALK, KNAD, KNADH, KO, KINAD, KINADH, VM1, VM2, VM3, KALD, KDHA, kd1, kd2, kd3, kL, OZ

R1 = VM1 * E1 *ALK * NAD / ((KALK + ALK)*(KNAD * (1 + NADH / KINADH) + NAD))
R2 = VM2 * E2 * NADH * O / ((KNADH * (1 + NAD / KINAD)) * (KO + O))
R3 = VM3 * E3 * ALD * DHA / ((KALD + ALD) * (KDHA + DHA))
R4 = kL * (OZ-O)
ALK' = ((ALK0-ALK) / TAU) - R1
NAD' = ((NAD0-NAD)/TAU) - R1 + R2
NADH' = ((NADH0-NADH) / TAU) + R1 - R2
O'= ((O0-0) / TAU) - R2 + R4
ALD' = ((ALD0-ALD)/TAU) + R1 - R3
DHA' = ((DHA0-DHA) / TAU) - R3
ALDOL' = ((ALDOL0-ALDOL)/TAU)+R3
E1' = - kd1 * E1
E2' = - kd2 * E2
E3' = - kd3 * E3

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KO = 0.0045
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
KALD = 167.34
KDHA = 11.01
VM1 = 0.344*60
VM2 = 16.4*60
VM3 = 10.2*60
kd1 = 0.008
kd2 = 0.066
kd3 = 0.078
kL = 1.134
OZ = 0.28

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = 10
ALK0 = 10
NAD = 0.5
NAD0 = 0.5
NADH = 0
NADH0 = 0
O = 0.27
O0 = 0.27
ALD = 0
ALD0 = 0
DHA = 12
DHA0 = 12
ALDOL = 0
ALDOL0 = 0
TAU = 10
// TAU = 25
// TAU = 50
// TAU = 100
// TAU = 200

// TAU = 350
E1=1.5
E2=1.015
E3=2.5

***

```
// MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE U REAKTORU S DOTOKOM,  PROMJENA DOTOKA ( 3,00 dm3/h; 0,50 dm3/h; 0,10 dm3/h; 0,05 dm3/h; 0,01 dm3/h; 0,001 dm3/h)
IndVars: T
DepVars: ALK, ALD, ALDOL, DHA
Params: KALK, KNAD, KNADH, KO, KINAD, KINADH, VM1, VM2, VM3, KALD, KDHA, kd1, kd2, kd3, kL, OZ

R1 = VM1 * E1 * ALK *NAD / ( (KALK + ALK) * (KNAD * (1 + NADH / KINADH) + NAD) )
R2 = VM2 * E2 * NADH * O / ( (KNADH * (1 + NAD / KINAD)) * (KO + O) )
R3 = VM3 * E3 * ALD * DHA / ( (KALD + ALD) * (KDHA + DHA) )
R4 = kL * (OZ - O)
ALK' = F * (ALK0 - ALK) / V - R1
NAD' = F * (NAD0 - NAD) / V - R1 + R2
NADH' = F * (NADH0 - NADH) / V + R1 - R2
O' = F * (O0 - O) / V - R2 + R4
ALD' = F * (ALD0 - ALD) / V + R1 - R3
DHA' = F * (DHA0 - DHA) / V - R3
ALDOL' = F * (ALDOL0 - ALDOL) / V + R3
V' = F
E1' = - kd1 * E1
E2' = - kd2 * E2
E3' = - kd3 * E3

//Vrijednosti parametara
KALK = 10.91
KNAD = 0.399
KNADH = 0.005
KO = 0.0045
KINAD = 0.132
KINADH = 0.011
KALD = 167.34
KDHA = 11.01
VM1 = 0.344*60
VM2 = 16.4*60
VM3 = 10.2*60
kd1 = 0.008
kd2 = 0.066
kd3 = 0.078
kL = 1.134
OZ = 0.28

//Konstante
ALK0 = 10
ALD0 = 0
DHA0 = 12
ALDOL0 = 0
O0 = 0.27
NAD0 = 0.5
NADH0 = 0
F = 3.00
// F = 0,50
// F = 0.10
// F = 0.05
// F = 0.01
// F = 0.001

//Pocetne vrijednosti
T = 0
ALK = ALK0
NAD = NAD0
```

NADH = NADH0
O = O0
ALD = ALD0
DHA = DHA0
ALDOL = ALDOL0
E1 = 1.5
E2 = 1.015
E3 = 2.5
V = 10

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14. svibnja 1986. godine u Bjelovaru. Osnovnu školu sam završila u Grubišnom Polju nakon koje upisujem srednju Medicinsku školu u Bjelovaru, smjer farmaceutski tehničar. Srednju školu završavam 2005. godine. Nakon završene srednje škole odradila sam pripravnički staž u Virovitici nakon kojeg sam položila državni stručni ispit u Zagrebu. 2007. godine upisujem preddiplomski sveučilišni studij na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagreb.