Matematičko modeliranje aldolne adicije u različitim tipovima reaktora

Sokač, Tea

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:149:609215

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tea Sokač

Matematičko modeliranje aldolne adicije u različitim tipovima reaktora

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Đurđa Vasić – Rački, prof. dr.sc.

Članovi ispitnog povjerenstva: Zvjezdana Findrik Blažević, prof. dr. sc.
Marija Vuković Domanovac, prof. dr. sc.
Đurđa Vasić-Rački, prof. dr.sc.

Zagreb, rujan 2015.

SADRŽAJ

POPIS SIMBOLA ……..……4
SAŽETAK …….5
ABSTRACT ……...6

1. UVOD ……....7
2. OPĆI DIO ……..8
2.1. Bakterija *Escherichia coli*…….……..8
2.2. Enzimi……...……10
2.2.1. Koenzimi ……12
2.3. Aldolaza……12
2.3.1. Reakcija aldolne adicije ……..13
2.3.2. Kinetika enzima …….……14
2.3.3. Stabilnost enzima ……14
2.4. Kaskadna reakcija …….……15
2.5. Tipovi reaktora ……...…16
2.5.1. Kotlasti reaktor……..16
2.5.2. Kotlasti reaktor s dotokom …….……..18
2.5.3. Protočno kotlasti reaktor ……..……19
3. MATEMATIČKO MODELIRANJE……21
3.1. Uvod u matematičko modeliranje…….. ……...21
3.2. Brzina enzimske reakcije ……..22
3.3. Michaelis Menteničina kinetika ……22
3.4. Kinetički model oksidacije amino alkohola ……26
3.5. Kinetički model oksidacije aminoalkohola uz regeneraciju koenzima ……26
3.6. Kinetički model aldolne adicije ……26
3.7. Kinetički model kaskadne reakcije ……27
3.8. Matematički model kotlastog reaktora ……..27
3.8.1. Reakcija aldolne adicije ……...27
3.8.2. Kaskadna reakcija ……28
3.9. Matematički model protočno kotlastog reaktora ……...29
3.9.1. Reakcija aldolne adicije ……...29
3.9.2. Kaskadna reakcija ……29

3.10. Matematički model kotlastog reaktora s dotokom ……..…30
3.10.1. Reakcija aldolne adicije ……...30
3.10.2. Kaskadna reakcija ……30
4. REZULTATI I RASPRAVA ……..32
4.1. Kinetički parametri ……...32
4.2. Rezultati ……34
4.2.1. Rezultati aldolne adicije ……..34
4.2.1.1. Kotlasti reaktor ……..34
4.2.1.2. Protočno kotlasti reaktor ……...39
4.2.1.3. Kotlasti reaktor s dotokom ……43
4.2.2. Rezultati kaskadne reakcije ……....45
4.2.2.1. Kotlasti reaktor ……..45
4.2.2.2. Protočno kotlasti reaktor …….……..50
4.2.2.3. Kotlasti reaktor s dotokom ……54
4.3. RASPRAVA ……..56
4.3.1. Reakcija aldolne adicije ……...……56
4.3.1.1. Kotlasti reaktor …….…..56
4.3.1.2. Protočno kotlasti reaktor ……59
4.3.1.3. Kotlasti reaktor s dotokom ……61
4.3.2. Kaskadna reakcija ……62
4.3.2.1. Kotlasti reaktor ……..……..…62
4.3.2.2. Protočno kotlasti reaktor ……63
4.3.2.3. Kotlasti reaktor s dotokom ……64
5. ZAKLJUČAK …….…65
5.1. Aldolna adicija ……..65
5.2. Kaskadna reakcija …….…65
6.LITERATURA ……66
7. PRILOZI ……..68

POPIS SIMBOLA

c	molarna koncentracija, mmol dm^{-3}
V	volumen, dm^3
t	vrijeme, h
q	volumni protok, dm^3/ h
V_m	maksimalna brzina reakcije, U mg^{-1}
K_m	Michaelisova konstanta, mmol dm^{-3}
K_i	konstanta inhibicije, mmol dm^{-3}
k_d	konstanta deaktivacije enzima, h^{-1}
X	konverzija, /
I_{MAX}	maksimalno iskorištenje, /
τ	vrijeme zadržavanja, h

ADH	alkohol dehidrogenaza
DHA	dihidroksiaceton
FSA	D – fruktoza – 6 – fosfat aldolaza

SAŽETAK

U ovom radu je numerički na temelju razvijenog modela implementiranog u programu SCIENTIST, ispitivana aldolna adicija dihidroksiacetona na N-Cbz-3-aminopropanala koju katalizira enzim D – fruktoza – 6 – fosfat aldolaza (FSA). Isto tako je istraživana ova reakcija spojena s oksidacijom N-Cbz-3-aminopropanola u N-Cbz-3-aminopropanala u kaskadnu reakciju. Oksidacija alkohola koju katalizira alkohol dehidrogenaza (ADH), je provedena uz regeneraciju koenzima NAD+ s enzimom NADH oksidaza..

Modeli su razvijeni za šaržni, kotlasto protočni i reaktor s dotokom.

Potrebni kinetički parametri su uzeti iz literature.

Dobiveni rezultati pokazuju da konverzija mjerodavnog reaktanta u šaržnom reaktoru kod aldolne adicije ovisi o količini FSA enzima, te o početnom omjeru dva reaktanta Konverzija u protočno kotlastom reaktoru raste s vremenom zadržavanja, a u reaktoru s dotokom konverzija s povećanjem brzine dotoka opada.

U kaskadnoj reakciji oksidacija alkohola plus aldolna adicija, iskorištenje na aldolu u šaržnom reaktoru raste s povećanjem koncentracije dihidroksiacetona, a opada s povećanjem koncentracije alkohola. Iskorištenje ovisi o stabilnosti enzima u reakcijama.

Iskorištenje na aldolu ovisi o vremenu zadržavanja u kotlasto protočnom reaktoru, a o brzini dotoka u reaktoru s dotokom.

Najveće iskorištenje na aldolu je moguće ostvariti u šaržnom reaktoru uz suvišak dihidroksiacetona.

ABSTRACT

In this work, with developed model in SCIENTIST, aldol addition of dihydroxyacetone (DHA) to N-Cbz-3-aminopropanal, which is catalyzed by enzyme D-fructose-6-phosphate aldolase (FSA), is numerical examined. Also this reaction connected with oxidation N-Cbz-3-aminopropanola in N-Cbz-3-aminopropanal is study in cascade reaction. Oxidation of alcohol, which is catalyzed by alcohol dehydrogenaese (ADH), is examined with regeneration coenzyme NAD^+ with enzyme NADH oxidase.

Models are developed for batch,fed-batch and continuously stirred tank (CSTR) reactor.

Kinetic parameters were taken from literature.

Results are demonstrating that conversion of limited reactant in batch reactor in aldol addition depends on concentration of FSA enyzme and on starting ratio of two reactants. Conversion in CSTR increases with residence time and in fed-batch reactor it decreases when the flow is growing.

In cascade reaction, oxidation of alcohol plus aldol addition, yield on aldol in batch reactor increases when the concetration of dihydroxyacetone increases and it decreases when the concetration of alcohol increases. Yield of the reaction depend on stability of enzymes.

Yield on aldol depends on residence time in CSTR and in fed-batch reactor it depends on the flow.

The maximum yield on aldol is possible to reach in batch reactor with excess of dihydroxyacetone (DHA).

1. UVOD

Poznato je da se mikroorganizmi sve više koriste kao izvor enzima za katalizu različitih reakcija. Jedan od takvih mikroorganizama je vrlo poznata bakterija *Escherichia coli* koja živi u probavnom sustavu sisavaca te je nužna za pravilnu probavu hrane. Iako je većina tipova *E.coli* bezopasna za čovjeka, neki tipovi ove bakterije svejedno mogu izazvati razne tegobe kod čovjeka [http://hr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli].

Enzimi su dijelovi bioloških sustava s funkcijom kataliziranja kemijskih reakcije koje proizvode živi organizmi. Razlikujemo intracelularne i ekstracelularne enzime. Intracelularni se nalaze unutar stanice,vezani za staničnu stijenku ili u citoplazmi. Vrlo su nestabilni, a da bi ih se ekstrahiralo iz stanice,potrebno je razbiti staničnu stijenku, odnosno permeabilizirati ju primjenom mehaničkih, kemijskih i mikrobioloških metoda. Zbog prethodno navedenih razloga, intracelularni enzimi su skuplji od ekstracelularnih. Broj ekstracelularnih enzima je daleko manji,ali su oni i stabilniji. Oni su metaboliti stanica pa ih one izbacuju nakon sinteze [http://hr.wikipedia.org/wiki/Enzim].

U posljednjih pedesetak godina enzimi imaju prednost pred klasničnim katalizatorima primjerice zbog toga što ubrzavaju kemijsku reakciju do 10^{20} puta,ne zahtijevaju primjenu visokih temperatura i tlakova te ekstremne pH vrijednosti. Najčešće se koriste u prehrambenoj, farmaceutskoj industriji,u analitičke svrhe, te u mnogim drugim industrijama [Štorek H., 2002.].
Ograničavajući faktor uporabe enzima u industrijskim procesima jest njihova nestabilnost. Stoga je vrlo važno za daljnje povećanje uporabe enzima u industriji, poboljšati operacijsku stabilnost enzima odnosno učiniti enzime aktivnima kroz dulji period vremena [Visković K., 2009.].

2. OPĆI DIO

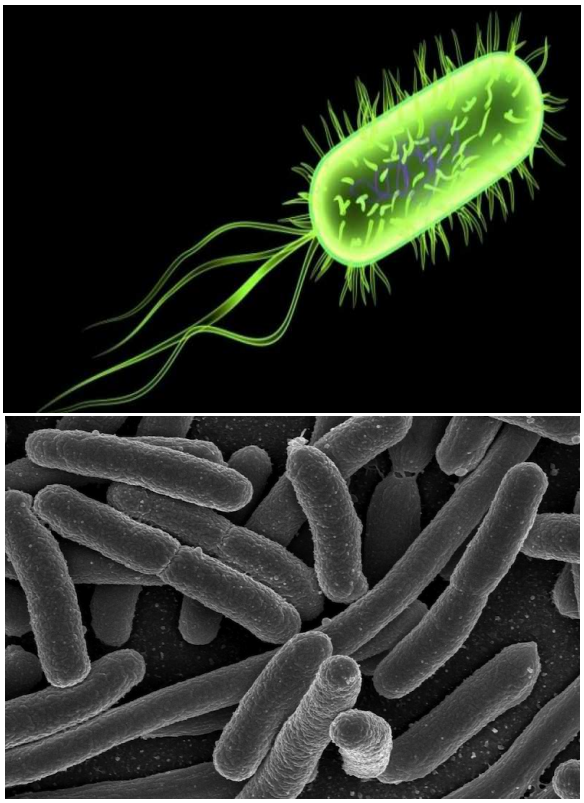
2.1. BAKTERIJA *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli (skraćeno *E. coli*) (Slike 2.1. i 2.2.) jedna je od glavnih vrsta bakterija koje žive u donjem dijelu probavnog sustava sisavaca. Nužne su za pravilnu probavu hrane i sudjeluju u radu crijevne flore. Njezina prisutnost u podzemnim vodama pokazatelj je fekalne zaraze. Pripada skupini *Enterobacteriaceae* gdje se korijenska riječ „entero“ odnosi na crijevo. Otkrio ju je pedijatar i bakteriolog 1885. godine Theodor Escherich [http://hr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli].

Broj jedinki bakterije *E. coli* se u prosječnom dnevnom fecesu čovjeka kreće između 100 milijardi i 10 bilijuna,a bakterija se unosi u organizam unutar 40 sati od rođenja kroz hranu. Svi različiti podtipovi fekalnih bakteija s oznakom *coli* i sve slične bakterije koje žive u tlu su okupljene u „koliformnu“ skupinu. Tehnički se koliformi definiraju kao aerobne i neobavzeno anaerobne, nesporogene, gram-negativne,štapićaste bakterije koje fermentiraju laktozu i pritom kroz 48 sati pri 35°C stvaraju plinski produkt. U tijelu se taj plin otpušta kao flatus. Stanice *E. coli* su izdužene, duljine 1- 2 μm i promjera 0.1 – 0.5 μm. Ova bakterija pripada prilično otpornim bakterijama ; mjesecima može živjeti u vodi i zemlji. U različitim vrstama hrane i namirnica lako se i brzo razmnožava, a temperatura od 60°C ih ubija [http://hr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli].
Većina tipova *E. coli* bezopasna je za čovjeka, ali neki tipovi mogu izazvati različite bolesti kod ljudi, na primjer najčešće izaziva infekcije mokraćnog mjehura kod žena, može izazvati meningitis kod novorođene djece te razne infekcije rana. Kako bismo se zaštitili od zaraza koje širi *E. coli* trebali bismo jesti dobro kuhanu i opranu hranu, izbjegavati slabo pečeno meso i nepasterizirano mlijeko i sokove, nedovoljno obrađene salame te voće i povrće nepoznatog porijekla [http://hr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli] .
Na području otpadnih voda *E. coli* se pokazala kao „indikator“ nivoa onečišćenja vode,a koristi se i u biotehnologiji. Proučavanjem genetike *E. coli* tijekom 1970-ih godina, razvijena je rekombinantnu DNK tehnologiju. Genetski modificirana *E. coli* se najviše primjenjuje u proizvodnji etanola, proteina i aminokiselina [http://hr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli].

Bakterija *E.coli* uglavnom je poznata kao patogena u hrani,no zadnja istraživanja koja je proveo tim znanstvenika iz Južne Koreje ukazuju na novo razumijevanje u primjeni ove

bakterije – oni su je uspješno genetski promijenili i pomoću nje proizveli benzin. Osnovna komponenta konvencionalnog benzina su aciklički zasićeni ugljikovodici zvani alkani,koji se stvaraju vezanjem ugljikovih i vodikovih atoma. Tim znanstvenika iz Južne Koreje je koristio modificiranu bakteriju *E.coli* i hranio je glukozom,što je rezultiralo time da je bakterija proizvela enzim koji može šećer pretvoriti u masne kiseline,a one se potom transformiraju u alkane s istim kemijskim i strukturnim integritetom kao oni koji se nalaze u konvencionalnom benzinu. No, negativna strana je što su u laboratoriju uspjeli dobiti 580 mg benzina od 1 L glukozne kulture te je potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se dobila što veća količina produkta [http://znano.st/znanost-zdravlje-i-medicina/3/sto-novo-saznajemo-o-zloglasnoj-bakteriji-e-coli/1120/].



Slike 1. i 2. Bakterija *Escherichia coli*
[http://hr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli]

2.2. ENZIMI

Enzimi (fermenti) , biokatalizatori, su tvari biološkog podrijetla (proizvedeni u stanicama) koji ubrzavaju kemijske reakcije potrebne za održavanje životnih funkcija. Oni ne djeluju samo u živim organizmima nego i izvan njih (npr. u laboratorijskim posudama). Industrijski se proizvode i upotrebljavaju kao izvanredno aktivni katalizatori. Također sudjeluju u izmjeni energije između stanice i njezine okoline [Viličić, 1976.].

Ime enzim dolazi od grčke riječi „en zym“ što znači u kvasu, a ime ferment dolazi prema latinskoj riječi „fermentum“ što znači kvas. Oba ta imena podsjećaju na najstariji poznati enzimski preparat, kvas ili kiselo tijesto, koji se već u antičkom Egiptu upotrebljavao u proizvodnji kruha. Enzime su prvi ispitivali kemičari u prvoj polovici 20. stoljeća [Viličić, 1976.].

Dosad je otkriveno približno 3500 vrsta enzima te su svi poznati kao globularne bjelančevine (proteini) molekulske mase od 1200 do više stotina tisuća. Struktura enzima određuje njihovu funkciju te se po strukturi dijele u dvije osnovne skupine: monomerni enzimi (sadrže jedan polipeptidni lanac) i oligomerni enzimi (sadrže više polipeptidnih lanaca koji mogu biti isti ili različiti). Budući da su enzimi katalizatori, djeluju tako da reakciju provode po reakcijskom putu na kojemu je niža energija aktivacije te ju tako ubrzavaju. Energija aktivacije je energija koju je potrebno dovesti molekulama u pojedinoj reakciji da međusobno reagiraju. Što je energija aktivacije veća, to je manji broj molekula koje mogu prijeći energijsku barijeru što reakciju čini sporijom. Enzimi ne mijenjaju reakciju u kojoj sudjeluju nego ju samo ubrzavaju što znači da se reakcija kreće u istom smjeru sa ili bez enzima,a enzim izlazi nepromijenjen iz određene reakcije [Viličić, 1976.]

Prema vrsti reakcije koju kataliziraju,enzime dijelimo na:

1. Oksidoreduktaze – kataliziraju reakcije oksido – redukcije, a pripadaju im oksidaze, peroksidaze, hidrokislaze.
2. Transferaze – kataliziraju prenošenje funkcionalnih grupa aldehidnih ili keto ostataka, a pripadaju im dekarboksilaze, aldolaze, hidrataze,sintetaze.

Na aktivnost enzima utječu razni čimbenici kao što su pH, temperatura, koncentracija enzima i supstrata. Kao u svim kemijskim reakcijama tako i u enzimskim reakcijama brzina reakcija raste s porastom temperature. Međutim,enzimskim reakcijama brzina raste s temperaturom samo do određenog maksimuma, a pri daljnjem povišenju temperature ona opada zbog sve veće toplinske denaturacije enzima. Što se tiče pH vrijednosti, postoji tzv. pH – optimum pri kojemu je aktivnost enzima maksimalna. Neki enzimi se ponašaju atipično, a to znači da nemaju pH – optimum nego im aktivnost raste s pH vrijednošću do određene vrijednosti nakon koje postaje konstantna [Viličić, 1976.]

Enzimi imaju određene prednosti i nedostatke u odnosu na klasične katalizatore. Prednosti enzima pred klasičnim katalizatorima su: reakcije ne zahtijevaju primjenu visokih temperatura i tlakova, ne zahtijevaju ekstremne pH vrijednosti, ubrzavaju reakcije do 10^{20} puta. Enzimi su specifični katalizatori, obnovljivi su i ekološki prihvatljivi, te stabilni i stereoselektivni. Osnovni nedostaci enzima kao biokatalizatora su relativno visoka cijena, sklonost deaktivaciji zbog čega se često imobiliziraju na čvrsti nosilac. Imobilizacija enzima omogućuje njegovu višekratnu uporabu. Tim se postupkom homogeni biokatalizator prevodi u heterogeni, a takvi biokatalizatori se nazivaju imobilizirani enzimi. Osim navedenih nedostataka, može se još dodati i to da ubrzavaju samo jednu reakciju, nestabilni su izvan prirodnog okruženja i dobivaju se u malim količinama [Štorek H., 2002.]
Enzimi iz sirovina biljnog i životinjskog podrijetla upotrebljavaju se odavna. Mnogi od njih upotrebljavat će se vjerojatno i u budućnosti jer su zbog svojih specifičnih svojstava pogodni za svrhe kojima služe. Zbog rastuće potražnje za enzimima sve se više osjeća da je njihova prirodna sirovinska baza preuska te njihova proizvodnja postaje skuplja. Zato se genetskim promjenama mikroorganizama ta baza proširuje. Danas se enzimi industrijski dobivaju isključivo pomoću živih stanica. Proizvodnja industrijskih enzima obuhvaća izbor i selekcioniranje organizama pomoću kojih će se proizvoditi željeni enzim [Viličić, 1976.].

Većina enzima upotrebljava se u prehrambenoj industriji. Međutim, enzimi u prehrambenoj tehnologiji, pored pozitivne uloge imaju i negativnu te se prehrambena industrija zapravo bori i protiv primjene enzima. Enzimi se mogu koristiti i kao lijekovi; ili se bolesniku daju enzimi koje tijelo samo proizvodi, ali u nedovoljnoj količini ili se koriste za razgrađivanje tkiva, lučevina [Viličić, 1976.].

2.2.1. KOENZIMI

Neki enzimi se sastoje, osim od visokomolekularnog proteinskog dijela i od nižemolekularnog, neproteinskog, termostabilnog dijela zvanog koenzim ili prostetske grupe enzima. Taj dio enzima može s proteinskim dijelom biti slabije ili čvršće vezan. Danas se zna da koenzim nije katalizator u smislu klasične definicije tog pojma jer on u reakciji koju katalizator katalizira ne ostaje nepromijenjen, nego se u toj reakciji mijenja. Tek drugom reakcijom, koja slijedi odmah iza prve i u kojoj sudjeluje drugi supstrat, a katalizira je isti ili drugi enzimski protein, koenzim se regenerira [Viličić, 1976.] .

2.3. ALDOLAZA (D – FRUKTOZA – 6 – FOSFAT ALDOLAZA)

Aldolaze su enzimi pomoću kojih se stvara veza ugljik – ugljik u organskim spojevima. Koriste se pri sintezi složenijih spojeva, kao što su ugljikohidrati i aminokiseline te sudjeluju u anabolizmu i katabolizmu gotovo svih organizama. Aldolaza katalizira reakciju aldolne adicije koja se odvija između nukleofila i elektrofila. Njihova prednost je u tome da često mogu kontrolirati stereokemiju novonastalih spojeva bez obzira na strukturu i stereokemiju supstrata. [Sudar M. et al., 2013.]

D – fruktoza – 6 – fosfat aldolaza (FSA) je još do kraja neispitana vrsta aldolaza, a izolirana je iz bakterije *E. coli* te je dokazano da katalizira adiciju dihidroksiacetona na aldehid pri čemu nastaje aldol. Sprenger i Schürmann su otkrili ovu aldolazu i dokazali da je to otporan i koristan enzim za reakciju aldolne adicije. Aldolaze te vrste tvore Schiff-ovu bazu kao intermedijer koji dovodi do stvaranja nukleofilnog imina. Schiff-ove baze su spojevi koji imaju dvostruku vezu ugljik – dušik, a nastaju kondenzacijom aldehida i ketona s primarnim aminima. Većina Schiff-ovih baza je nestabilna i postoje samo kao reakcijski međuprodukti. Imin se potom stereoselektivno dodaje aktivnom akceptoru, aldehidu [Sudar M. et al., 2013.].

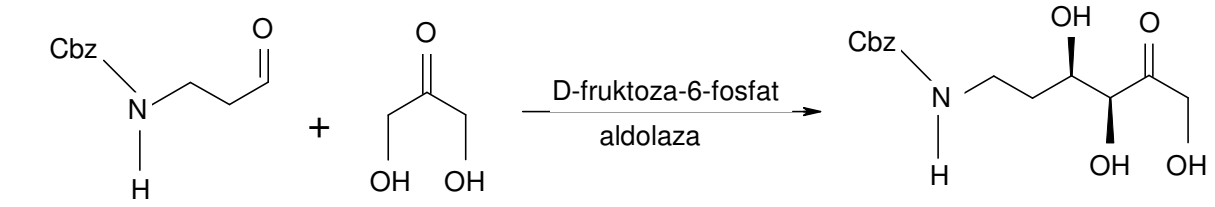
2.3.1. REAKCIJA ALDOLNE ADICIJE

Aldolna adicija (kondenzacija) je reakcija koju kataliziraju enzimi aldolaze, dobar je primjer za nukelofilne supstitucije, a stanice je koriste za stvaranje C – C veze. U metabolizmu, aldolne adicije su vrlo česte [Pine, 1994.]

Aldolna reakcija jedan je od važnih sintetičkih postupaka gdje se koriste karbonilni spojevi. Reakcija ima također industrijsku primjenu. Propanal (akrolein), polazni materijal u brojnim industrijskim postupcima,može se prirediti miješanom aldolnom reakcijom formaldehida i acetaldehida. [Pine, 1994.]

Aldolna se reakcija primjenjuje i za pripravu peteročlanih i šesteročlanih prstena. Kad nisu prisutni sterički problemi, povoljne promjene entropije pogoduju intramolekulskoj ciklizaciji. Aldolna ciklizacija je jedan stupanj u Robinsonovoj anelaciji koja se primjenjuje u sintezi steroida.
U ovom radu ispitan je troenzimski sustav u kojem se koriste alkohol dehidrogenaza, NADH oksidaza i D-fruktoza-6-fosfat aldolaza.

Reakcija aldolne adicije ispitana u ovom radu izgleda kao na slici:



N-Cbz-3-aminopropanal Dihidroksiaceton Aldol

Slika 3. Reakcija aldolne adicije

2.3.2. KINETIKA ENZIMA

Kinetika aldolne adicije ispitana je metodom početnih brzina na temelju podataka dobivenih eksperimentom. Eksperimenti su provedeni u šaržnom reaktoru volumena 0.5 cm^3 te je ispitivan utjecaj svake komponente na reakciju. Iz toga cilja proveden je niz eksperimenata pri čemu se koncentracija aldola prati pomoću HPLC-a. Iz promjena koncentracija aldola na početku reakcije, određen je nagib koji je korišten za izračunavanje aktivnosti enzima [Sudar M. et al., 2013.].

Tijekom aldolne adicije ispitivan je utjecaj oba reaktanta na reakciju. Kada je koncentracija dihidroksiacetona promijenjena na 120 mmol dm^{-3}, koncentracija N – Cbz – aminopropanala je konstantna te iznosi 262 mmol dm^{-3}. Kada je koncentracija N – Cbz – aminopropanala promijenjena na 450 mmol dm^{-3}, koncentracija dihidroksiacetona je konstantna te iznosi 46 mmol dm^{-3} [Sudar M. et al., 2013.].

2.3.3. STABILNOST ENZIMA

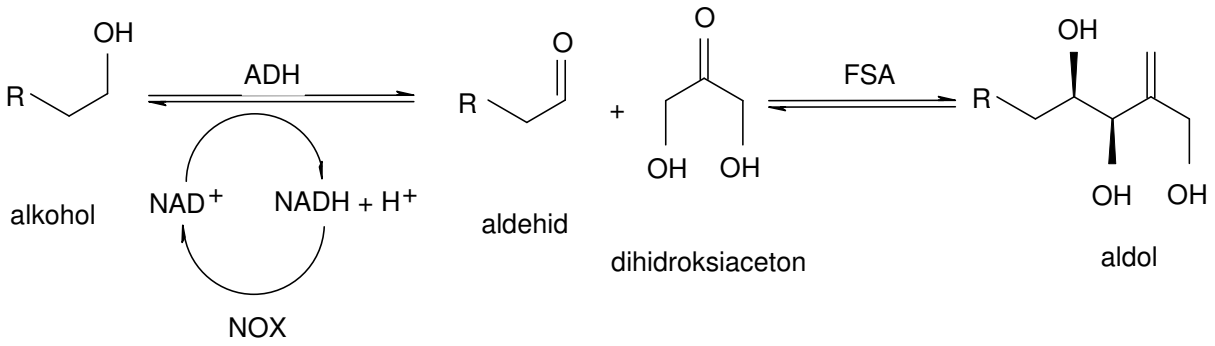
Aktivnost aldolaze ispitana je tijekom eksperimenta s ciljem da se procijeni njezina stabilnost. Uzorci su uzeti iz reaktora u različitim vremenskim intervalima te su provedeni eksperimenti u svrhu određivanja aktivnosti enzima. Eksperimenti su provedeni uz etil – acetat kao standardno otapalo za ispitivanje aktivnosti enzima. Koncentarcije reaktanata (dihidroksiacetona i N – Cbz – aminopropanala) su bile 100 mmol dm^{-3}. Koncentracija aldola prati se tijekom eksperimenta, a aktivnost enzima je određena iz nagiba pravca [Sudar M. et al., 2013.].

2.4. KASKADNE REAKCIJE

Kaskadne reakcije predmet su istraživanja u posljednjih nekoliko godina jer omogućuju određene ekonomske uštede, smanjuju potrošnju resursa i vremena, te smanjuju proizvodnju otpada u industrijskoj proizvodnji. Tako je na primjer dovoljno jedno otapalo, postupak obrade i metode pročišćavanja produkta da bi se proizveo produkt koji inače zahtijeva nekoliko individualnih koraka. Važnost tih razmatranja postaje sve veća s godinama jer je velika potreba za pronalaženje metode za upravljanje Zemljinim resursima [Bulger P.G. 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. Prednost kaskadnih reakcije u odnosu na klasične reakcije je u tome da se ne treba izolirati međuprodukt što dovodi do boljeg iskorištenja reakcije. Do danas je razvijeno nekoliko definicija koje su manje ili više slične jedna drugoj [Findrik Z. et al., 2009.].

Na slici 4. prikazan je primjer kaskadne reakcije.



Slika 4. Kaskadna reakcija oksidacije N-Cbz-3-aminopropanola u N-Cbz-3-aminopropanala uz regeneraciju koenzima NAD^+ i aldolna adicija dihidroksiacetona na N-Cbz-3-aminopropanol

2.5. TIPOVI REAKTORA

Reaktori koje se koriste u ovom radu su kotlasti reaktor, reaktor s dotokom i protočno kotlasti reaktor.

2.5.1. KOTLASTI REAKTOR

Kotlasti reaktor je najstarija poznata vrsta reaktora, nađena u Pompejima gdje se koristio za proizvodnju piva i sapuna. Danas se također mnogi korisni produkti najekonomičnije dobivaju u kotlastim reaktorima. Jednostavnost izvedbe i prilagodljivost promjenjivim uvjetima i zahtjevima čine kotlaste reaktore nezamjenjivim procesnim jedinicama u kemijskoj industriji. Zbog prekidnog rada kotlasti reaktor je pogodan za manju proizvodnju širokog spektra različitih produkata npr. u farmaceutskoj industriji, industriji boja, u proizvodnji polimernih proizvoda te u biokemijskim procesima.
Konstruktivno je izveden najčešće u obliku zatvorenog kotla, snabdjevenog miješalicom, sa otvorima kroz koje se reakcijska smjesa unosi odnosno iznosi na početku odnosno na kraju procesa te plaštem za izmjenu topline,za zagrijavanje ili hlađenje. Ovo je samo primitivna slika realnog sustava koji sadrži mnogo više potrebnih elemenata zavisno o vrsti reakcije, kontroli, vođenju, regulaciji, izmjeni topline te sigurnosti pri radu [Gomzi Z., 1998.].

Kotlasti (šaržni) reaktor radi u uvjetima nestacionarnog stanja što znači da veličine stanja ovise o vremenu. Prema tome sastav reakcijske smjese, brzina reakcije i količina utrošene (oslobođene) topline uslijed kemijske reakcije su promjenjive veličine. Reaktorski prostor je homogen. Još jedna značajka ovog reaktora je zatvorenost sustava odnosno nema izmjene tvari s okolinom tijekom procesa (sva količina reakcijske smjese na početku se unese u reaktor,reakcija započinje, traje izvjesno vrijeme i završava te se reaktor tek tada prazni).
Model „idealnog“ kotlastog reaktora sadrži pretpostavku da je volumen reakcijske smjese stalan i nezavisan o vremenu tj. nema promjene gustoće.
[Gomzi Z., 1998.]

Matematički model reaktora čine bilance množine tvari i topline. Ako pretpostavimo da se u reaktoru odigrava samo jedna reakcija, tada je model sastavljen od jedne bilance množine

tvari (komponente A) i jedne bilance topline. U tom slučaju bilanca za množinu tvari u kotlastom reaktoru izgleda ovako:

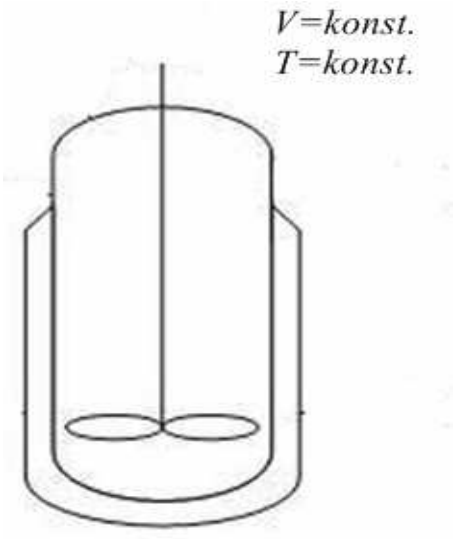
KOLIČINA TVARI A NASTALA KEMIJSKOM REAKCIJOM U REAKTORSKOM VOLUMENU	=	BRZINA AKUMULACIJAETVARI A U REAKTORSKOM VOLUMENU

Matematički izražena jednadžba (1) za bilancu tvari A glasi:

$$r_A V = -\frac{dn_A}{dt} \qquad (1)$$

Ovdje treba samo općenito reći da su uobičajene jedinice za brzinu kemijske reakcije mol s^{-1} m^{-3} pa je u gornjoj jednadžbi potrebno brzinu množiti s volumenom V da se dobije količina tvari A nestala kemijskom reakcijom u reaktorskom volumenu [Gomzi Z., 1998.].

Na slici 5. je shematski prikazan idealni kotlasti reaktor.



Slika 5. Kotlasti reaktor

2.5.2. KOTLASTI REAKTOR SA DOTOKOM

Reaktor s dotokom 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 točci jednak.

Ovaj tip reaktora se najčešće upotrebljava kada je supstrat inhibitor ili je toksičan pa ga treba postepeno dovoditi u reaktor [Vasić – Rački 1990.] .

Bilanca tvari komponente A za takav tip reaktora dana je slijedećom jednadžbom:

$$\frac{d(\mathrm{V} \bullet \mathrm{c}_A)}{dt} = c_{A0} \bullet q + r_A \bullet V \qquad (2)$$

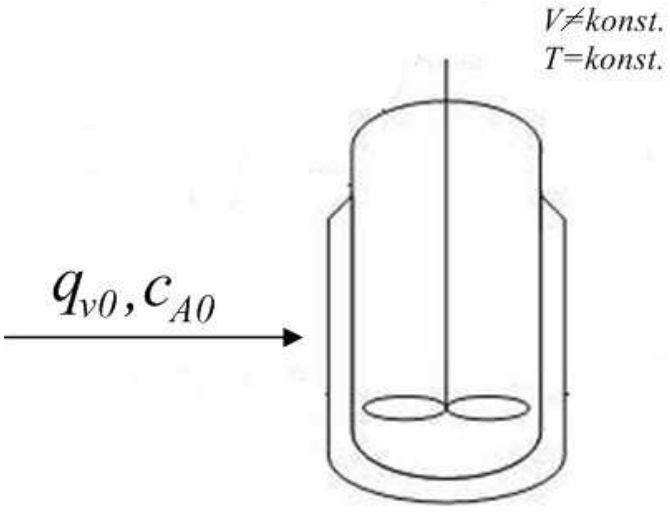
gdje q označava volumni protok,a c_{A0} koncentraciju komponente A u dotoku.

Ako se uzme u obzir da je promjena volumena u vremenu jednaka brzini volumnog dotoka $\left(\frac{dV}{dt}\right) = q$ jednadžba (2) poprima slijedeći oblik:

$$\frac{dc_A}{dt} = \frac{(c_{A0} - c_A) \bullet q}{V} + r_A \qquad (3)$$

[Visković K.,2009.].

Na slici 6. je shematski prikazan kotlasti reaktor s dotokom.



Slika 6. Kotlasti reaktor s dotokom

2.5.3. PROTOČNO KOTLASTI REAKTOR

Po obliku protočno kotlasti reaktor sličan je kotlastom,posjeduje uređaj za miješanje,a potrebno je omogućiti grijanje ili hlađenje reakcijske smjese kroz stijenku reaktora. Posebno treba napomenuti da moraju biti ugrađeni uređaji za uvođenje odnosno odvođenje reakcijske smjese. U stacionarnom radu,ali još više u nestacionarnom PKR reaktori se često koriste u industriji, bilo kao pojedinačne jedinice, bilo kao niz reaktora slijedno ili paralelno povezanih. Općenito nisu pogodni za rad pri viskom tlakovima, a uglavnom se koriste za provedbu reakcija u kapljevitom sustavu. Često se primjenjuju i za heterogene sustave (reaktor s mjehurićima,suspenzijski reaktor). Zbog svojih svojstava pogodni su za reakcije kod kojih su konverzije malene,a isto tako i za provedbu složenih reakcija [Gomzi Z., 1998.].

Osnovne značajke „idealnog“ protočno kotlastog reaktora su:

- Reakcijska smjesa je dobro miješana i prema toma je njezin sastav u svakoj točci reakcijske smjese isti.
- Reaktor radi u stacionarnom stanju odnosno nema promjene njegovih svojstava s vremenom.
- 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.
- PKR reaktor je otvoreni sustav, što znači da se za vrijeme reakcije izmjenjuje reakcijska masa s okolinom.

Kod ovog tipa reaktora potrebno je spomenuti i značajku prostornog vremena, τ (s). Na primjer,ako prostorno vrijeme neke kemijske reakcije iznosi 3 s, to znači da će za 3 s kroz reaktor proći jedan reaktorski volumen [Gomzi Z.,1998.].

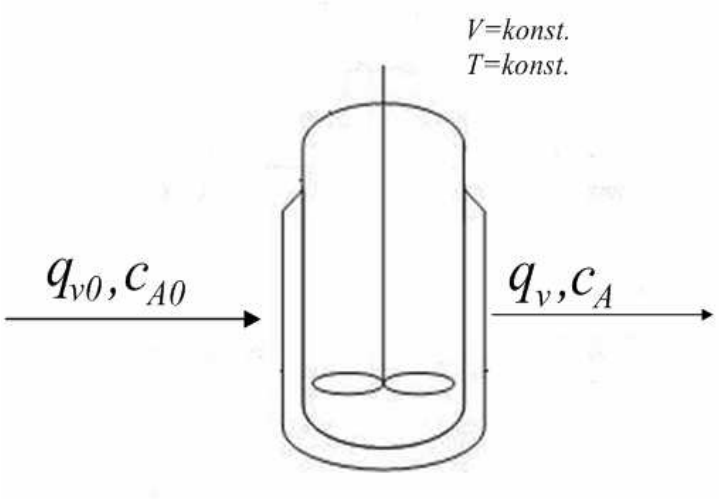
Opća bilanca komponente A za PKR koji radi u stacionarnom stanju, kada je ulazni protok jednak izlaznom, sadrži slijedeće članove:

MNOŽINA TVARI A UNIJETA U REAK. VOLUMEN U JEDINIČNOM VREMENU	–	MNOŽINA TVARI A IZNIJETA IZ REAK. VOLUMENA U JEDINIČNOM VREMENU	=	MNOŽINA TVARI A NESTALA KEM. REAKCIJOM U REAK. VOLUMENU I JEDINIČNOM VREMENU

Množina tvari koja se unosi ili iznosi u jediničnom vremenu u reaktor, odnosno jednostavnije brzina protjecanja ili protok tvari A, najbolje je izraziti molnim protokom F. Matematički napisana bilanca komponente A tada glasi:

$$q_{v0} - q_v = r_A V \qquad (4)$$

Na slici 7. je shematski prikazan protočno kotlasti reaktor.



Slika 7. Protočno kotlasti reaktor

3. MATEMATIČKO MODELIRANJE

3.1. UVOD U MATEMATIČKO MODELIRANJE

Matematičko modeliranje je postupak opisivanja realnog sustava matematičkim jednadžbama s ciljem razvoja i uporabe matematičkog modela za kasnije analize, projektiranje i optimiranje sustava za koji je model izrađen.
Matematički model opisuje sustav pomoću skupova varijabli i jednadžbi, koje opisuju odnose među varijablama.
Sustav je apstraktna (zamišljena) cjelina, za koju smatramo da nema interakcija s okolinom nego je izolirana i egzistira kao nezavisna. Najčešće je sustav definiran matematičkim relacijama između ulaznih i izlaznih veličina [http://www.ptfos.unios.hr/joomla/modeli/images/files/prezentacije/Uvod%20u%20matematicko%20modeliranje.pdf].

Varijable u modelu predstavljaju neka svojstva sustava (npr. *T, p, q, c*). U modelu mogu postojati različiti tipovi varijabli, pa tako one mogu biti:

- Ulazne i izlazne
- Zavisne i nezavisne
- Slučajne varijable

Matematički modeli mogu biti:
1.) Linearni i nelinearni
2.) Deterministički i stohastički
3.) Statički i dinamički
4.) Diskretni/diskontinuirani i kontinuirani
5.) Deduktivni i induktivni

Što je više veza među varijablama poznato to će model biti točniji. Stoga je nekada u model korisno ugraditi selektivne informacije na temelju intuicije, iskustva, stručnog mišljenja ili uvjerljivosti matematičkog izraza.

Što je više varijabli i veza među njima obuhvaćeno modelom, to je model složeniji i njegova uporaba je manje jednostavan. 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. BRZINA ENZIMSKE REAKCIJE

Brzina enzimske reakcije je intenzivna veličina i definirana je kao promjena broja molova tvari u jedinici vremena. Brzina enzimske reakcije opisuje se kinetičkim modelom.
Kinetički model enzimske reakcije je matematički izraz koji opisuje vezu između brzine enzimske reakcije i veličine reakcijskog sustava (koncentracije, tlaka i/ili temperature) te se postavlja na temelju eksperimentalnih kinetičkih- istraživanja [Predavanje: https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Kemijski_i_biokemijski_reaktori-Enzimska_kinetika.pdf].

Kinetički modeli su potrebni iz više razloga, na primjer za optimiranje procesnih uvjeta, zbog procjene volumena reaktora, zbog procjene konverzije u reaktoru, za oponašanje (simulaciju) procesa, za procjenu procesnih varijabli i parametara. S obzirom na poznavanje mehanizma kemijske reakcije dijelimo ih na mehanističke i empirijske
[Predavanje:
https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Kemijski_i_biokemijski_reaktori-Enzimska_kinetika.pdf].

Kinetički model se razvija slijedećim nizom postupaka:

- Izbor modela
- Ispitivanje valjanosti modela
- Poopćavanje modela
- Potvrda modela (procjena parametara)

Neki od kriterija za izbor najboljeg modela su: najjednostavniji model uz prihvatljivu grešku, najmanji broj parametara, model izveden na temelju fizičke slike ili mehanizma reakcije te model sa najmanjim kvadratnim odstupanjem. Također mehanistički modeli imaju prednost pred empirijskim ako je poznat mehanizam reakcije
[Predavanje:
https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Kemijski_i_biokemijski_reaktori-Enzimska_kinetika.pdf].

3.3. MICHAELIS – MENTENIČINA KINETIKA

Kinetika enzimskih reakcija se opisuje odgovarajućim matematičkim modelom. Složenost matematičkog modela ovisi o karakteristikama promatrane enzimske reakcije; prisutnosti jednog ili dva supstrata, prisutnosti inhibicije sa supstratom i/ili produktom, deaktivaciji enzima [Dunn et al.,1992.].
L. Michaelis i M.L. Menten su predložili da se prvo vežu enzim (E) i supstrat (S) dajući pritom kompleks enzim-supstrat (ES) (jednadžba 5.), uz pretpostavku da je to brza i reverzibilna reakcija. Taj kompleks se pritom kemijski mijenja što rezultira stvaranjem produkta (P) i njegovim odvajanjem od enzima (jednadžba 6.) [Duraković, 1996.].

$$S + E \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \qquad (5)$$

$$ES \xrightarrow{k_3} P + E \qquad (6)$$

Osnovni kinetički model kojim se opisuje brzina enzimskih kataliziranih reakcija je Michaelis – Menteničina jednadžba:

$$r_S = \frac{V_m \bullet c_S}{K_m^{\ S} + c_S} \qquad (7)$$

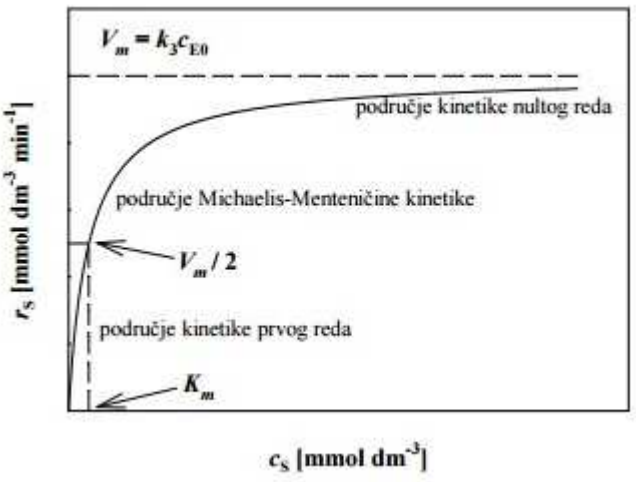
Radi se o kinetičkom modelu koji opisuje jednosupstratnu reakciju, odnosno reakciju u kojoj reakcijska brzina ovisi o koncentraciji jednog supstrata pri čemu je r_S brzina potrošnje supstrata, c_S koncentracija supstrata (mmol dm^{-3}), V_m je maksimalna brzina reakcije (mmol dm^{-3} min^{-1}), a K_m^S je Michaelisova konstanta (mmol dm^{-3}). Parametar V_m je ovisan o koncentraciji enzima (jednadžba 8.).

$$V_m = k_3 \bullet E_0 \qquad (8)$$

Michaelisova konstanta (K_m^S) numerički izražava afinitet enzima prema supstratu. K_m^S se definira kao ona koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine, a ovisi o supstratu te o uvjetima okoline kao što su pH i temperatura. Eksperimentalno se određuje mjerenjem početne brzine reakcije kod različitih koncentracija supstrata, a računski se definira kao

$$K_m^S = \frac{(k_1 + k_2)}{k_1} \qquad (9)$$

Na slici 8. je prikazana ovisnost početne brzine enzimski katalizirane reakcije o koncentraciji supstrata.



Slika 8. Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji supstrata za Michaelis - Menteničinu kinetiku

Michaelis – Menteničina kinetika prikazuje tri različita područja brzine reakcije (Slika 3.1.). Pri vrlo nisikim i vrlo visokim koncentracijama supstrata ovisnost reakcijske brzine r_S o koncentraciji supstrata c_S je linearna. Područje niskih koncentracija supstrata ($c_S << K_m^S$) se može aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda, a područje visokih koncentracija supstrata ($c_S >> K_m^S$) može se aproksimirati kinetikom reakcije nultog reda.

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 djelomično ili potpuno onemogućena [Duraković, 1996.].

3.4. KINETIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA

Kinetički model oksidacije amino alkohola prikazuje slijedeća jednadžba (10):

$$r_1 = \frac{V_{m1} \bullet c_{alkohol} \bullet c_{NAD} \bullet \gamma_{ADH}}{((K_m^{\ alkohol} + c_{alkohol}) \bullet (K_m^{\ NAD} \bullet (1 + \frac{c_{NADH}}{K_i^{\ NADH}}) + c_{NAD}))} \tag{10}$$

3.5. KINETIČKI MODEL OKSIDACIJE AMINO ALKOHOLA UZ REGENERACIJU KOENZIMA

Kinetički model oksidacije amino alkohola uz regeneraciju koenzima prikazuju slijedeće jednadžbe (12), (13) i (14):

$$r_1 = \frac{V_{m1} \bullet c_{alkohol} \bullet c_{NAD} \bullet \gamma_{ADH}}{((K_m^{\ alkohol} + c_{alkohol}) \bullet (K_m^{\ NAD} \bullet (1 + \frac{c_{NADH}}{K_i^{\ NADH}}) + c_{NAD}))} \tag{11}$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \bullet c_{NADH} \bullet c_O \bullet \gamma_{NADH}}{(K_m^{\ NADH} \bullet (1 + \frac{c_{NAD}}{K_i^{\ NAD}})) \bullet (K_m^{\ O} + c_O)} \tag{12}$$

Slijedeća jednadžba (14) prikazuje proces dobave kisika:

$$r_3 = k_L (c_{O_2,ZAS} - c_O) \tag{13}$$

3.6. KINETIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE

Matematički model za reakciju aldolne adicije dihidroksiacetona i N-Cbz-3- aminopropanala obuhvaća kinetičku i bilancnu jednadžbu za svaki reaktor. Kinetički model za reakciju aldolne adicije prikazuje jednadžba (14):

$$r_4 = \frac{V_{m4} \bullet c_{N-Cbz-3-a\min opropanal} \bullet c_{DHA} \bullet \gamma_{FSA}}{(\mathrm{K}_m^{\ N-Cbz-3-a\min opropanal} + c_{N-Cbz-3-a\min opropanal}) \bullet (K_m^{\ DHA} + c_{DHA})} \tag{14}$$

Reverznu reakcija aldolne adicije prikazuje jednadžba (15) koja je u modelu zanemarena:

$$r_5 = \frac{V_{m5} \bullet c_{aldol} \bullet \gamma_{FSA}}{K_m^{\ aldol} \bullet (1 + \frac{c_{N-Cbz-3-a\min opropanal}}{K_i^{\ N-Cbz-a\min opropanal}}) + c_{aldol}} \tag{15}$$

3.7. KINETIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE

Kinetički model kaskadne reakcije prikazuju slijedeće jednadžbe (16),(17),(18) i (19):

$$r_1 = \frac{V_{m1} \bullet c_{alkohol} \bullet c_{NAD} \bullet \gamma_{ADH}}{((K_m^{\ alkohol} + c_{alkohol}) \bullet (K_m^{\ NAD} \bullet (1 + \frac{c_{NADH}}{K_i^{\ NADH}}) + c_{NAD}))} \tag{16}$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \bullet c_{NADH} \bullet c_O \bullet \gamma_{NADH}}{(K_m^{\ NADH} \bullet (1 + \frac{c_{NAD}}{K_i^{\ NAD}})) \bullet (K_m^{\ O} + c_O)} \tag{17}$$

$$r_3 = k_L (c_{O,ZAS} - c_O) \tag{18}$$

$$r_4 = \frac{V_{m4} \bullet c_{N-Cbz-3-a\min opropanal} \bullet c_{DHA} \bullet \gamma_{FSA}}{(\mathrm{K}_m^{\ N-Cbz-3-a\min opropanal} + c_{N-Cbz-3-a\min opropanal}) \bullet (K_m^{\ DHA} + c_{DHA})} \tag{19}$$

3.8. MATEMATIČKI MODEL KOTLASTOG REAKTORA

3.8.1. REAKCIJA ALDOLNE ADICIJE

Bilance tvari reaktanata i produkta za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru prikazane su slijedećim jednadžbama (20),(21) i (22):

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-a\min opropanal}}{dt} = -r_4 + r_5 \tag{20}$$

$$\frac{dc_{DHA}}{dt} = -r_4 + r_5 \tag{21}$$

$$\frac{dc_{aldol}}{dt} = r_4 - r_5 \tag{22}$$

Stabilnost enzima aldolaze prikazana je slijedećom jednadžbom (23):

$$\frac{dV_{m4}}{dt} = -k_d \bullet V_{m4} \tag{23}$$

3.8.2. KASKADNA REAKCIJA

Bilance tvari reaktanata i produkata za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru prikazane su slijedećim jednadžbama (24),(25),(26),(27),(28),(29) i (30):

$$\frac{dc_{alkohol}}{dt} = -r_1 \tag{24}$$

$$\frac{dc_{NAD}}{dt} = -r_1 + r_2 \tag{25}$$

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = r_1 - r_2 \tag{26}$$

$$\frac{dc_O}{dt} = -r_2 + r_3 \tag{27}$$

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-a\min opropanal}}{dt} = r_1 - r_4 \tag{28}$$

$$\frac{dc_{DHA}}{dt} = -r_4 \tag{29}$$

$$\frac{dc_{aldol}}{dt} = r_4 \tag{30}$$

Kaskadnu reakciju kataliziraju ukupno 3 enzima – dehidrogenaza(ADH), NADH oksidaza (NOX) i aldolaza (FSA) te njihovu stabilnost prikazuju slijedeće jednadžbe (31),(32) i (33):

$$\frac{dV_{m1}}{dt} = -k_{d1} \bullet V_{m1} \tag{31}$$

$$\frac{dV_{m2}}{dt} = -k_{d2} \bullet V_{m2} \tag{32}$$

$$\frac{dV_{m4}}{dt} = -k_{d4} \bullet V_{m4} \tag{33}$$

3.9. MATEMATIČKI MODEL PROTOČNO KOTLASTOG REAKTORA

3.9.1. REAKCIJA ALDOLNE ADICIJE

Bilance tvari reaktanata i produkta za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru prikazane su slijedećim jednadžbama

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-a\min opropanal}}{dt} = \frac{c_{N-Cbz-3-a\min opropanal,0} - c_{N-Cbz-3-a\min opropanal}}{\tau} - r_4 + r_5 \qquad (34)$$

$$\frac{dc_{DHA}}{dt} = \frac{c_{DHA,0} - c_{DHA}}{\tau} - r_4 + r_5 \qquad (35)$$

$$\frac{dc_{aldol}}{dt} = \frac{c_{aldol,0} - c_{aldol}}{\tau} + r_4 - r_5 \qquad (36)$$

Jednadžba (37) koja prikazuje stabilnost enzima aldolaze jednaka je kao i kod kotlastog reaktora:

$$\frac{dV_{m4}}{dt} = -k_d \bullet Vm_4 \qquad (37)$$

3.9.2. KASKADNA REAKCIJA

Bilance tvari reaktanata i produkata za kaskadnu reakciju u protočno kotlastom reaktoru prikazuju slijedeće jednadžbe (38),(39),(40),(41),(42),(43) i (44):

$$\frac{dc_{alkohol}}{dt} = \frac{(c_{alkohol,0} - c_{alkohol})}{\tau} - r_1 \qquad (38)$$

$$\frac{dc_{NAD}}{dt} = \frac{(c_{NAD,0} - c_{NAD})}{\tau} - r_1 + r_2 \qquad (39)$$

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = \frac{(c_{NADH,0} - c_{NADH})}{\tau} + r_1 - r_2 \qquad (40)$$

$$\frac{dc_{O}}{dt} = \frac{(c_{O,0} - c_{O})}{\tau} - r_2 + r_3 \qquad (41)$$

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-a\min opropanal}}{dt} = \frac{(c_{N-Cbz-3-a\min opropanal,0} - c_{N-Cbz-3-a\min opropanal})}{\tau} + r_1 - r_4 \qquad (42)$$

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

$$\frac{dc_{aldol}}{dt} = \frac{(c_{aldol,0} - c_{aldol})}{\tau} + r_4 \qquad (44)$$

Kaskadnu reakciju kataliziraju ukupno 3 enzima te njihovu stabilnost prikazuju već navedene jednadžbe (31),(32) i (33).

3.10. MATEMATIČKI MODEL KOTLASTOG REAKTORA S DOTOKOM

3.10.1. REAKCIJA ALDOLNE ADICIJE

Bilance tvari reaktanata i produkta za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru s dotokom prikazane su slijedećim jednadžbama

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-a\min opropanal}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{N-Cbz-3-a\min opropanal,0} - c_{N-Cbz-3-a\min opropanal})}{V} - r_4 + r_5 \tag{45}$$

$$\frac{dc_{DHA}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{DHA,0} - c_{DHA})}{V} - r_4 + r_5 \tag{46}$$

$$\frac{dc_{aldol}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{aldol,0} - c_{aldol})}{V} + r_4 - r_5 \tag{47}$$

Stabilnost enzima u protočno kotlastom reaktoru je prikazana već navedenom jednadžbom (48) :

$$\frac{dV_{m4}}{dt} = -k_d \bullet V_{m4} \tag{48}$$

3.10.2. KASKADNA REAKCIJA

Bilance tvari reaktanata i produkata za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru s dotokom prikazuju slijedeće jednadžbe (49),(50),(51),(52),(53),(54) i (55):

$$\frac{dc_{alkohol}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{alkohol,0} - c_{alkohol})}{V} - r_1 \tag{49}$$

$$\frac{dc_{NAD}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{NAD,0} - c_{NAD})}{V} - r_1 + r_2 \tag{50}$$

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{NADH,0} - c_{NADH})}{V} + r_1 - r_2 \tag{51}$$

$$\frac{dc_{O}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{O,0} - c_{O})}{V} - r_2 + r_3 \tag{52}$$

$$\frac{dc_{N-Cbz-3-a\min opropanal}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{N-Cbz-3-a\min opropanal,0} - c_{N-Cbz-3-a\min opropanal})}{V} + r_1 - r_4 \tag{53}$$

$$\frac{dc_{DHA}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{DHA,0} - c_{DHA})}{V} - r_4 \tag{54}$$

$$\frac{dc_{aldol}}{dt} = \frac{q \bullet (c_{aldol,0} - c_{aldol})}{V} + r_3 \tag{55}$$

Kaskadnu reakciju kataliziraju ukupno 3 enzima te njihovu stabilnost prikazuju već navedene jednadžbe (31),(32) i (33).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. KINETIČKI PARAMETRI

U tablicama 1. i 2. nalaze se parametri koji su korišteni za rekaciju aldolne adicije te za kaskadnu reakciju.

Tablica 1. Kinetički parametri za reakciju aldolne adicije

PARAMETRI	MJERNA JEDINICA	VRIJEDNOST
K_m^{DHA}	mmol dm^{-3}	17,1
$K_m^{N-Cbz-3-a\min opropanal}$	mmol dm^{-3}	37,9
V_{m4}^{FSA}	U mg^{-1}	1,6
K_m^{aldol}	mmol dm^{-3}	293,51
V_{m5}^{FSA}	U mg^{-1}	39,8
$K_i^{N-Cbz-3-a\min opropanal}$	mmol dm^{-3}	0,02

Navedeni parametri su preuzeti iz rada, a dobiveni su eksperimentima provedenim u šaržnom reaktoru volumena 0,5 cm^3 [Sudar et al., 2013.].

Tablica 2. Konstanta deaktivacije enzima aldolaze za reakciju aldolne adicije [Sudar et al., 2013.]

ENZIM	k_d/ h^{-1}
D-fruktoza-6- fosfat aldolaza (FSA)	0,078

Tablica 3. Kinetički parametri za kaskadnu reakciju

PARAMETRI	MJERNA JEDINICA	VRIJEDNOST
$K_m^{alkohol}$ *	mmol dm^{-3}	10,91
K_m^{NAD} *	mmol dm^{-3}	0,399
K_m^{NADH} **	mmol dm^{-3}	0,005
$K_m^{N-Cbz-3-a\min opropanal}$ ***	mmol dm^{-3}	167,34
K_i^{NAD} **	mmol dm^{-3}	0,132
K_i^{NADH} *	mmol dm^{-3}	0,011
$K_m^{o_2}$ **	mmol dm^{-3}	0,0045
K_m^{DHA} ***	mmol dm^{-3}	11,01
$c_{0_2,ZAS}$	mmol dm^{-3}	0,28
V_{m1}^{ADH} *	U mg^{-1}	0,344
$V_{m2}^{NADH-oksidaza}$ **	U mg^{-1}	16,4
V_{m4}^{FSA} ***	U mg^{-1}	10,2

* [Sudar M., 2012.]

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

*** [Sudar M., 2013.]

U slijedećoj tablici 3. navedene su vrijednosti konstanta deaktivacije enzima.

Tablica 4. Konstante deaktivacije enzima korištene za kaskadnu reakciju [Sudar M., Rad prihvaćen za objavu]

ENZIM	k_d/ h^{-1}
Dehidrogenaza (ADH))	0,08
NADH oksidaza	0,066
D-fruktoza-6- fosfat aldolaza aldolaza (FSA)	0,078

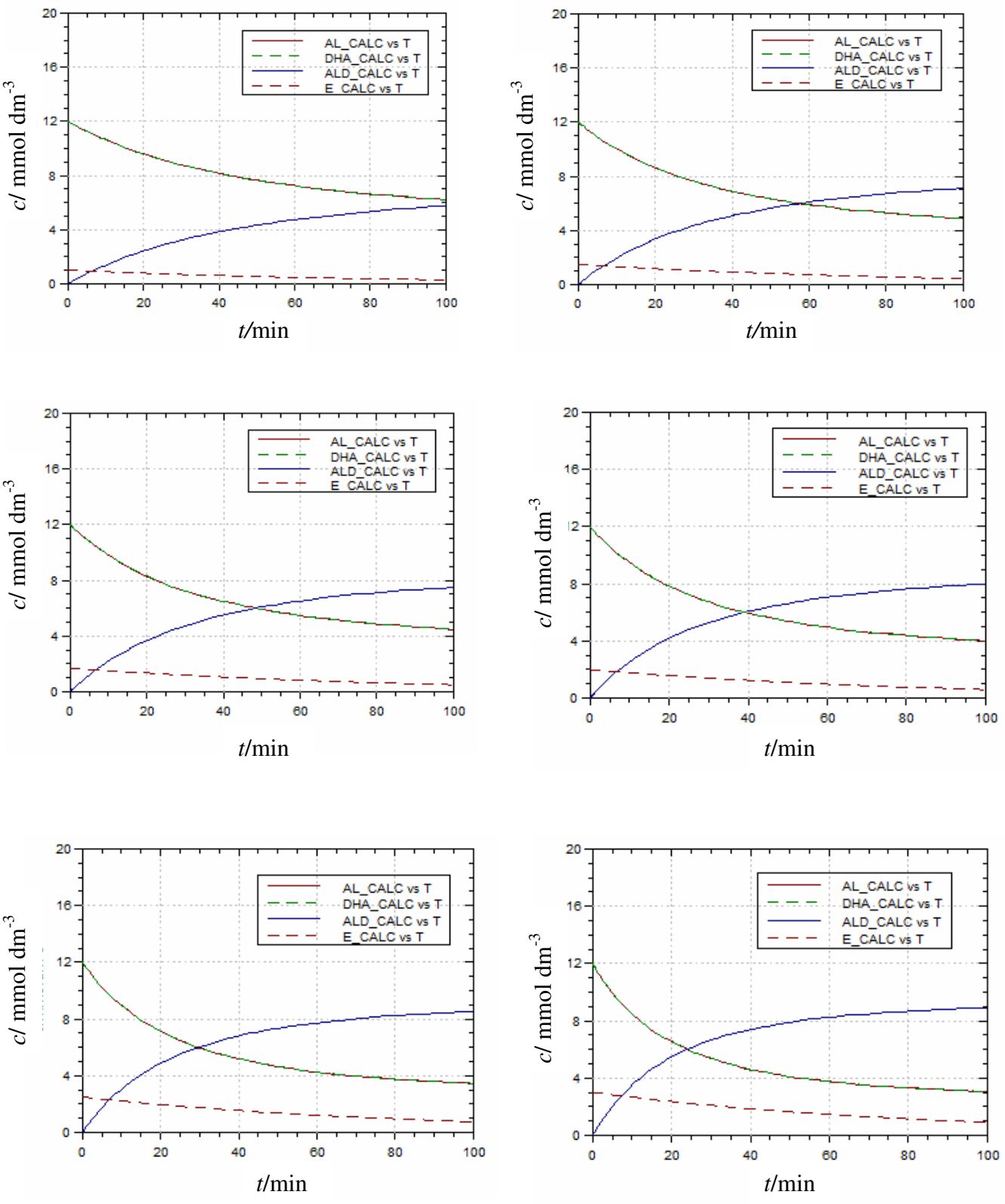
4.2. REZULTATI

4.2.1. REAKCIJA ALDOLNE ADICIJE

4.2.1.1. KOTLASTI REAKTOR

Tablica 5. Vrijednosti koncentracija reaktanata i enzima te konverzije dobivene pomoću matematičkog modela za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru uz nestabilan enzim (k_d= 0,078 h^{-1})

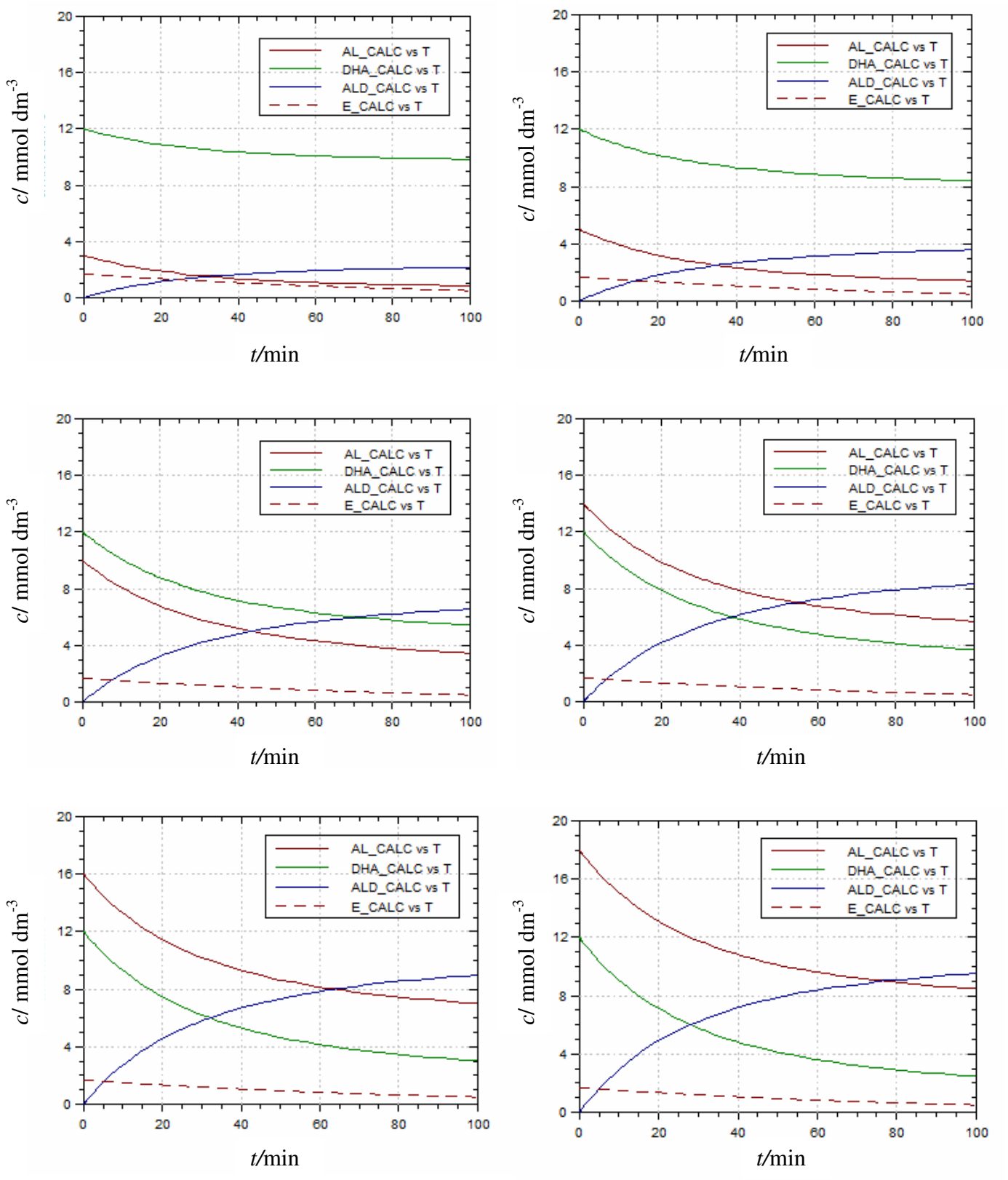
***c* (N-Cbz-3-aminopropanal) [mmol dm^{-3}]**	***c* (DHA) [mmol dm^{-3}]**	***c* (FSA) [mmol dm^{-3}]**	$X_{100\ min}$ **[-]**
12	12	1	0,480
12	12	1,5	0,593
12	12	1,7	0,625
12	12	2	0,665
12	12	2,5	0,712
12	12	3	0,743



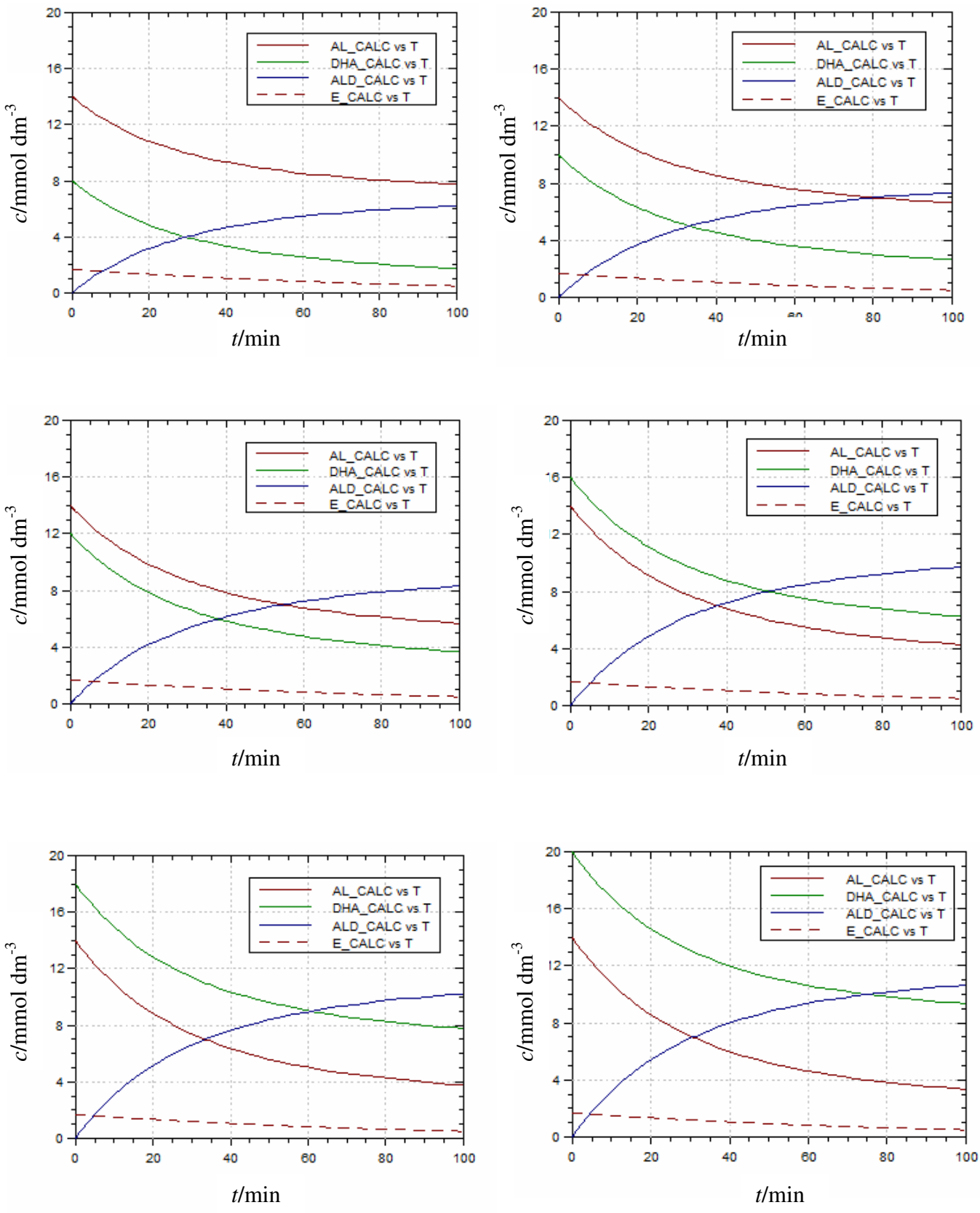
Slika 9. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru uz stehiometrijski omjer reaktanata i promjenu koncentracije enzima

Tablica 6. Vrijednosti različitih koncentracija dihidroksiacetona i N-Cbz-3-aminopropanala za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru

***c* (N-Cbz-3-aminopropanal) [mmol dm^{-3}]**	***c* (DHA) [mmol dm^{-3}]**	**X_{100min} [-]**
3	12	0,716
5	12	0,714
10	12	0,656
14	12	0,692
16	12	0,747
18	12	0,793
14	8	0,778
14	10	0,736
14	12	0,692
14	16	0,694
14	18	0,730
14	20	0,760



Slika 10. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije uz konstantnu koncentraciju dihidroksiacetona,uz promjenu koncentracije N-Cbz-3-aminopropanala te pri konstantnoj koncentraciji enzima (c = 1,7 mmol dm^{-3}) u kotlastom reaktoru



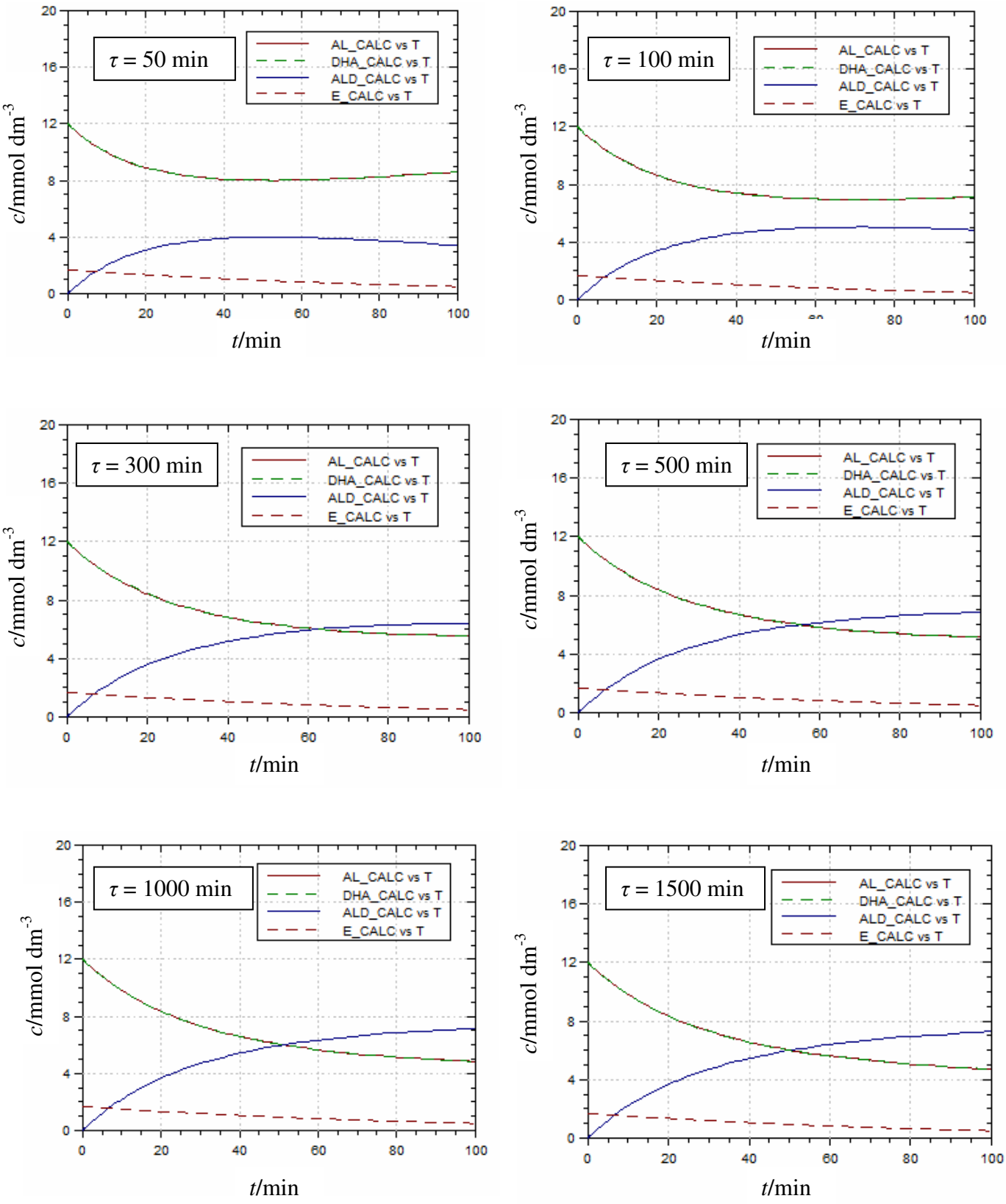
Slika 11 . Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije uz konstantnu koncentraciju N-Cbz-3-aminopropanala,uz promjenu koncentracije dihidroksiacetona te pri konstantnoj koncentraciji enzima (c = 1,7 mmol dm^{-3}) u kotlastom reaktoru

4.2.1.2. PROTOČNO KOTLASTI REAKTOR

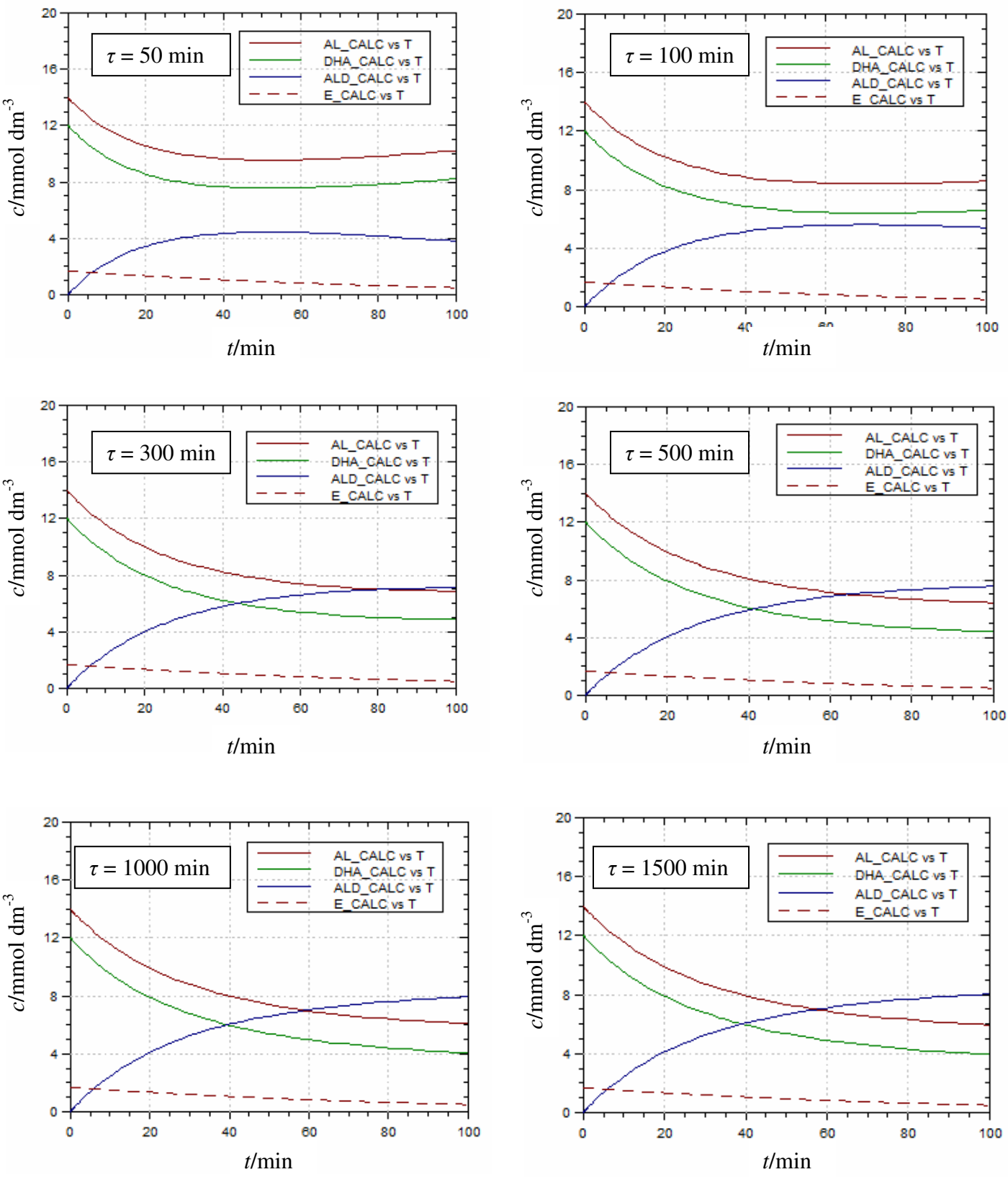
U tablici 7. prikazane su vrijednosti vremena zadržavanja i koncentracija reaktanata za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru. U protočno kotlastom reaktoru pratila se promjena konverzije promjenom vremena zadržavanja.

Tablica 7. Vrijednosti vremena zadržavanja i koncentracija dihidroksiacetona i N-Cbz-3-aminopropanala za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru uz nestabilan enzim ($k_d \neq 0$)

***c* (N-Cbz-3-aminopropanal) [mmol dm^{-3}]**	***c* (DHA) [mmol dm^{-3}]**	***τ* [min]**	**$X_{KON,100min}$ [-]**
12	12	50	0,283
12	12	100	0,405
12	12	300	0,535
12	12	500	0,569
12	12	1000	0,596
12	12	1500	0,606
14	12	50	0,315
14	12	100	0,449
14	12	300	0,593
14	12	500	0,630
14	12	1000	0,660
14	12	1500	0,670



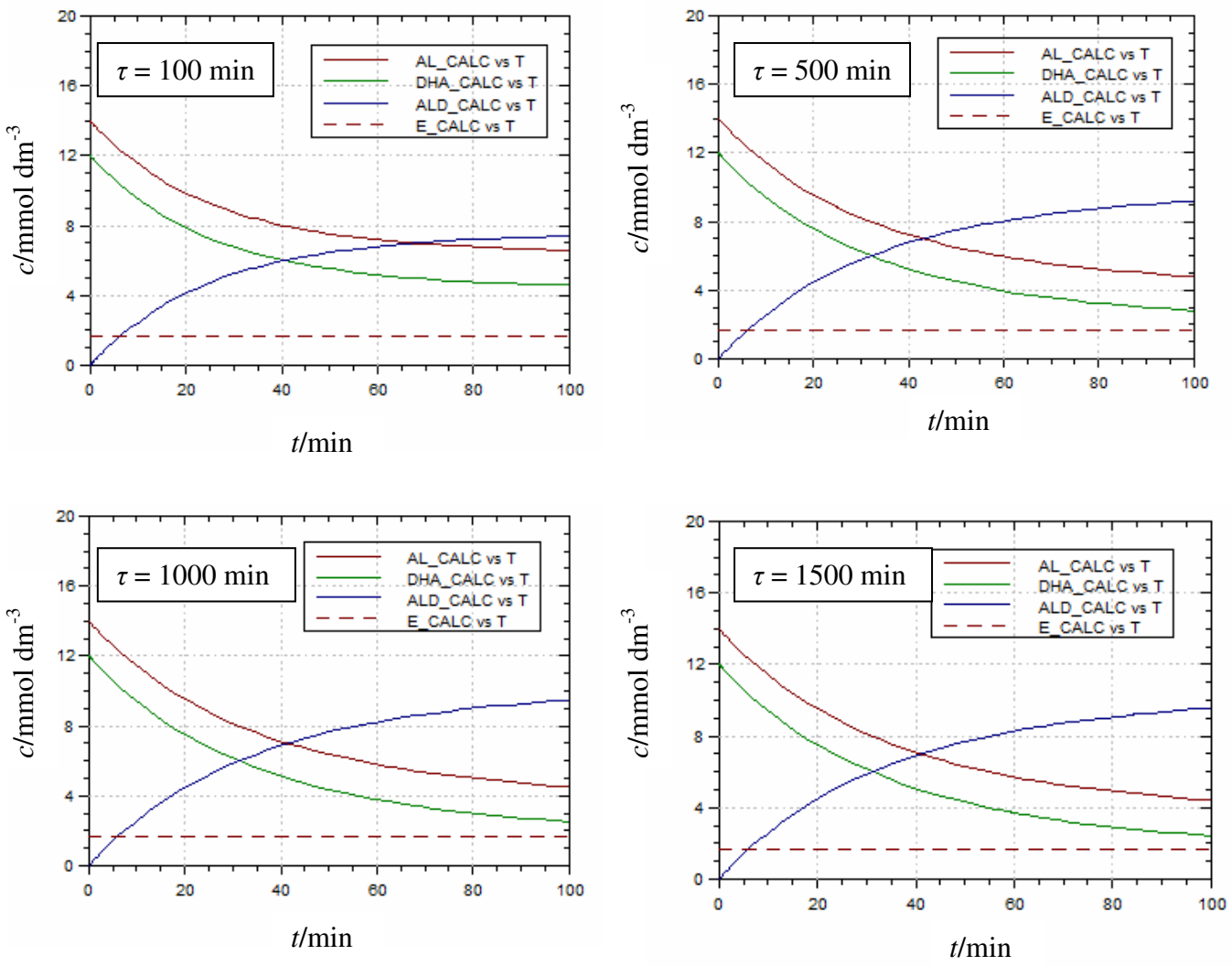
Slika 12. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru uz stehiometrijski omjer reaktanata te uz promjenu vremena zadržavanja ($k_d \neq 0$)



Slika 13. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru uz vrijednosti koncentracija reaktanata c(DHA) = 12 mmol dm^{-3} i c(N-Cbz-3-aminopropanal) = 14 mmol dm^{-3} uz promjenu vremena zadržavanja ($k_d \neq 0$)

Tablica 8. Vrijednosti koncentracija reaktanata i vremena zadržavanja za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru uz stabilan enzim ($k_d = 0$)

c (N-Cbz-3-aminopropanal) [mmol dm^{-3}]	**c (DHA) [mmol dm^{-3}]**	**τ [min]**	**$X_{KON,100min}$ [-]**
14	12	100	0,616
14	12	500	0,765
14	12	1000	0,789
14	12	1500	0,797

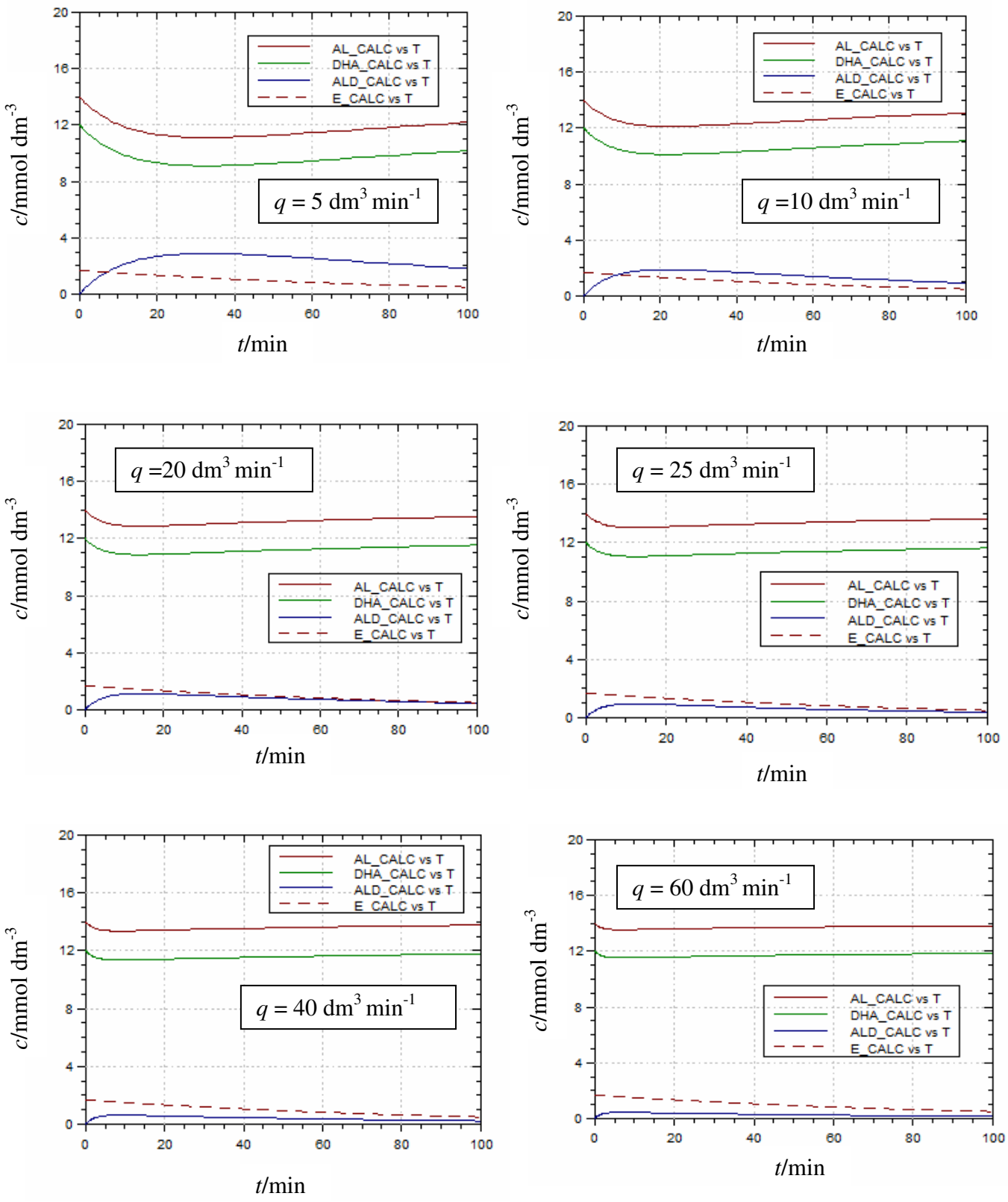


Slika 14. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije u protočno kotlastom reaktoru uz konstantne vrijednosti reakanata te uz promjenu vremena zadržavanja uz stabilan enzim ($k_d = 0$)

4.2.1.3. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM

Tablica 9. Vrijednosti koncentracija reaktanata i protoka za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru konstantnog volumena 100 dm^3 ($k_d \neq 0$)

c **(N-Cbz-3-aminopropanal) [mmol** $\mathbf{dm^{-3}}$**]**	***c*** **(DHA) [mmol** $\mathbf{dm^{-3}}$**]**	***q*** **[**$\mathbf{dm^3\ min^{-1}}$**]**	$X_{KON,100min}$ **[-]**
14	12	5	0,151
14	12	10	0,077
14	12	20	0,038
14	12	25	0,030
14	12	40	0,019
14	12	60	0,012



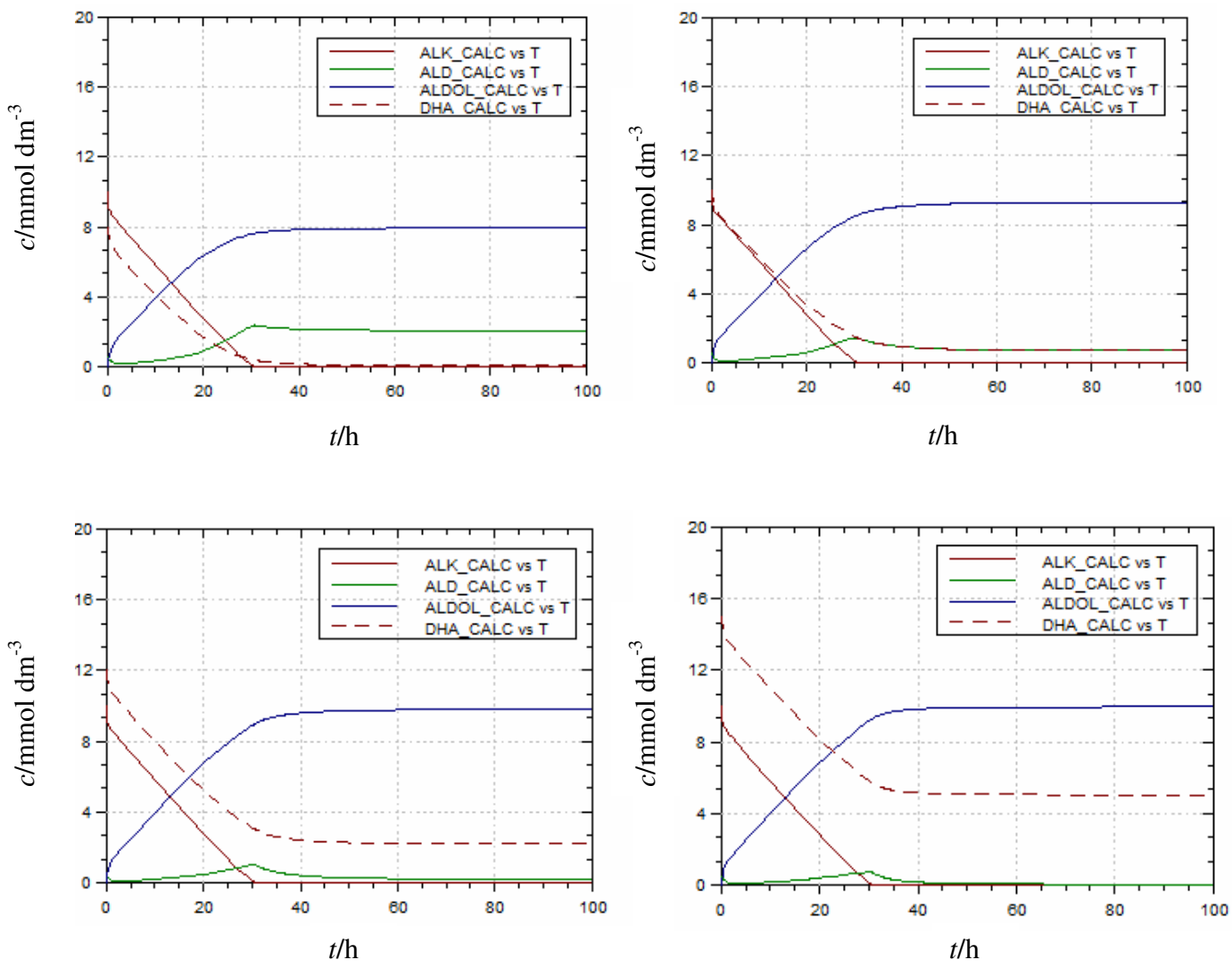
Slika 15. Grafički prikaz simulacija za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru sa dotokom uz konstantne koncentracije reaktanata te uz promjenu protoka

4.2.2. KASKADNA REAKCIJA

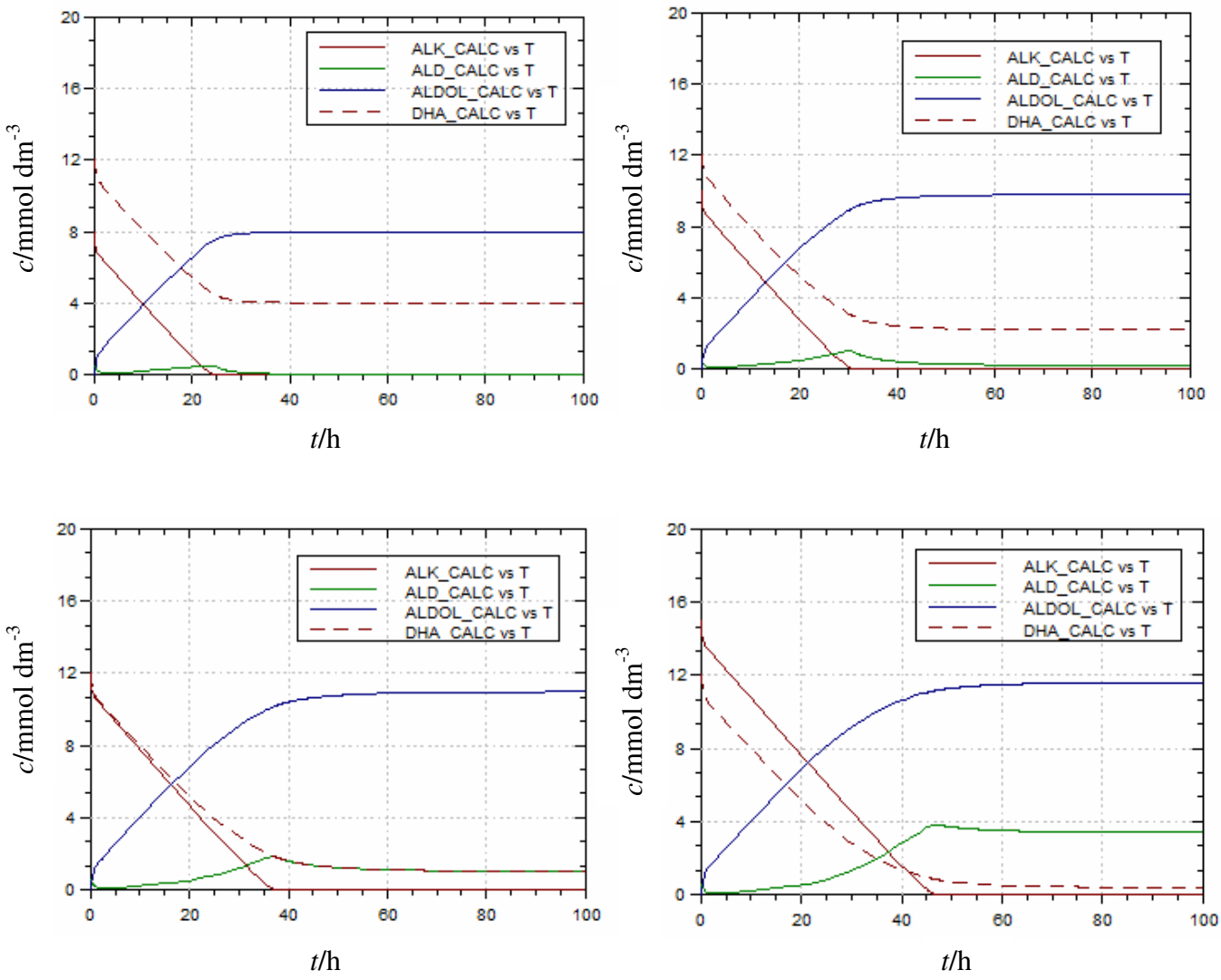
4.2.2.1. KOTLASTI REAKTOR

Tablica 10. Vrijednosti različitih koncentracija aminoalkohola i dihiroksiacetona za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru te maksimalnog iskorištenja na aldolu uz nestabilne enzime ($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$)

***c* (AMINO ALKOHOL) [mmol dm^{-3}]**	***c* (DHA) [mmol dm^{-3}]**	***t* (I_{MAX}) [h]**	**I_{MAX} [-]**
10	8	90	0,793
10	10	90	0,930
10	12	85	0,980
10	15	100	0,996
8	12	85	0,998
10	12	90	0,980
12	12	90	0,914
15	12	95	0,774



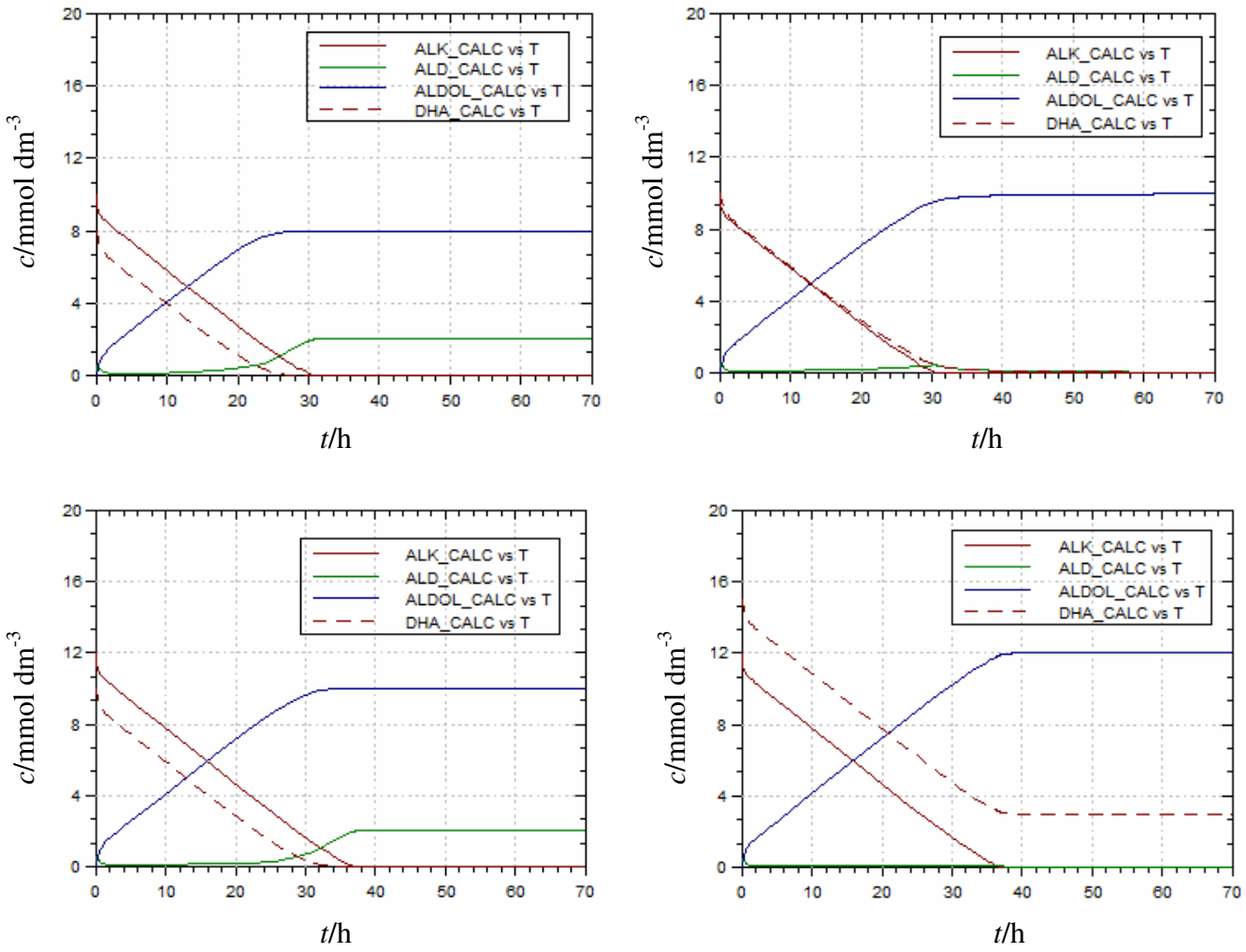
Slika 16. Grafički prikaz simulacija za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru uz konstantnu koncentraciju aminoalkohola te uz promjenu koncentracije dihidroksiacetona uz nestabilne enzime ($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$)



Slika 17. Grafički prikaz simulacija za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru uz konstantnu koncentraciju dihidroksiacetona te uz promjenu koncentracije aminoalkohola uz nestabilne enzime ($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$)

Tablica 11. Vrijednosti različitih koncentracija aminoalkohola i dihiroksiacetona za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru te maksimalnog iskorištenja na aldolu uz stabilne enzime ($k_{d1} = k_{d2} = k_{d3} = 0$)

***c* (AMINO ALKOHOL) [mmol dm^{-3}]**	***c* (DHA) [mmol dm^{-3}]**	***t* (I_{MAX}) [h]**	I_{MAX} [-]
10	8	35	0,800
10	10	65	0,996
12	10	38	0,833
12	15	42	1

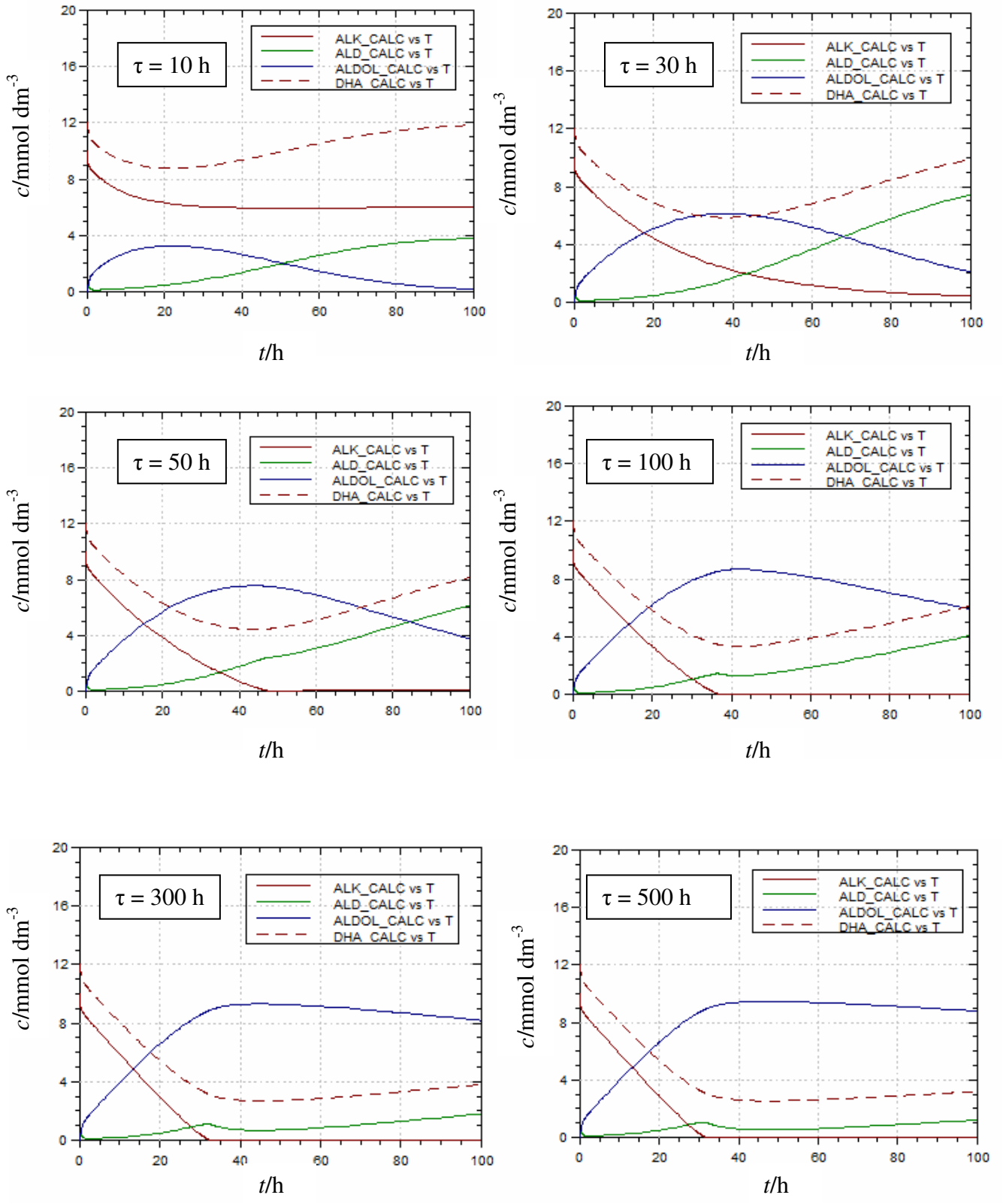


Slika 18. Grafički prikaz simulacija za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru uz određene koncentracije aminoalkohola i dihidroksiacetona uz stabilne enzime ($k_{d1} = k_{d2} = k_{d3} = 0$)

4.2.2.2. PROTOČNO KOTLASTI REAKTOR

Tablica 12. Vrijednosti koncentracija reaktanata za kaskadnu reakciju uz različite vrijednosti vremena zadržavanja u protočno kotlastom reaktoru uz nestabilne enzime ($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$)

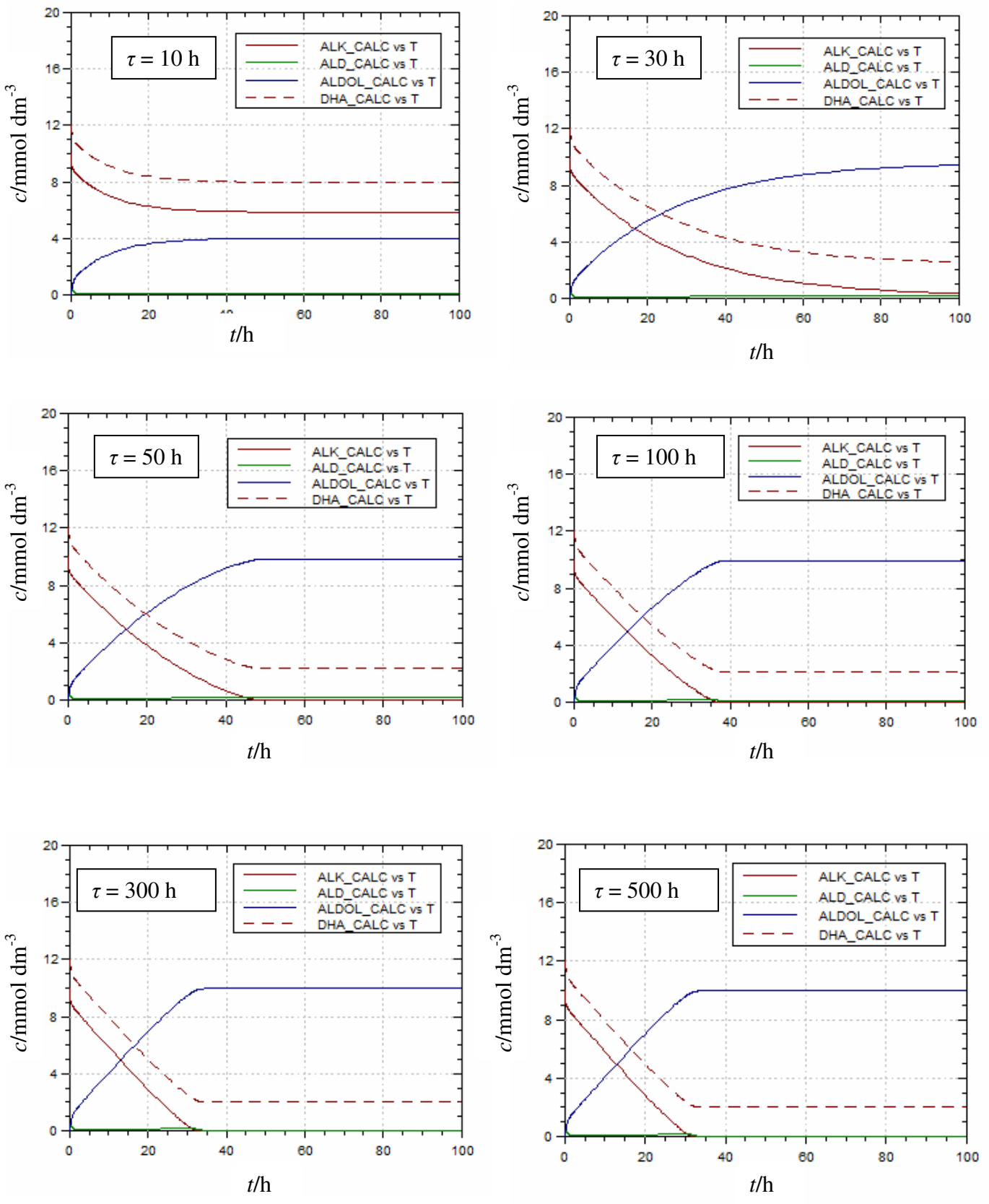
***c* (ALKOHOL) [mmol dm^{-3}]**	***c* (DHA) [mmol dm^{-3}]**	***τ* [h]**	***t* (I_{MAX}) [h]**	***I*$_{MAX}$ [-]**
10	12	10	20	0,323
10	12	30	35	0,612
10	12	50	40	0,755
10	12	100	40	0,865
10	12	300	45	0,931
10	12	500	50	0,945



Slika 19. Grafički prikaz simulacija kaskadne reakcije u protočno kotlastom reaktoru uz konstantne koncentracije alkohola i dihiroksiacetona uz promjenu vremena zadržavanja te uz nestabilne enzime ($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$)

Tablica 13. Vrijednosti koncentracija alkohola i dihidroksiacetona za kaskadnu reakciju uz promjenu vremena zadržavanja te uz stabilne enzime ($k_{d1} = k_{d2} = k_{d3} = 0$)

***c* (ALKOHOL) [mmol dm^{-3}]**	***c* (DHA) [mmol dm^{-3}]**	**τ [h]**	***t* (I_{MAX}) [h]**	**I_{MAX} [-]**
10	12	10	90	0,402
10	12	30	100	0,942
10	12	50	55	0,981
10	12	100	45	0,990
10	12	300	35	0,996
10	12	500	40	0,998

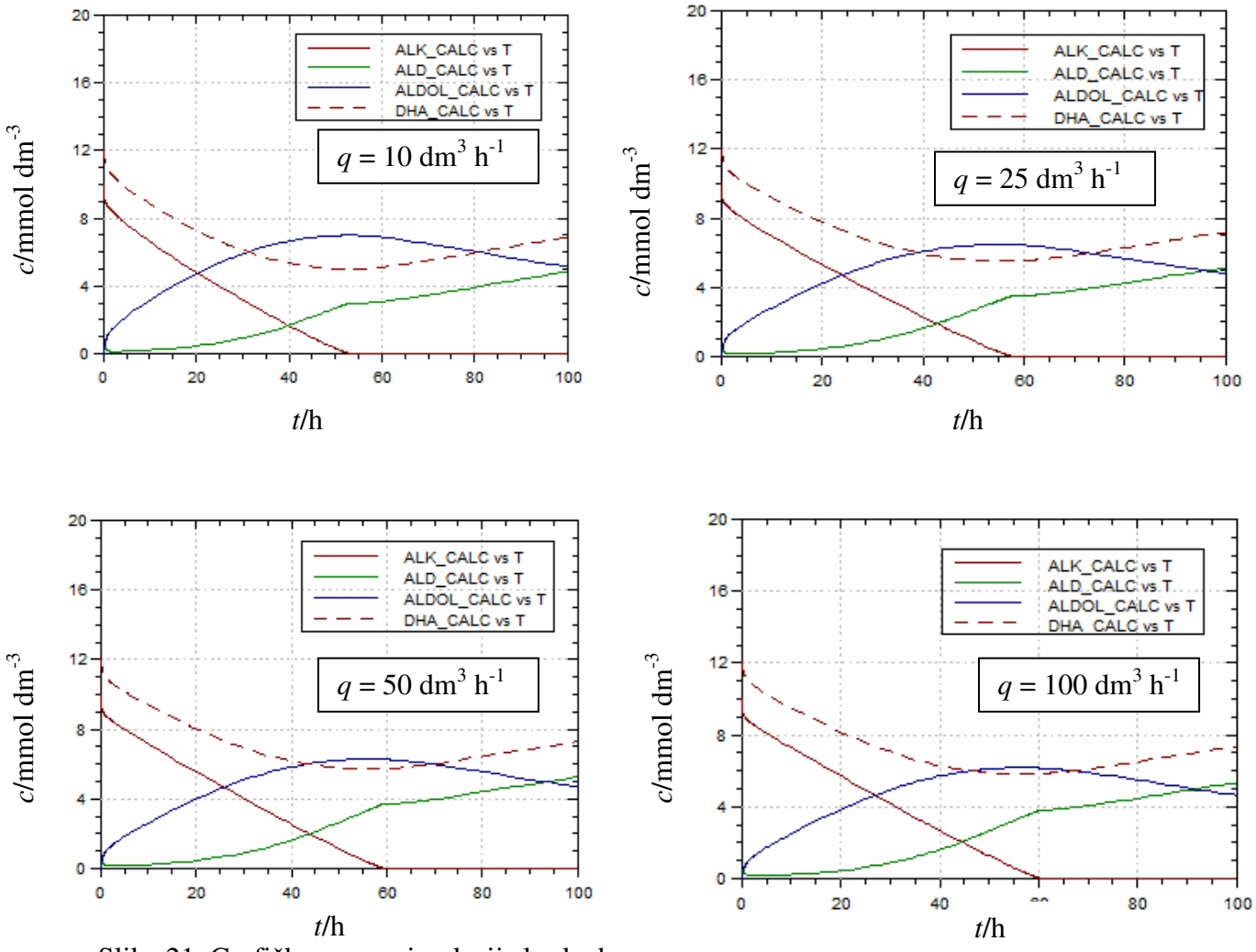


Slika 20. Grafički prikaz simulacija kaskadne reakcije u protočno kotlastom reaktoru uz stabilne enzime($k_{d1} = k_{d2} = k_{d3} = 0$)

4.2.2.3. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM

Tablica 14. Vrijednosti koncentracija alkohola i dihidroksiacetona za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru s dotokom uz nestabilne enzime ($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$)

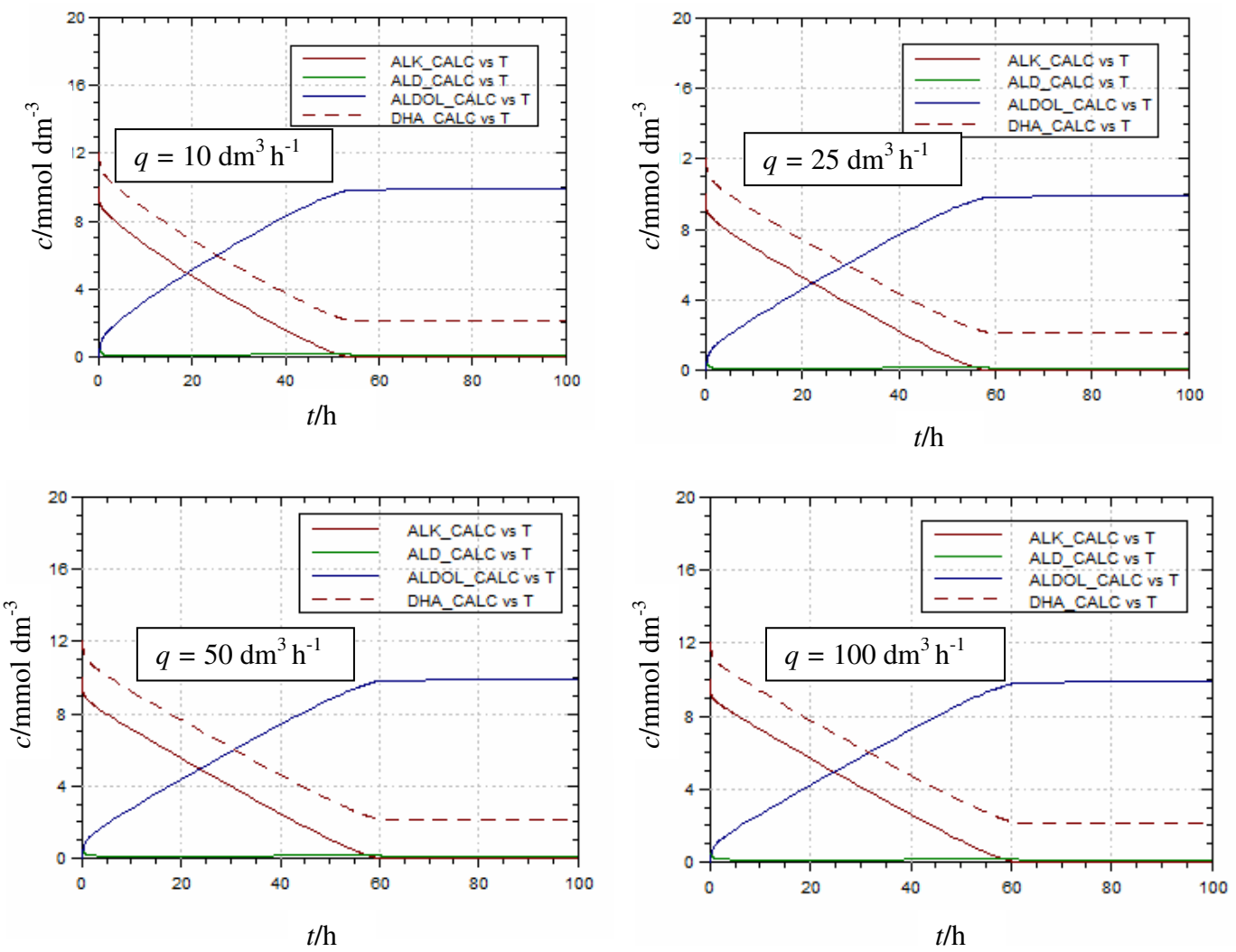
***c* (ALKOHOL) [mmol dm^{-3}]**	***c* (DHA) [mmol dm^{-3}]**	***q*** **[dm^3 h^{-1}]**	***t* (I_{MAX}) [h]**	I_{MAX} [-]
10	12	10	55	0,698
10	12	25	55	0,648
10	12	50	55	0,628
10	12	100	55	0,617



Slika 21. Grafički prikaz simulacija kaskadne reakcije u kotlastom reaktoru s dotokom pri različitim protocima uz nestabilne enzime ($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$)

Tablica 15. Vrijednosti koncentracija alkohola i dihidroksiacetona za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru s dotokom uz stabilne enzime ($k_{d1} = k_{d2} = k_{d3} = 0$)

***c* (ALKOHOL) [mmol dm^{-3}]**	***c* (DHA) [mmol dm^{-3}]**	***q* [dm^3 h^{-1}]**	***t* (I_{MAX}) [h]**	I_{MAX} [-]
10	12	10	100	0,991
10	12	25	100	0,990
10	12	50	95	0,990
10	12	100	95	0,989



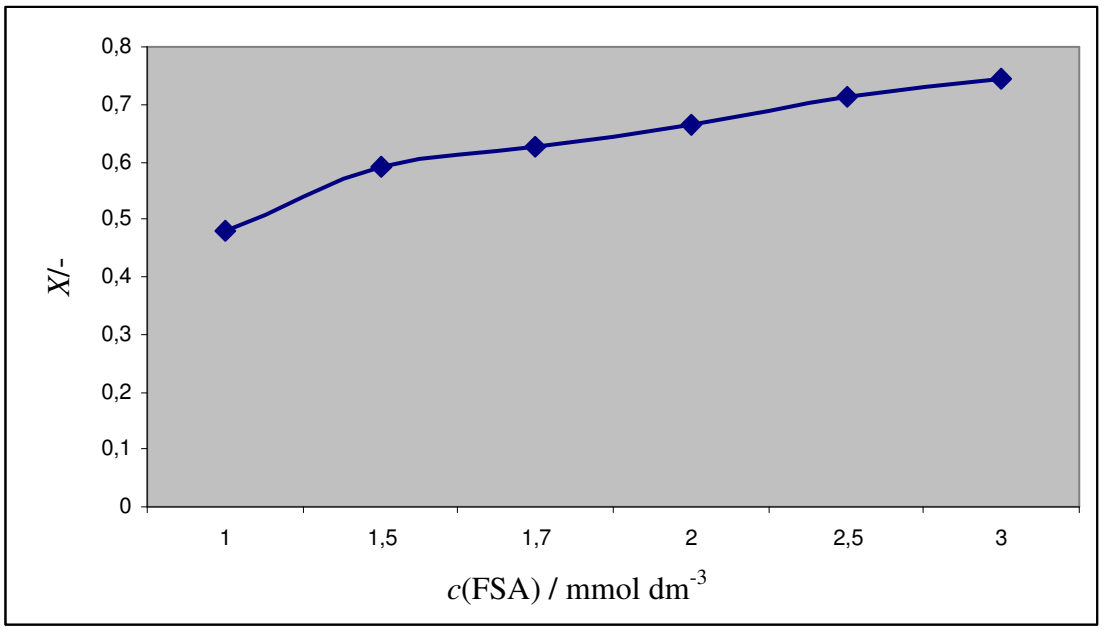
Slika 22. Grafički prikaz simulacija kaskadne reakcije u kotlastom reaktoru s dotokom uz konstantne koncentracije reaktanata te uz stabilne enzime ($k_{d1} = k_{d2} = k_{d3} = 0$)

4.3. RASPRAVA

4.3.1. REAKCIJA ALDOLNE ADICIJE

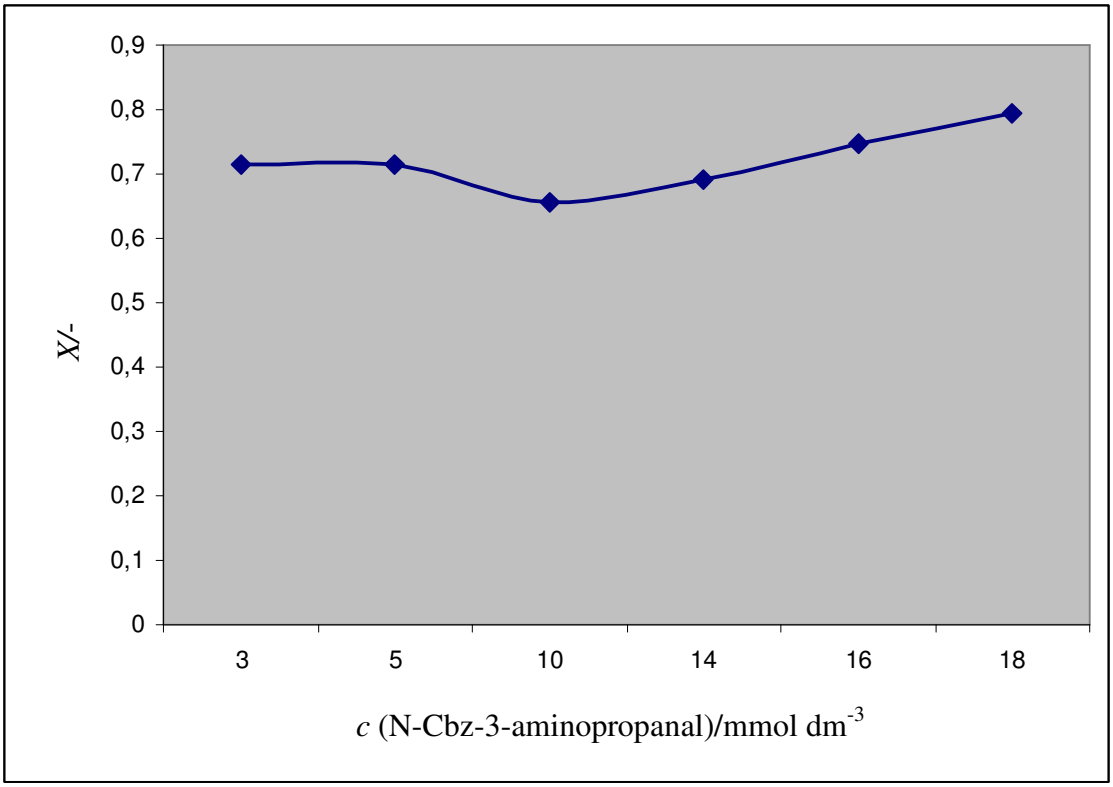
4.3.1.1. KOTLASTI REAKTOR

Na temelju rezultata dobivenih pomoću matematičkih modela u SCIENTISTU može se zaključiti da konverzija raste povećanjem koncentracije enzima što je i prikazano na slici 21.

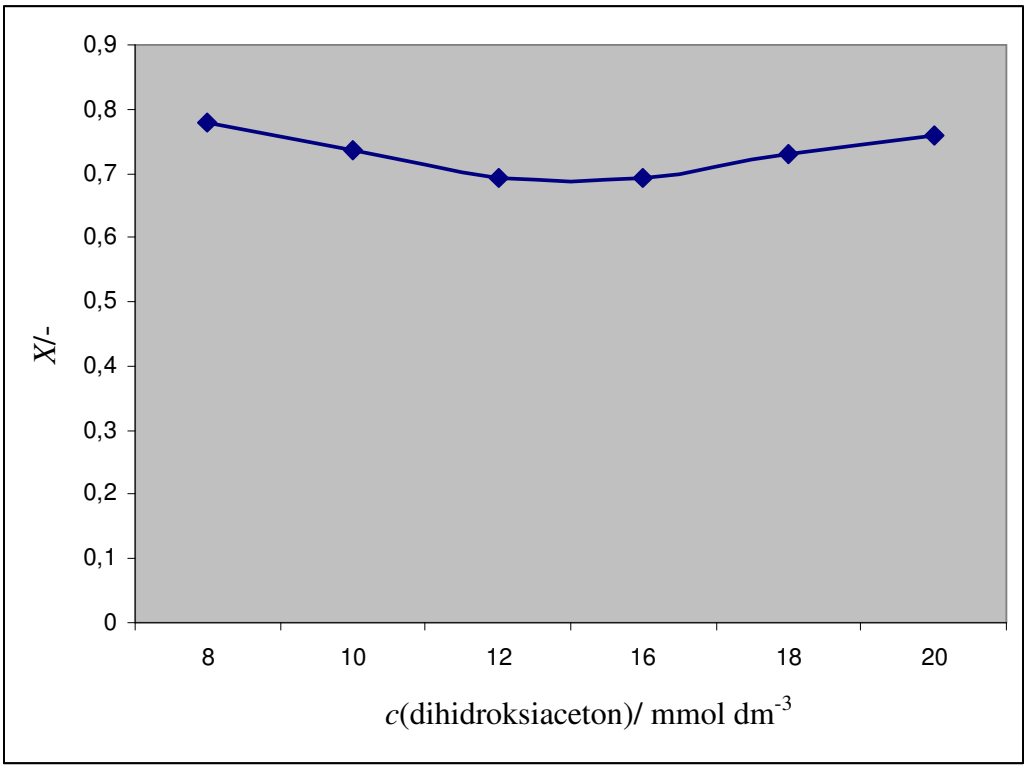


Slika 23. Ovisnost konverzije (X) o koncentraciji enzima za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru

Na slijedećim slikama 23. i 24. su grafički prikazi koji pokazuju da promjena koncentracije N-Cbz-3-aminopropanala pri konstantnoj koncentraciji dihidroksiacetona utječe na konverziju i obrnuto da promjena koncentracije dihidroksiacetona pri konstantnoj koncentraciji N-Cbz-3-aminopropanala utječe na konverziju.



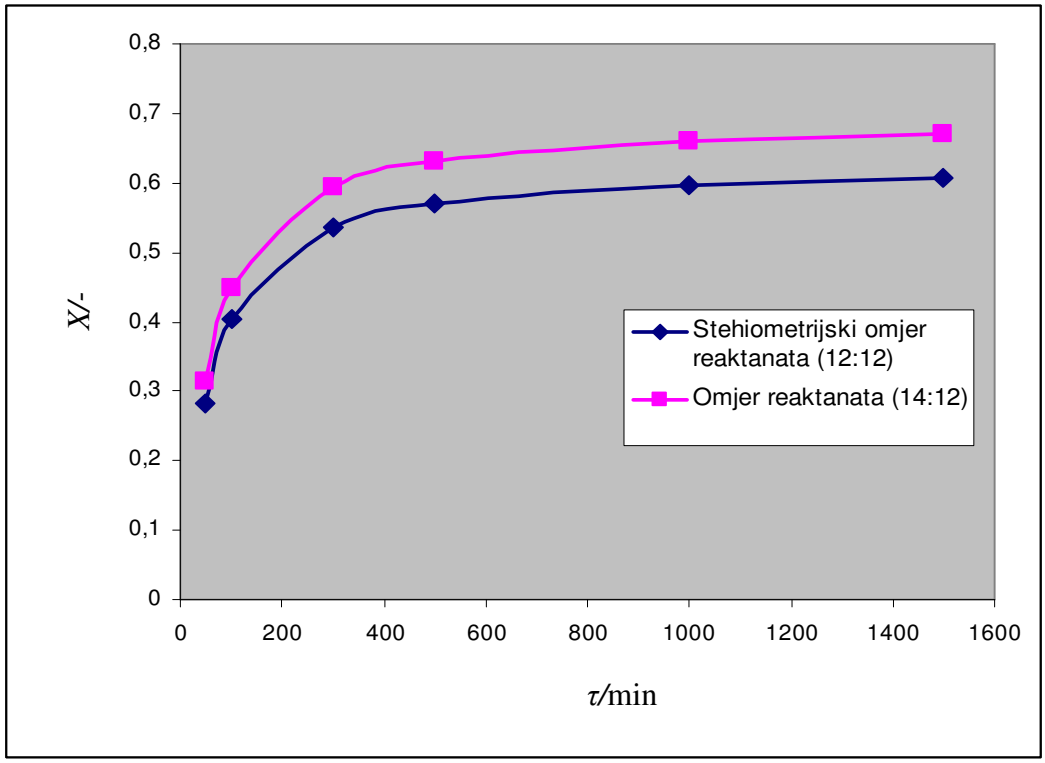
Slika 24. Ovisnost konverzije (X) o koncentraciji N-Cbz-3-aminopropanala pri konstantnoj vrijednosti dihidroksiacetona (12 mmol dm^{-3}) za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru



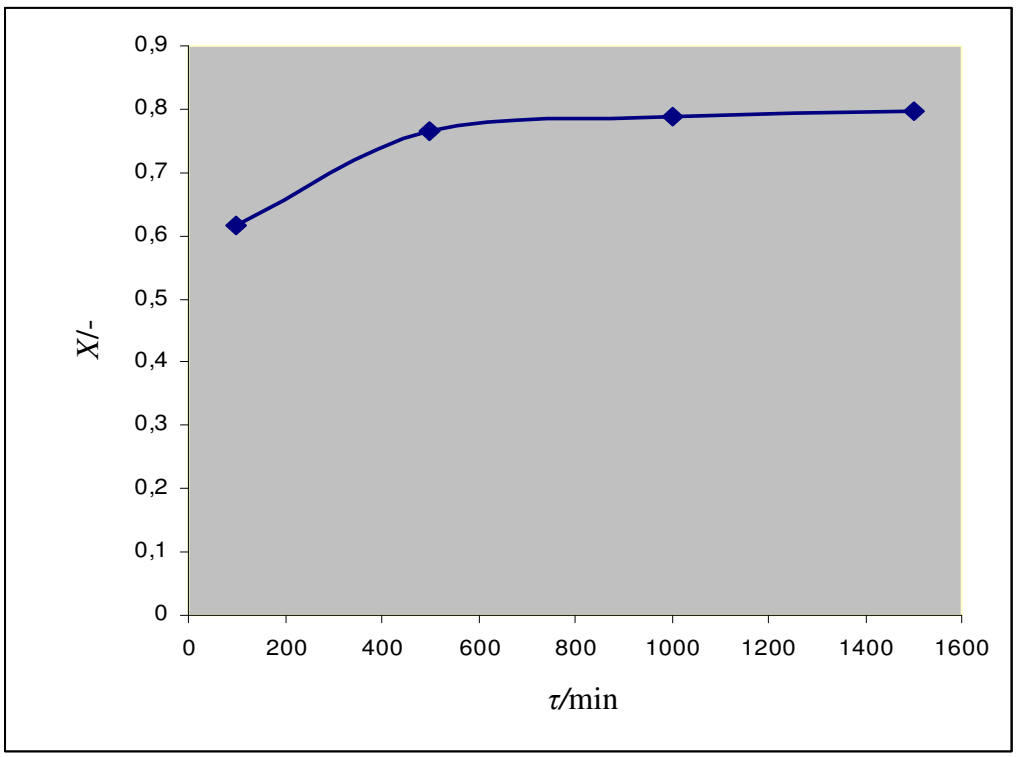
Slika 25. Ovisnost konverzije (*X*) o koncentraciji dihidroksiacetona pri konstantnoj vrijednosti N-Cbz-3-aminopropanala (14 mmol dm^{-3}) za reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru

4.3.1.2. PROTOČNO KOTLASTI REAKTOR

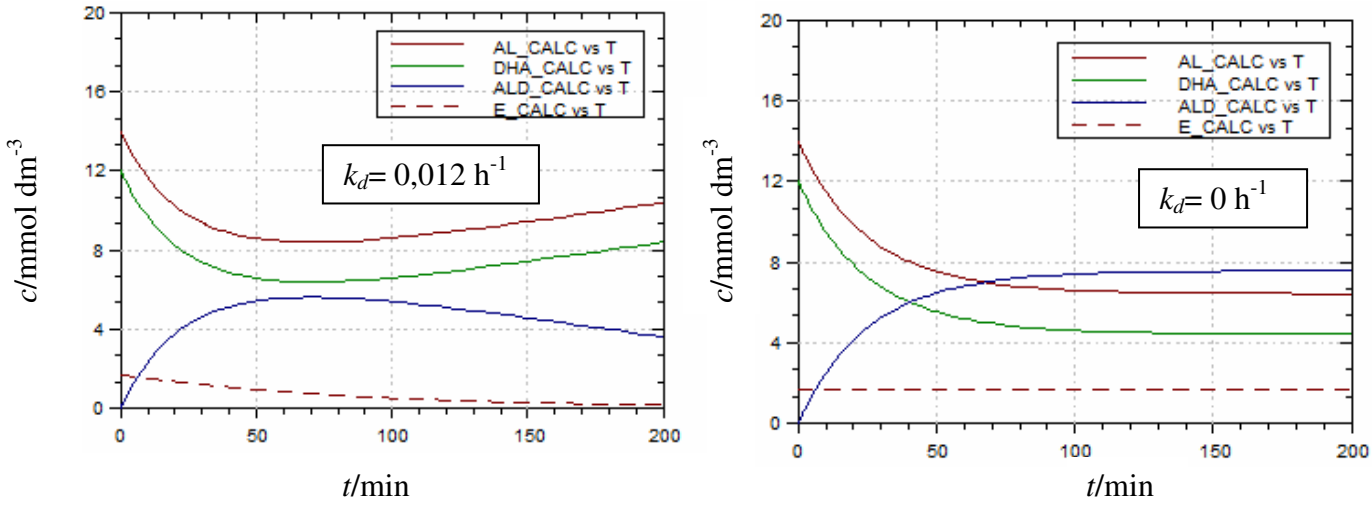
Karakteristika ovog reaktora je vrijeme zadržavanja te se na slici 25. vidi promjena konverzije promjenom vremena zadržavanja – povećanjem vremena zadržavanja povećava se i konverzija.



Slika 26. Ovisnost konverzije (X) o vremenu zadržavanja (τ) za reakciju aldolne adicije pri stehiometrijskom omjeru reaktanata (12:12) te omjeru reaktanata N-Cbz-3-aminopropanala i DHA 14:12



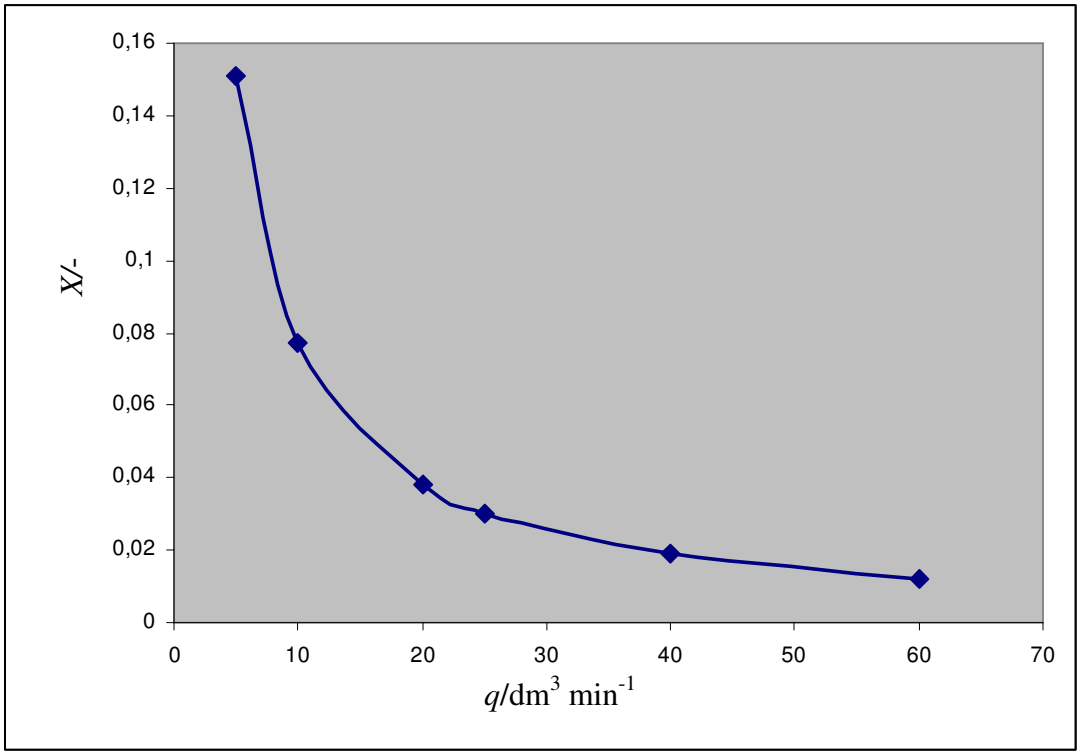
Slika 27. Ovisnost konverzije (X) o vremenu zadržavanja za reakciju aldolne adicije pri omjeru koncentracija aldehida i DHA 14:12 uz stabilan enzim ($k_d = 0$)



Slika 28. Usporedni prikaz reakcije aldolne adicije pri koncentracijama reaktanata DHA 12 mmol dm^{-3} i N-Cbz-3-aminopropanala 14 mmol dm^{-3} uz vrijeme zadržavanja τ =100 min uz k_d=0,012 h^{-1} (nestabilan enzim) i k_d = 0 (stabilan enzim)

4.3.1.3. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM

U ovom reaktoru pratila se promjena protoka te je na slici prikazan utjecaj protoka na konverziju u kotlastom reaktoru s dotokom – povećanjem protoka smanjuje se konverzija. Također se može primijetiti da je konverzija kod ovog tipa reaktora manja nego kod ostalih navedenih tipova.

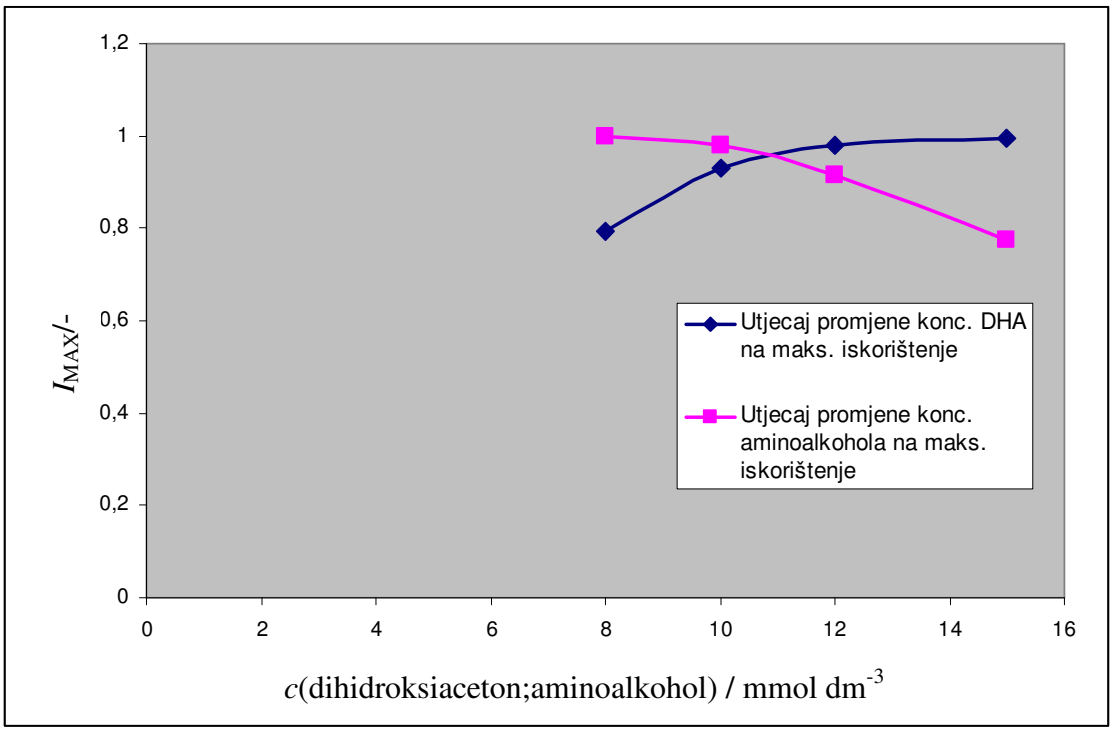


Slika 29. Ovisnost konverzije (X) o protoku uz konstantne koncentracije DHA i N-Cbz-3-aminopropanala u kotlastom reaktoru s dotokom

4.3.2. KASKADNA REAKCIJA

4.3.2.1. KOTLASTI REAKTOR

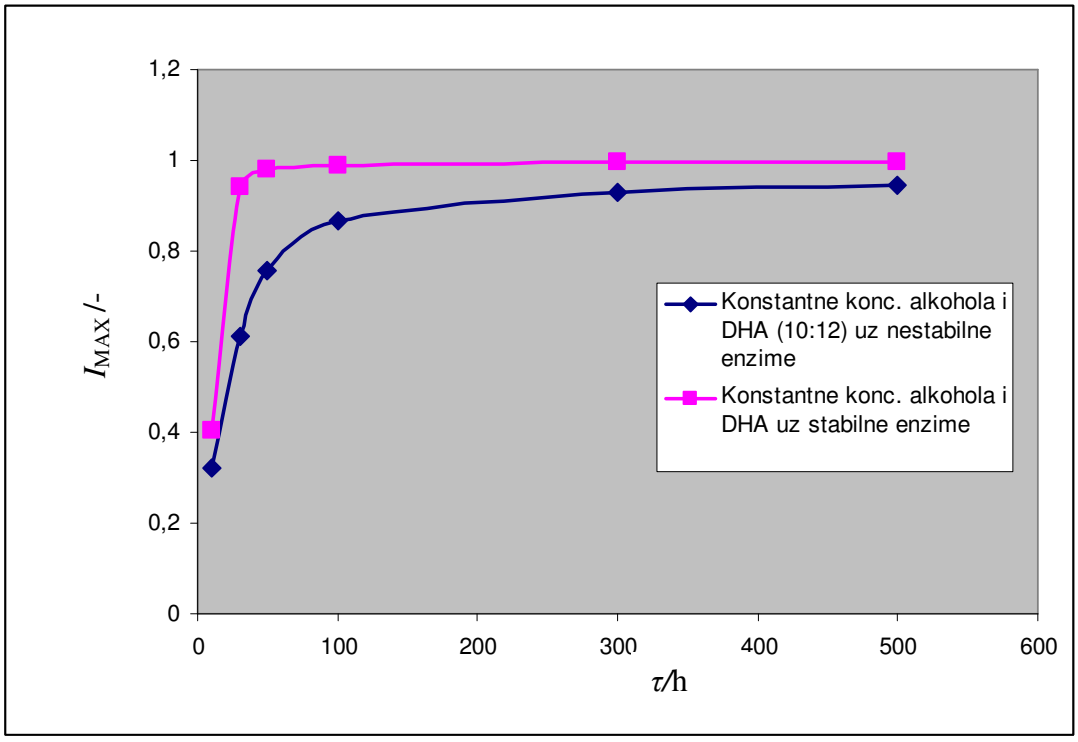
Na slici 26. prikazan je utjecaj promjene koncentracije dihidroksiacetona uz konstantnu koncentraciju aminoalkohola na maksimalno iskorištenje na aldolu te obrnuto, utjecaj promjene koncentracije aminoalkohola uz konstantnu koncentraciju dihidroksiacetona na maksimalno iskorištenje na aldolu. Kod oba slučaja uzeti su nestabilni enzimi ($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$).



Slika 30. Utjecaj promjene koncentracije reaktanata na maksimalno iskorištenje uz nestabilne enzime ($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$)

4.3.2.2. PROTOČNO KOTLASTI REAKTOR

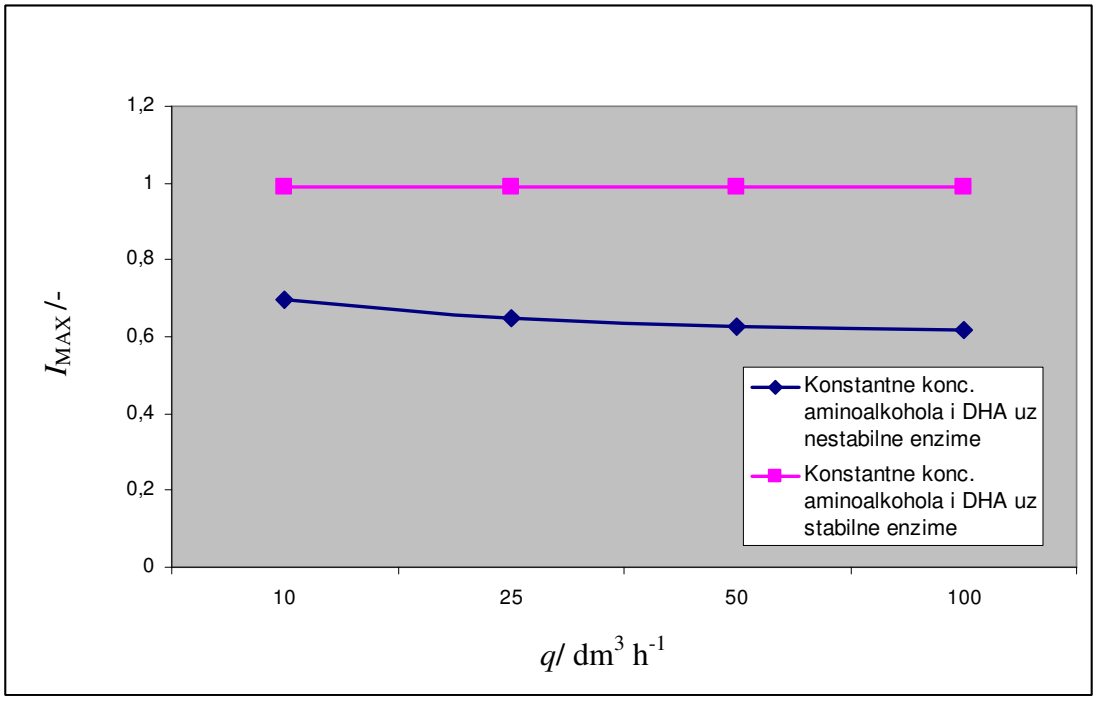
Kod kaskadne reakcije također je ispitan utjecaj vremena zadržavanja na maksimalno iskorištenje na aldolu. Na slici 25. je prikazana usporedba ovisnosti maksimalnog iskorištenja o vremenu zadržavanja za nestabilne i stabilne enzime. Iz slike se vidi da povećanjem vremena zadržavanja raste i maksimalno iskorištenje reakcije bez obzira radi li se o stabilnim ili nestabilnim enzimima.



Slika 31. Usporedba ovisnosti iskorištenja (I_{MAX}) o vremenu zadržavanja (τ) uz nestabilne($k_{d1} \neq k_{d2} \neq k_{d3} \neq 0$) i stabilne enzime ($k_{d1} = k_{d2} = k_{d3} = 0$)

4.3.2.3. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM

Kao i kod reakcije aldolne adicije, kod ovog tipa reaktora pratio se utjecaj promjene protoka na maksimalno iskorištenje reakcije. Iz slike 26. vidi se da povećanjem protoka pada maksimalno iskorištenje kaskadne reakcije.



Slika 32. Ovisnost maksimalnog iskorištenja (I_{MAX}) o protoku uz konstantne koncentracije DHA i amino alkohola u kotlastom reaktoru s dotokom

5. ZAKLJUČAK

5.1. ALDOLNA ADICIJA

Na temelju rezultata dobivenih u kotlastom reaktoru može se zaključiti da konverzija mjerodavnog reaktanta raste povećanjem koncentracije enzima (FSA), a ovisi o omjeru koncentracija reaktanata tj. N-Cbz-3-aminopropanala i dihidroksiacetona.

U protočno kotlastom reaktoru konverzija raste povećanjem vremena zadržavanja te ovisi o tome da li je enzim stabilan ili nestabilan. Kad je enzim nestabilan u protočno kotlastom reaktoru teško je ostvariti stacionarnu konverziju odnosno moguće ju je ostvariti samo pri nekim ekstremnim uvjetima, pa je konverzija o kojoj je bila riječ procijenjena nakon vremena trajanja od 100 minuta.

U kotlastom reaktoru s dotokom konverzija opada povećanjem protoka.

5.2. KASKADNA REAKCIJA

Maksimalno iskorištenje na aldolu u kotlastom reaktoru ovisi o omjeru koncentracija reaktanata i najveće je pri koncentracijama aminoalkohola 10 mmol dm^{-3} i dihidroksiacetona 15 mmol dm^{-3} kada su svi enzimi nestabilni.

U protočno kotlastom reaktoru povećanjem vremena zadržavanja raste i maksimalno iskorištenje na aldolu te je ono najveće pri τ = 500h te pri koncentracijama aminoalkohola 10 mmol dm^{-3} i 12 mmol dm^{-3} dihidroksiacetona.

Maksimalno iskorištenje u reaktoru s dotokom kada su enzimi nestabilni opada povećanjem protoka,a kada su enzimi stabilni raste porastom protoka.

6. LITERATURA

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

2. Dunn I.J., Heinzle E., Ingham J., Prenosil J.E., Principles, Applications and Modelling with PC Simulations (1992), Biol React Eng, Wiley – VCH, Weinheim, str. 25 – 31, 113.

3. Duraković S., Opća mikrobiologija (1996), Prehrambeno tehnološko inženjerstvo, Zagreb, str. 231 – 232.

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

5. Gomzi Z., Kemijski reaktori, Hinus, Zagreb, 1998., str. 27 – 35, 48 – 61.

6. Hranuelli F., Jakobović Z., Podlesnik V., Viličić F., Tehnička enciklopedija 5. dio, Zagreb, 1976., str. 334 – 345.

7. http://hr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli (pristup 24. veljače 2015.)

8. http://znano.st/znanost-zdravlje-i-medicina/3/sto-novo-saznajemo-o-zloglasnoj-bakteriji-e-coli/1120/ (pristup 26. ožujka 2015.)

9.https://www.fkit.unizg.hr/_download/repository/Kemijski_i_biokemijski_reaktori-Enzimska_kinetika.pdf (pristup 24. ožujka 2015.)

10.http://www.ptfos.unios.hr/joomla/modeli/images/files/prezentacije/Uvod%20u%20matematicko%20modeliranje.pdf (pristup 24. ožujka 2015.)

11. http://hr.wikipedia.org/wiki/Enzim (pristup 15. travnja 2015.)

12. Pine S.H., Organska kemija,Školska knjiga, Zagreb, 1994., str. 404 – 410

13. 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.

14. Sudar M., Findrik Z., Vasić – Rački Đ.,Soler A., Clapés P., A new concept for production of (3*S*,4*R*)-&-[(benzyloxycarbonyl)amino]-5,6-dideoxyhex-2-ulose,a precursor of D-fagomine, Rad prihvaćen za objavu, RSC Advances (2015) DOI: 10.1039/C5RA14414K

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

16. Sudar M., Findrik Z., Vuković Domanovac M., Vasić-Rački Đ., Coenzyme regeneration Catalyzed by NADH oksidase from *Lactococcus lactis*, Biochemical Engineering Journal, 88 (2014) 12-18

17. Štorek H., Optimiranje biosinteze oksido-redukcijskih biokatalizatora, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2002., str. 7 – 9.
18. Vasić-Rački Đ., Biokemijsko inženjerstvo, Kem Ind 39, 1990., 459-467
19. Visković Katica, Utjecaj kalcijevih iona na stabilizaciju α-amilaze pri hidrolizi škroba, Studentski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2009., str. 5, 23-24

7. PRILOZI

7.1. MATEMATIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE U KOTLASTOM REAKTORU U SCIENTISTU

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: T
DepVars: AL,DHA,ALD,E,X
Params: KAL, KDHA, KALD,KIAL,VM1,VM2

//matematicki model
R1=(VM1*AL*DHA*E)/((KAL+AL)*(KDHA+DHA))
R2=VM2*ALD*E/(KALD*(1+AL/KIAL)+ALD)
AL'=-R1+R2
DHA'=-R1+R2
ALD'=R1-R2
E'=-kd*E
X=(DHA0-DHA)/DHA0

//pocetne vrijednosti
T=0
AL=14
AL0=14
DHA0=12
DHA=12
ALD0=0
ALD=0
E=1.7

//vrijednosti parametara
KAL=37.9
KDHA=17.1
KALD=293.51
KIAL=0.02
kd=0.012
VM1=1.6
VM2=39.8
***
```

7.2. MATEMATIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE U PROTOČNO KOTALSTOM REAKTORU U SCIENTISTU

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: T
DepVars: AL,DHA,ALD,E,X
Params: KAL, KDHA, KALD,KIAL,VM1,VM2

//matematicki model
R1=(VM1*AL*DHA*E)/((KAL+AL)*(KDHA+DHA))
R2=VM2*ALD*E/(KALD*(1+AL/KIAL)+ALD)
AL'=(AL0-AL)/TAU-R1+R2
DHA'=(DHA0-DHA)/TAU-R1+R2
ALD'=(ALD0-ALD)/TAU+R1-R2
E'=-kd*E
X=(DHA0-DHA)/DHA0

//pocetne vrijednosti
T=0
AL=14
AL0=14
DHA0=12
DHA=12
ALD0=0
ALD=0
E=1.7

//vrijednosti parametara
KAL=37.9
KDHA=17.1
KALD=293.51
KIAL=0.02
kd=0.012
VM1=1.6
VM2=39.8
TAU=50
***
```

7.3. MATEMATIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE U KOTLASTOM REAKTORU S DOTOKOM U SCIENTISTU

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: T
DepVars: AL,DHA,ALD,E,X
Params: KAL, KDHA, KALD,KIAL,VM1,VM2

//matematicki model
R1=(VM1*AL*DHA*E)/((KAL+AL)*(KDHA+DHA))
R2=VM2*ALD*E/(KALD*(1+AL/KIAL)+ALD)
AL'=(q*(AL0-AL))/V-R1+R2
DHA'=(q*(DHA0-DHA))/V-R1+R2
ALD'=(q*(ALD0-ALD))/V+R1-R2
E'=-kd*E
X=(DHA0-DHA)/DHA0

//pocetne vrijednosti
T=0
AL=14
AL0=14
DHA0=12
DHA=12
ALD0=0
ALD=0
E=1.7

//vrijednosti parametara
KAL=37.9
KDHA=17.1
KALD=293.51
KIAL=0.02
kd=0.012
VM1=1.6
VM2=39.8
V=100
q=5
***
```

7.4. MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE U KOTLASTOM REAKTORU U SCIENTISTU

```
// MicroMath Scientist Model File-KASKADNA REAKCIJA
IndVars: T
DepVars: ALK,NAD,NADH,O, ALD,ALDOL,DHA, E1,E2, E3,R1,R2,R3,I
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
I=ALDOL/ALK0
//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
kd2=0
kd3=0
kL=1.134
OZ=0.28
//Pocetne vrijednosti
T=0
ALK=10
ALK0=10
```

NAD=1
NAD0=1
NADH=0
NADH0=0
O=0.27
O0=0.27
ALD=0
ALD0=0
DHA=12
DHA0=12
ALDOL=0
ALDOL0=0
E1=5
E2=0.49
E3=2.1
***

7.5. MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE U PROTOČNO KOTLASTOM REAKTORU U SCIENTISTU

```
// MicroMath Scientist Model File-KASKADNA REAKCIJA
IndVars: T
DepVars: ALK,NAD,NADH,O, ALD,ALDOL,DHA, E1,E2, E3,R1,R2,R3,I
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-O)/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
I=ALDOL/ALK0
//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
// kd2=0
// kd3=0
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=0.28
NAD0=1
```

```
NADH0=0
TAU=10
//Pocetne vrijednosti
T=0
ALK=ALK0
NAD=NAD0
NADH=NADH0
O=O0
ALD=ALD0
DHA=DHA0
ALDOL=ALDOL0
E1=5
E2=0.49
E3=2.1
***
```

7.6. MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE U KOTLASTOM REAKTORU S DOTOKOM U SCIENTISTU

```
// MicroMath Scientist Model File-KASKADNA REAKCIJA-FED-BATCH
IndVars: T
DepVars: ALK,NAD,NADH,O, ALD,ALDOL,DHA, E1,E2, E3,R1,R2,R3,I
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'=q*(ALK0-ALK)/V-R1
NAD'=q*(NAD0-NAD)/V-R1+R2
NADH'=q*(NADH0-NADH)/V+R1-R2
O'=q*(O0-O)/V-R2+R4
ALD'=q*(ALD0-ALD)/V+R1-R3
DHA'=q*(DHA0-DHA)/V-R3
ALDOL'=q*(ALDOL0-ALDOL)/V+R3
V'=F
E1'=-kd1*E1
E2'=-kd2*E2
E3'=-kd3*E3
I=ALDOL/ALK0
//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=25.23
ALDOL0=0
O0=0.28
NAD0=1
NADH0=0
q=10
```

```
//Pocetne vrijednosti
T=0
ALK=ALK0
NAD=NAD0
NADH=NADH0
O=O0
ALD=ALD0
DHA=DHA0
ALDOL=ALDOL0
E1=5
E2=0.49
E3=2.1
V=100
***
```