

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

Ana Vrsalović Presečki

**STUDIJ PROCESA PRIDOBIVANJA ENZIMA U
RASTUĆIM STANICAMA PEKARSKOG KVASCA**

MAGISTARSKI RAD

Zagreb, 2003.

UDK: 66:663.14:663.15:681.5.015 (043.2)=862

Znanstveno područje: tehničke znanosti

Znanstveno polje: kemijsko inženjerstvo

Institucija: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Voditelj rada: Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof.

Broj stranica: 98

Broj slika: 63

Broj tablica: 12

Broj literarnih referenci: 80

Datum obrane: 11.studenog, 2003.

Sastav povjerenstva za obranu:

1. Dr. sc. Želimir Kurtanjek, red. prof. PBF-a
2. Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof. FKIT-a
3. Dr. sc. Felicita Briški, doc. FKIT-a

Institucije u kojima je rad pohranjen:

1. Knjižnica Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, Marulićev trg 20
2. Nacionalna i sveučilišna biblioteka u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice, bb

Tema rada "Studij procesa pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca" prihvaćena je na sjednici Znanstveno nastavnog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 02. prosinca 2002. godine.

SAŽETAK

U ovom radu proveden je uzgoj pekarskog kvasca u kotlastom bioreaktoru Razvijen je matematički model za opis proizvodnje enzima alkohol dehidrogenaze, koji se biosintetizira u pekarskom kvascu ovisno o uvjetima uzgoja.

Na temelju podataka dobivenih uzgojem pekarskog kvasca pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} \approx 30 \text{ g dm}^{-3}$ i mikraerofilnim uvjetima, postavljen je nestrukturni matematički model procesa. Parametri modela procijenjeni su nelinearnom regresijskom analizom korištenjem simpleks metode optimiranja po Nelder-Mead-u. Provedena je ocjena valjanosti modela tako da su rezultati simulacija procesa uz pomoć procijenjenih parametara uspoređeni sa rezultatima pokusa, te je utvrđeno njihovo slaganje. Model je validiran pri različitim početnim koncentracijama glukoze, te aerobnim uvjetima. Validacijom modela pri mikraerofilnim uvjetima, ali pri različitim početnim koncentracijama glukoze pokazano je da matematički model vrijedi u rasponu početnih koncentracija glukoze $c_{G0} = 5 - 50 \text{ g dm}^{-3}$, dok pri aerobnim uvjetima predloženi model dobro opisuje nastajanje biomase, potrošnju glukoze te promjenu koncentracije etanola tijekom pokusa. Pri aerobnim uvjetima dobivena je manja volumna aktivnost enzima ADH u odnosu na koncentraciju biomase.

Ključne riječi: pekarski kvasac, enzim, alkohol dehidrogenaza, modeliranje

ABSTRACT

Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is a very important source of different metabolites, especially enzymes, which is produced under different conditions. In this work baker's yeast cultivation in the batch bioreactor was carried out for developing a mathematical model to describe production of enzyme alcohol dehydrogenase. Oxidoreduction enzyme alcohol dehydrogenase, especially important for analytical purpose, is synthesized by baker's yeast under special conditions.

Two sets of baker's yeast cultivations with the initial glucose concentration of 30 g dm⁻³ and under microaerophilic conditions were carried out for the model development. The unstructured model was chosen for describing kinetic of baker's yeast growth and consumption of substrate. Model parameters were estimated by nonlinear regression using simplex method by Nelder-Mead. Comparing the results of simulation, which were done by using does estimated parameters, and the experimental results, statistical model evaluation was done. Model is validated for different initial glucose concentrations under microaerophilic and aerobic conditions. By model validation is shown that mathematical model is valid for the cultivations under microaerophilic conditions with the initial glucose concentration between 5 – 50 g dm⁻³. Under aerobic conditions proposed model is valid for describing biomass production, glucose consumption and change of ethanol concentration during the experiment. A lower volume activity of enzyme ADH in relation to the assigned biomass concentration, under aerobic conditions, was observed.

Key words: baker's yeast, enzyme, alcohol dehydrogenase, modelling

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. OPĆENITO O KVASCIMA	3
2.2. PEKARSKI KVASAC (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	4
2.2.1. Životni ciklus stanica <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2.2.2. Fiziologija stanica pekarskog kvasca	5
2.2.3. Uvjeti uzgoja pekarskog kvasca	8
2.2.3.1. Utjecaj koncentracije biomase na reološka svojstva reakcijskog medija	10
2.2.4. Krivulja rasta	10
2.3. PRIMJENA PEKARSKOG KVASCA U INDUSTRIJI	12
2.3.1. Industrijska proizvodnja etanola	12
2.3.2. Proizvodnja kvaščeve biomase	13
2.3.3. Pekarski kvasac kao izvor biokatalizatora	14
2.3.3.1. Pekarski kvasac u organskoj sintezi	15
2.3.3.2. Primjeri redukcije karbonilnih veza	17
2.3.3.3. Primjeri ostalih reakcija	22
2.4. ENZIMI	25
2.5. ALKOHOL DEHIDROGENAZA	27
2.5.1. Izoenzimi YADH	28
2.5.2. Specifičnost enzima	28
2.5.3. Primarna struktura	29
2.5.3.1. Aktivna mjesta	29
2.6. MODELI RASTA BIOMASE	31
2.6.1. Modeli nastajanja produkata	32
2.6.1.1. Modeli proizvodnje enzima u stanici	33
2.6.2. Matematički modeli rasta pekarskog kvasca	37
2.6.2.1. Model A. H. E. Bijkerka i R. J. Halla	37
2.6.2.2. Model B. Sonnleitnera i O. Käppelia	38
3. EKSPERIMENTALNI DIO	42
3.1. UZGOJ PEKARSKOG KVASCA NA TRESILICI	42

3.1.1. Djelatni kvasac	42
3.1.2. Hranjive podloge	42
3.1.2.1. Podloga za izolaciju, uzgoj i čuvanje kvasca	42
3.1.2.2. Podloga za uzgoj kvasca za pripravu inokuluma	42
3.1.2.3. Podloga za pripravu inokuluma i uzgoj pekarskog kvasca u bioreaktoru	42
3.1.3. Priprava inokuluma	43
3.2. UZGOJ PEKARSKOG KVASCA U BIOREAKTORU	43
3.2.1. Bioreaktor	43
3.2.2. Proces proizvodnje enzima alkohol dehidrogenaze u šaržnom bioreaktoru	44
3.2.3. Postupak uzimanja uzorka iz reaktora	45
3.2.4. Sterilizator	45
3.2.5. Spektrofotometar	45
3.2.6. Centrifuga	45
3.2.7. Tresilica	46
3.3. ANALITIČKE METODE	46
3.3.1. Određivanje koncentracije biomase	46
3.3.2. Određivanje aktivnosti enzima ADH u stanici	46
3.3.3. Određivanje koncentracije etanola	49
3.3.4. Određivanje koncentracije proteina	50
3.3.5. Određivanje koncentracije glukoze	51
4. MODELIRANJE	53
4.1. MODELIRANJE UZGOJA PEKARSKOG KVASCA I NASTAJANJE ENZIMA ADH	53
4.2. NELINEARNO OPTIMIRANJE PARAMETARA MODELA	57
4.2.1. Metoda Nelder-Meada	58
4.3. RJEŠAVANJE DIFERENCIJALNIH JEDNADŽBI MODELA	59
4.3.1. Metoda Runge-Kutta IV	59
4.3.2 Episode algoritam	60
5. REZULTATI I RASPRAVA	61
5.1. OPTIMIRANJE UZGOJA INOKULUMA	62
5.2. RAZVOJ MODELA	63
5.3. VALIDACIJA MODELA PRI RAZLIČITIM POČETNIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE	67

5.3.1. Validacija modela pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$	68
5.3.2. Validacija modela pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$	70
5.3.3. Validacija modela pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$	72
5.4. VALIDACIJA MODELA PRI AEROBNIM UVJETIMA	74
5.4.1. Validacija modela pri aerobnim uvjetima pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$	74
5.4.2. Validacija modela pri aerobnim uvjetima pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$	76
5.5. PREDVIĐANJE PROIZVODNJE ENZIMA ADH PRI RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA KISIKA	81
5.6. PREDVIĐANJE PROIZVODNJE ENZIMA ADH U RAZLIČITIM VOLUMENIMA REAKCIJSKE SMJESE	84
6. ZAKLJUČAK	86
7. LITERATURA	87
8. PRILOZI	93
SIMBOLI	
SKRAĆENICE	

1. UVOD

Miroorganizmi se sve više upotrebljavaju kao izvori biokatalizatora, jer posjeduju enzime koji omogućuju provođenje biotransformacija. Njihovom se upotrebom izbjegava visoka cijena izolacije i pročišćavanja enzima. Mogu se koristiti imobilizirani na čvrstu podlogu ili u suspenziji kao i čisti enzimi¹. Također postoji mogućnost regeneracije enzima unutar imobilizirane cijele stanice inkubacijom na hranjivoj podlozi². Zbog ovih prednosti, enzimi u cijelim stanicama mikroorganizama, kao biokatalizatori, sve više dobivaju na važnosti, pa se stoga i javlja sve veća potreba za njihovim boljim poznавanjem.

Enzimi u cijeloj stanci pekarskog kvasca su privukli pažnju, kao potencijalni biokatalizatori, zbog niske cijene pekarskog kvasca, jednostavnog uzgoja stanice i nepatogenosti³. Posebno je važna nepatogenost jer se u današnje vrijeme sve više pažnje poklanja zaštiti i očuvanju okoliša.

Jedan od enzima koji je produkt metabolizma pekarskog kvasca je enzim alkohol dehidrogenaza. Enzim alkohol dehidrogenaza pripada grupi oksidoreduktaza. To je enzim koji reagira uz koenzim nikotinamid adenin dinukleotidu, koji je uključen u dvo-elektronske oksidacije ili redukcije. Enzim alkohol dehidrogenaza katalizira enantioselektivnu oksidaciju primarnih alkohola kojom se pripravljaju kiralni aldehydi. Isto tako katalizira oksidaciju serije α-hidroksi i α-amino alkohola u odgovarajuće aldehyde, te oksidaciju D- i L-amino alkohola u amino aldehyde⁴.

Pridobivanje ADH je direktno vezano s koncentracijom otopljenog kisika i glukoze u mediju u kojem se uzgaja pekarski kvasac, pa ako su dobro proučeni uvjeti nastajanja enzima može se osigurati njegova uspješna proizvodnja.

Napredak biotehnologije je otvorio potrebu za kvantitativnim vrednovanjem procesa s mikroorganizmima kako bi se oni mogli uspješnije iskoristiti u industrijske svrhe⁵. Zato se radi na matematičkim modelima koji opisuju brzinu rasta mikroorganizama i omogućuju predviđanje ponašanja bioprosesa s mikroorganizmima u različitim uvjetima. Oni također omogućuju optimiranje bioprosesa, predviđanje uvjeta dobivanja maksimalnog iskorištenja na željenom produktu, te optimiranje vremena njegove proizvodnje. Mikroorganizmi su sami po sebi, iako jednostavne građe, vrlo kompleksni organizmi, te nije jednostavno matematičkim modelom opisati reakcije koje se događaju u njihovim stanicama, odnosno reakcije pomoću tih stanica.

U literaturi se mogu pronaći različiti matematički modeli koji opisuju brzinu rasta pekarskog kvasca. Neki su razvijeni obzirom na asimetrični dinamički odgovor na skokomičnu promjenu u dotoku supstrata⁶, dok je u drugima naglasak dan na specifične aspekte vezane uz samu stanicu mikroorganizma, kao što su duljina staničnog životnog ciklusa ili raspodjela starosti stanice⁷. Velika pažnja se posvećivala i tome da se matematičkim modelima koje opisuju brzinu rasta stanica opiše i dugi period prilagodbe na respiraciju⁸ ili rast u periodu prilagodbe⁹. Novija istraživanja su usmjereni na pronalaženje strukturnih matematičkih modela koji se temelje na opisu brzina unutarstaničnih reakcija, a samim time i na brzine proizvodnje intracelularnih enzima^{10,11,12}.

Namjera ovog rada je bila da se prikupe informacije o ponašanju kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, te pomoći njih napravi nestrukturni matematički model, kako bi se optimirala brzina rasta pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), te pronašla zavisnost brzine rasta, količine biomase i brzine dobivanja enzima alkohol dehidrogenaze (ADH).

2. OPĆI DIO

2.1. OPĆENITO O KVASCIMA

Kvasci pripadaju carstvu *Fungi*, zajedno sa pljesnima i mesnatim gljivama. *Fungi* su eukarioti, a mogu biti jednostanični ili višestanični. S obzirom da nemaju klorofil, nemaju mogućnost obavljanja fotosinteze, pa do hrane dolaze apsorpcijom iz okoline.

Stanice kvasca su kuglastog ili jajolikog oblika, promjera 5-8 µm. Razmnožavaju se najčešće nespolnim načinom, tj. pupanjem. Na roditeljskoj stanci raste pup, jezgra se dijeli i jedna odlazi u pup, koji se otkida kada dostigne veličinu osnovne stanice¹³.

Kvasci zasigurno po brojnosti čine ekonomski najznačajniju skupinu mikroorganizama. Zbog svoje klasične industrijske primjene u dizanju tijesta, te u fermentacijama piva i vina, *Saccharomyces cerevisiae* je najpoznatija vrsta iz roda *Saccharomyces*, tako da se često pojam kvasac i *Saccharomyces cerevisiae* upotrebljavaju kao sinonimi. Inače kvasci iz roda *Saccharomyces* su specifični po tome što se ubrajaju među malobrojne kvasce koji mogu rasti i u anaerobnim uvjetima¹⁴. Drugi fermentativni kvasci kao što su oni iz rodova *Candida* i *Kluyveromyces* trebaju određenu količinu kisika za rast. Takvi kvasci zahtijevaju strogu kontrolu dobave kisika tijekom procesa, te stoga imaju manju produktivnost pri proizvodnji etanola. Nadalje kvasci iz roda *Saccharomyces* manje su osjetljivi na visoke koncentracije etanola, te se upravo zbog toga koriste za proizvodnju etanola.

U novije vrijeme tradicionalna primjena kvasaca u klasičnim biotehnološkim procesima proširena je i na područje moderne biotehnologije, kao rezultat upotrebe rekombinantne DNK. Naime od 1978. kada je pokazano da se kvasac može transformirati sa stranom (heterolognom) DNK, napravljen je znatan napredak na tom području¹⁵. U mnogim industrijskim procesima kvasci se koriste više nego bakterije za proizvodnju mnogih heterolognih proteina, zbog činjenice da pripadaju u eukariotske organizme. To im omogućuje pravilno provođenje post-translacijskih promjena, što ima za posljedicu dobivanje proteina željene biološke aktivnosti. Nadalje, značajna prednost kvasaca u usporedbi s bakterijama je ta što u hranjivu podlogu mogu izlučiti u potpunosti pravilno nabrane heterologne proteine. Obzirom da kvasci izlučuju samo ograničen broj proteina, strani proteini mogu biti proizvedeni u relativno čistom obliku što ujedno procese izolacije čini manje kompleksnim.

U počecima primjene tehnologije rekombinantne DNK sa stanicama kvasaca, *Saccharomyces cerevisiae* je gotovo isključivo upotrebljavan kao radni mikroorganizam. Međutim, uočene su određene negativne karakteristike koje posjeduje ovaj kvasac kao domaćin za ekspresiju heterolognih proteina, a to su: prekomjerna glikolizacija heterolognih, većinom humanih proteina¹⁶, ograničen kapacitet izlučivanja proteina, nedostatak pogodnih inducibilnih promotora, naglašen Crabtree učinak^{17,18}. Upravo posljednja navedena karakteristika zahtijeva strogu kontrolu koncentracije šećera u hranjivoj podlozi kako bi se dobilo što veće iskorištenje biomase, a samim tim i veća količina željenog proteina. Zbog toga industrijska primjena kvasca *Saccharomyces cerevisie* kao domaćina za ekspresiju heterolognih proteina postaje sve manje interesantna. Stoga su se razvijali ekspresijski sustavi kod drugih kvasaca. Među onima koji se danas najčešće upotrebljavaju su kvasci koji rastu na laktazi iz roda *Kluyveromyces*, metanolotrofni kvasci vrsta *Hansenula polymorpha* i *Pichia pastoris*, kvasac koji se užgaja na alkanima *Yarrowia lipolytica*, te kvasac *Schizosaccharomyces pombe*. Njihove osnovne prednosti kao domaćina za ekspresiju heterolognih proteina su u široj specifičnosti za supstrate, u postojanju jakih inducibilnih promotora, te odsutnosti alkoholne fermentacije (ne pokazuju Crabtree učinak). Stoga se očekuje da će upotreba takvih kvasaca za proizvodnju heterolognih proteina postati uobičajena industrijska praksa.

2.2. PEKARSKI KVASAC (*Saccharomyces cerevisiae*)

U elementarnom sastavu pekarskog kvasca prevladavaju ugljik (48 %), kisik (31 %), dušik (8 %) i vodik (7 %). Biomasa se također sastoji od kalija, fosfora, magnezija, kalcija, sumpora i ostalih elemenata u tragovima.

Stanice kvasca, uz to što imaju veliku ulogu u proizvodnji kruha, piva, vina i alkohola, se sve više upotrebljavaju za biotransformacije, te u proizvodnji proteina uz modificiranje stanica genetičkim inženjeringom.

Iako se kvasac upotrebljava za proizvodnju alkoholnih pića još od davnih vremena, biokemijski putovi pri proizvodnji etanola i sama uloga kisika u njima još uvijek nije sasvim objašnjena. Kisik je sigurno potreban za biosintezu sterola i zasićenih masnih kiselina i vrlo vjerojatno nikotinske kiseline, te se bez njegovog korištenja ove tvari moraju dodavati u hranjivu podlogu. Kod procesa proizvodnje pekarskog kvasca mora se težiti optimiranju iskorištenja na kvaščevoj biomasi, dok se kod procesa proizvodnje alkoholnih pića zahtijeva minimaliziranje broja stanica kvasca, a sam proces je usmjeren na povećanje akumulacije

metabolita, posebno etanola. Za proizvodnju kvasca u velikim količinama, potrebno je dodavati supstrat postupno, da se ograniči količina proizvedenog etanola. Iako stanice naknadno mogu rasti na etanolu kada se potroši glukoza, puno je učinkovitije postići veliku gustoću stanica izbjegavanjem proizvodnje etanola.

2.2.1. Životni ciklus stanica *Saccharomyces cerevisiae*

Razmnožavanje stanica *Saccharomyces* se odvija pupanjem i to tako da se stanice pupa formiraju lateralno na glavnoj stanicici majke. Pup se povećava sve dok ne dostigne približnu veličinu stanice majke, nakon čega se razdvaja i razbija vezu s roditeljskom stanicom. Nova stаница, stаница kćer, zajedno sa stanicom majkom ponavlja proces pupanja. Ovaj dio ciklusa poznat je kao nespolni rast. Kada uvjeti postanu nepovoljni za nespolni rast, *Saccharomyces* može sporulacijom proizvoditi askospore koje kvascu omogućuju preživljavanje tijekom dužih sušnih perioda i viših temperatura¹⁹.

2.2.2. Fiziologija stanicice pekarskog kvasca

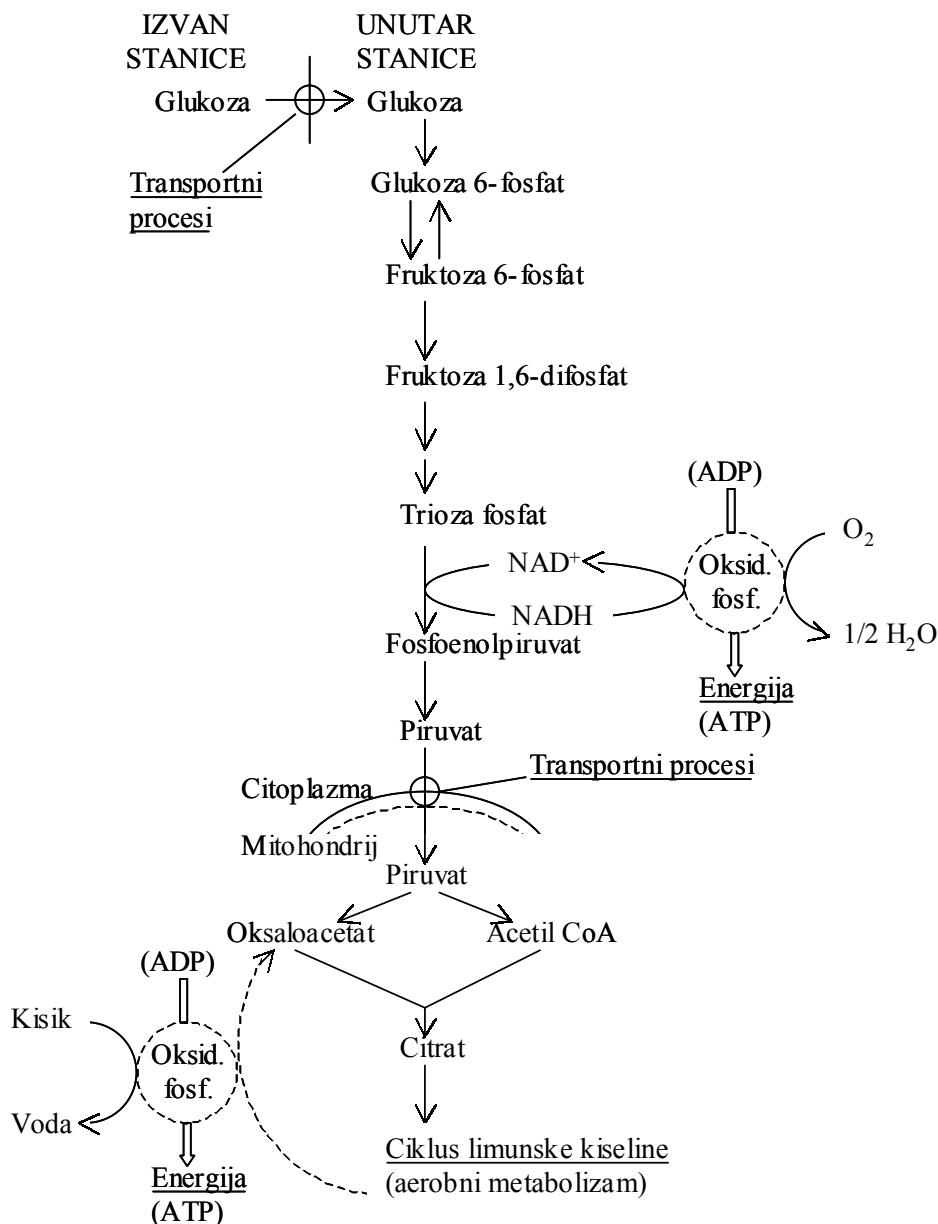
Fiziologija većine kvasaca se najčešće sagledava obzirom na njihov odziv na povećanje, odnosno smanjenje koncentracije glukoze i kisika. Posljedice tih djelovanja poznate su kao Crabtree i Pasteur-ov učinak.

Kvasac pokazuje Crabtree učinak²⁰ kada je njegov oksidativni metabolizam pod pritiskom uzrokovanim porastom koncentracije glukoze u hranjivoj podlozi. Drugim riječima, povećanje koncentracije glukoze iznad određene kritične vrijednosti rezultira smanjenom sposobnosti kvasca da oksidira glukozu. Kao rezultat, stаница ulazi u stanje neravnoteže i reducirajući ekvivalenti (u reduciranom obliku koenzima nikotin adenin dinukleotid - NADH) se počinju akumulirati puno brže nego što ih je stаница sposobna reoksidirati u procesu oksidativne fosforilacije. Jedini način da stаница reoksidira akumulirani NADH jest da se aktivira redukcija nekog akumuliranog intermedijera.

U glikolizi dolazi do oksidacije glukoze u piruvat, dok se respiracijom oksidira piruvat u ciklusu limunske kiseline u mitohondriju.

Tako kvasac reducira piruvat u etanol, istovremeno reoksidirajući NADH u NAD⁺. Iz tog razloga, čak i u prisutnosti odgovarajuće koncentracije kisika, učinak oksidativne fosforilacije je ograničen kada je kvasac Crabtree-pozitivan i povećanje koncentracije glukoze neizbjježno uzrokuje akumulaciju etanola^{21,22}.

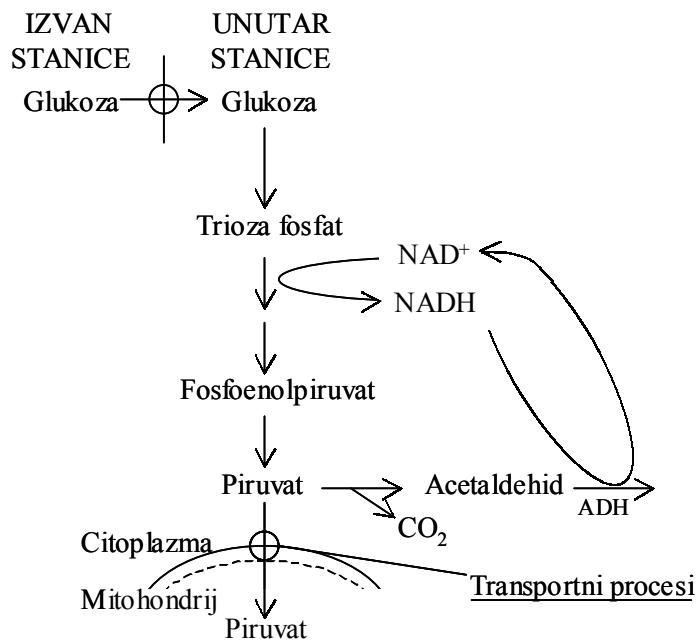
Drugi učinak koji se povezuje s kvascima je Pasteur-ov učinak²⁰ koji se očituje pri aerobnim uvjetima kada kvasac troši manje glukoze i proces fermentacije, odnosno proizvodnja etanola je usporena. Veličina učinka ovisi o relativnoj sposobnosti glikolitičkog puta (razgradnja glukoze u piruvat) naspram respiratornom kapacitetu stanice (oksidacija piruvata u mitohondrijima) – vidi sliku 2.1.



Slika 2.1. Metabolizam glukoze pri aerobnim uvjetima¹⁹

Kod *Saccharomyces cerevisiae* etanol se može proizvoditi i pri aerobnim uvjetima zbog potiskivanja oksidativnog metabolizma u prisutnosti glukoze. Iako kvasac raste aerobno

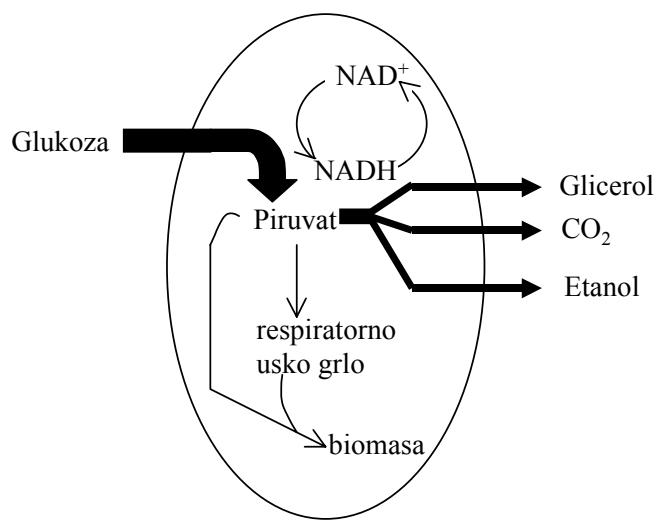
fermentativni kapacitet je još prisutan, te zbog toga dolazi do stvaranja etanola. Pri tim okolnostima Pasteur-ov učinak je znatno umanjen.



Slika 2.2. Metabolizam glukoze pri anaerobnim uvjetima¹⁹

Sažeto objašnjenje Crabtree i Pasteur-ovog učinka može se dobiti ispitivanjem procesa glikolize koji je odgovoran za kataboliziranje glukoze. Konačan produkt glikolize je piruvat. Ako ne nastaje etanol, sav piruvat ulazi u mitohondrije gdje se pretvara u acetil-CoA i oksaloacetat uz enzime piruvat dehidrogenazu (piruvat → acetil-CoA) i piruvat karboksilazu (piruvat → oksaloacetat). Ova dva produkta iz piruvata zatim zajedno reagiraju dajući citrat koji se tada metabolizira u seriji reakcija poznatijim kao ciklus limunske kiseline (slika 2.1.). Ako se oksidacija piruvata kroz ciklus limunske kiseline zaustavi zbog nedostatka kisika koji je glavna pokretačka sila u ovom ciklusu ili zbog prevelike koncentracije piruvata koji se proizvodi iz glukoze, doći će do prezasićenja piruvatom izvan mitohondrija (slika 2.2.). Tada taj piruvat ima drugaćiji mehanizam, a njegovo akumuliranje ovisi o vrsti kvasca. Kod *Saccharomyces cerevisiae* ubrzat će se potrošnja i metabolizam glukoze koji rezultira većom proizvodnjom piruvata nego što mitohondriji mogu podnijeti, dok će kod drugih kvasaca odsutnost kisika uzrokovati usporenu oksidaciju piruvata.

Bez obzira na objašnjenje za prekomjernu proizvodnju piruvata, stanica mora smanjiti koncentraciju piruvata na učinkoviti način. Proizvodnja piruvata je usklađena sa formiranjem reducirajućih ekvivalenata (NADH) koji se proizvode u kasnijim stupnjevima glikolize. Ovi reducirani ekvivalenti se moraju reoksidirati, ali sama činjenica da se proizvede previše piruvata znači da se mora pronaći drugačiji mehanizam od oksidativne fosforilacije za reoksidaciju NADH. Rješenje toga je pretvorba piruvata u etanol. To je reduktivni proces koji je povezan sa završnim stupnjem reoksidacije NADH. Ovi procesi sumarno su prikazani na slici 2.3, a izraz "usko grlo respiracije" upotrebljava se za indiciranje nemogućnosti stanice da manipulira sa visokom koncentracijom piruvata koji se proizvodi pod određenim okolnostima (visoka koncentracija glukoze ili niska koncentracija kisika). Također je vidljivo iz slike 2.3 da se pored etanola proizvode i male količine glicerola.



Slika 2.3. Shematski prikaz metabolizma glukoze u etanol kada je pretvorba piruvata limitirana zbog visoke koncentracije glukoze (Crabtree učinak) ili zbog anaerobnih uvjeta (Pasteur-ov učinak)¹⁹

2.2.3. Uvjeti uzgoja pekarskog kvasca

Za odgovarajući rast pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) potrebno je osigurati odgovarajući hranjivi medij kao energetski izvor, izvor dušika, fosfora i nekih metala (K, Ca, Fe, Zn, Mg, Cu).

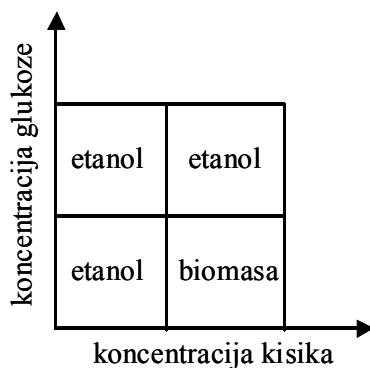
Kao izvori energije koriste se tvari s visokim sadržajem šećera ili čisti šećer. Izvor dušika su uglavnom amonijeve soli ili amonijak, a fosfora ortofosfati ili fosforna kiselina. Kalij je važan za izgradnju protoplazme. Kalcij sudjeluje u uklanjanju otrovnih materijala koji nastaju za vrijeme uzgoja pekarskog kvasca, a željezo i sumpor u reakcijama oksidacije i

redukcije. Magnezij je neophodan za aktivaciju fosfataza koje sudjeluju u alkoholnoj fermentaciji. Bakar ubrzava oksidacijske procese, važan je za izgradnju vitamina i sintezu bijelančevina²³.

Pekarski kvasac nije osjetljiv mikroorganizam. Tolerira širok raspon koncentracija vodikovih iona, pa može rasti pri pH između 3,6 i 6, međutim optimum se nalazi pri pH između 4,5 i 5²⁰. Industrijski uzgoji pekarskog kvasca obično započinju pri nižim pH vrijednostima jer je tada kontaminacija bakterijama minimalna, a kasnije se pH povisuje dodatkom lužine do optimalne vrijednosti. Temperatura provedbe uzgoja pekarskog kvasca je obično 30 °C jer je tada generacijsko vrijeme najkraće. Generacijsko vrijeme je vrijeme potrebno za udvostručenje početne populacije mikroorganizama¹³.

Kako bi se omogućio normalan rast i razvoj kvasca i u laboratorijskim uvjetima, potrebno mu je dati sve potrebne hranjive tvari. Zato se pripremaju posebne podloge kemijski definiranog sastava. Čak i uz prisustvo svih potrebnih elemenata za rast, dolazi do pojave koje nije uvijek moguće predvidjeti, a to su inhibicije glukozom i etanolom, te neodgovarajućom količinom kisika u mediju.

Uzgoj pekarskog kvasca^{24,25} jako ovisi o koncentraciji glukoze i kisika. One kontroliraju dva moguća katabolička puta glukoze, a to su pretvorba u etanol i ugljični dioksid, te pretvorba u ugljični dioksid i vodu. Prvi katabolički put ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP$) ne daje znatnu količinu energije jer ona ostaje vezana u energetski bogatijim molekulama etanola, dok za drugi katabolički put ($C_6H_{12}O_6 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + 16-28 ATP$) to nije slučaj. Etanol proizveden uzgojem pekarskog kvasca može biti oksidiran u slijedećem stupnju šaržnog uzgoja prema reakciji: $C_2H_5OH + 3O_2 \rightarrow 2CO_2 + 3H_2O + 6-11ATP$. Pokazano je da se tijekom prve faze uzgoja pekarskog kvasca proizvodi etanol i nakon što se sva glukoza potroši, dolazi do oksidacije etanola kojeg biomasa također koristi za svoj rast.



Slika 2.4. Kvalitativna interakcija između koncentracije glukoze i kisika prilikom uzgoja pekarskog kvasca²⁰

Interakcija između koncentracije kisika i glukoze u očekivanim putovima se može opisati na slijedeći način: pri niskim koncentracijama glukoze i kisika nastaje etanol. Isto se događa pri niskim koncentracijama kisika i visokim koncentracijama glukoze, te pri visokim koncentracijama kisika i glukoze (Crabtree učinak). Pri visokim koncentracijama kisika i niskim koncentracijama glukoze nastaje biomasa²⁰. Prethodno napisano je pojednostavljeno prikazano na slici 2.4.

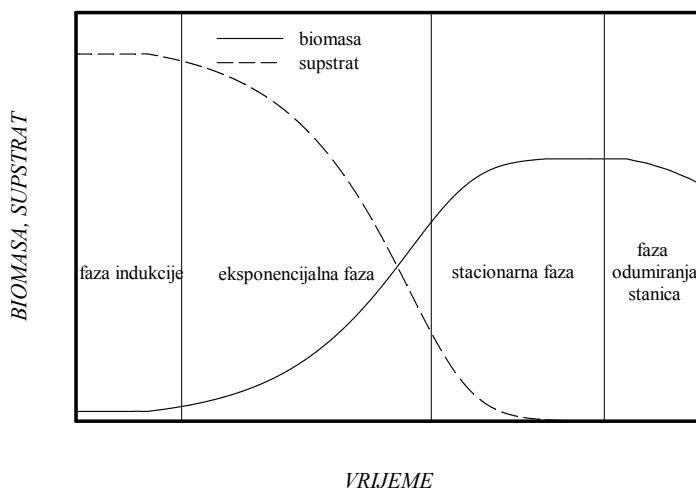
Osim kisika i glukoze na uzgoj pekarskog kvasca također utječe i etanol. Etanol inhibira rast kvasca *Saccharomyces cerevisiae* na glukozi. To je nekompetitivna inhibicija jer etanol utječe na maksimalnu specifičnu brzinu rasta, no ne i na afinitet sustava prema glukozi²⁶.

2.2.3.1. Utjecaj koncentracije biomase na reološka svojstva reakcijskog medija

Osim prethodno opisanih utjecaja glukoze i kisika na reakcijski medij i ishod biokemijskih reakcija u stanicama kvasca, utjecaj glukoze se može opisati i na drugi način. Naime, ovisno o koncentraciji glukoze i kisika, nastati će određena količina biomase u reakcijskom mediju. Time se mijenjaju reološka svojstva medija. Reološka svojstva suspenzije koja sadrži mikroorganizme utječu izravno na miješanje, te prijenos tvari i topline, a mogu utjecati i na ishod mikrobioloških reakcija, te na odzive senzora koji služe za praćenje i vođenje²⁷. Pokazano je da se suspenzije niskih koncentracija ponašaju kao Newtonski, a one viših koncentracija kao ne-Newtonski fluidi. Također je pokazano, da povećanjem koncentracije biomase u bioreaktoru, dolazi i do promjena u morfologiji kvasaca, odnosno promjena u obliku staničnih agregata. Tako primjerice može doći do poteškoća pri spektrofotometrijskom određivanju koncentracije biomase.

2.2.4. Krivulja rasta

Rast i razvoj pekarskog kvasca u uvjetima šaržnog uzgoja odvija se nekoliko faza. Uobičajeno, promjena broja živih stanica mikroorganizma s vremenom, može se prikazati slikom 2.5²⁸.



Slika 2.5. Uobičajene faze rasta biomase u uvjetima šaržnog uzgoja²⁸

Faza indukcije ili prilagodbe je vrijeme u kojem se kvasac prilagođava novonastalim uvjetima. U toj se fazi ne povećava broj stanica, ali je prisutna znatna metabolička aktivnost jer stanice sintetiziraju potrebne enzime kako bi mogle rasti u novonastaloj sredini⁷. Trajanje te faze ovisi o: sastavu novog medija, sastavu podloge na kojoj je mikroorganizam rastao, vrsti i starosti nacijepljenog soja, raznim fizikalnim faktorima i o vrsti produkata metabolizma.

Tijekom faze eksponencijalnog rasta stanice dostižu maksimalnu brzinu rasta, a njihov kemijski sastav se više ne mijenja. Duljina te faze ovisi o velikom broju međuzavisnih parametara, a traje toliko dugo dok mikroorganizmi imaju dovoljno hranjivih tvari. Na duljinu faze eksponencijalnog rasta utječe i vrsta produkta metabolizma mikroorganizma i njihov utjecaj na brzinu rasta biomase.

Tijekom stacionarne faze stanice poprimaju maksimalnu veličinu i volumen populacije je najveći. Ova faza nastupa kada koncentracija neke od komponente neophodne za rast ili koncentracija nekog katalitičkog otrova dostižu takvu razinu koja više ne može podržati maksimalnu brzinu rasta.

Faza odumiranja stanica može imati različito vrijeme trajanja, koje je ovisno o uvjetima provedbe mikrobnog procesa i vrsti mikroorganizama. Ova faza počinje kada pojedine stanice liziraju (dolazi do pucanja stanične stjenke), pa unutarstanične komponente iz takvih stanica (šećeri, aminokiseline, vitamini) služe za održavanje životnih funkcija preostalih stanica.

Svaka od ovih faza značajna je za mikrobiološki proces koji se proučava ili vodi pa je poznavanje zakonitosti zbivanja u svakoj pojedinoj fazi od izuzetne važnosti. Tako je,

primjerice, osnova dobrog oblikovanja procesa smanjiti vrijeme trajanja faze indukcije i što više produžiti vrijeme trajanja eksponencijalnog rasta¹³.

2.3. PRIMJENA PEKARSKOG KVASCA U INDUSTRIJI

Kvasci se upotrebljavaju u mnogim industrijskim procesima, kao što su proizvodnja alkoholnih pića, biomase (pekarski i krmni kvasac) i različitih metaboličkih produkata. Posljednja grupa uključuje enzime, vitamine, kapsularne polisaharide, karotene, polihidrilne alkohole, lipide, glikolipide, limunsku kiselinu, etanol, ugljični dioksid i proekte dobivene primjenom rekombinantne DNK²⁹. Većina vrsta kvasca upotrebljavanih u nekim od gore navedenih procesa dobiveni su kao prirodni izolati koji su upotreboom tehnika genetičkog inženjerstva dalje mijenjani i selekcionirani u svrhu dobivanja boljih karakteristika, odnosno uklanjanja nepoželjnih svojstava. Malo je informacija dostupno o prirodnim nalazištima takvih kvasaca, te o vektorima odgovornim za njihovo raspoređivanje u prirodi.

2.3.1. Industrijska proizvodnja etanola

Etanol se danas proizvodi kemijski iz petrokemikalija i uzgojem pekarskog kvasca. Visoka cijena i ograničene rezerve nafte povećavaju mikrobnu proizvodnju etanola u mnogim zemljama, osobito onima koje nemaju nafte, a raspolažu obnovljivim izvorima sirovina kao što su šećerne, škrobne i celulozne poljoprivredne kulture.

Mikrobiološka proizvodnja etanola provodi se s pomoću kvasca *Saccharomyces cerevisiae* u šaržnim reaktorima, jer je proces relativno jednostavan za vođenje i nema strogih zahtjeva za sterilnošću. Osim etanola, značajnije proekte takvog procesa čine samo kvaščeva biomasa, koja se najčešće suši, termolizira i prodaje kao suhi neaktivni kvasac, te ugljični dioksid koji se tijekom procesa odvodi u stanicu za prikupljanje, gdje se pere, komprimira i puni u čelične boce. Premda proizvodnja etanola uzgojem pekarskog kvasca šaržnim postupkom predstavlja dobro poznat industrijski proces, moguće je provesti i kontinuiranu proizvodnju etanola u više stupnjeva (3-5 bioreaktor), pri čemu se u prvi bioreaktor kontinuirano dovodi svježi supstrat, te reciklirana biomasa kvasca odvojena iz hranjive podloge posljednjeg bioreaktora u nizu²².

Obzirom da nezasićene masne kiseline i steroli čine komponente neophodne za rast stanica kvasca³⁰, a kako njihova biosinteza uključuje molekulu kisika, neophodno je tijekom procesa proizvodnje etanola dodavati male količine kisika.

Etanol proizведен uzgojem pekarskog kvasca u industrijskom mjerilu upotrebljava se uglavnom za proizvodnju alkoholnih pića i octa, te kao gorivo u nekim zemljama²².

2.3.2. Proizvodnja kvaščeve biomase

U mnogim zemljama način prehrane ljudi ukazivao je na slabo izbalansiranu i često proteinima nedostatnu prehranu. Upravo je taj problem uvjetovao veliki interes širom svijeta za pronalaženje izvora visoko kvalitetnih proteina. Mikrobna biomasa predstavlja potencijalno bogat proteinski izvor, a u usporedbi sa životinjskim stanicama mikroorganizmi imaju prednost zahvaljujući mnogo bržem rastu i manjim hranidbenim zahtjevima jer se mogu uzgajati na otpadnim tvarima, te na jednostavnim organskim spojevima uz dodatak anorganskih izvora dušika, fosfora i sumpora. Daljnja prednost mikroorganizama je u mnogo većem iskorištenju proteina po jedinici supstrata.

Stoga se pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* upotrebljava kao proteinska komponenta u ljudskoj prehrani. Proizvodnja tog kvasca isključivo za potrebe pekarske industrije započinje sredinom XIX stoljeća. Način njegove proizvodnje izravno odražava fiziologiju tog mikroorganizma. Tako se pekarski kvasac ne može proizvoditi jednostavnom šaržnom fermentacijom u kojoj se dodaje višak supstrata jer pokazuje fenomen Crabtree-činka koji je kod kvasca izravno povezan s proizvodnjom etanola koji nije poželjan pri proizvodnji biomase jer smanjuje iskorištenje. Zbog toga se pekarski kvasac proizvodi tzv. fed-batch postupkom (uzgoj s dotokom supstrata), odnosno kontroliranim dovođenjem glukoze u medij tijekom uzgoja. Zbog toga što se smanjenom koncentracijom kisika inducira alkoholna fermentacija, neophodno je osigurati odgovarajuću dobavu kisika i dobro miješanje. Naknadno je utvrđeno da se fenomen Crabtree-činka očituje ne samo za vrijeme šaržnog uzgoja, nego i tijekom uzgoja sa ograničenom koncentracijom ugljika pri višim prostornim brzinama.

Kako se proizvedena biomasa prvenstveno upotrebljava za dizanje tijesta stvaranjem ugljičnog dioksida, potrebno je istaknuti da pri njenoj proizvodnji nije dovoljno osigurati samo visoko iskorištenje na biomasi. Naime, potrebno je da ta biomasa na kraju procesa ima niz drugih karakteristika kao što su visoki fermentacijski kapacitet, dobru stabilnost, te mogućnost preživljavanja tijekom skladištenja. Ovo posljednje svojstvo je izravno uvjetovanom količinom trehaloze u biomasi³¹.

Nekoliko faktora uvjetuje izbor šaržnog procesa sa dotokom glukoze za industrijsku proizvodnju pekarskog kvasca. Jedna od značajnijih prednosti takvog uzgoja u odnosu na

kontinuirani uzgoj je da se upotrebom fiziološki aktivnog inokuluma izbjegava neophodna apsolutna sterilnost, koju je potrebno obavezno održavati tijekom kontinuiranog uzgoja. Daljnja prednost šaržnog uzgoja uz dotok glukoze je u tome što je za nju potrebna relativno jednostavna oprema te u činjenici da se kvaščeva biomasa ne uklanja odmah iz bioreaktora već se ostavlja da sazrije kako bi joj se poboljšala kakvoća. To ne predstavlja problem u slučaju šaržnog uzgoja uz dotok glukoze, ali bi vjerojatno zahtijevalo dvostupanjski proces u slučaju kontinuiranog uzgoja.

2.3.3. Pekarski kvasac kao izvor biokatalizatora

Biotransformacije se sve više u zadnjim desetljećima upotrebljavaju za proizvodnju kemikalija. Mogu se provoditi na dva načina i to upotrebom enzima u cijelim stanicama kao biokatalizatora ili sa izoliranim i pročišćenim enzimima³². Prednost prvog načina je izbjegavanje relativno skupog procesa izolacije enzima, dok se upotrebom pročišćenog enzima dobiva produkt visoke čistoće sa vrlo malim brojem sporednih produkata.

Pekarski kvasac kao izvor biokatalizatora ima brojne prednosti pred ostalim mikroorganizmima. Naime on je relativno jak mikroorganizam³³ koji se zbog svoje otpornosti može koristiti u industriji. Raste na definiranom, jednostavnom mediju, te nema nekih potreba za posebnim hranjivim tvarima. Vrlo je otporan prema promjeni uvjeta u okolišu zbog širokog raspona fizikalnih i kemijskih parametara pri kojima može rasti. Obzirom da je genetički vrlo stabilan, može se koristiti za kultivacije tijekom dužeg razdoblja.

Kvasac može koristiti više supstrata paralelno i/ili jedan supstrat putem paralelnog, ali različitog primarnog mehanizma. Iskorištava neke evolucijski razvijene mehanizme za čuvanje ugljika i energije, ako su dostupni, pod drugačijim nerastućim uvjetima. Velika prednost pekarskog kvasca je ta što se smatra sigurnim odnosno nepatogenim mikroorganizmom za proizvodnju hrane i lijekova.

2.3.3.1. Pekarski kvasac u organskoj sintezi

Prilikom korištenja bioloških, biokemijskih i biometričkih metoda za sintezu organskih spojeva, ključnu ulogu ima proizvodnja čistih optičkih aktivnih spojeva. Posebno se isplati kopirati prirodne metode sinteze jer u prirodi većinom nastaju čisti enantiomeri. Njihova sinteza je posebno važna pri proizvodnji lijekova koji su od većeg značenja, a posebno u slučaju ako enantiomeri nemaju isto biološko djelovanje³⁴.

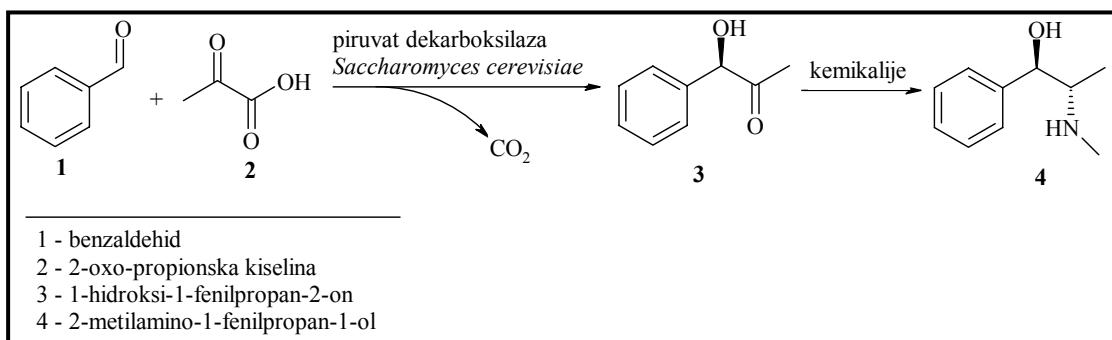
Posebno značenje za organsku kemijsku sintezu u posljednje vrijeme ima pekarski kvasac. Naime diploidne ili poliploidne vrste, kao što je pekarski kvasac, povlaštene su u industrijskoj primjeni, jer pokazuju veću fiziološku aktivnost od haploidnih vrsta, te se zbog toga postižu veće konverzije u željenim reakcijama. Povećanje broja stanica kvasca ovisi o vanjskim uvjetima (hranjivoj podlozi, koncentraciji kisika). Pri korištenju čišćeg roda koristit će se povoljniji uvjeti koji traže nespolno razmnožavanje i koji garantiraju ujednačenost roda tijekom dužeg razdoblja u određenom prostoru, te pomoći kojih se može dobro upravljati sa iskorištenjem, te selektivnosti prema produktu.

Kvasac koji se najčešće koristi u preparativnoj organskoj kemiji uzgojen je iz pivskog kvasca. Prednost mu je laka dostupnost. Naime mnogi katalizatori i kiralni katalizatori, koji se koriste kod asimetričnih sinteza u više stupnjeva, su teško dostupni i k tome vrlo skupi, dok se kvasac može lako nabaviti i vrlo je jeftin. Uz to jednostavan je za upotrebu, ne zahtjeva posebnu sterilnost i nije patogen, te koristi sirovi ili grožđani šećer za rast. Prednost pekarskog kvasca je i u činjenici da kao i mnoge druge gljive i mikroorganizmi ima brzu i učinkovitu izmjenu tvari s okolinom, te se njihovim uzgojem može dobiti veliki broj produkata koji se mogu poslije izolirati iz medija. Stanična stjenka i membrana propusne su za velik broj sintetskih supstrata.

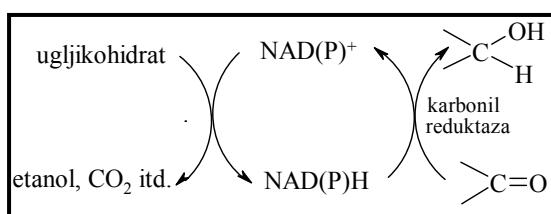
Ovisnost procesa rasta kvasca o koncentraciji kisika može biti korisna za organsku kemijsku sintezu. Buchner i Hahn 1895. i 1897. pronašli su da se aerobni i anaerobni uzgoj može provoditi sa ekstraktima nerastućih stanica kvasca. Dumas je 1874. prvi put opisao reducirajuća svojstva kvasca na sintetskom supstratu. Dodatkom sumpornog praha suspenziji pekarskog kvasca i otopine šećera nastaje H_2S^{34} .

Najznačajnija upotreba kvasca u okviru organsko-kemijske sinteze je kataliziranje asimetričnih redukcija karbonilnih veza pri čemu nastaju optički aktivni alkoholi. Ta reakcija je poznata još od kraja preprošlog stoljeća, a prvi iscrpan opis stereoselektivne redukcije karbonilne veze su napravili Neuberg i Lewit (1918). Otada se ta metoda koristi za proizvodnju čistih enantiomera alkohola³⁴.

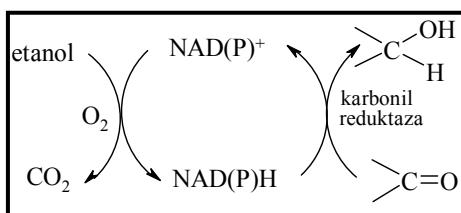
Jedna od prvih industrijski važnijih biotransformacija provedenih sa pekarskim kvascem je kondenzacija benzaldehida s 2-oxo-propionskom kiselinom kojom nastaje optički aktivni 1-hidroksi-1-fenil-2-propanon. Iz njega se kemijskim putem dobiva efedrin (slika 2.6.) koji se u medicini koristi za liječenje astme, peludne groznice, bronhitisa, te kao dekongenativ⁴.

**Slika 2.6.** Proizvodnja L-efedrina

Bioredukcije se obično provode u vodenom mediju u prisutnosti ugljikohidrata ili etanola. Redukcija se odvija uz regeneraciju reduciranih oblika nikotinamidnog koenzima uz oksidaciju kosupstrata (ugljikohidrata ili etanola). Upotreba ugljikohidrata kao energetskog izvora za regeneraciju NAD(P)H može biti neadekvatna zbog potrebe za visokom koncentracijom ugljikohidrata (glukoze) u usporedbi sa koncentracijom supstrata, te zbog njihovog metabolizma pri kojem dolazi do stvaranja snažne pjene od ugljikovog dioksida i proizvodnje štetnih sporednih produkata³⁵ (slika 2.7.).

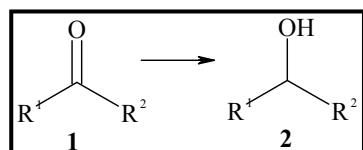
**Slika 2.7.** Prikaz reakcijskog mehanizma regeneracije koenzima uz korištenje ugljikohidrata kao energetskog izvora³⁵

Kada se etanol upotrebljava kao izvor energije redukcija se mora odvijati pri aerobnim uvjetima. Za redukciju uz upotrebu etanola potrebna je nešto niža koncentracija etanola u odnosu za istu uz ugljikohidratre. Također osim ugljikovog dioksida, nema drugih sporednih produkata³⁵ (slika 2.8.).

**Slika 2.8.** Prikaz reakcijskog mehanizma regeneracije koenzima uz korištenje etanola kao energetskog izvora³⁵

2.3.3.2. Primjeri redukcije karbonilnih veza

Tablica 2.1. Redukcija karbonilne veze |1| u sekundarne alkohole |2| uz pekarski kvasac³⁴



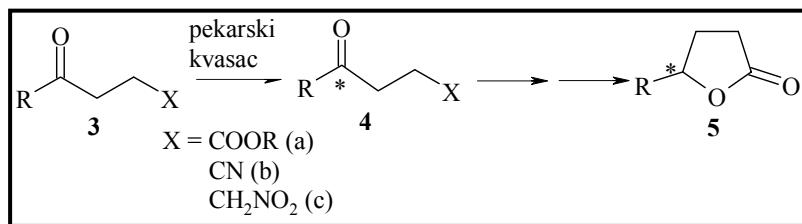
Broj	R ¹	R ²	ee [%]	Glavni izomer	Iskorištenje [%]
1	CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	82	S	18
2	CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₂ CH ₃	23	S	12
3	CH ₂ CH ₃	(CH ₂) ₃ CH ₃	27	S	8
4	CH ₃	C ₆ H ₅	89	S	45
5	CF ₃	Cikloheksil	>95	R	88
6	CH ₃		94	S	74
7	C ₆ H ₅	(CH ₂) ₂ -N(CO) ₂ Ph	>95	R	68
8		COOCH ₂ CH ₃	92	R	55
9	CH ₃	COOCH ₂ CH ₃	91	S	47
10	CH ₃	CH ₂ OOCH ₂ CH ₃	85	S(L)	59-76
11	CH ₂ CH ₃	CH ₂ OOCH ₃	89	S(L)	44[a]
12	CH ₂ CH ₃	CH ₂ OOCH ₃	86	R(D)	67[b]
13	CH ₂ CH ₃	CH ₂ OOCH ₂ CH ₃	40	R(D)	67
14	CH ₂ CH ₃	CH ₂ OO(CH ₂) ₇ CH ₃	~100	S(L)	67
15	CF ₃	CH ₂ OOCH ₂ CH ₃	84	R(L)	60
16	CH ₂ Cl	CH ₂ OO(CH ₂) ₇ CH ₃	~100	R(L)	67
17	CH ₂ SO ₂ C ₆ H ₅	CH ₂ OOCH ₃	98	R(L)	80
18	CH ₂ CH ₂ CH=C(CH ₃) ₂	CH ₂ COOK	99	S(L)	59

Mnogi ketoni se uz pekarski kvasac reduciraju u sekundarne alkohole (tablica 2.1, primjer 1-6). Enantiomerni suvišak je to veći što se pokrajnji lanci R₁ i R₂ više razlikuju jedan od drugoga^{34,36}.

Dulji alkilni supstituenti od metila djeluju nepovoljno na iskorištenje (tablica 2.1, primjer 1-3), dok se uz heterocikle kao supstituente dobivaju vrlo visoka iskorištenja.

α -ketoester se reducira u α -karboksiester s visokom enantioselektivnošću (tablica 2.1, primjer 7-9)^{38,34}. Ova reaktivnost se pripisuje enzimima L ili D-laktat dehidrogenazi. α -ketokiseline se reduciraju u primarne alkohole nakon dekarboksilacije^{34,37,38}.

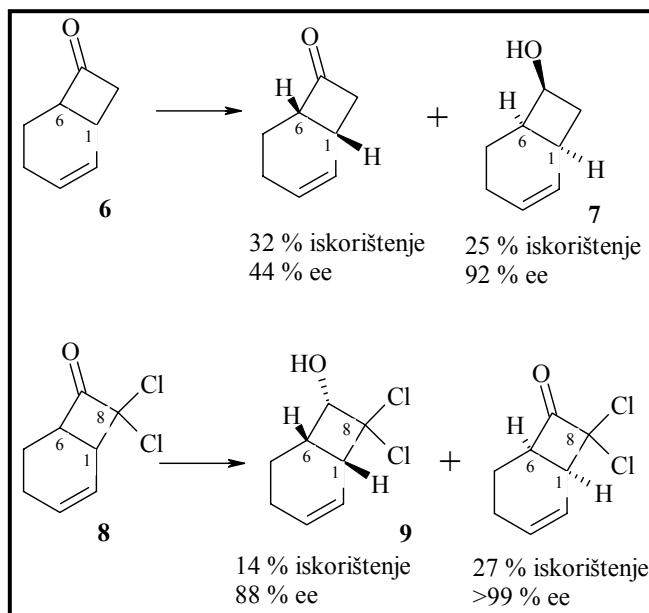
Među najbolje istražene reakcije s kvascem pripada redukcija β -dikarbonilnih veza, posebno β -ketoestera (tablica 2.1, primjer 10-17). Kod tih reakcija enantioselektivnost ovisi o samom mehanizmu reakcije³⁹. Konverzija, iskorištenje i enantioselektivnost također jako ovise o uvjetima reakcije (hranjivoj podlozi, procesu prijenosa tvari u kvazu), tako da se vrlo teško može procijeniti ishod procesa (tablica 2.1, primjer 11, 12). Dobiveni β -hidroksiesteri karboksilnih kiselina su vrlo važni za organsku kemijsku sintezu i koriste se za proizvodnju velikog broja prirodnih i umjetnih tvari. Posebna pozornost se pridaje istraživanju β -hidroksiesteri maslačne kiseline (tablica 2.1, primjer 10)³⁴.



Slika 2.9. Redukcija γ -ketokiselina i γ -ketokiselinskih estera 3a, ketonitrila 3b i nitroketona 3c sa kvascem u odgovarajuće alkohole 4 kao i ciklizacija u butirokolaktoni 5³⁴

Redukcija γ -ketoestera (slika 2.9, primjer 3a) je reakcija koju je nešto teže provesti. Kroz modifikaciju strukture (vladanje soli γ -ketokiselina, promjenom supstituenata) ili promjenom reakcijskih putova mogu se dobiti zadovoljavajući rezultati (iskorištenja veća od 50 % sa visokom enantioselektivnošću), te dobiti vrlo zanimljivi enantiočisti γ -butirokolaktoni. Iskorištenje se može povećati povećanjem količine kvasca u sustavu u odnosu na količinu supstrata. Daljnja mogućnost njihovog nastajanja je provođenje redukcije ketonitrila |3b| u hidroksinitrile 4b, te se pročišćavanjem i dodatnom ciklizacijom mogu proizvesti γ -butirokolaktoni. Također se mogu dobiti redukcijom nitroketona |3c| (slika 2.9.) u alkohole, te ciklizacijom uz pomoć oksidacije nitrilne skupine. Ovi laktoni su inače aromatične i mirisne tvari koji se nalaze kao strukturni elementi brojnih prirodnih i sintetskih tvari (npr. insektferomoni, antibiotici, insekticidi)³⁴.

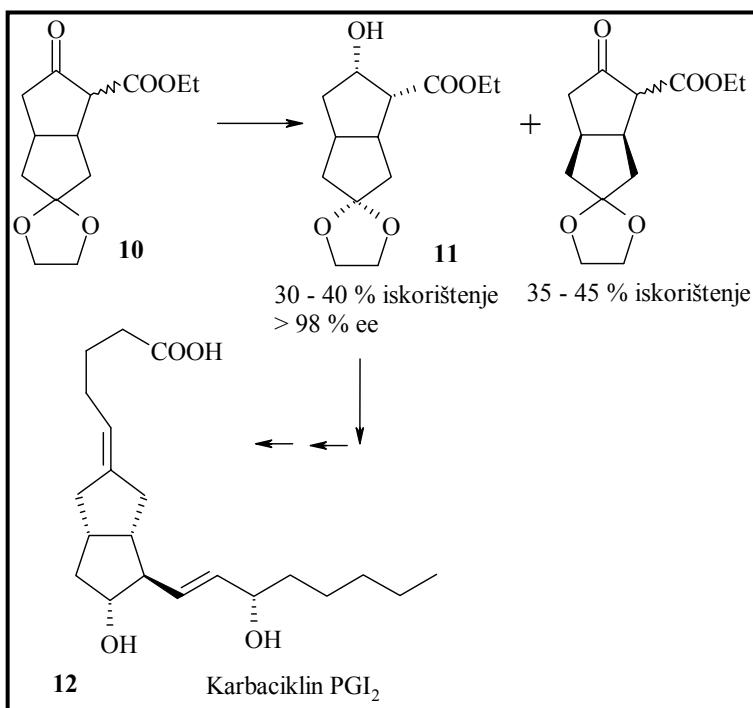
Redukcijom uz kvasac se mogu provesti razdvajanja racematne smjese (slika 2.10.).



Slika 2.10. Razdvajanje racematske smjese biciklo[4.2.0]2-en-7-on i 8,8diklorobiciklo[4.2.0]2-en-7-on redukcijom uz pekarski kvasac³⁴

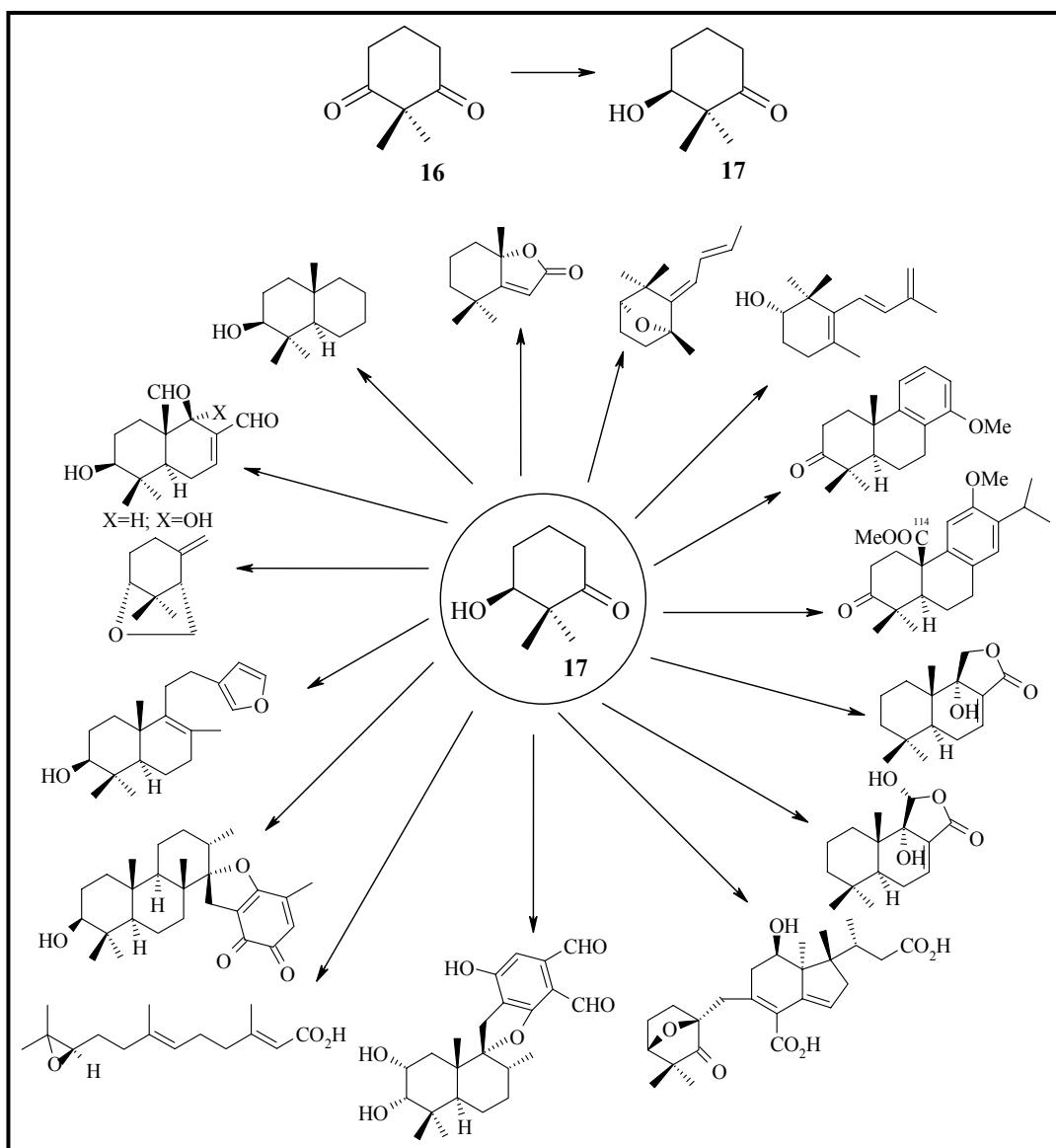
Naime kod redukcije različitih enantiomera sudjeluju različiti enzimi, te se vrlo brzo mogu razlikovati s obzirom na brzinu kinetičke pretvorbe. Primjer pokazuje osjetljivost kvasca na različite supstrate, te kako može reagirati. Nesupstituirani biciklooktenoni |6| postaju (1S, 6R)-enantiomeri prije nego što se reduciraju u alkohole |7|, te se njihovi 8,8-diklorderivati |8| reduciraju u sekundarne alkohole |9|³⁴.

Jedna interesantna klasa supstrata su jednostavnii α -supstituirajući β -ketoesteri. U pokazanom primjeru prikazani su ciklički β -ketoesteri (slika 2.11.). Supstrat |10| se uz pekarski kvasac reducira u spoj |11| koji se upotrebljava za sintezu karbociklina PGI₂. Inače stabilna struktura Prostaciklina PGI₂ se upotrebljava u medicini jer djeluje na opadanje krvnog tlaka i smanjenje uzbudjenja³⁴.



Slika 2.11. Asimetrična redukcija estera ciklopantanonkarboksilne kiseline uz pekarski kvasac. Primjena u proizvodnji karbaciklina PGI₂³⁴

Višestruka primjena pekarskog kvasca u organsko kemijskoj sintezi, posebno kod složenih struktura, je redukcija cikličkih β -diketona (slika 2.12.)⁴⁰⁻⁴². β -cikloheksadion i β -ciklopentadion reagiraju sa policikličkim spojevima uz visoko iskorištenje. Redukcijom jedna od dviju karbonilnih skupina postaje selektivna za sekundarni alkohol S(L)-konfiguracije. Spoj [17] (slika 2.12.), koji nastaje kada se 2,2-dimetilcikloheksan-1,3-dion [16] reducira uz pekarski kvasac, daje uz asimetričnu sintezu brojne terpenoidne prirodne tvari³⁴.

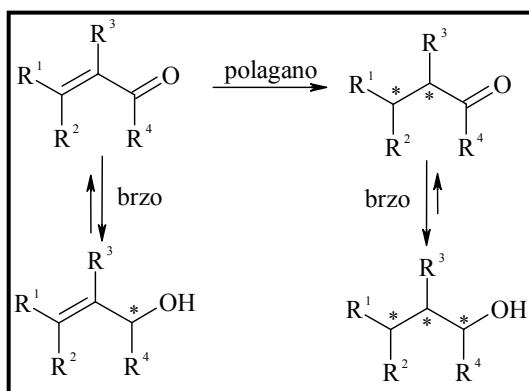


Slika 2.12. Primjeri primjene β -hidroksiketona |17| za sintezu prirodnih terpenoidnih tvari³⁴

Ako izolirane dvostrukе veze u nizu nisu reducirane, tada α , β nestabilne karbonilne veze i alilalkoholi |18| mogu preći u alkil alkohole |19| (tablica 2.2.)³⁴. Najčešće Z-supstituirane dvostrukе veze će se lakše reducirati od već spomenutih E-supstituiranih dvostrukih veza. U primjeru 4 (tablica 2.2.) pokazana je redukcija dimetilacetala i slobodne aldehydne skupine, prije provedbe redukcije spoja |19| (tablica 2.2.). Kod α , β nestabilnih ketona i aldehyda dolazi vrlo brzo do redukcije karbonilne veze (slika 2.13.). Ova reakcija je uvijek reverzibilna dok je redukcija C-C dvostrukе veze vrlo spora i ireverzibilna.

Tablica 2.2. Redukcija α,β nezasićenih veza uz pekarski kvasac

Broj	R	X	ee [%]	Iskorištenje
				[%]
1	CH ₃	CHO	95	28
2		CH ₂ OH	>99	72
3		CHO	>97	35
4	CO ₂ CH ₂ CH ₃	CH(OCH ₃) ₂	>98	49

**Slika 2.13.** Kinetička shema redukcije α,β nezasićenih aldehida i ketona kao i alilalkohola u alkil alkohole³⁴

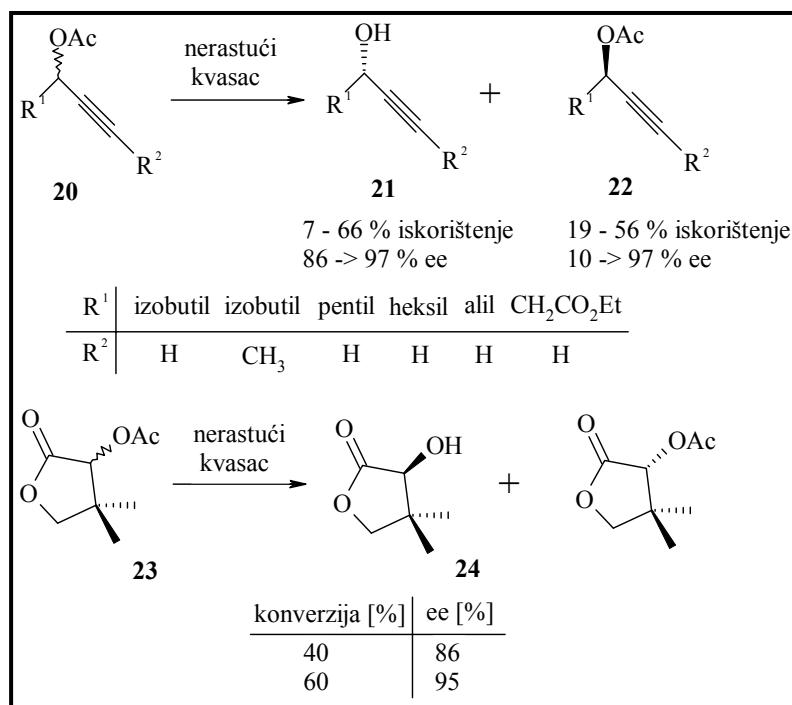
2.3.3.3. Primjeri ostalih reakcija

Prilikom reakcije 1,3-dinitroarena uz pekarski kvasac dolazi do redukcije nitro grupe u amino grupu (tablica 2.3.).³⁴ Postoji li i neki drugi supstituent u orto ili meta položaju, dolazi uglavnom do regioselektivne redukcije (primjer 1, tablica 2.3.). Sterički razmještaj drugog supstituenta pogoduje redukciji para-nitro grupe (primjer 2, tablica 2.3.), pri čemu nastaje jedan slobodan par elektrona (primjer 3, 4, tablica 2.3.) koji dovodi do reakcije u orto položaju.

Tablica 2.3. Redukcije 1,3-dinitroarena u 3-nitroaniline³⁴

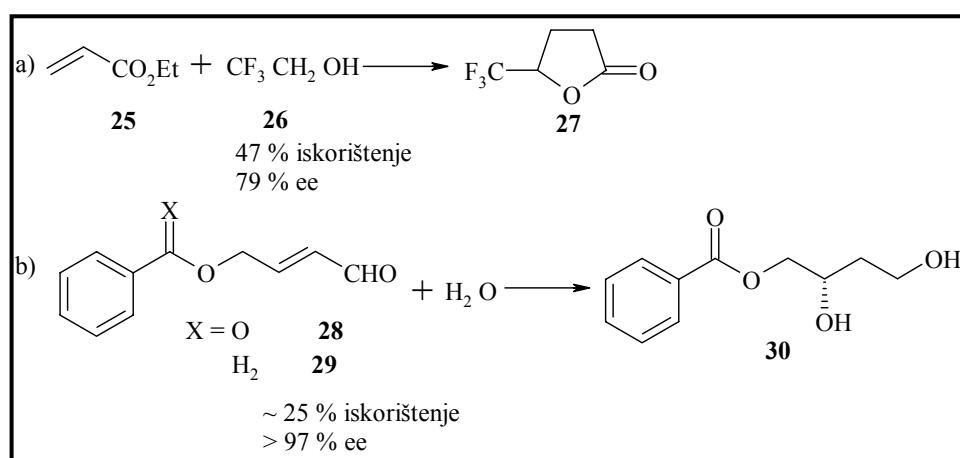
Broj	Reaktant	Produkti		Omjer izomera	Iskorištenje [%]
1				1/1	44
2				1/3	37
3				5/1	36
4					35

S pekarskim kvascem se osim redukcija mogu provoditi i druge reakcije. Hidroliza estera je jedna od tih reakcija kojom se dobivaju mnogi korisni produkti uz visoku enantioselektivnost (slika 2.14.). Hidroliza acetil derivata [20] u sekundarne alkohole [21] (slika 2.14.) se također provodi ako je iskorištenje reakcije veće od 40%. Pri konverziji od 60% moguće je produkt [22] (slika 2.14.) izolirati uz visoku enantioselektivnost³⁴.

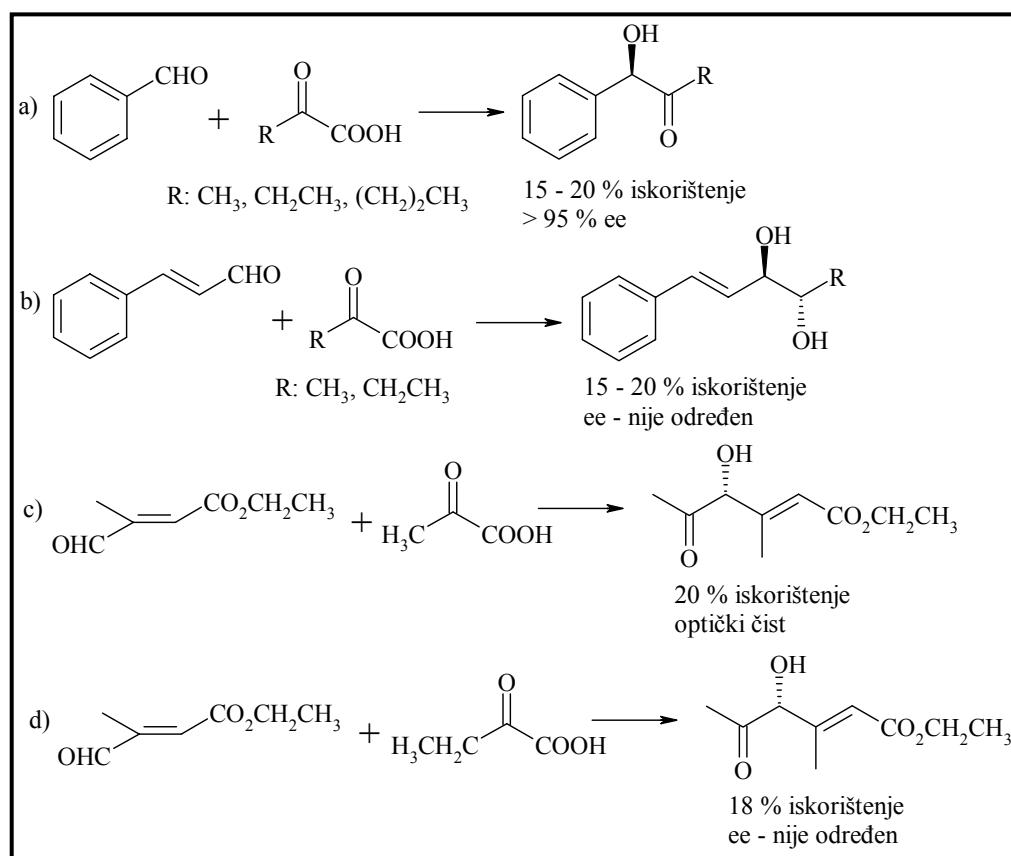


Slika 2.14. Primjeri asimetričnih hidroliza estera uz pekarski kvasac³⁴

Stereoselektivne adicije α , β nezasićenih karbonilnih veza se također mogu provesti uz pekarski kvasac (slika 2.15.). Adicijom 2,2,2-trifluor etanola na ester akrilne kiseline [25] dolazi do nastajanja laktona [27] (slika 2.15, reakcija a). Adicijom vode i redukcijom karbonilne veze aldehidi [28] i [29] se prevode u zasićeni butantriol [30] (slika 2.15, reakcija b)³⁴.



Slika 2.15. Adicije na α , β nezasićene karbonilne veze³⁴



Slika 2.16. Primjeri mješovitih aciloin kondenzacija koje se mogu odvijati uz pekarski kvasac³⁴

Uz pekarski kvasac C-C vezanjem moguće je doći do miješane aciloin kondenzacije (slika 2.16) u kojoj sudjeluju aromatski i α , β nezasićeni aldehydi, dok je drugi reaktant α -ketokiselina^{43,44}. Aldehydna skupina se reducira uz piruvat dekarboksilazu kvasca uz koju se odvija i završna faza aciloin kondenzacije. U oba slučaja se kao koenzim koristi tiamin iz kvasca koji preuzima ulogu cijanida u aciloin kondenzaciji aromatskih aldehyda³⁴.

2.4. ENZIMI

Konverzija glukoze u etanol i ugljični dioksid u stanici kvasca je jedna od prvih detaljno proučavanih biokemijskih reakcija. Prepostavka vezana za tu pretvorbu, da je katalizirana ekstraktom kvasca, dovela je do otkrića enzima i koenzima i tako postavila temelje moderne biokemije⁴⁵.

Enzimi su proteinske molekule koje kataliziraju kemijske reakcije u živom organizmu¹³, te ih zbog toga nazivamo biokatalizatorima. Iako su veoma djelotvorni, nisu uvijek idealni za upotrebu jer su općenito nestabilni, te se kao takvi ne mogu koristiti na povišenim temperaturama i u otopinama organskih otapala⁴⁶. Da bi bili primjenjivi u industriji, moraju po svojstvima biti superiorni klasičnim kemijskim katalizatorima. To znači da moraju imati visoku aktivnost i stabilnost, te mora postojati mogućnost njihove višekratne uporabe jer im je cijena previsoka, te u suprotnom nisu isplativi.

Enzimi nastaju unutar žive stanice i kataliziraju reakcije u blagim uvjetima, što je dakako prednost u odnosu na klasične katalizatore koji obično zahtijevaju posebne uvjete tlaka i temperature.

Razlikujemo intracelularne i ekstracelularne enzime. Intracelularni se nalaze unutar stanice, vezani za staničnu stjenku ili u citoplazmi. Vrlo su nestabilni, a da bi ih ekstrahirali iz stanice, moramo razbiti staničnu stjenku, odnosno permeabilizirati ju primjenom mehaničkih, kemijskih ili mikrobioloških metoda⁴⁷. Zbog prethodno navedenih razloga, intracelularni su enzimi skuplji od ekstracelularnih. Broj ekstracelularnih enzima je daleko manji, ali su oni stabilniji. Oni su metaboliti stanica, pa ih one izbacuju nakon sinteze, te stoga nisu potrebni procesi razbijanja stanične stjenku.

Enzimi se mogu, osim u pročišćenom obliku, upotrijebiti i u cijelim stanicama, bilo živim ili neživim. Vrlo često se enzimi upotrebljavaju u imobiliziranom obliku. Imobilizacija je postupak pretvorbe homogenog enzima u heterogeni⁴⁸. Imobilizirani biokatalizatori mogu biti stanice ili organele u obliku koji omogućava njihovu višekratnu upotrebu. Još se nazivaju heterogeni biokatalizatori. Prvobitno su imobilizirani čisti enzimi, te oni čine prvu generaciju heterogenih biokatalizatora. Drugu generaciju čine imobilizirane cijele stanice. Prednosti druge generacije heterogenih biokatalizatora jesu⁴⁹:

- mogućnost provedbe višestupnjevskih procesa jer stanica može sadržavati nekoliko enzima
- ekonomski su prihvatljiviji
- postoji mogućnost regeneracije koenzima unutar imobilizirane cijele stanice inkubacijom na hranjivoj podlozi

Sam postupak imobilizacije se sastoji u fizičkoj lokalizaciji enzima na nekom nosiocu. Još uvijek ne postoji univerzalni nosilac, niti univerzalne metode imobilizacije. Najvažnije je koristiti metode koje će dati dugotrajnije aktivan enzim na jeftinom nosiocu⁵⁰.

Enzimi se sastoje od apoenzima (proteinskog lanca) i prostetičke skupine (koenzim). Kao prostetička skupina često se nalazi metalni ion, te se takvi enzimi onda nazivaju metaloenzimi.

Enzimi posjeduju prednosti pred klasičnim katalizatorima:

- ne zahtijevaju primjenu ekstremnih reakcijskih uvjeta (pH, temperature, tlak)
- djeluju pri niskim koncentracijama
- izvori enzima su obnovljivi
- biorazgradljivi su
- provode kompleksne reakcije u jednom stupnju

Uz navedene prednosti, enzimi imaju i nedostatke:

- visoka cijena izolacije i pročišćavanja
- lako podlježu inhibiciji supstratom i/ili produktom
- deaktivacija uslijed promjene reakcijskih uvjeta
- nestabilnost izvan prirodnog okruženja (u otopljenom obliku)

Iz prethodnog se dade zaključiti da su biokatalizatori veoma važni katalizatori jer omogućuju provedbu reakcija koje bi standardnim kemijskim postupcima bilo vrlo teško ili pak nemoguće provesti.

2.5. ALKOHOL DEHIDROGENAZA

Kvaščeva alkohol dehidrogenaza je dio velike obitelji cinkovih alkohol dehidrogenaza⁵¹. Obzirom da je poznata primarna struktura 47 članova ove obitelji, iz jednog starog gena napravljeno je evolucijsko stablo uz pretpostavku različitog razvoja. Pomoću njega moguće je identificirati četiri različite grupe alkohol dehidrogenaza iz ove obitelji: kralježnjaci, biljke, eukariotski mikroorganizmi i prokariotske bakterije. Pekarski kvasac je član treće grupe i ima tri izoenzima alkohol dehidrogenaze^{52,53}: YADH-1⁵⁴, YADH-2 i YADH-3. YADH-1 je konstitucijski oblik koji nastaje tijekom anaerobnog uzgoja pekarskog kvasca. YADH-2 se nalazi u citoplazmi, dok se YADH-3 stvara u mitohondriju. Za najveći postotak aktivnosti alkohol dehidrogenaze koja se dobiva u rastućim stanicama pekarskog kvasca odgovoran je YADH-1.

Alkohol dehidrogenaza je jedan od prvih izoliranih i pročišćenih enzima. Postoji više metoda njezine izolacije. Obično se provode tako da se nakon razbijanja stanične stjenke, ona ukloni, te se dobije bezstanični ekstrakt sa intracelularnim produktima. Stanica se može razbiti upotrebom mlina ili ultrazvučnih igala, dok se enzim iz ekstrakta izolira upotrebom

različitih separacijskih tehnika kao što su anionski izmjenjivači, ultrafiltracija i gel filtracijska kromatografija⁵⁵.

2.5.1. Izoenzimi YADH

Usporedbom kinetičkih svojstava izoenzima ADH, uočava se velika sličnost. U tablici 2.5. su prikazane kinetičke konstante tri izoenzima ADH izolirana iz pekarskog kvasca⁵⁶.

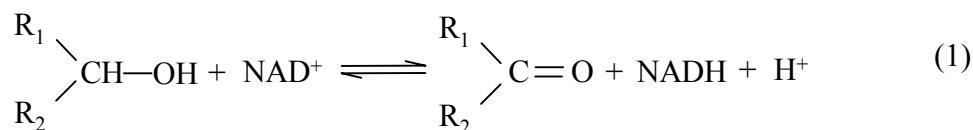
Tablica 2.5. Kinetičke konstante izoenzima ADH izoliranih iz pekarskog kvasca⁵⁶

konstante	YADH-1	YADH-2	YADH-3
V_1 [s ⁻¹]	340	130	450
K_A [μ M]	170	110	240
K_B [mM]	17	0,81	12
V_1/K_B [mM ⁻¹ s ⁻¹]	20	160	37,5
V_2 [s ⁻¹]	1700	1040	2100
K_Q [μ M]	110	50	70
K_P [mM]	1,1	0,09	0,44
V_2/K_P [mM ⁻¹ s ⁻¹]	1540	11550	4770

Vidljivo je da YADH-1 i YADH-3 imaju vrlo slične kinetičke karakteristike, dok je YADH-2 specifičnija za etanol i acetaldehid kao supstrate. Kada je napravljena kinetika za YADH-1 i YADH-2 sa alkoholima velikih molekulskih masa i diolima kao supstratima, utvrđeno je da je za sve alkohole normalizirana brzina YADH-2 bila oko tri puta veća.

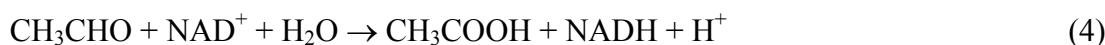
2.5.2. Specifičnost enzima

Kvaščeva alkohol dehidrogenaza katalizira sljedeću reverzibilnu redoks reakciju:



Pri neutralnom pH ravnoteža je pomaknuta uljevo. Specifični supstrati za ADH su nerazgranati alifatski alkoholi, a svako grananje u pokrajnjem lancu smanjuje aktivnost enzima i umanjuje njegovu djelotvornost⁵⁷. Ovaj enzima je također specifičan za sekundarne alkohole. Etanol je daleko najbolji supstrat⁵⁸, dok je metanol vrlo slab supstrat za YADH

(aktivnost enzima za metanol kao supstrat je 0.07% aktivnosti enzima za etanol kao supstrat pod istim uvjetima). Enzim oksidira metanol uz NAD⁺ u formaldehid i NADH, ali je reakcija vrlo kompleksna zbog brojnih sporednih reakcija. Također je nađeno da su glicerol, gliceraldehid, acetol, te benzil alkohol i benzaldehid vrlo slabi supstrati, dok 2-klor-etanol, 2-fluor-etanol, 2,2,2-trifluoretanol, propargil alkohol, glicidol i polietilen glikol uopće ne reagiraju uz ADH kvasca. Kvaščeva alkohol dehidrogenaza katalizira tri bitne ireverzibilne kemijske reakcije.



Obzirom da je kloracetaldehid jako dobar supstrat za YADH, a 2-kloretanol se uopće ne oksidira sa NAD⁺ reakcija (2) je ireverzibilna. *p*-Nitrozo-*N,N*-dimetilanilin (NDMA) se brzo reducira sa NADH u prisutnosti YADH⁵¹. Primarni produkt ove reakcije, korespondirajući hidroksilamin, se transformira u komponentu kinonediimina gubitkom molekule vode koja se reducira neenzimatski uz NADH u *p*-amino-*N,N*-dimetilanilin. YADH pokazuje slabu aktivnost aldehid dehidrogenaze, te je uz nju moguće katalizirati ireverzibilnu oksidaciju acetaldehida u octenu kiselinu uz NAD⁺.

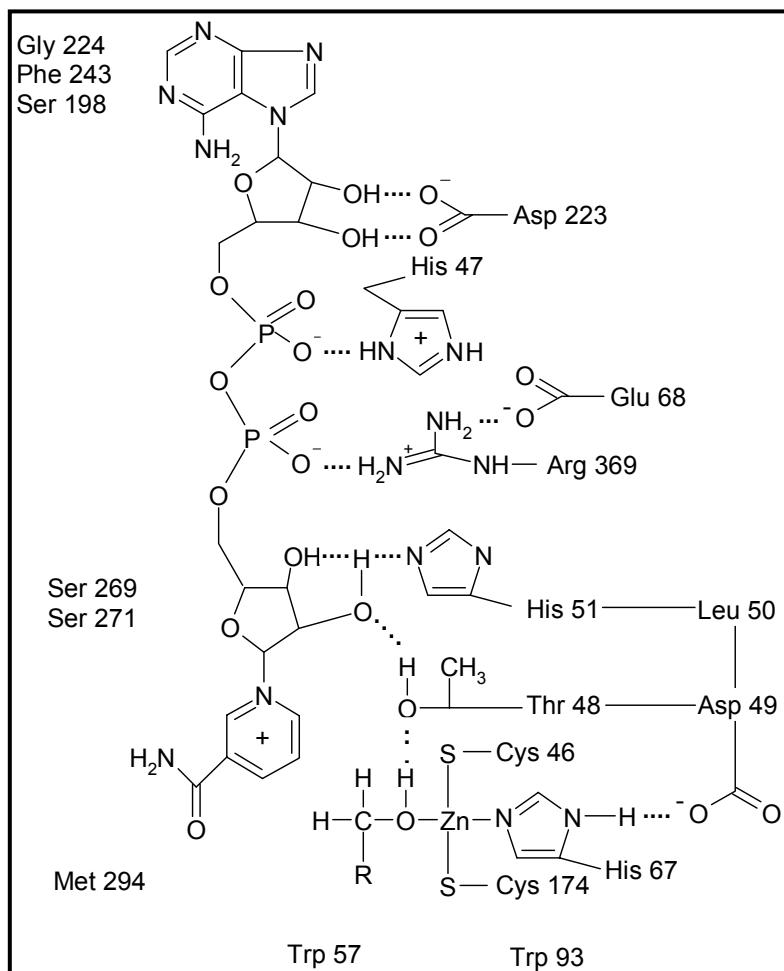
2.5.3. Primarna struktura

YADH je tetramer sastavljen od četiri jednake podjedinice, a svaka podjedinica se sastoji od jednog polipeptidnog lanca sa 347 aminokiselina sa molekularnom masom od 36 kDa⁵⁵. Svaka podjedinica ima jedno mjesto za vezanje koenzima, te jedan vezani cinkov atom koji je vrlo bitan za samu biokatalizu. Drugi cinkov atom (podjedinica) je vezan u tetrahedronskom obliku sa četiri atoma sumpora iz cisteinskog ostatka⁵¹.

2.5.3.1. Aktivna mjesta

Podjedinice kvaščeve alkohol dehidrogenaze su vjerojatno podijeljene na dva područja: katalitičko područje i područje vezanja koenzima. Područja su različite veličine tako da katalitičko područje sadrži 3/5 ukupnih aminokiselina, dok područje vezanja koenzima sadržava preostalih 2/5 aminokiselina. Područja su odvojena pukotinom, tj. dubokim džepom u koji se smješta supstrat i nikotinamidni dio koenzima. Jedno područje veže koenzim, dok

drugo omogućava povezivanje sa katalitičkim cinkom kao i s većinom grupa koje kontroliraju specifičnost supstrata⁵¹.



Slika 2.17. Shematski prikaz aktivnih mesta alkohol dehidrogenaze u stanici kvasca⁵¹

Slika 2.17. prikazuje model aktivnog centra alkohol dehidrogenaze iz koje je vidljiv mehanizam rada samog enzima. Da bi došlo do katalize aktivni centri enzima moraju vezati molekule supstrata i molekule koenzima na produktivan način i postepeno katalizirati reakciju prijenosa vodika između njih.

Mjesto vezanja adenozina je lako dostupno, dok se centar vezanja nikotinamida nalazi u sredini molekule, sakriven duboko unutar proteina. Aminokiseline primarne strukture enzima su uključene u vezanje supstrata i koenzima i u samu katalizu.

Unutrašnji zid džepa je obrubljen pokrajnjim lancima Triptofan-57, Triptofan-93, Asparagin-110, Leucin-132, Tirozin-140, Treonin-141, Metionin-294, Alanin-296 i Izoleucin-318 koji potječe iz iste podjedinice kao i ligandi cinka. Mjesto vezanja supstrata kraj cinka je usko jer pristup ograničavaju Triptofan-93 i Treonoin-48.

2.6. MODELI MIKROBIOLOŠKOG RASTA

U velikom broju radova su predloženi modeli rasta stanica kvasca, no ne postoji univerzalni model koji bi mogao opisati rast pri različitim uvjetima.

Modeli mikrobiološkog rasta mogu se podijeliti u strukturne i nestrukturne modele, a oba se mogu dalje podijeliti na segregirane i nesegregirane²⁸. Strukturni modeli^{59,60} tretiraju stanicu kao složeni sustav i temelje se na opisu stvarne biološke slike zbivanja u stanicama mikroorganizma. Oni uzimaju u obzir fiziološke promjene koje se odvijaju u stanicama biomase. Nestrukturni modeli^{61,62} definiraju rast biomase kao funkciju makroskopskih varijabli - koncentracije i broja stanica biomase, te promatraju stanicu kao crnu kutiju i ne uzimaju u obzir fiziološke promjene koje se događaju u stanci mikroorganizma. Oni se mogu primijeniti samo pri idealnim uvjetima ili u ranoj logaritamskoj fazi rasta.

Segregirani modeli rasta tretiraju svaku stanicu kao neovisan entitet, odnosno definiraju populaciju stanica kao skupinu takvih neovisnih stanica, čija se svojstva mogu opisati distribucijama u odnosu na pojedina svojstva (starost, veličina, brzina rasta, produktivnost...). Nesegregirani modeli tretiraju biomasu kao skup prosječnih stanica, koje sve imaju jednake karakteristike u svakom trenutku vremena. Oni se koriste kada je populacija relativno homogena i kada nisu poznati uvjeti koji upravljaju diobom stanica.

Jedan od najpoznatijih nestrukturnih modela definirao je Monod²⁸. Njegov model daje ovisnost specifične brzine rasta biomase o koncentraciji supstrata, a dan je izrazom 2.1.:

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s} \quad 2.1.$$

gdje je μ_{MAX} maksimalna specifična brzina rasta biomase [h^{-1}], c_s koncentracija supstrata [g dm^{-3}], a K_s konstanta zasićenja supstratom [g dm^{-3}]. Konstanta zasićenja supstratom je jednaka onoj koncentraciji supstrata kod koje je specifična brzina rasta jednaka polovini maksimalne specifične brzine rasta.

Ovaj model ima brojne nedostatke. Ne može opisati fazu indukcije jer je konstanta zasićenja, K_s , po svojoj vrijednosti u većini procesa puno manja od koncentracije supstrata, c_s , pa praktički odmah po inokulaciji, prema ovom modelu počinje period eksponencijalnog rasta. Isto vrijedi i za fazu odumiranja stanica koji ovaj model ne može opisati.

Specifična brzina rasta može biti, kao što je već navedeno, inhibirana komponentama podloge ili produktima metabolizma mikroorganizma. Tada je potrebno modificirati osnovni Monodov model. U slučaju inhibicije supstratom²⁸, jednadžba 2.1. poprima oblik:

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s + \frac{c_s^2}{K_i^S}} \quad 2.2.$$

gdje je K_i^S konstanta inhibicije supstratom [g dm^{-3}]. U slučaju inhibicije produktom Monodov izraz (jednadžba 2.1.) poprima sljedeći oblik:

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot \frac{c_s}{K_s \cdot \left(I + \frac{c_p}{K_i^P} \right) + c_s} \quad 2.3.$$

gdje je c_p koncentracija produkta [gdm^{-3}], a K_i^P konstanta inhibicije produktom [g dm^{-3}].

Postoje brojne modifikacije Monodovog modela rasta biomase, a jedna od njih je sljedeća, koja uzima u obzir fazu indukcije mikrobiološkog rasta:

$$\mu = \mu_{MAX} \cdot \frac{c_s}{K_s + c_s} \cdot \left(1 - e^{\frac{-t}{t_L}} \right) \quad 2.4.$$

gdje je t_L vrijeme trajanja faze indukcije.

2.6.1. Modeli nastajanja produkata

Stanice mogu sintetizirati različite produkte. Postoji nekoliko sistema za klasifikaciju ovih produkata. Kinetički modeli su razvijeni za neke jednostavnije sisteme. Jedan od najčešćih načina, koji se primjenjuje u modeliranju nastajanja produkta, klasificira produkte na temelju mehanizma njihovog stvaranja, tj. da li su rezultat primarnih metaboličkih funkcija ili nastaju sekundarnim metabolizmom. Konačni produkti energetskog i ugljikovog metabolizma su primarni metaboliti. Obzirom da je njihova proizvodnja proporcionalna rastu populacije stanica, oni se još nazivaju produkti vezani uz rast (*growth associated*)⁶³.

Produkti kao što su antibiotici i vitamini se uglavnom u šaržnim kulturama proizvode na kraju eksponencijalne faze. Ovi sekundarni metaboliti se najčešće nazivaju produkti nevezani uz rast (*non-growth associated*), te njihova kinetika ne ovisi o brzini rasta stanica. Uz ove dvije vrste produkata, postoje produkti čija se kinetika nalazi između, te se oni nazivaju produkti djelomično vezani uz rast (*partially growth associated*). U njih spadaju amino kiseline, mlijecna kiselina, intermedijeri iz ciklusa limunske kiseline, ekstracelularni polisaharidi i otapala kao što su aceton i butanol.

Izrazi za brzinu za ove tri vrste produkata nastali su iz studije Luedekinga i Pireta za stvaranje mlijecne kiseline uz *Lactobacillus delbrueckii*. Naime oni su pronašli da

proizvodnja mlijecne kiseline ovisi o koncentraciji stanica i o brzini njihova nastajanja, te su predložili slijedeći izraz:

$$r_P = \alpha r_X + \beta \cdot c_X = \alpha \mu \cdot c_X + \beta \cdot c_X \quad 2.5.$$

Vidljivo je da se ovaj izraz može podijeliti na izraz koji je vezan za rast ($\alpha \mu c_X$), te onaj koji nije vezan (βc_X).⁶³ Prema ovom pristupu proizlaze tri vrste produkata obzirom na rast stanice:

- vezani uz rast $r_P = \alpha \mu \cdot c_X$ 2.6.

- nevezani uz rast $r_P = \beta \cdot c_X$ 2.7.

- djelomično vezani uz rast $r_P = \alpha \mu \cdot c_X + \beta \cdot c_X$ 2.8.

2.6.1.1. Modeli proizvodnje enzima u stanici

Prilikom modeliranja nastajanja enzima važno je poznavati faktore koje utječu na mehanizam nastajanja enzima u stanici koji se mogu podijeliti u dvije kategorije¹:

- inducirani sistemi
- represijski mehanizmi

Naime vrlo malo enzima pripada kategoriji konstitutivnih, tj. onih koji se proizvode cijelo vrijeme mikrobiološke proizvodnje stanica pod svim uvjetima. To su uglavnom enzimi centralnog respiratornog metabolizma. Na sintezu ostalih enzima utjecaj imaju tvari koje induciraju njihovu proizvodnju i većina enzima koji se dobivaju industrijski ubraja se u ovu kategoriju. Represijski mehanizmi se javljaju kada konačni produkt ili meduprodukt katabolizma inhibira nastajanje enzima.

Modeli nastajanje enzima u stanici se uglavnom temelje na modelima nastajanja produkata. Najuobičajeni nestruktturni modeli za proizvodnju enzima⁶⁴ prikazani su u tablici 2.6.

Tablica 2.6. Modeli koji se koriste u mikrobiološkoj proizvodnji enzima⁶⁴.

Autori	Model
Brown & Vass	$\frac{dc_E}{dt} = k_E \frac{dc_{X_{t-t_m}}}{dt}$
Kono & Asai	$\frac{dc_E}{dt} = k_E \cdot c_X$
Luedeking & Piret	$\frac{dc_E}{dt} = a \frac{dc_X}{dt} + b c_X$
Kosaric, Yu & Zajic	$\frac{dc_E}{dt} = (k_1 + k_2 + 1) \frac{dc_X}{dt} + k_1 c_X$
LeDuy	$\frac{dc_E}{dt} = k_1 \frac{dc_{X_{t-t_l}}}{dt} + k_2$

c_E u jednadžbama predstavlja volumnu aktivnost enzima [U dm⁻³], c_X koncentraciju biomase [g dm⁻³], t_m vrijeme potrebno da se enzim počne sintetizirati [h], t_l fazu prilagodbe [h], dok su k , k_E , k_1 , k_2 , a i b konstante.

U literaturi se može naći više primjera korištenja ovih modela. Za proizvodnju amilaze *Calvatia gigantea*⁶⁴ najbolje slaganje je dobiveno uz model Brown & Vassa. To je model kojim se opisuje proizvodnja enzima vezana uz rast stanice, ali u obzir uzima vrijeme potrebno da se enzim počne sintetizirati. Inače se primjenjuje za modeliranje proizvodnje velikog broja produkata nastalih biokemijskom aktivnošću mikroorganizama. S tim modelom je opisana i proizvodnja dekstransukraze bakterijom *Leuconostoc mesenteroides*⁶⁵.

Također se u literaturi mogu naći i primjeri modifikacija ovih modela, obzirom na faktore koji utječu na sintezu enzima. Nastajanje enzima glukoza oksidaze u *Aspergillus niger*⁶⁶ koji katalizira oksidaciju glukoze proizvodeći pritom glukonsku kiselinu i vodikov peroksid se opisuje modificiranim modelom Luedekinga & Pireta (tablica 2.6.). Naime enzim se u mediju spontano deaktivira, a brzina deaktivacije se opisuje kinetikom prvog reda:

$$r_{DE1} = k_{D1} c_E \quad 2.9.$$

Uz ovu deaktivaciju, glukoza oksidaza se deaktivira i zbog prisustva vodikovog peroksida. Brzina te deaktivacije je opisana kinetikom drugog reda jer ovisi o koncentraciji enzima i koncentraciji vodikovog peroksida:

$$r_{DE2} = k_{D2} c_E \cdot c_{H_2O_2} \quad 2.10.$$

Uzimajući u obzir prethodno navedene postavke brzina akumulacije enzima u mediju dana je izrazom:

$$\frac{dc_E}{dt} = a \frac{dc_X}{dt} + bc_X - (r_{DE1} + r_{DE2}) \quad 2.11.$$

Proizvodnja amilaze u kvascima *Schwanniomyces castellii* i *alluvius*⁶⁷ opisana je modelom vezanim uz rast stanice u koji je ugrađen troparametarski model kataboličke represije:

$$Q = \frac{1 + a(c_G / c_X)}{1 + b(c_G / c_X)} \quad 2.12.$$

jer u tom sustavu glukoza ili neki njezin katabolički produkt inhibiraju proizvodnju enzima. Sumarni model proizvodnje amilaze je dan izrazom:

$$\frac{dc_E}{dt} = k_E Q \frac{dc_X}{dt} \quad 2.13.$$

Sinteza enzima α-galaktozidaza u pljesni *Monascus* je potisnuta kataboličkom represijom⁶³. Kada pljesan raste uz glukozu kao izvor energije i ugljika, enzim se uopće ne sintetizira. Ako su kao supstrati prisutni glukoza i galaktoza, glukoza se prva troši i za to vrijeme ne dolazi do proizvodnje enzima. Za strukturni model za proizvodnju enzima potrebno je prepostaviti koncentraciju intracelularne galaktoze pomoću koje dolazi do njegove sinteze:

$$\frac{dc_{GALi}}{dt} = \left[U \left(\frac{G_{GAL} c_{GALi}}{K_M + c_{GAL}} - c_{GALi} \right) - k_1 c_{GALi} \right] \cdot c_X \quad 2.14.$$

U ovoj jednadžbi utjecaj glukozne represije se modelira uzimajući u obzir slijedeću pretpostavku: kada je ekstracelularna koncentracija glukoze veća od $c_{G,krit}$, brzina transporta galaktoze u stanicu odmah prestaje, tj. kada je $c_G \geq c_{G,krit}$ tada je koeficijent transporta glukoze u stanicu $U [h^{-1}]$ jednak nuli. Bez galaktoze u stanci, represor (R) inhibira sintezu mRNK koja je odgovorna za proizvodnju α -galaktozidaze. U prisutnosti galaktoze, ona stvara kompleks sa represorom $[Rc_{GAI}]$ koji se više ne može vezati za DNK i tada počinje proizvodnja enzima. Količina (neidentificiranog) intracelularnog represora može se računati ako se pretpostavi da se stvara konstantnom brzinom k_2 , raspada po kinetici prvog reda (k_3R), te da reverzibilno reagira sa galaktozom stvarajući kompleks $[Rc_{GAI}]$:

$$\frac{dR}{dt} = (k_2 - k_3 R - k_4 [Rc_{GALi}] + k_5 [Rc_{GAI}]) \cdot c_X \quad 2.15.$$

Za određivanje količine mRNK pretpostavlja se da njezina sinteza ovisi o koncentraciji slobodnog represora. Naime u prisutnosti galaktoze, koncentracija slobodnog represora se smanjuje, jer se ona veže za represor, koji tada više nije efektivan u sprječavanju stvaranja mRNK. Tada je brzina sinteze mRNK proporcionalna smanjenju slobodnog represora od neke maksimalne vrijednosti R_{MAX} . Uz pretpostavku da raspad mRNK prati kinetiku prvog reda, njezina sinteza je opisana izrazom:

$$\frac{dM}{dt} = [k_6 (R_{MAX} - R) - k_7 M] \cdot c_X \quad 2.16.$$

Obzirom da mRNK daje informaciju DNK za proizvodnju enzima α -galaktozidaze u pljesni *Monascus*, brzina njegova nastajanja je proporcionalna koncentraciji mRNK:

$$\frac{dc_E}{dt} = k_8 M \cdot c_X \quad 2.17.$$

Pri postavljanu strukturalnih modela u kojima se opisuju metabolički putovi u stanci brzina nastajanja enzima se često opisuje Monodovim izrazom. Brzina proizvodnje enzima

ovisi o intacelularnoj koncentraciji supstrata ili produkata koji sudjeluju odnosno nastaju u reakciji koja se provodi uz pojedini enzim. Tako npr. brzina nastajanja enzima alkohol dehidrogenaze iz *Saccharomyces cerevisiae* ovisi o intracelularnoj koncentraciji acetaldehida i koenzima NADH¹².

$$r_{ADH} = r_{ADH}^{\max} \frac{c_{Aldi}}{K_{Ald} + c_{Aldi}} \frac{c_{NADHi}}{K_{NADH} + c_{NADHi}} \quad 2.18.$$

Proizvodnja enzima u stanici se može također modelirati i modelom odjeljaka kojim se predočuje biomasa, a koji spada u strukturne modele. Tim modelom se biomasa dijeli u najčešće dvije ili tri zasebne cjeline (odjeljka). Za opisivanje nastajanja enzima endonukleaze u *Escherichia coli* stanica je podijeljena na tri odjeljka⁶⁸. Prvi, odnosno aktivni dio sastoји se od ribosoma, RNK i različnih aktivnih strukturalnih dijelova. Ostala dva su genetički odjeljci koji se sastoje od proteina, tj. enzima endonukleaze i DNK. Prednost ovog modela je što se procijenjeni parametri mogu koristiti u sustavima različitim od onih u kojima su procijenjeni jer se temelje na opisu stvarnih zbivanja u stanici.

2.6.2. Matematički modeli rasta pekarskog kvasca

Iako u literaturi postoji cijeli niz modela koji opisuju rast *Saccharomyces cerevisiae*, niti jedan nije u mogućnosti da u potpunosti opiše rast pri različitim uvjetima koji mogu nastati pri uzgoju kvasca.

2.6.2.1. Model A. H. E. Bijkerka i R. J. Halla

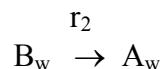
Osnovna postavka modela kojeg su predložili Bijkerk i Hall⁶⁹ je pupajući krug. Oni su pretpostavili da se rast stanica kvasca može predočiti u dva stupnja. Prvi stupanj obuhvaća akumulaciju supstrata i ovisan je o dostupnosti supstrata. U drugom stupnju stanice se dijele i ovaj stupanj je neovisan o supstratu. Generacijsko vrijeme je tada jednako sumi trajanja pupajuće faze i faze kada je stanica sama. Ovaj koncept rasta je upotrijebljen za razvoj modela rasta u dva stupnja. Model se bazira na slijedećim prepostavkama:

- sastav stanice i medija tvori jedinstven, jednoliko raspoređen sustav
- limitirajući supstrat je ugljik koji je također izvor energije
- biomasa je podijeljena u dva dijela, "A" masa i "B" masa

- "A" masa ima funkciju potrošnje supstrata i proizvodnje energije, dok masa "B" ima svojstvo reprodukcije i dijeljenja stanice
- prvi korak u podijeljenom procesu rasta i dijeljenja predstavlja akumulaciju energije i drugih metabolita. Pretpostavljeno je da je ovaj korak akumulacije uzrokovan masom "A" i opisuje konverziju mase "A" u masu "B".



- drugi korak predstavlja umnožavanje stanice. Pretpostavljeno je da masa "B" uzrokuje ovaj korak i opisuje konverziju mase "B" u masu "A".



Ovaj model su kasnije proširili Pamment⁸, Hall i Barford⁷ na opisivanje ponašanja kvasca u prijelaznom periodu tj. periodu indukcije. Oni su pronašli da dužina trajanja perioda indukcije ne ovisi o koncentraciji stanica, nego da ona ovisi o potrebi stanice da sintetizira adekvatnu količinu glikolitičkih odnosno respiratornih enzima.

2.6.2.2. Model B. Sonnleitnera i O. Käppelia

Model⁵ je razvijen na slijedećim zapažanjima i pretpostavkama:

- rast na glukozi i na etanolu slijedi približno idealno Monod-ovu kinetiku
- nema nusprodukata rasta u značajnim količinama; glavni produkti su biomasa, CO₂, H₂O i pri odgovarajućim uvjetima etanol. Eksperimentalna ugradnja ugljika je uvijek vrlo blizu 100 %
- specifična brzina potrošnje kisika je linearno povezana sa brzinom specifične potrošnje glukoze samo pri oksidativnom metabolizmu. Pri oksido-reduktivnim uvjetima (uvjeti pri kojima stanice stvaraju etanol) specifična brzina potrošnje kisika postaje konstantna i na svojoj maksimalnoj vrijednosti je neovisna o brzini rasta
- glukoza inhibira potrošnju etanola kao supstrata za rast, ako je prisutna u mjerljivim količinama
- glukoza se može metabolizirati aerobno i anaerobno, dakako, sa različitim brzinama i različitim efektima
- etanol se može metabolizirati samo aerobno

- elementarni sastav biomase koja raste na glukozi ne ovisi o proizvodnji etanola. Sastav mase koja raste na etanolu teži da bude nešto različit od onog na glukozi, ali razlike su unutar analitičke pogreške.

Prema gore navedenim pretpostavkama formuliran je model:

- Postoje tri različite stehiometrijske jednadžbe za opis rasta *Saccharomyces cerevisiae* na glukozi i (ili) na etanolu: čisti oksidativni (formula 1 i 3) i čisti reduktivni (formula 2) metabolizam.



Biomasa X ima molekularnu formulu $\text{C}_1\text{H}_{HX}\text{O}_{OX}\text{N}_{NX}$, gdje su HX, OX, NX i molekularne mase izračunate iz elementarne analize biomase. Za dušik je primijećeno da nema promjene u njegovom oksidativnom stanju, pa prema tome bilanca za dušik ne utječe na definirani sustav jednadžbi. Dakako, dušik mora biti prisutan u jednadžbama zbog utjecaja na bilancu vodika, koja mora biti zadovoljena.

- Iz gornjih jednadžbi dobivene su tri linearne algebarske jednadžbe, od kojih svaka sadrži bilancu za ugljik, kisik i vodik. Ovaj sistem jednadžbi nije definiran i prema tome se ne može riješiti tako dugo dok broj nepoznanica nije veći od broja jednadžbi za jedan. Prema tome potrebno je postaviti jedan empirijski koeficijent, i to po jedan za svaki set jednadžbi. Najvjerojatniji mjerni koeficijenti su koeficijenti iskorištenja (obzirom na mase) koji su proporcionalni stehiometrijskim koeficijentima (obzirom na množinu) u gornjim jednadžbama.

$$Y_{X/G}^{OX} = b \frac{\text{molekulska masa biomase}}{\text{molekulska masa glukoze}} \quad 2.19.$$

$$Y_{X/G}^{RED} = g \frac{\text{molekulska masa biomase}}{\text{molekulska masa glukoze}} \quad 2.20.$$

$$Y_{X/Et}^{OX} = l \frac{\text{molekulska masa biomase}}{\text{molekulska masa etanola}} \quad 2.21.$$

- Respiratori kapacitet stanice upravlja glukoznim ili etanolnim metabolizmom pri rastu stanica i proizvodnji produkata i predstavlja "usko grlo" (ograničenje) za oksidativnu potrošnju supstrata. Pri niskoj koncentraciji supstrata prevladava čisti oksidativni metabolizam (sa prvim prioritetom za glukozu i drugim za etanol). Pri koncentraciji glukoze većoj od kritične glukoza se metabolizira kombiniranim oksidativnim i reduktivnim putem. Dio glukoze ispod kritične koncentracije se metabolizira prema formuli 1, a ostatak se

metabolizira reduktivno prema formuli 2. Kako je potrošnja etanola čisti oksidativni proces i nije prioritet, ne dolazi do potrošnje etanola pri ovim uvjetima. Rast na etanolu kao čistom supstratu je ograničen respiratornim kapacitetom.

d) Potrošnja glukoze slijedi Monodovu kinetiku

$$r_G = r_{G,\max} \cdot \frac{c_G}{K_G + c_G} \quad 2.22.$$

e) Potrošnja etanola slijedi Monod-ovu kinetiku. Prioritetna potrošnja glukoze obzirom na etanol može se opisati kao inhibicija sa stvarno dostupnom glukozom.

$$r_{Et,up} = r_{Et,\max} \cdot \frac{c_{Et}}{K_{Et} + c_{Et}} \cdot \frac{K_i}{K_i + c_G} \quad 2.23.$$

f) Respiracija sama po sebi ovisi o dostupnosti otopljenog kisika.

$$r_O \leq r_{O,\max} \frac{c_O}{c_O + K_O} \quad 2.24.$$

ili

$$r_O^i \leq r_{O,\max}^i \frac{c_O}{c_O + K_O} \quad 2.25.$$

gdje su r_O^i i $r_{O,\max}^i$ brzine potrošnje kisika pri metabolizmu glukoze ili etanola.

g) Rast je autokatalitička reakcija.

$$r_X = \mu \cdot c_X \quad 2.26.$$

Ukupna specifična brzina rasta (μ_{ukupni}) je rezultat zbroja svih brzina potrošnje supstrata, gdje vrijede tri jednadžbe.

$$\mu_j = -Y_{X/S_j} r_{S_j} \quad 2.27.$$

$$\mu_{ukupni} = \mu_{OX} + \mu_{RED} + \mu_{Et} \quad 2.28.$$

$$\mu_{ukupni} = -Y_{X/G}^{OX} \cdot r_{G,OX} - Y_{X/G}^{RED} \cdot r_{G,RED} - Y_{X/Et} \cdot r_{Et,OX} \quad 2.29.$$

Za koeficijente iskorištenja se prepostavlja da su konstantni pri prvoj aproksimaciji. Vrijednosti za pojedine r i dakako za pojedine μ , zavise od slijedećeg:

1. Brzina potrošnje kisika nije jednaka maksimalnoj potrošnji kisika, tj. $r_{O,G,\max} = ar_S$ manji je nego $r_{O,\max}$. Sva glukoza je metabolizirana oksidativno u ovisnosti o dostupnosti otopljenog kisika.

$$r_{O,G} \leq r_{O,\max} \frac{c_O}{c_O + K_O} \quad 2.30.$$

ili, ako je odvojeno razmatrano potrošnja kisika pri potrošnji glukoze i etanola je:

$$r_{O,G} = r_{O,G,\max} \frac{c_O}{c_O + K_O} \quad 2.31.$$

$$\text{sa } r_{O,G,\max} = \min \left[\frac{r_{O,\max}}{ar_G} \right] \quad 2.32.$$

$$r_{G,OX} = \frac{r_{O,G}}{a} \quad 2.33.$$

Ostatak respiratornog kapaciteta može se upotrijebiti za rast na etanolu, ako je etanol prisutan u mediju, ali će ovisiti o dostupnosti kisika.

2. Brzina potrošnje glukoze je veća od mogućnosti respiracije, pa će $q_{O,G,\max} = ar_G$ biti veće nego $r_{O,\max}$, tj. ona količina glukoze koja se može oksidativno metabolizirati (u ovisnosti o dostupnosti otopljenog kisika) je potrošena prema putu (1), a ostatak (tj. $r_{G,RED} = r_G - r_{G,OX}$) je potrošen prema putu (2). Brzina potrošnje supstrata postavljena na ovaj način omogućava definiranje pojedinih specifičnih brzina μ vrijednosti upotrebljavajući pripadajuće konstante iskorištenja i sumirajući ih, te se na tako može dobiti ukupna brzina rasta.

h) Brzine nastajanja produkata (CO_2 , H_2O i etanola) rezultiraju iz stehiometrijskih jednadžbi (1-3) i iz gore navedenih brzina potrošnji supstrata za pojedine načine rasta.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. UZGOJ PEKARSKOG KVASCA NA TRESILICI

3.1.1. Djelatni kvasac

Za ovaj rad je bio odabran pekarski kvasac *Saccharomyces cerevisiae* (br. 52) pohranjen u zbirci mikroorganizama Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Čista kultura pekarskog kvasca se čuvala u hladnjaku na 4°C.

3.1.2. Hranjive podloge

3.1.2.1. Podloga za izolaciju, uzgoj i čuvanje kvasca

Za pripravu kosih podloga potrebno otopljeno je 47 g malt-agara u 1 dm³ hladne destilirane vode koji je nakon 15 minuta nabubrio. Nakon bubrenja otopina je zagrijavana uz konstantno miješanje, do potpunog otapanja i bistrenja. Dobivena podloga je ulijevana u epruvete, sterilizirana u autoklavu na 1,1 bar i 121°C, kroz 15 minuta. Nakon sterilizacije podloge su nakošene i ostavljene da se hlađenjem želiraju. Tako dobivene podloge su se čuvale u hladnjaku na 4 °C.

3.1.2.2. Podloga za uzgoj kvasca za pripravu inokuluma

Otopljeno je 13-15 g agar-a u 1 dm³ hranjive podloge i ostavljeno 15 minuta da agar nabubri. Zatim je zagrijavano na plameniku do vrenja dok se podloga nije otopila i otopina razbistrlila, te se potom ulijevala u epruvete. Tako dobivena podloga je sterilizirana na 110°C, 0,5 bar u trajanju od 30 minuta. Nakon sterilizacije epruvete su ukošene, te ostavljene da se hlađenjem želiraju. Podloge su se također čuvale u hladnjaku na 4 °C.

3.1.2.3. Podloga za pripravu inokuluma i uzgoj pekarskog kvasca u bioreaktoru

Hranjiva podloga za uzgoj pekarskog kvasca je pripravljena na temelju literaturnih podataka⁷⁰ slijedećeg je sastava: FeSO₄ × 7H₂O 0,012 g dm⁻³; (NH₄)₂SO₄ 7,5 g dm⁻³; CaCl₂

0,030 g dm⁻³; KH₂PO₄ 1,5 g dm⁻³; CuSO₄ × 5H₂O 0,001 g dm⁻³; ZnSO₄ × 7H₂O 0,006 g dm⁻³; MgSO₄ × 7H₂O 0,691 g dm⁻³; glukoza 5, 10, 30, 50 g dm⁻³.

Hranjiva podloga za pripremu inokuluma je bila identičnog sastava.

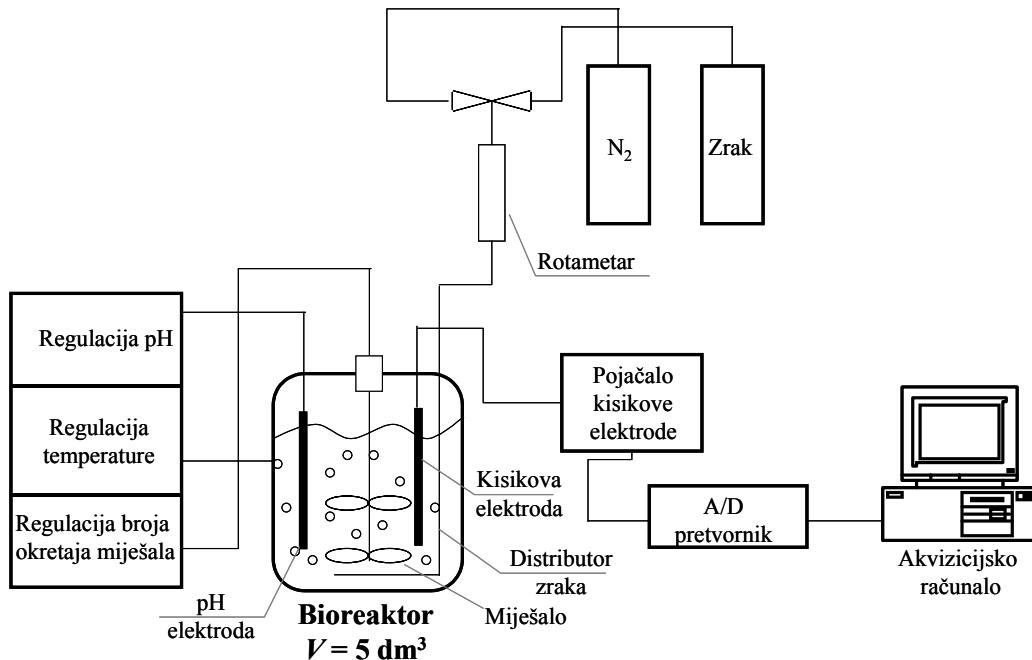
3.1.3. Priprava inokuluma

Pet dana prije provođenja uzgoja pekarskog kvasca u bioreaktoru kultura kvasca je precijepljena sa malt-agara (koji je bio korišten za održavanje kulture kvasca) na svježu podlogu malt-agara i na dvije podloge s glukoznim agarom. Nakon 72 h inkubacije na 28 °C u termostatu kulturu iz jedne epruvete sa glukoznim agarom je prenešen ezom uz sterilnu tehniku rada u Erlenmeyerovu tikvicu sa 100 cm³ hranjive podloge. Isti postupak je ponovljen i sa drugom epruvetom. Dobiven inokulum je termostatiran na tresilici (160 min⁻¹) pri 28 °C kroz 24 h. Tako pripremljen inokulum (200 cm³) korišten je za uzgoj pekarskog kvasca u reaktoru.

3.2. UZGOJ PEKARSKOG KVASCA U BIOREAKTORU

3.2.1. Bioreaktor

Uzgoj pekarskog kvasca je proveden u bioreaktoru proizvođača DRAŠLER volumena 5 dm³ prikazanog na slici 3.1. Reaktor je opremljen sustavom za regulaciju pH i temperature, te sustavom za regulaciju broja okretaja miješala (200-600 min⁻¹). Miješanje se provodilo sa dva turbinska miješala smještена na različitim visinama u reaktoru. Reaktor je također opremljen sustavom za sterilno uzimanje uzorka, distributorom zraka, filterom za sterilno uvođenje zraka, kisikovom i pH elektrodom, priključkom za uvođenje antipjenila (maslinovo ulje), te s četiri razbijača vrtloga. Uz pomoć kisikove elektrode dobivali su se podaci o koncentraciji otopljenog kisika u reaktoru, te su akvizirani na računalu svakih deset sekundi. Regulacijom broja okretaja miješala i regulacijom protoka zraka na rotometru kontrolirala se i regulirala koncentracija otopljenog kisika u reaktoru. pH se regulirao dodatkom kiseline ili lužine, a kontrolirao pomoću pH elektrode.



Slika 3.1. Shema bioreaktora

3.2.2. Proces proizvodnje enzima alkohol dehidrogenaze u šaržnom bioreaktoru

Prije sterilizacije bioreaktora provedeno je baždarenje pH elektrode sa komercijalnim puferima na dvije točke (pH 4 i pH 7).

Bioreaktor je steriliziran vodenom parom temperature 121 °C, pri tlaku od 1,5 bar tijekom 15 minuta. Tijekom sterilizacije reaktor je zatvoren čeličnim plaštem.

Nakon sterilizacije u bioreaktor je sterilno dodano 3,3 dm³ hranjive podloge koja je termostatirana na 30° C. Zatim je provedeno baždarenje kisikove elektrode na dvije točke pomoću dušika i zraka. Propuhivanjem dušika kroz destiliranu vodu u bioreaktoru je određena nulta točka koncentracije kisika, a propuhivanjem zraka je određena druga točka u kojoj je koncentracija otopljenog kisika jednaka koncentraciji zasićenja za dani normalni tlak i temperaturu.

Trenutak početka reakcije aproksimiran je sterilnim dodavanjem 200 cm³ inokuluma. Istovremeno je počela akvizicija podataka o koncentraciji otopljenog kisika na računalu.

Uzgoj pekarskog kvasca provođen je na temperaturi 30° C i pH 5 koji je održavan dodatkom otopina NaOH ili HCl koncentracije 5 mol dm⁻³. Koncentracija otopljenog kisika u reakcijskom mediju regulirana je mijenjanjem broja okretaja miješala.

Uzorak za analizu, volumena 15 cm^3 , uziman je sterilno svakih sat vremena s početkom eksponencijalne faze uzgoja .

3.2.3. Postupak uzimanja uzorka iz reaktora

Na gumenoj cijevi koja je izlazila iz reaktora se nalazila klema. Druga se klema nalazila na cijevi koja je bila spojena na špricu. Uzorak je tri puta uvučen u špricu i vraćen u reaktor. Na taj je način uzorak homogeniziran, a šprica ispirana od prethodnog uzorka. Uzorak volumena $12-15 \text{ cm}^3$ je zatim ponovo uvučen u špricu, zrak je istiskivan iz šprice, a klema na cijevi koja izlazi iz reaktora je zatvarana. Potom je otvorena klema na cijevi za ispuštanje, te je dio uzorka ispuštan kao otpad, a ostatak u plastičnu epruvetu. Nakon toga je klema na cijevi za ispuštanje zatvorena. Uzeti je uzorak odmah analiziran.

3.2.4. Sterilizator

Za sterilizaciju hranjivih podloga, posuđa i dijelova reaktora korišten je autoklav proizvođača Sutjeska, Beograd. Boce sa hranjivim podlogama zatvarane su sa vatenim čepovima, koji su imali funkciju filtra zraka, i bili obloženi aluminijskom folijom, kako bi nakon sterilizacije ostali zaštićeni od utjecaja mikroorganizama.

3.2.5. Spektrofotometar

Mjerenje koncentracije biomase, etanola, glukoze, proteina, volumne aktivnosti enzima ADH provedeno je upotrebom spektrofotometrijskih metoda na dvozračnom spektrofotometru SHIMADZU UV-1601 (Japan).

3.2.6. Centrifuga

Uzorci su centrifugirani na stojećoj, horizontalnoj centrifugi proizvođača TEHTNICA (Slovenija) na 5000 min^{-1} .

3.2.7. Tresilica

Inokulum je pripreman na tresilici *vibromix* 313 *EVT* proizvođača TEHTNICA (Slovenija).

3.3. ANALITIČKE METODE

Tijekom provedbe uzgoja pekarskog kvasca praćene su koncentracije: biomase, etanola, glukoze, proteina, te koncentracija otopljenog kisika, kao i aktivnost enzima ADH (specifična i volumna).

3.3.1. Određivanje koncentracije biomase

Koncentracija biomase je određena mjerenjem apsorbancije na spektrofotometru u vidljivom području na 660 nm⁷¹. Prije samog određivanja koncentracije biomase u uzorcima iz reaktora bilo je potrebno napraviti baždarni pravac(prilog 3.). On je dobiven mjerenjem apsorbancije otopina poznatih koncentracija biomase. Uz pomoć nagiba baždarnog pravca, razrjeđenja i vrijednosti apsorbancije uzorka nepoznate koncentracije uzete iz reaktora, određivana je koncentracija biomase. Koncentracija biomase u reakcijskom mediju računata je iz slijedećeg izraza 3.1. koji je izведен iz jednadžbe baždarnog pravca.

$$c_x = \frac{ABS \cdot Fr}{k} \quad 3.1.$$

gdje je: c_x - koncentracija biomase [g dm^{-3}];

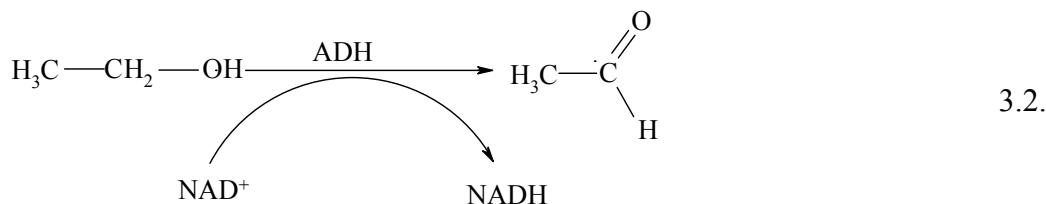
ABS - apsorbancija [-];

Fr - faktor razrjeđenja [-];

k - nagib baždarnog pravca, koji prolazi kroz ishodište i iznosi $0,8195 \text{ dm}^3 \text{ g}^{-1}$;

3.3.2. Određivanje aktivnosti enzima ADH u stanici

Određivanje aktivnosti enzima ADH se temelji na reakciji oksidacije alkohola u acetaldehid uz NAD^+ kao koenzim pri $\text{pH} = 8,7$ (ADH je najaktivnija pri ovom pH). To je dvosupstratna reakcija katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom, a provodi se u glicin-pirofosfatnom puferu. Shematski se ona može prikazati slijedećom jednadžbom 3.2.



U reakciji je spektrofotometrijski mjerena promjena koncentracije NADH pri valnoj duljini $\lambda = 340$ nm. Naime, reducirani nikotin-amid-adenin-dinukleotid (NADH) apsorbira maksimalnu količinu svjetla valne duljine od 340 nm, dok njegova oksidirana forma (NAD^+) u valnom području od 300 do 400 nm ne apsorbira svjetlo.

Za određivanje aktivnosti enzima ADH nastalog u stanicama kvasca korištene su slijedeće kemikalije:

- Natrijev pirofosfat ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$); Kemika
- Glicin (α -aminooctena kiselina – $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$); Merck;
- Semikarbazid-hidroklorid ($\text{H}_2\text{NNHCONHHCl}$); Kemika;
- Natrijev hidroksid (NaOH); Kemika;
- Etanol, 96 %-tni; Kemika;
- NAD^+ (β -nikotin-amid-adenin-dinukleotid); Merck.

Priprava otopina:

1. Glicin-sodium-pirofosfatni pufer
 - 10 g $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ i 0,5 g glicina potrebno je otopiti u 300 cm^3 redestilirane vode i podesiti pH te otopine na 8,7 sa otopinom NaOH koncentracije 5 mol dm^{-3} .
2. Otopina semikarbazid-hidroklorida
 - 2,5 g semikarbazid-hidroklorida potrebno je otopiti u 10 cm^3 2 mol dm^{-3} NaOH .
3. Otopina NAD^+
 - 0,2 g NAD^+ potrebno je otopiti u 10 cm^3 destilirane vode.
4. Otopina etanola
 - korištena je otopina etanola koncentracije $16,9\text{ mol dm}^{-3}$ (96 %-tni etanol)

U kvarcene kivete volumena 3 cm^3 potrebno je odpipetirati volumen svake komponente prema tablici 3.1.

Tablica 3.1. Sastav otopina u kiveti za ispitivanje aktivnosti enzima ADH.

Materijal	Slijepi uzorak [cm ³]	Mjerni uzorak [cm ³]
Glicin-pirofosfatni pufer	2,0	2,0
Semikarbazid-hidroklorid	0,1	0,1
NAD ⁺	0,2	0,2
Etanol	0,1	0,1
Uzorak	-	0,5
Redestilirana voda	0,5	-

Prije određivanja aktivnosti uzorak je bilo potrebno pripremiti. Iz reaktora uzeti uzorak je centrifugiran 10 minuta na 5000 min⁻¹. Bistra otopina je korištena za određivanje koncentracije etanola i glukoze, dok je biomasa (talog) zaostala na dnu kivete korištena za određivanje aktivnosti. Bistra je otopina oddekantirana, a na biomasu je dodana određena količina detergenta radi permeabilizacije stanične stjenke⁷². Količina dodanog detergenta je bila ekvivalentna količini nastale biomase. Kao detergent je korištena 0,02 %-tna otopina heksadecil-trimetil-amonijum bromida (Fluka) u 0,1 mol dm⁻³ puferu K₂HPO₄-KH₂PO₄; pH 7.

Tako pripremljen uzorak je homogeniziran na homogenizatoru 15 minuta, a zatim centrifugiran 10 minuta na 5000 min⁻¹. Bistra otopina je oddekantirana, a na biomasu je dodano 5 cm³ 0,1 mol dm⁻³ pufera K₂HPO₄-KH₂PO₄, te je otopina homogenizirana 5 minuta na homogenizatoru. Od ovako pripremljenog uzorka odpipetirano je 0,5 cm³ za određivanje aktivnosti.

Potrebno je bilo raditi brzo jer reakcija započinje čim je uzorak dodan. Tijekom reakcije dolazi do nastanka NADH što spektrofotometar registrira kao promjenu absorbancije u vremenu. Apsorbancija je proporcionalna aktivnosti enzima ADH u stanicama kvasca.

Volumna aktivnost enzima se računa iz izraza 3.3.

$$A_V = \frac{V_r}{\varepsilon_{340} \cdot d \cdot V_m} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad 3.3.$$

gdje je: V_r - ukupni dodani volumen reaktanta [cm³];

V_m - volumen dodanih mikroorganizama [cm³] (uzorka u kiveti);

ε_{340} - ekstincijski koeficijent [cm²μm⁻¹], ($\lambda = 340$ nm; $\varepsilon_{340} = 6,22$ cm²μm⁻¹);

d - promjer kivete [cm], ($d=1$ cm);

$\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$ - promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca) [min⁻¹].

Specifična aktivnost predstavlja aktivnost enzima ADH po gramu kvasca i izračunava se prema izrazu:

$$A_s = \frac{A_V}{c_x} \quad 3.4.$$

gdje je: A_s - specifična aktivnost [U mg^{-1}];
 A_V - volumna aktivnost [U cm^{-3}];
 c_x - koncentracija biomase u kvarcnoj kiveti [g dm^{-3}].

Reakcija dehidriranja alkohola je reverzibila. Dodatkom semikarbazid-hidroklorid, koji veže acetaldehid se ravnoteža pomiče udesno. Radilo se u glicin-pirofosfatnom puferu radi sprečavanja denaturacije enzima ionima teških metala⁷³.

3.3.3. Određivanje koncentracije etanola

Koncentracija etanola je određivana pomoću Boehringerova UV-testa⁷⁴. Ta se metoda temelji na reakciji 3.2. i provodi pri pH 8,7 jer je pri toj pH vrijednosti aktivnost ADH najveća za danu reakciju. Ovom se metodom spektrofotometrijski određuje koncentracija nastalog NADH pri valnoj duljini od 340 nm.

Priprava otopina:

Za mjerjenje koncentracije etanola upotrijebljene su otopine koje su korištene i za mjerjenje aktivnosti enzima ADH, samo je za oksidaciju etanola u uzorku iz bioreaktora upotrijebljen čisti enzim ADH proizvođača BOEHRINGER (Manheim, Njemačka). Korištena je otopina ADH koncentracije 30 mg cm⁻³, a enzim je otapan u puferu K₂HPO₄ – KH₂PO₄ koncentracije 0,1 mol dm⁻³ i pH 7.

Postupak:

Mjerenu koncentraciju etanola je prethodilo pripremanje uzorka. 10 cm³ uzorka je centrifugirano 10 minuta na 5000 min⁻¹ zbog odvajanja biomase. Biomasa (talog) zaostala nakon centrifugiranja je služila za određivanje aktivnosti enzima ADH u kvascu, a bistra otopina iznad biomase je korištena za određivanje koncentracije etanola. Uzorci su pripremani u kvarcnim kivetama volumena 3 cm³. Bilo je potrebno pripremiti i slijepu probu. Apsorbancija se određuje na 340 nm. Sastav slijepog i mjernog uzorka dan je u tablici 3.2.

Tablica 3.2.: Sastav otopine u kiveti za određivanje koncentracije etanola.

Materijal	Slijepi uzorak [cm ³]	Mjerni uzorak [cm ³]
Pufer	2,60	2,60
NAD ⁺	0,20	0,20
Semikarbazid-hidroklorid	0,10	0,10
Uzorak	-	0,10
Redestilirana voda	0,10	-
ADH	0,02	0,02

Mjerenje absorbancije je provedeno nakon pola sata, te ponovo nakon pet minuta, odnosno dok se apsorbancija nije ustalila na nekoj određenoj vrijednosti. Na osnovu te apsorbancije izračunate su koncentracije etanola u bioreaktoru na temelju izraza 3.5.

$$c_{EtOH} = \frac{ABS}{k} \cdot Fr \quad 3.5.$$

gdje je: c_{EtOH} - koncentracija etanola [g dm⁻³];

ABS - očitana apsorbancija nastalog NADH na 340 nm [-];

k - koeficijent baždarnog pravca koji iznosi 9,7575 dm³g⁻¹;

Fr - faktor razrjeđenja [-].

3.3.4. Određivanje koncentracije proteina

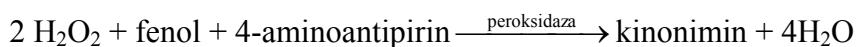
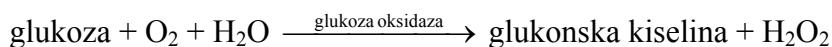
Za određivanje koncentracije proteina je korišteno 0,8 cm³ uzorka pripremljenog kao za određivanje aktivnosti enzima. Reagens za određivanje proteina je pripreman tako da je pomiješano 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 reagensa (BSA) proizvođača Fluka s 50 cm³ etanola, 100 cm³ H₃PO₄ (85 %-tna) i 850 cm³ redestilirane vode. Tako dobiveni reagens je korišten za određivanje apsorpcijskog maksimuma na $\lambda = 595$ nm.

Prije samog određivanja koncentracije proteina u uzorcima bilo je potrebno odrediti baždarni pravac (prilog 2.) mjeranjem apsorbancije otopina BSA poznate koncentracije na valnoj duljini od 595 nm. Koncentracije standardnih otopina BSA su bile slijedeće: 1 µg cm⁻³; 2,5 µg cm⁻³; 5 µg cm⁻³; 7,5 µg cm⁻³; 10 µg cm⁻³, a pripremene su razrjeđenjem otopine BSA koncentracije 0,1 mg cm⁻³. Iz ovisnosti apsorbancije o vremenu dobivena je jednadžba pravca potrebna za preračunavanje koncentracije proteina u uzorcima.

Koncentracija proteina je određivana na slijedeći način: 0,8 cm³ uzorka je pomiješano sa 0,2 cm³ reagensa, te je nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi došlo do pojavljivanja plave boje. Na valnoj duljini od 595 nm je mjerena apsorbancija uzorka, a uz pomoć ranije određenog baždarnog pravca izračunava se koncentracija proteina u uzorku.

3.3.5. Određivanje koncentracije glukoze

Glukoza u uzorcima je određivana primjenom koloroenzimske (PAP) metode koja se zasniva na slijedećim reakcijama:



Kinonimin daje obojenje otopini koje apsorbira vidljivo svjetlo na valnoj duljini od 500 nm. Količina apsorbiranog svjetla proporcionalna je koncentraciji glukoze u otopini.

Prije mjerena je bilo potrebno pripremiti uzorak. 10 cm³ uzorka je centrifugirano 10 minuta na 5000 min⁻¹ zbog odvajanja biomase. Bistra otopina iznad biomase je korištena za određivanje koncentracije glukoze.

Otopine reagensa:

R1 reagens:

4-aminoantipirin	0,40 mmol dm ⁻³
glukoza oksidaza (GOD)	>300 µkat dm ⁻³
peroksidaza (POD)	>17 µkat dm ⁻³

R2 pufer:

Fosfatni pufer (pH = 7,4 ± 0,05)	100 mmol dm ⁻³
Fenol	10 mmol dm ⁻³

R3 standard: 5,56 mmol dm⁻³

Reagens je otopljen u puferu, te je sadržaj vraćen u otopinu pufera. Tako priređena otopina je bila stabilna 4 tjedna na temperaturi 2- 8 °C.

Mjerenja je provođeno spektrofotometrijski na valnoj duljini od 500 nm i temperaturi od 20 – 25 °C. Prije mjerena apsorbancije uzorka potrebno je napraviti baždarni pravac (prilog 1.) uz pomoć otopina glukoze poznatih koncentracija (standard). Rađeno je u

plastičnim kivetama volumena 1 cm³. Kao slijepa proba je korištena destilirana voda. Sastavi uzoraka prikazani su u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Sastav uzorka u kiveti za prilikom određivanja koncentracije glukoze.

Materijal	Sastav baždarnih otopina [cm ³]	Sastav otopine s uzorkom [cm ³]
Standard	0,01	-
Uzorak	-	0,01
Otopina reagensa	1,00	1,00

4. MODELIRANJE

4.1. MODELIRANJE UZGOJA PEKARSKOG KVASCA I NASTAJANJE ENZIMA ADH

Na temelju eksperimentalnih podataka postavljen je nestrukturni model rasta pekarskog kvasca koji se temelji na nekoliko pretpostavki:^{75,76}

- u reaktoru postoje dvije faze; plin i kapljevina, a mikroorganizmi se ne tretiraju kao posebna faza zbog svojih malih dimenzija i gustoće koja je bliska onoj vode
- sadržaj reaktora je homogen i u radijalnom i aksijalnom smjeru
- bilance topline nisu razmatrane u ovom modelu jer je temperatura u reaktoru kontrolirana
- prijenos tvari između plinske i kapljevite faze je objašnjen modelom filma⁷³ koji je i uklopljen u model

Uz ove su pretpostavke napisane bilance tvari za glukozu, etanol, kisik i biomasu za šaržni bioreaktor:

$$\frac{dc_x}{dt} = (\mu_{OX} + \mu_{RED} + \mu_{Et}) \cdot c_x \quad 4.1.$$

$$\frac{dc_G}{dt} = -(r_{G,ox} + r_{G,red}) \cdot c_x \quad 4.2.$$

$$\frac{dc_{Et}}{dt} = (r_{Et,pr} - r_{Et,OX}) \cdot c_x \quad 4.3.$$

$$\frac{dc_O}{dt} = k_L a \cdot (c_{O,ZAS} - c_O) - r_O \cdot c_x \quad 4.4.$$

U izrazima 4.1., 4.2., 4.3. i 4.4. lijeva strana jednadžbe predstavlja akumulaciju tvari u vremenu, dakle biomase u jednadžbi 4.1., glukoze u jednadžbi 4.2., etanola u jednadžbi 4.3. i kisika u jednadžbi 4.4. μ_{OX} predstavlja specifičnu brzinu rasta na glukozi u aerobnim uvjetima, μ_{RED} predstavlja također specifičnu brzinu rasta na glukozi, no u uvjetima limitiranosti kisikom. μ_{Et} predstavlja specifičnu brzinu rasta na etanolu u aerobnim uvjetima [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$]. c_X predstavlja koncentraciju biomase [$\text{g}_{ST} \text{dm}^{-3}$], c_G predstavlja koncentraciju glukoze [g dm^{-3}], c_{Et} predstavlja koncentraciju etanola [g dm^{-3}] i c_O predstavlja koncentraciju kisika u reakcijskom mediju [g dm^{-3}]. $c_{O,ZAS}$ predstavlja koncentraciju kisika u zasićenju [g dm^{-3}]. $k_L a$ predstavlja volumni koeficijent prijenosa kisika [h^{-1}], r_O specifičnu brzinu

potrošnje kisika [h^{-1}], $r_{Et,pr}$ specifičnu brzinu nastajanja etanola [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$], $r_{Et,OX}$ specifičnu brzinu oksidacije etanola [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$], $r_{G,OX}$ specifičnu brzinu potrošnje glukoze u aerobnim uvjetima [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$], $r_{G,RED}$ specifičnu brzinu potrošnje glukoze u anaerobnim uvjetima [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$]

Bilancna jednadžba za volumnu aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze izvedena je na temelju eksperimentalnih rezultata iz kojih je bilo vidljivo da volumna aktivnost prati rast biomase. Na temelju toga je pretpostavljeno da je brzina nastajanja enzima ADH u stanici kvasca vezana uz brzinu rasta biomase. Obzirom da je uočen lagani pad aktivnosti enzima kod zaustavljanja rasta stanica, odnosno prijelaza u stacionarni period, zaključeno je da tijekom proizvodnje enzima dolazi i do deaktivacije uzrokovane nepovoljnim uvjetima u bioreaktoru (temperatura, pH). Uz ove postavke napisan je slijedeći izraz za promjenu volumne aktivnosti enzima u vremenu¹:

$$\frac{dA_V}{dt} = a(\mu_{OX} + \mu_{RED} + \mu_{Et})c_x - bc_x \quad 4.5.$$

U izrazu 4.5. a i b su konstante koje se procjenjuju iz eksperimentalnih rezultata.

Pri modeliranju procesa u bioreaktoru važno je naglasiti da se zapravo promatraju dva sustava. Jedan od sustava je sam bioreaktor sa sadržajem, a drugi sustav stanica koja se može smatrati malim bioreaktorom unutar velikog bioreaktora. Kinetika, transport i dinamika sustava biomase je drugačija od one reaktora⁷⁶.

Specifična brzina potrošnje supstrata u uvjetima u kojima je ona limitirajući faktor opisana je jednadžbom 4.6.

$$r_G = r_{G,max} \cdot \frac{c_G}{K_G + c_G} \quad 4.6.$$

$r_{G,max}$ predstavlja specifičnu maksimalnu brzinu potrošnje glukoze [$\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$], koja se kao početna vrijednost za optimizaciju parametara modela izračuna iz eksperimentalnih podataka.

Drugim se supstratom smatra kisik, pa mu je u uvjetima limitiranim brzinom njegove potrošnje specifična potrošnja $r_{O,lim}$ [$\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$] dana jednadžbom 4.7.

$$r_{O,lim} = r_{O,max} \cdot \frac{c_O}{K_O + c_O} \quad 4.7.$$

Specifična brzina potrošnje glukoze u aerobnim uvjetima $r_{G,OX}$, [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$], može biti limitirana specifičnom brzinom potrošnje glukoze, ili pak specifičnom brzinom potrošnje kisika. Uvijek je ona manja brzina mjerodavna i određuje ukupnu brzinu procesa. Otuda slijedi jednadžba

4.8. iz koje slijedi da je specifična brzina potrošnje glukoze u aerobnim uvjetima određena manjom od te dvije specifične brzine. $Y_{O/G}$ u toj jednadžbi predstavlja iskorištenje kisika na glukozi [g g^{-1}], a početna vrijednost za optimizaciju parametara modela proizlazi iz stehiometrijskih koeficijenata makroskopskih jednadžbi.

$$r_{G,OX} = \min \left[\frac{r_G}{r_{O,lim} / Y_{O/G}} \right] \quad 4.8.$$

Do anaerobnog rasta na glukozi dolazi kada je kapacitet respiracije nedovoljan da metabolizira svu glukozu aerobno. Iz toga slijedi da je specifična brzina potrošnje glukoze $r_{G,RED}$ [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$] u takvim uvjetima dana izrazom 4.9.

$$r_{G,RED} = r_G - r_{G,OX} \quad 4.9.$$

Specifična brzina proizvodnje etanola $r_{Et,pr}$, [$\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$], u takvim je uvjetima dana jednadžbom 4.10. $Y_{Et/G}$ predstavlja iskorištenje na etanolu u reakciji nastajanja etanola iz glukoze [gg^{-1}], čija početna vrijednost za optimizaciju parametara modela također proizlazi iz stehiometrijskih koeficijenata makroskopskih jednadžbi.

$$r_{Et,pr} = Y_{Et/G} \cdot r_{G,RED} \quad 4.10.$$

Obzirom da je treći supstrat etanol, potrebno je definirati specifičnu brzinu njegove potrošnje [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$] na isti način kao što je definirana za glukozu i kisik.

$$r_{Et,up} = r_{Et,max} \cdot \frac{c_{Et}}{K_{Et} + c_{Et}} \quad 4.11.$$

$r_{Et,max}$ predstavlja maksimalnu brzinu potrošnje etanola [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$] čija se gruba procjena može izračunati iz eksperimentalnih podataka, a K_{Et} konstantu zasićenja etanolom [g dm^{-3}].

$$r_{Et,OX} = \min \left[\left(r_{O,lim} - r_{G,OX} \cdot Y_{O/G} \right) / Y_{O/Et} \right] \quad 4.12.$$

Brzina oksidacije etanola je određena minimalnom od dvije brzine navedene u izrazu 4.12. Druga brzina je određena brzinom potrošnje kisika od koje se oduzima potrošnja kisika vezana za glukozu uz uzimanje u obzir iskorištenja kisika na glukozi $Y_{O/G}$ [g g^{-1}], i iskorištenje kisika na etanolu $Y_{O/Et}$ [g g^{-1}].

Uzimajući u obzir prethodno navedeno moguće je napisati izraz za ukupnu specifičnu brzinu potrošnje kisika.

$$r_o = Y_{O/G} \cdot r_{G,OX} + Y_{O/Et} \cdot r_{Et,OX} \quad 4.13.$$

Specifična brzina rasta biomase [$\text{g g}^{-1}\text{h}^{-1}$] definirana je brzinom rasta na glukozi u aerobnim i u uvjetima limitiranosti kisikom, te brzinom rasta na etanolu u aerobnim uvjetima. Iz toga proizlaze jednadžbe 4.14., 4.15. i 4.16.

$$\mu_{OX} = Y_{X/G}^{OX} \cdot r_{G,OX} \quad 4.14.$$

$$\mu_{RED} = Y_{X/G}^{RED} \cdot r_{G,RED} \quad 4.15.$$

$$\mu_{Et} = Y_{X/Et} \cdot r_{Et,OX} \quad 4.16.$$

$Y_{X/G}^{OX}$ [gg^{-1}] u jednadžbi 4.14. predstavlja iskorištenje aerobnog puta pretvorbe glukoze u biomasu, $Y_{X/G}^{RED}$ [g g^{-1}] u jednadžbi 4.15. predstavlja iskorištenje puta pretvorbe glukoze u biomasu u uvjetima limitiranosti koncentracijom kisika, a $Y_{X/Et}$ u jednadžbi 4.16. predstavlja iskorištenje u procesu nastajanja biomase iz etanola [g g^{-1}].

Posljednja jednadžba modela uzima u obzir promjenu ukupnog volumnog koeficijenta prijenosa kisika $k_L a$ [h^{-1}] zbog promjene koncentracije biomase u reaktoru⁷⁶.

$$k_L a = k_L a_0 (1 + 0.07 \cdot c_X) \quad 4.17.$$

$k_L a_0$ je početna vrijednost ukupnog volumnog koeficijenta prijenosa kisika procijenjena na temelju empirijske korelacije⁷⁶ dane jednadžbom 4.18.

$$k_L a_0 = 3600 \left[0.026 \left(\frac{P}{V} \right)^{0.4} V_{plin}^{0.5} \right] \quad 4.18.$$

$\frac{P}{V}$ [kW m^{-3}] u jednadžbi 4.18. predstavlja karakteristiku bioreaktora određenu njegovim volumenom i snagom miješala. Obzirom da snaga miješala ovisi o broju okretaja miješala, a koji je tijekom provođenja pokusa mijenjan, procijenjena je srednja vrijednost na osnovi literaturnih podataka⁷⁷. V_{plin} predstavlja volumen plinske faze u reaktoru [m^3] koji se računa iz izraza 4.19.

$$V_{plin} = \frac{4G}{3600 D_r^2} \quad 4.19.$$

G u jednadžbi 4.19. predstavlja protok zraka [$\text{m}^3 \text{h}^{-1}$], a D_r promjer bioreaktora [m].

4.2. NELINEARNO OPTIMIRANJE PARAMETARA MODELA

Neka su A i B dva skupa podataka za koje vrijedi da je $x \in A$ i $y \in B$ između kojih postoji veza oblika⁷⁷:

$$y = f(x; \beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n) \quad 4.20.$$

ili predočeno matrično

$$Y = F(X; \beta) \quad 4.21.$$

Kako su skupovi A i B u većini slučajeva eksperimentalni podaci onda prethodne jednakosti obično ne vrijede, nego postoji određeno odstupanje koje se može definirati kao:

$$\varepsilon = Y_E - Y \quad 4.22.$$

Iz izraza 4.21. i 4.22. slijedi da je:

$$Y_E = Y + \varepsilon \quad 4.23.$$

ili

$$Y_E = F(X; \beta) + \varepsilon \quad 4.24.$$

Funkcija 4.24. se naziva regresijska funkcija.

Temeljni problem regresijske funkcije je pronalaženje vrijednosti parametara $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ koje ostvaruju minimalni ε , tj. za koje vrijedi $\varepsilon \rightarrow 0$.

Ovaj problem je moguće riješiti nelinearnim optimiranjem parametara tako da se odredi kriterij kojim će se moći utvrditi kada je ostvarena minimalna greška ε . Taj kriterij se naziva funkcijom cilja. Jedna od najjednostavnijih funkcija cilja je funkcija najmanjeg kvadratnog odstupanja, koja glasi:

$$\min \phi = \sum_{i=1}^n (Y_{E_i} - Y_i)^2 \quad 4.25.$$

ili

$$\min \phi = \sum_{i=1}^n [Y_{E_i} - f_i(x_i, \beta)]^2 \quad 4.26.$$

Postoji više metoda nelinearnog optimiranja parametara koje se mogu podijeliti u dvije grupe⁷⁸:

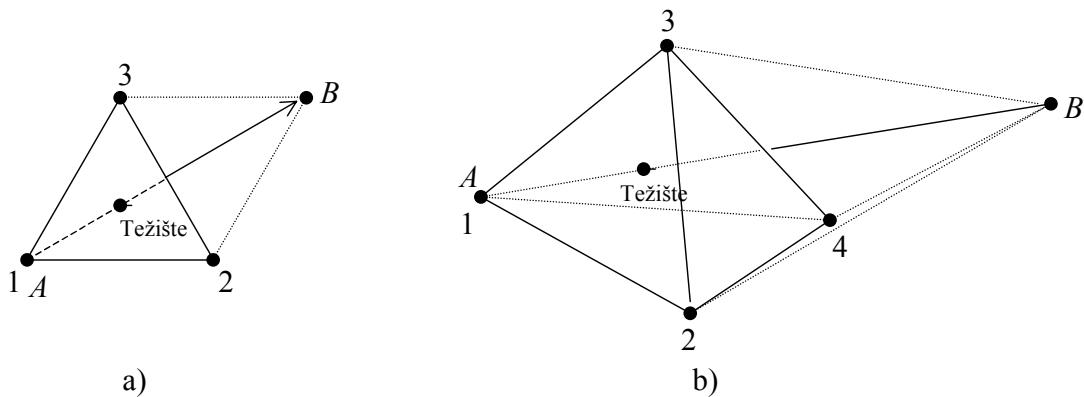
1. Metode bez derivacija
 - a) Simpleksna metoda
 - b) Metoda direktnog pretraživanja

2. Metode s derivacijama
 - a) Gauss-Newton-ova metoda
 - b) Gradijentna metoda
 - c) Marquardtova

4.2.1. Metoda Nelder-Meada⁷⁹

Parametri modela rasta pekarskog kvasca su optimirani nelinearnom regresijskom analizom korištenjem simpleks metode po Nelder-Meadu. Metoda Nelder-Meada pripada grupi simpleksnih metoda koje ne zahtijevaju derivacije i čija efikasnost raste s porastom broja parametara koje treba procijeniti. Kod ove metode funkcija cilja je definirana izrazom 4.26.

Metoda se temelji na tome da se pomoću postojećih točaka simpleksa računa slijedeća točka simpleksa upotrebom pravilnih geometrijskih oblika⁷⁸. Tako je za izračunavanje dva parametra simpleks istostranični trokut, dok je za četiri parametra pravilni tetraedar (slika 4.1.).



Slika 4.1. Pravilni simpleksi za dvoparametarske - a) i troparametarske funkcije – b)

Da bi se pronašao minimalni zbroj kvadrata greške ϕ , kao pokusne vrijednosti parametara mogu se pretpostaviti točke u parametarskom prostoru koje se nalaze na vrhovima simpleksa. Suma kvadrata greške se procjenjuje za svaki vrh, a zatim se iz točke koja dostiže najveću vrijednost funkcije cilja radi projekcija kroz težište (točka A, slika 5.1). Točka A se zatim briše i formira se novi simpleks, koji se zove refleksijski simpleks, od preostalih starih točaka i nove točke B, koja se nalazi na projiciranoj liniji na određenoj udaljenosti od težišta. U nastavku postupka uvijek se briše vrh koji ima najveću vrijednost funkcije cilja.

Uzimanjem u obzir pravila za smanjivanje veličine simpleksa, te pravila koja sprječavaju kruženje u blizini ekstrema omogućava se iznalaženje vrijednosti koje postižu minimalni zbroj kvadrata greške. U ovoj metodi je broj koraka fiksiran na smanjeni broj stupnjeva, ali tako da omogućava mijenjanje smjera traženja rješenja

4.3. RJEŠAVANJE DIFERENCIJALNIH JEDNADŽBI MODELA

Diferencijalne jednadžbe modela (jednadžbe bilanca tvari) rješavane su numerički Runge-Kutta IV algoritmom ili Episode algoritmom. Za simulacije je korišten Episode algoritam za krute sisteme diferencijalnih jednadžbi.

4.3.1. Metoda Runge-Kutta IV⁸⁰

Ova metoda je jedna od numeričkih metoda za rješavanje diferencijalnih jednadžbi. Postoje varijacije ove metode, ali se najčešće upotrebljava slijedeća: za diferencijalnu jednadžbu:

$$y' = f(x, y) \quad 4.27.$$

$$y(x_n) = y_n \quad 4.28.$$

računaju se koeficijenti po koracima slijedećim redom:

$$k_1 = hf(x_n, y_n) \quad 4.29.$$

$$k_2 = hf\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{k_1}{2}\right) \quad 4.30.$$

$$k_3 = hf\left(x_n + \frac{h}{2}, y_n + \frac{k_2}{2}\right) \quad 4.31.$$

$$k_4 = hf(x_n + h, y_n + k_3) \quad 4.32.$$

$$y_{n+1} = y_n + \frac{1}{6}(k_1 + 2k_2 + 2k_3 + k_4) \quad 4.33.$$

h je veličina koraka:

$$h = x_n - x_{n-1} \quad 4.34.$$

Jedan od načina dobivanja točnih rezultata ovom metodom je smanjivanje veličine koraka. Nedostatak je što se time povećava vrijeme računanja. Da bi se to izbjeglo uvodi se prilagodljiva kontrola veličine koraka, kojom se mijenja veličina koraka u svrhu dobivanja preciznijih rezultata za manje vrijeme računanja. Manji koraci se upotrebljavaju za intervale gdje su velike promjene vrijednosti, dok se veći uzimaju za ravna područja.

4.3.2 Episode algoritam⁸⁰

Pomoću Episode algoritma moguće je rješavati sisteme krutih diferencijalnih jednadžbi.

Krutost diferencijalnih jednadžbi se najčešće očituje kod problema koji sadrže dvije ili više zavisnih varijabli koje se razlikuju po načinu na koji ovise o nezavisnoj varijabli. Primjeri krutih jednadžbi su kinetički problemi koji se sastoje od jednog vrlo brzog i drugog polaganog procesa. Većina integratora, da bi izračunala stabilno rješenje, veličinu koraka limitira prema vremenskoj skali bržeg procesa. Ako je polaganiji proces tisuću puta sporiji od brzog procesa, integrator će morati uzeti tisuću puta više koraka, nego što je potrebno za polagan proces, čime se vrijeme računanja značajno povećava.

Episode se upotrebljava za rješavanje početnih vrijednosti krutih i ne-krutih sistema. Pomoću metoda sa promjenjivim koeficijentima (Adams-Moulton ili BDF metode), Jakobijeva matrica se tretira kao cijelina. Jakobijeva matrica se upotrebljava unutar algoritma za rješavanje sistema nelinearnih jednadžbi koje se pojavljuju kod ispravljanja iteracija za svaki pojedini korak.

Episode algoritam ima nekoliko značajki. Prvo, o promjeni veličine koraka i redoslijedu te promjene se odlučuje na kraju jednog uspješnog koraka, a ta promjena i njen redoslijed se u računanje uvode tek na početku slijedećeg koraka. Na taj način interpolacije između koraka upotrebljavaju više točnih podataka. Drugo, Episode sprema i ponovo upotrebljava Jakobijevu matricu, J , kao što se to radi pri Newtonovoj iteraciji, te na taj način čini računanje uspješnijim.

5. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je proveden uzgoj biomase pekarskog kvasca u kotlastom bioreaktoru u cilju razvoja matematičkog modela proizvodnje enzima alkohol dehidrogenaze.

U svrhu smanjivanja faze prilagodbe provedena su preliminarna mjerena da se pronađe optimalna početna koncentracije glukoze u inokulumu.

Na temelju podataka dobivenih uzgojem biomase u kotlastom bioreaktoru pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} \approx 30 \text{ g dm}^{-3}$ i mikroaerofilnim uvjetima, postavljen je nestrukturni matematički model procesa. Parametri modela procijenjeni su simpleks metodom Nelder-Mead-a pomoću programa napisanog u SCIENTIST-u komercijalnom software paketu.

Provadena je ocjena valjanosti modela tako da su rezultati simulacija uz pomoć procijenjenih parametara uspoređeni sa rezultatima pokusa. Model je validiran pri različitim početnim koncentracijama glukoze, te pri aerobnim uvjetima.

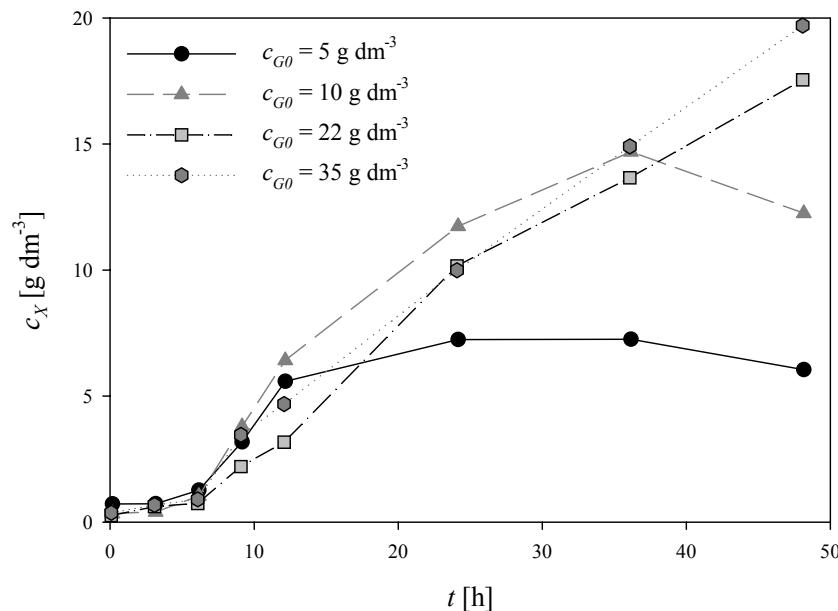
Svi pokusi su provođeni pri konstantnoj temperaturi $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, uz regulaciju pH i broja okretaja miješala. pH je održavan na 5 dodatkom kiseline ili lužine. Koncentracija kisika je održavana stalnom promjenom broja okretaja miješala i promjenom protoka zraka.

Tijekom provedbe eksperimenta praćena je koncentracija biomase, glukoze, etanola, te volumna aktivnost enzima ADH.

Obzirom da se radi o biološkom procesu svi su pokusi ponovljeni zbog loše ponovljivosti rezultata, koja je karakteristična za ove procese.

Na kraju je pomoću modela predviđeno ponašanje bioprosesa pri različitim koncentracijama kisika (obzirom na proizvodnju enzima ADH) uz pretpostavku da parametri modela kojim je opisana proizvodnja enzima ADH nelinearno ovise o koncentraciji kisika.

5.1. OPTIMIRANJE UZGOJA INOKULUMA



Slika 5.1. Vremenska promjena koncentracije biomase pri razlicitim početnim koncentracijama glukoze

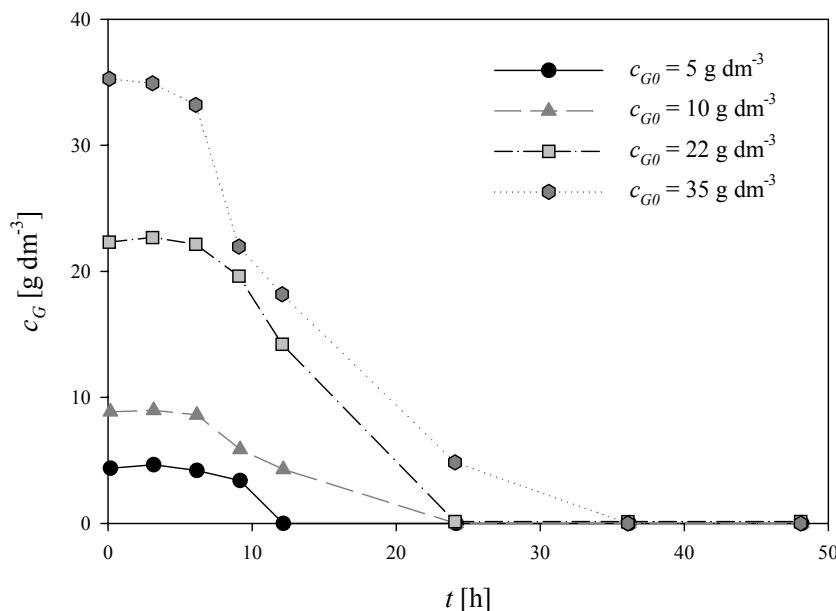
Uzgoj biomase u inokulumu proveden je u tikvicama pri temperaturi 30 °C i 160 min^{-1} tresilice bez kontinuiranog dotoka kisika. Sastav podloge naveden je u poglavljju 3.1.2.3. U ovim mjeranjima koncentracija etanola nije praćena.

Na slici 5.1. prikazan je utjecaj početne koncentracije glukoze na rast biomase u vremenu, a u tablici 5.1. su dana iskorištenja biomase na glukozi. Pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} \approx 5$ i 10 g dm^{-3} iskorištenje je najveće, dok se pri višim početnim koncentracijama glukoze ona smanjuju.

Tablica 5.1. Prikaz iskorištenja biomase na glukozi pri razlicitim početnim koncentracijama glukoze prilikom uzgoja pekarskog kvasca na tresilici

c_G [g dm ⁻³]	$Y_{X/S}$ [g g ⁻¹]
≈ 5	1,383
≈ 10	1,383
≈ 22	0,786
≈ 35	0,573

Naime, koncentracija kisika je u tikvicama ograničena, pa se pri višim koncentracijama glukoze, sva glukoza ne može razgraditi aerobno. Dio glukoze se tada metabolizira reduktivnim putem pri čemu nastaje etanol, što se odražava na nižim vrijednostima iskorištenja biomase na glukozi. Zbog toga je kao optimalna početna koncentracija glukoze određena $c_{G0} \approx 10 \text{ g dm}^{-3}$. Obzirom da je nakon 24-tog sata uzgoja inokuluma sva glukoza potrošena, što se vidi na slici 5.2. u dalnjim pokusima inokulum je uzbajan 24 sata pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} \approx 10 \text{ g dm}^{-3}$.



Slika 5.2. Vremenska promjena koncentracije glukoze pri različitim početnim koncentracijama glukoze

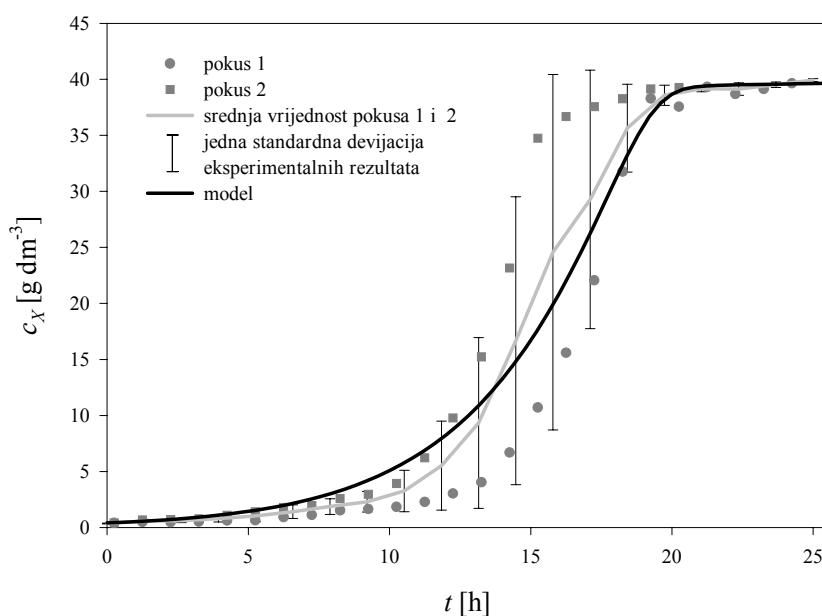
5.2. RAZVOJ MODELA

Za postavljanje matematičkog modela napravljene su dvije serije mjerena pri koncentraciji glukoze od 30 g dm^{-3} i pri mikroaerofilnim uvjetima, tj. koncentracija kisika je održavana na 10-20 % koncentracije zasićenja. Limitirana dobava kisika odabrana je zbog činjenice da se enzym alkohol dehidrogenaza koristi pri oksidativno reduktivnom metabolizmu, te je zbog toga pretpostavljeno da će tada i njegova aktivnost biti najveća. Pokus je ponovljen radi utvrđivanja ponovljivosti rezultata.

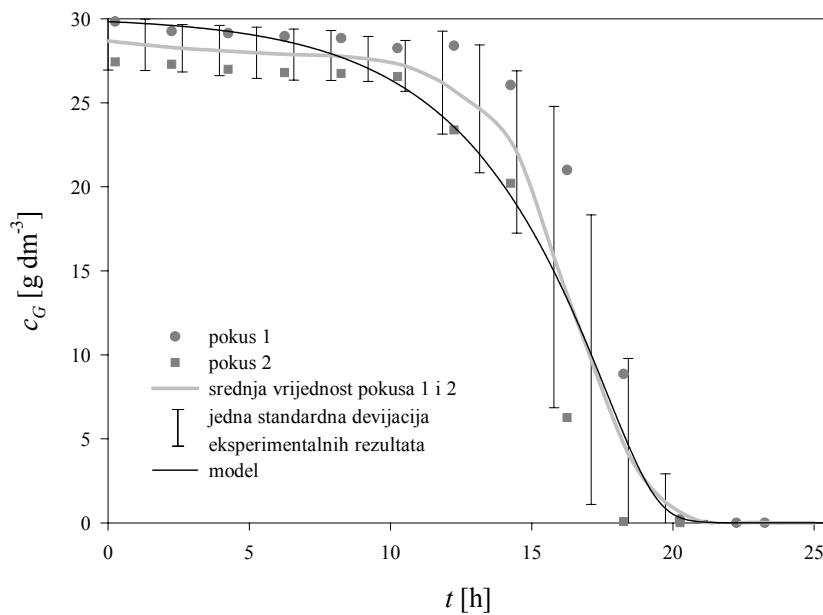
Sa slike 5.3. vidljivo je da se rast biomase može podijeliti na dva područja; područje eksponencijalnog rasta i područje linearog rasta. U području eksponencijalnog rasta biomasa

raste na glukozi u aerobnim i anaerobnim uvjetima. Do anaerobnih uvjeta dolazi samo kada je disanje nedovoljno da metabolizira ukupnu potrošnju glukoze aerobno. U anaerobnim uvjetima dolazi i do nastajanja etanola (slika 5.5.) a volumna aktivnost prati rast biomase (slika 5.6.). U području linearнog rasta biomase, biomasa aerobno raste na etanolu, što je vidljivo iz smanjenja koncentracije etanola iza 20-tog sata i koncentracije glukoze koja je nakon 20-tog sata pala na nulu (slika 5.4.). Do aerobnog rasta na etanolu, dolazi kada je brzina potrošnje kisika veća nego brzina potrošnje glukoze. Nakon pada koncentracije etanola na nulu, koncentracija kisika naglo raste i rast broja stanica pekarskog kvasca se zaustavlja. Volumna aktivnost nakon 20-tog sata lagano pada (slika 5.6.) zbog deaktivacije enzima.

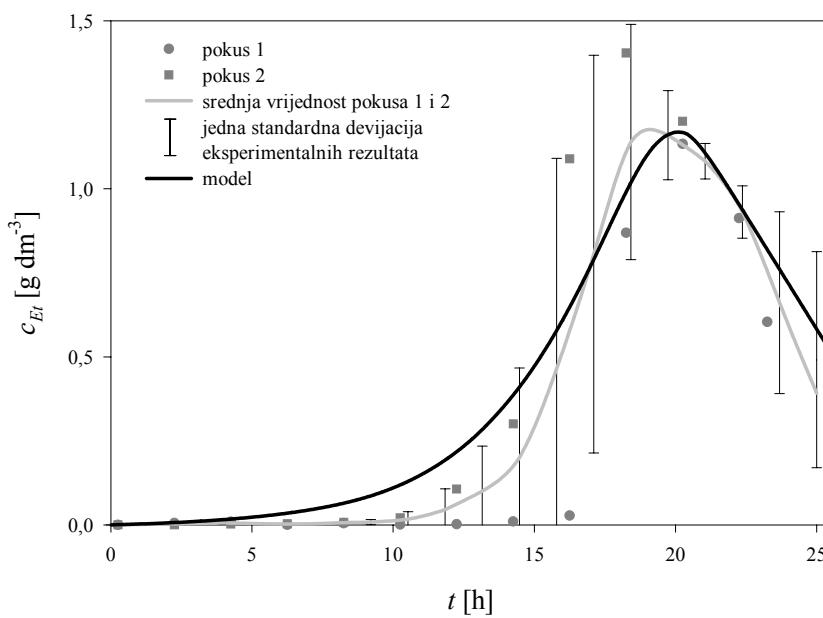
Pokus 1 i 2 pokazuju dobru ponovljivost, obzirom da se radi o biološkom procesu. Male razlike u vrijednostima najvjerojatnije su uzrokovane pogreškom nastalom eksperimentalnim mjeranjima.



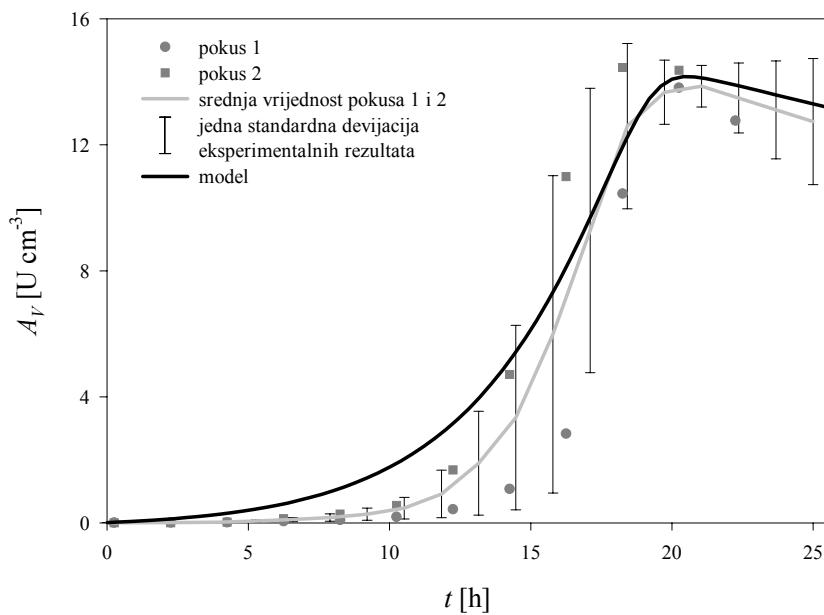
Slika 5.3. Vremenska promjena koncentracije biomase. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



Slika 5.4. Vremenska promjena koncentracije glukoze. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



Slika 5.5. Vremenska promjena koncentracije etanola. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



Slika 5.6. Vremenska promjena volumne aktivnosti. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

Na temelju ovih rezultata postavljen je model koji je prikazan u poglavlju 4. Parametri modela su optimirani pomoću SCIENTIST *software* paketa koji provodi nelinearnu regresijsku analizu i metodu optimiranja simpleks metodom po Nelder-Meadu. Diferencijalne jednadžbe modela rješavane su numerički Runge-Kutta IV algoritmom ili Episode algoritmom. Optimirani parametri su prikazani u tablici 5.2. Dobiveni parametri upotrijebљeni su za simulacije. Za simulacije je korišten Episode algoritam za krute sisteme diferencijalnih jednadžbi, koji je sastavni dio SCIENTIST paketa.

Rezultati usporedbe rezultata simulacije dobivenih pomoću modela i pokusa prikazani su na slikama 5.3 – 5.6. Obzirom da se podaci dobiveni modelom nalaze unutar gornjih i donjih vrijednosti standardnih devijacija eksperimentalnih rezultata može se zaključiti da se model dobro slaže sa rezultatima pokusa.

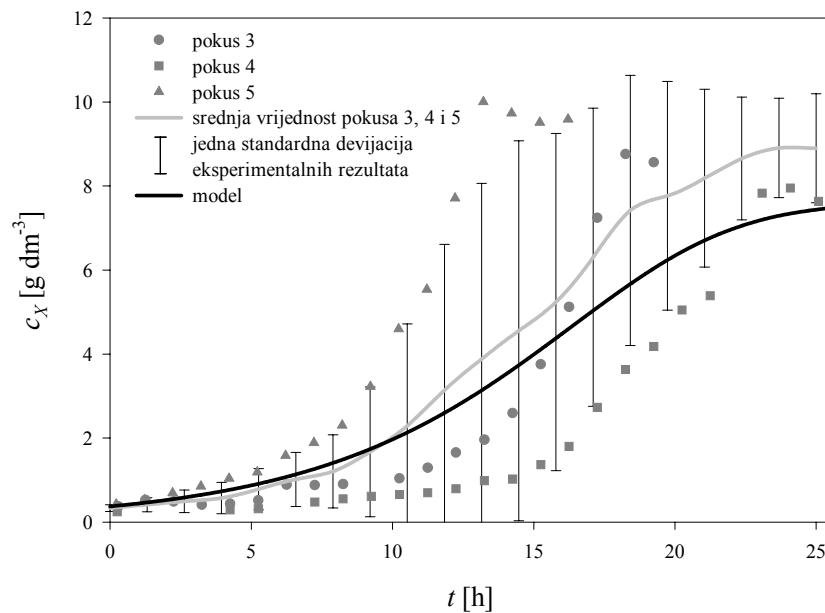
Tablica 5.2. Parametri dobiveni optimiranjem

Parametar	Procijenjene vrijednosti	\pm standardna greška
$r_{G,MAX} [\text{h}^{-1}]$	0,212	0,045
$r_{O,MAX} [\text{h}^{-1}]$	0,039	0,021
$r_{Et,MAX} [\text{h}^{-1}]$	1,454	0,521
$K_G [\text{g dm}^{-3}]$	3,674	1,121
$K_O [\text{g dm}^{-3}]$	$9,2 \cdot 10^{-5}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$
$K_{Et} [\text{g dm}^{-3}]$	1,200	1,154
$Y_{X/Et} [\text{g g}^{-1}]$	0,293	0,098
$Y_{O/Et} [\text{g g}^{-1}]$	2,838	1,241
$Y_{Et/G} [\text{g g}^{-1}]$	0,049	0,031
$Y_{O/G} [\text{g g}^{-1}]$	0,515	0,269
$Y_{X/G}^{OX} [\text{g g}^{-1}]$	1,521	0,347
$Y_{X/G}^{RED} [\text{g g}^{-1}]$	1,251	1,123
$a [\text{U g}^{-1}]$	0,400	0,987
$b [\text{U g}^{-1} \text{h}^{-1}]$	0,006	0,215

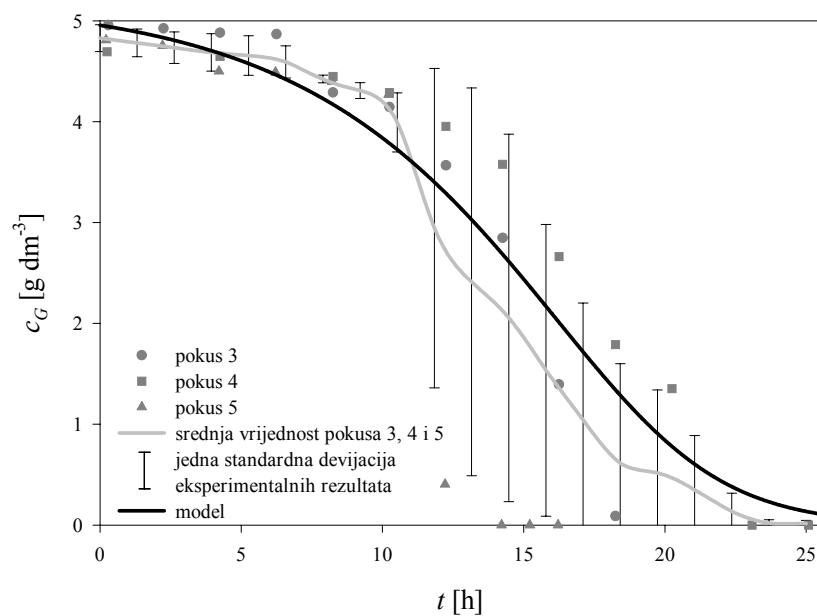
5.3. VALIDACIJA MODELA PRI RAZLIČITIM POČETNIM KONCENTRACIJAMA GLUKOZE

Kako je uočeno da volumna aktivnost prati rast biomase iz rezultata simulacije pomoću modela bilo je za očekivati da će pri nižim, odnosno višim početnim koncentracijama glukoze, nastati manje odnosno više biomase, a proporcionalno koncentraciji biomase i više enzima. Zbog toga je model validiran pri istim uvjetima dobave kisika, tj. pri mikroaerofilnim uvjetima, ali pri različitim početnim koncentracijama glukoze. Napravljeni su pokusi pri $c_{G0} \approx 5, 10$ i 50 g dm^{-3} . Za svaku pojedinu koncentraciju glukoze napravljeno je nekoliko serija mjerjenja zbog loše ponovljivosti rezultata pri bioprocесима. Na slikama 5.7.-5.18. prikazana je usporedba rezultata pokusa i simulacija pomoću modela. Vidljivo je dobro slaganje između rezultata pokusa i simulacije pomoću modela pri različitim početnim koncentracijama glukoze. Iz toga proizlazi da model vrijedi pri mikroaerofilnim uvjetima pri različitim početnim koncentracijama glukoze u području koncentracija glukoze $5 - 50 \text{ g dm}^{-3}$.

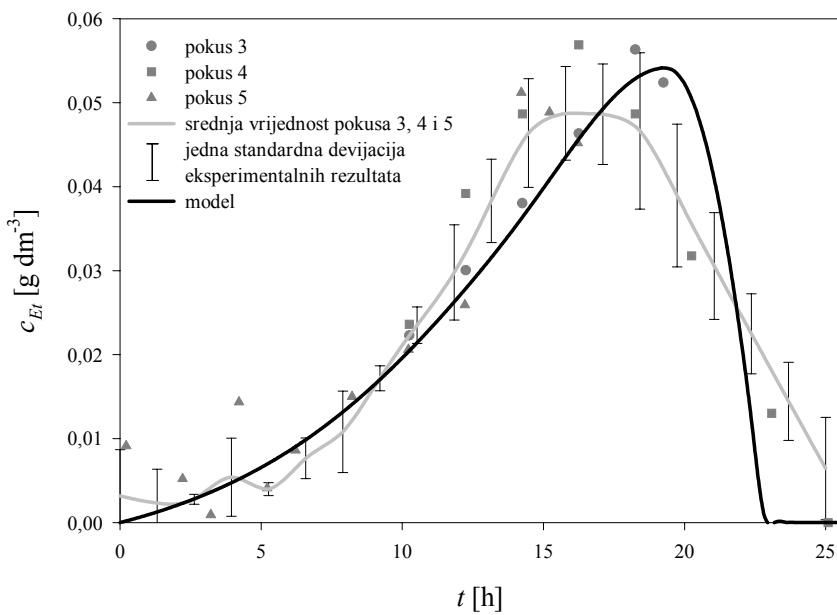
5.3.1. Validacija modela pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$



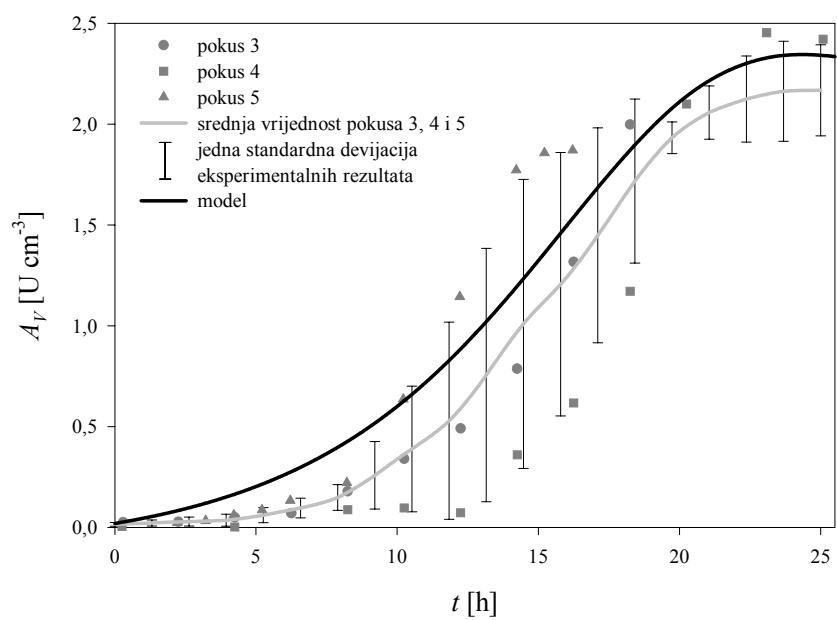
Slika 5.7. Vremenska promjena koncentracije biomase. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



Slika 5.8. Vremenska promjena koncentracije glukoze. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

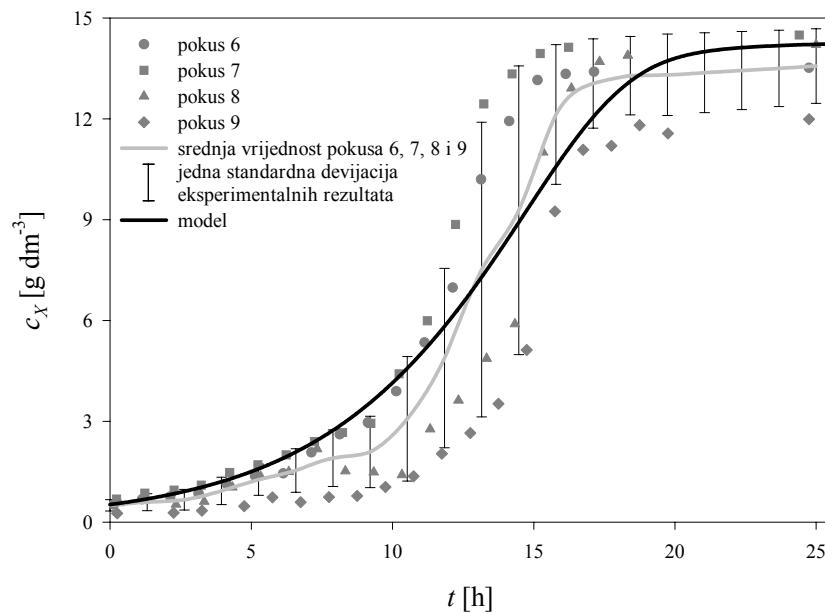


Slika 5.9. Vremenska promjena koncentracije etanola. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

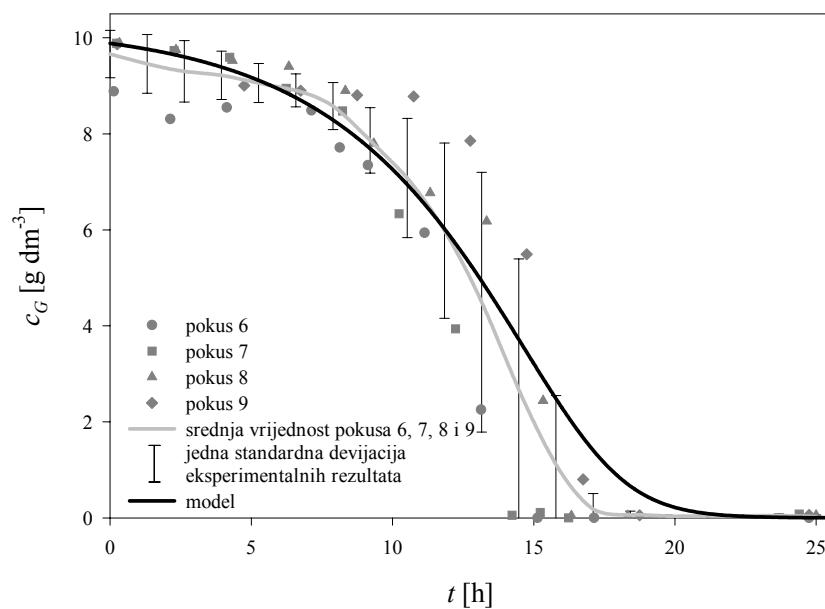


Slika 5.10. Vremenska promjena volumne aktivnosti. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

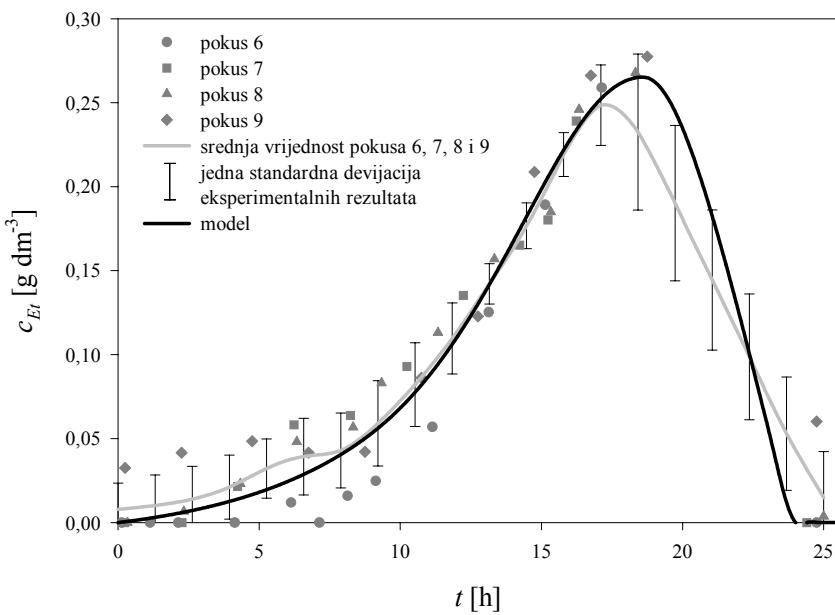
5.3.2. Validacija modela pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$



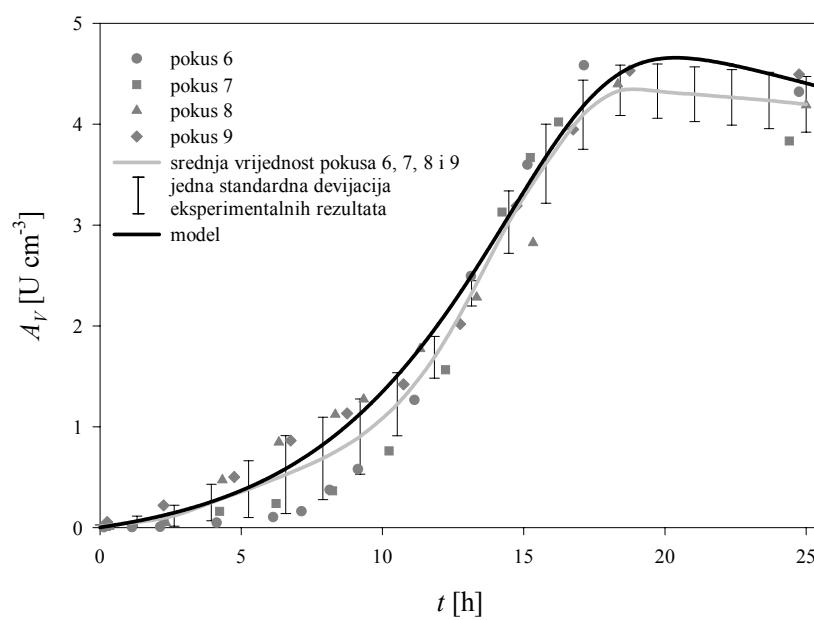
Slika 5.11. Vremenska promjena koncentracije biomase. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



Slika 5.12. Vremenske promjene koncentracije glukoze. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

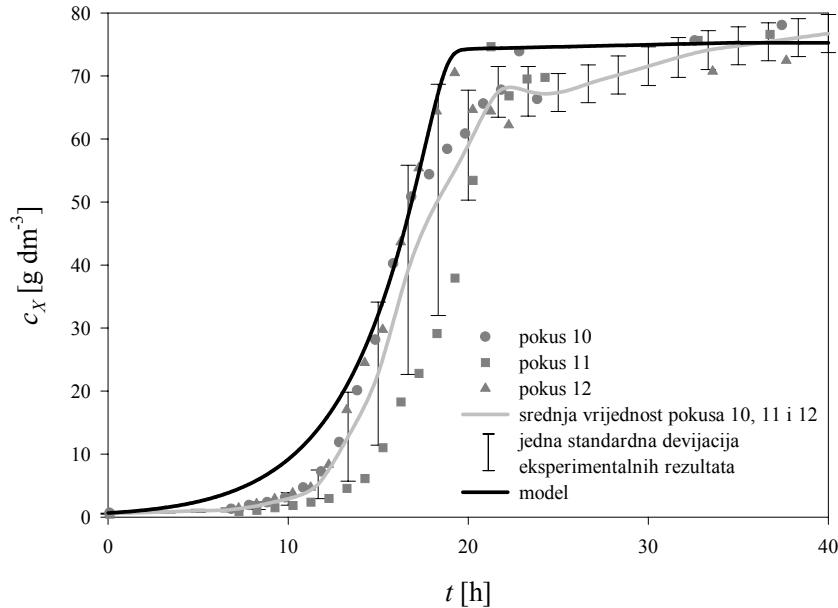


Slika 5.13. Vremenska promjena koncentracije etanola. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

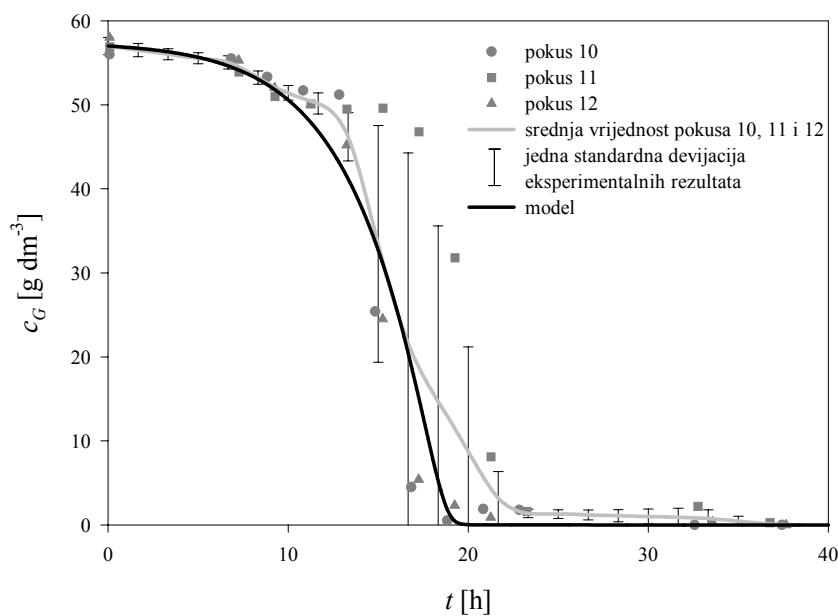


Slika 5.14. Vremenska promjena volumne aktivnosti. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

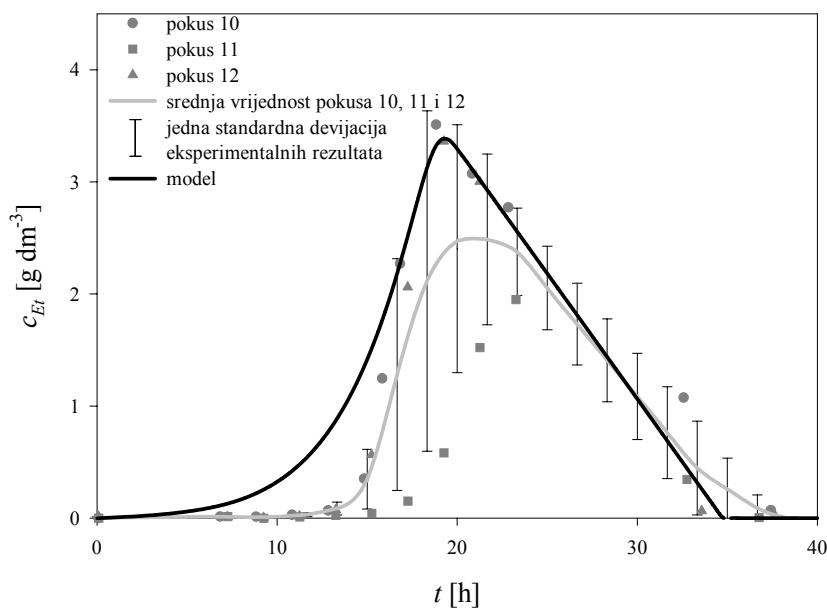
5.3.3. Validacija modela pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$



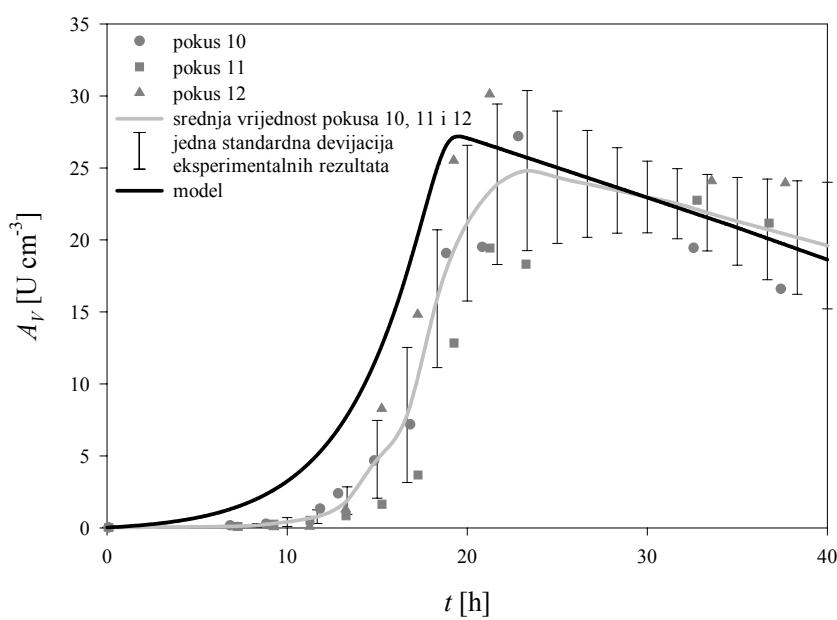
Slika 5.15. Vremenska promjena koncentracije biomase. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



Slika 5.16. Vremenska promjena koncentracije glukoze. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$) rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



Slika 5.17. Vremenska promjena koncentracije etanola. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

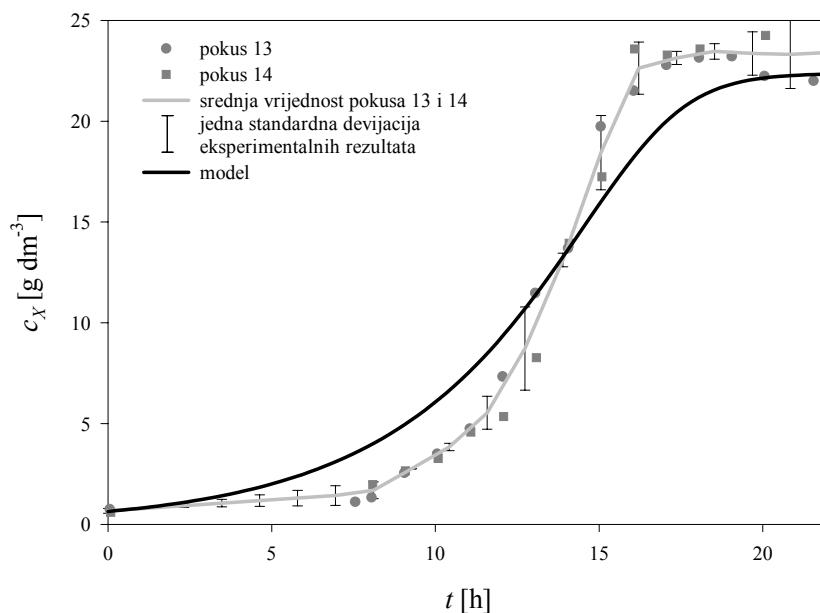


Slika 5.18. Vremenska promjena volumne aktivnosti. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

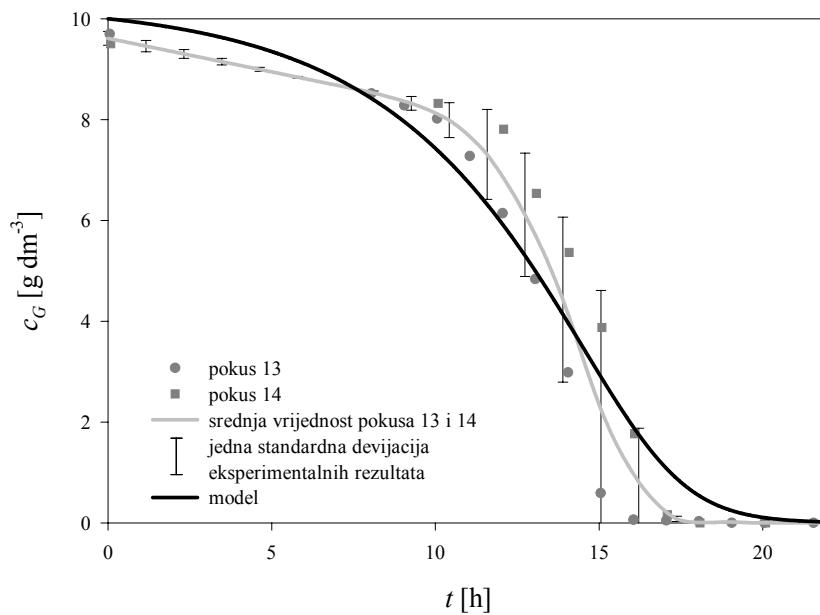
5.4. VALIDACIJA MODELA PRI AEROBNIM UVJETIMA

Da bi model bio validiran i pri aerobnim uvjetima napravljeni su pokusi pri koncentraciji kisika većoj od 40 % koncentracije zasićenja. Pokusi su provedeni pri dvije početne koncentracije glukoze $c_{G0} \approx 10 \text{ g dm}^{-3}$ i $c_{G0} \approx 50 \text{ g dm}^{-3}$, te su za svaku koncentraciju pokusi ponovljeni.

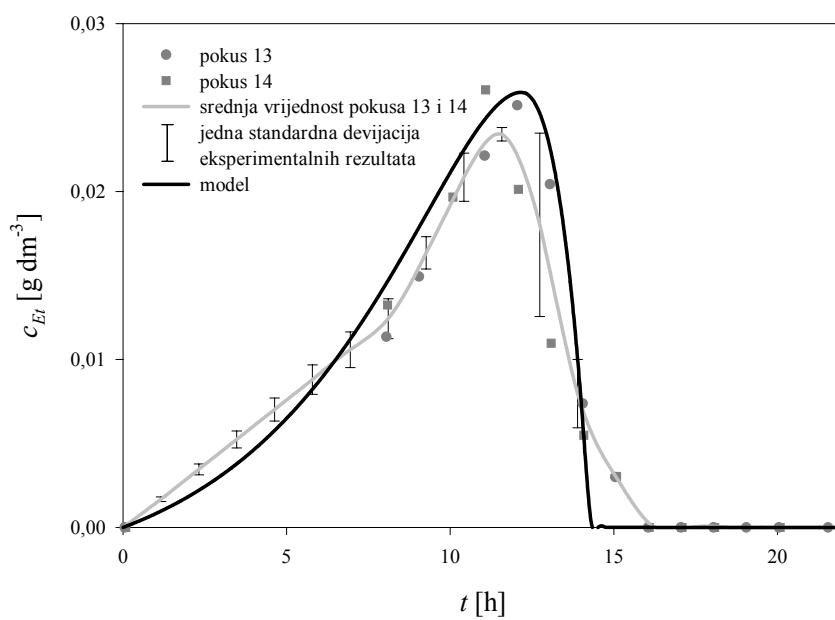
5.4.1. Validacija modela pri aerobnim uvjetima pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$



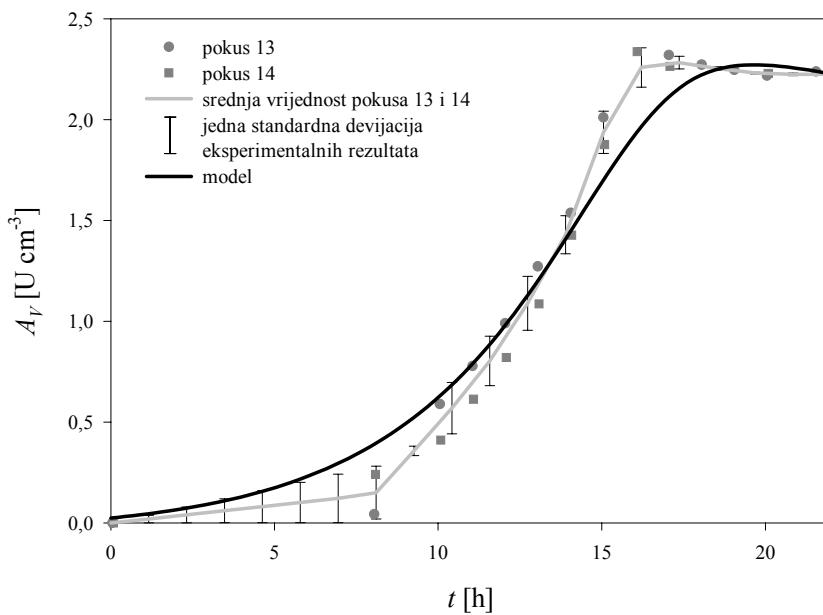
Slika 5.19. Vremenska promjena koncentracije biomase. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



Slika 5.20. Vremenska promjena koncentracije glukoze. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

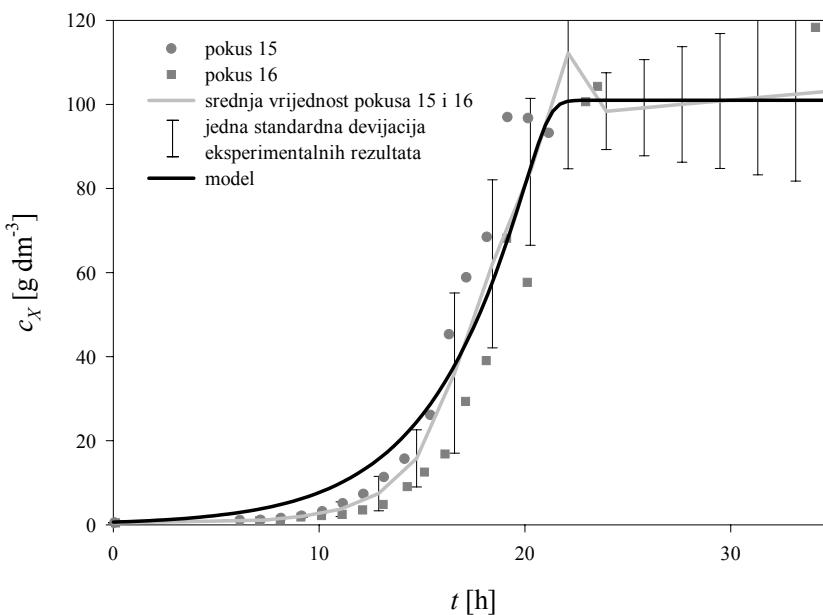


Slika 5.21. Vremenska promjena koncentracije etanola. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

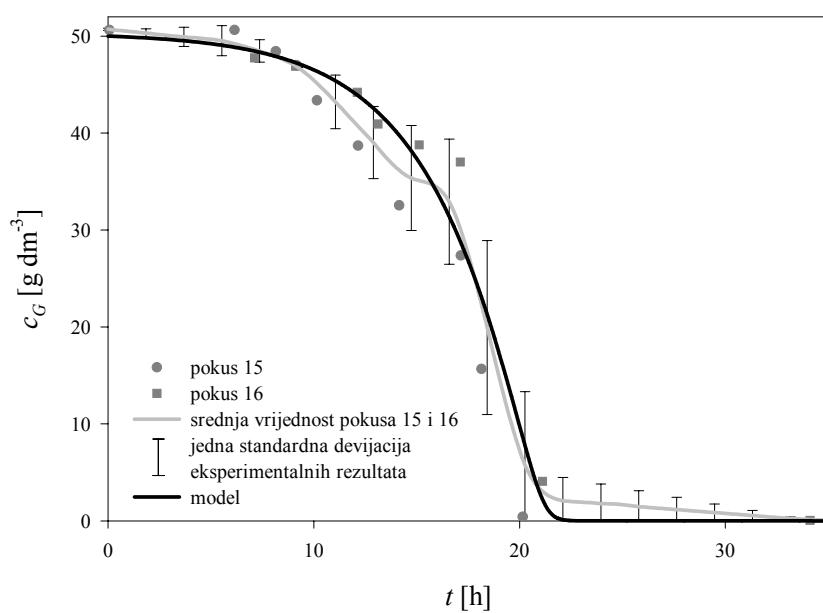


Slika 5.22. Vremenske promjene volumne aktivnosti. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

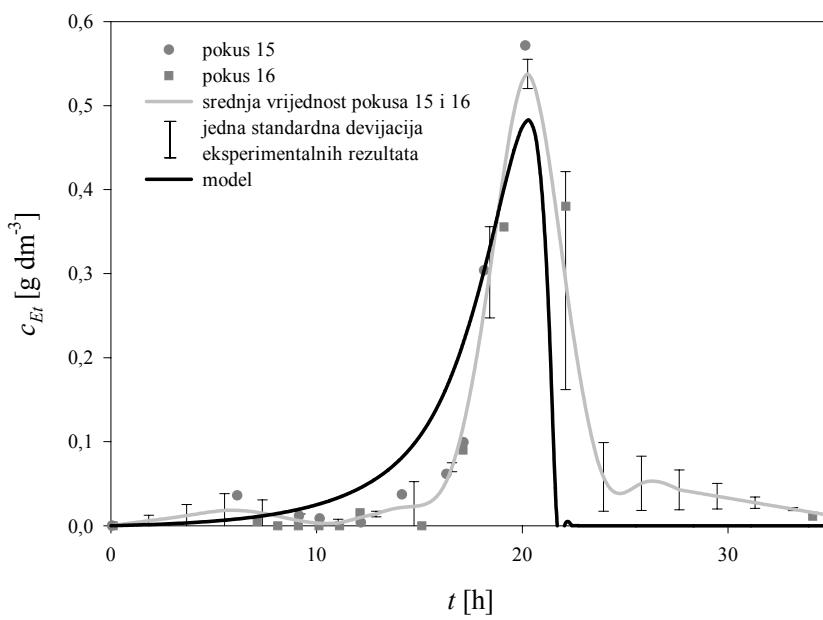
5.4.2. Validacija modela pri aerobnim uvjetima pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$



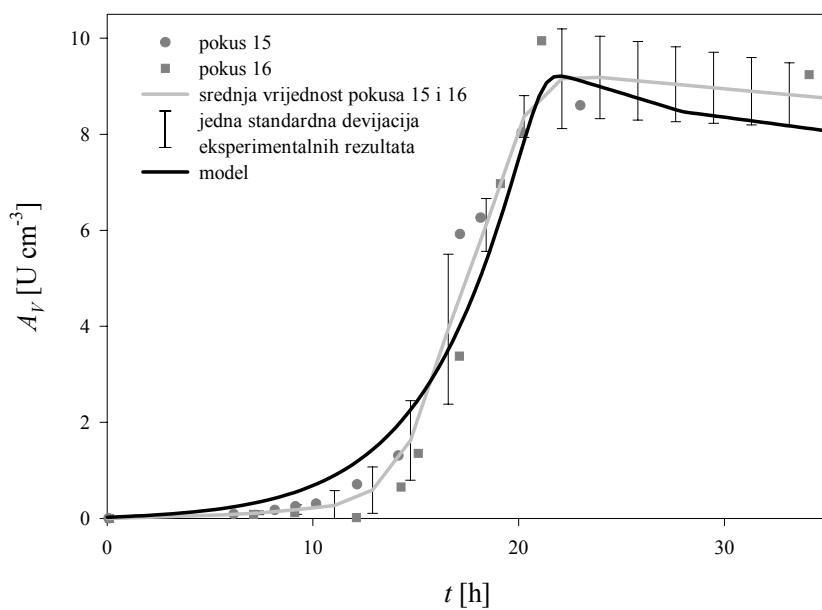
Slika 5.23. Vremenska promjena koncentracije biomase. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



Slika 5.24. Vremenska promjena koncentracije glukoze. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela

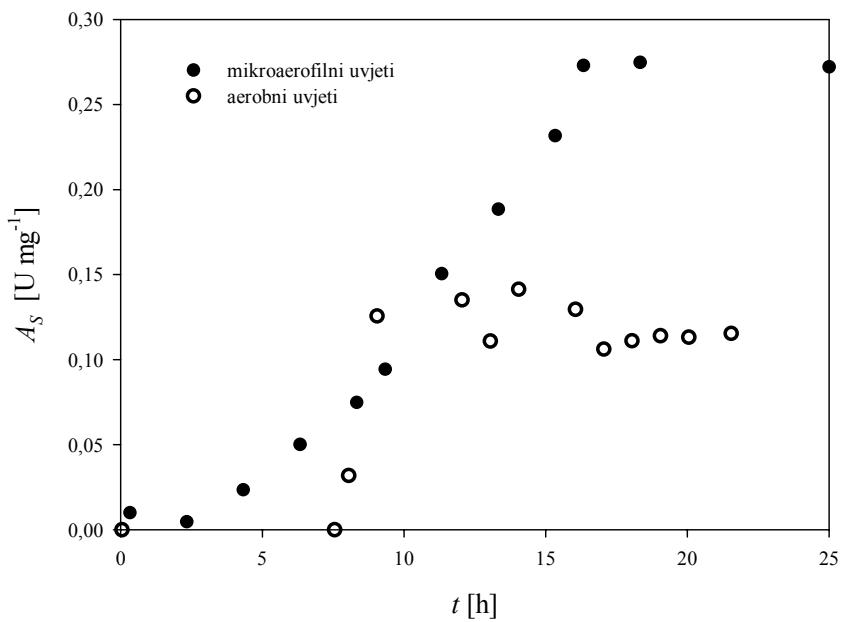


Slika 5.25. Vremenska promjena koncentracije etanola. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela



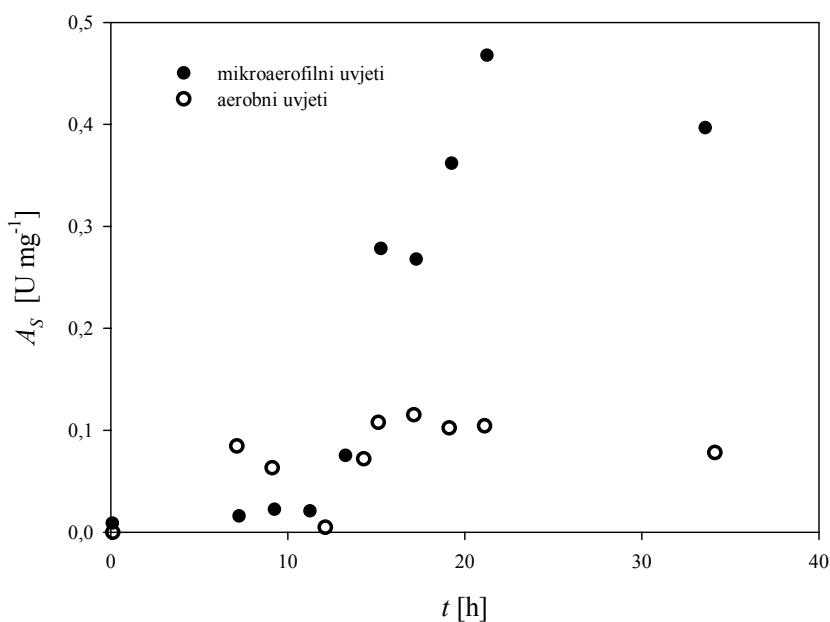
Slika 5.26. Vremenska promjena volumne aktivnosti. Usporedba rezultata pokusa ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti) i rezultata simulacije pomoću modela, te ocjena valjanosti modela.

Pri aerobnim uvjetima dobivena je manja volumna aktivnost enzima ADH obzirom na dobivenu koncentraciju biomase (slika 5.27. i 5.28.).



Slika 5.27. Usporedba specifične aktivnosti enzima ADH pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} \approx 10 \text{ g dm}^{-3}$

Tijekom rasta pekarskog kvasca na glukozi akumulira se etanol, odnosno enzim alkohol dehidrogenaza reducira acetaldehid u etanol. Tijekom rasta kvasca na etanolu troši se nakupljeni etanol, a enzim alkohol dehidrogenaza oksidira etanol u acetaldehid. Rast kvasca na etanolu i na glukozi odvija se različitim brzinama, pa se može pretpostaviti da stanica kvasca mijenja afinitet enzima alkohol dehidrogenaze prema etanolu i acetaldehidu. Promjena afiniteta enzima prema supstratu očituje se u promjeni aktivnosti enzima, zbog čega enzim alkohol dehidrogenaza iz stanice kvasca koja je rasla na glukozi pokazuje drugačiju aktivnost, nego onaj enzim iz stanice koja je rasla na etanolu.



Slika 5.28. Usporedba specifične aktivnosti enzima ADH pri mikroaerofilnim i aerobnim uvjetima pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} \approx 50 \text{ g dm}^{-3}$

Kada raste na glukozi, kvasac pokazuje dva metabolizma, oksidativni i oksidativno-reduktivni. Oksidativni metabolizam prevladava onda kada stanica kvasca ima dovoljnu količinu kisika za oksidaciju piruvata kroz ciklus limunske kiseline³³. Ako stanica nema dovoljno kisika, dolazi do nakupljanja piruvata u stanici, zbog nemogućnosti njegove oksidacije. Nakupljanje piruvata povezano je sa formiranjem reduktivnih ekvivalenata, kao što je NADH, koji nastaju u kasnijem stadiju glikolize. Stanica kvasca, da bi se riješila prevelike količine piruvata, reducira piruvat u etanol, a ujedno i oksidira NADH u NAD⁺.

Oksidativni i oksidativno-reduktivni metabolizmi odvijaju se različitim biološkim putovima, odnosno koriste se različiti enzimi pri jednom i pri drugom metabolizmu. Enzim

alkohol dehidrogenaza koristi se samo u oksidativno-reduktivnom metabolizmu, a stanica kvasca kada raste po ovom metabolizmu povećava njegovu proizvodnju. Ako pri rastu stanice prevladava oksidativni metabolizam, stanica ne upotrebljava enzim alkohol dehidrogenazu, pa stanica smanjuje njegovu proizvodnju. Oksidativni i oksidativno-reduktivni metabolizmi ne mogu se odvijati zasebno, nego se oni odvijaju istovremeno, samo se mijenja njihova međusobna zastupljenost. Zbog toga stanica kvasca ne deaktivira u potpunosti enzim alkohol dehidrogenazu kvasca pri oksidativnom metabolizmu, nego ona samo smanjuje njegovu proizvodnju.

Iz gore navedenoga može se pretpostaviti da pri šaržnom rastu kvasca na glukozi, kao izvoru energije, postoje tri različita enzima alkohol dehidrogenaze. Prvi je aktivan kada kvasac raste na glukozi aerobno, drugi kada raste na glukozi anaerobno i treći kada raste na etanolu aerobno.

Rezultati pokusa provedenih pri aerobnim uvjetima prikazani su na slikama 5.19.-5.26. Zbog dobivenih manjih vrijednosti volumnih aktivnosti, od onih koji je model predviđao, parametri a i b koji su direktno vezani za volumnu aktivnost ponovno su optimirani. Njihove vrijednosti su prikazane u tablici 5.3. i uspoređene su sa vrijednostima dobivenim pri aerobnim uvjetima. Vidljivo je da su parametri za aerobne uvjete otprilike četiri puta manji od onih za mikroaerofilne, što je vidljivo i na slikama 5.27. i 5.28. na kojima je prikazana usporedba specifičnih aktivnosti (jedn 3.4.). Usporedbom rezultata pokusa i simulacija pomoću modela, uz prethodno optimirane parametre (slike 5.19.-5.21. i 5.23.-5.25.) može se zaključiti da ovaj model dobro opisuje nastajanje biomase, potrošnju glukoze te promjenu koncentracije etanola tijekom pokusa pri različitim uvjetima dobave kisika. Uz upotrebu novih parametara dobiveno je dobro slaganje eksperimentalnih vrijednosti volumnih aktivnosti pri aerobnim uvjetima s modelom (slike 5.22. i 5.26.) pri različitim početnim koncentracijama glukoze.

Tablica 5.3. Parametri vezani za volumnu aktivnost dobiveni optimiranjem pri mikroaerofilnim uvjetima, te pri aerobnim uvjetima.

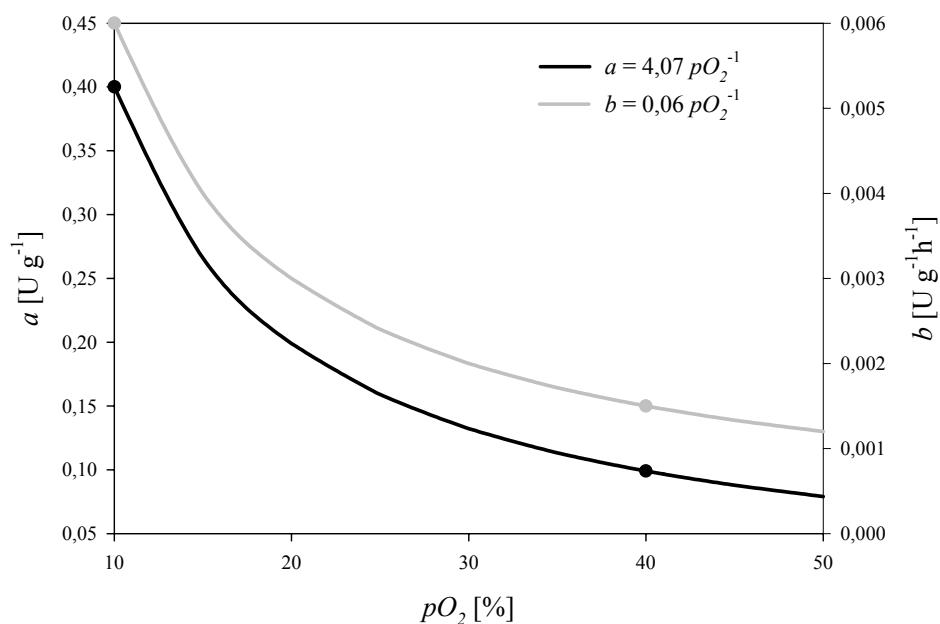
Parametar	Vrijednosti optimirane za mikroaerofilne uvjete	Vrijednosti optimirane za aerobne uvjete
$a \text{ [U g}^{-1}\text{]}$	0,400	0,099
$b \text{ [U g}^{-1} \text{ h}^{-1}\text{]}$	0,006	0,0015

5.5. PREDVIĐANJE PROIZVODNJE ENZIMA ADH PRI RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA KISIKA

Prethodne usporedbe rezultata eksperimenata i simulacija pomoću modela pokazale su da predloženi model dobro opisuje proizvodnju enzima ADH u rastućim stanicama pekarskog kvasca u rasponu početnih koncentracija glukoze 5 – 50 g dm⁻³. Također je pokazano da se uz procijenjene parametre mogu dobro opisati vremenske promjene koncentracije biomase, glukoze i etanola pri različitim održavanim koncentracijama kisika u mediju. Parametri a i b koji direktno opisuju proizvodnju enzima u stanici kvasca ovise o kisiku. Stoga se mogla procijeniti aktivnost nastalog enzima i pri drugim koncentracijama kisika u mediju, ako se pretpostavi empirijska nelinearna ovisnost (jedn. 5.1 i 5.2) tih parametara o kisiku (slika 5.29).

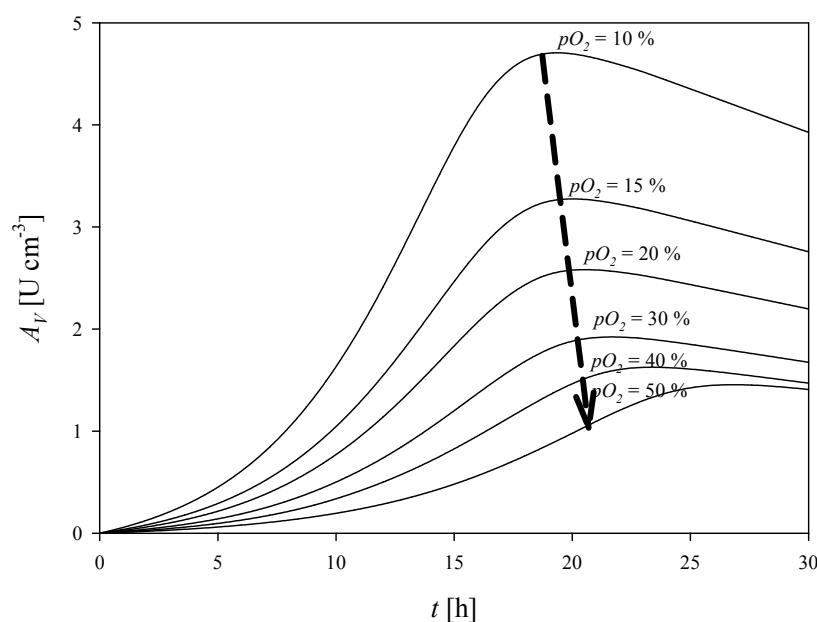
$$a = 4,7 \cdot pO_2^{-1} \quad 5.1.$$

$$b = 0,06 \cdot pO_2^{-1} \quad 5.2.$$



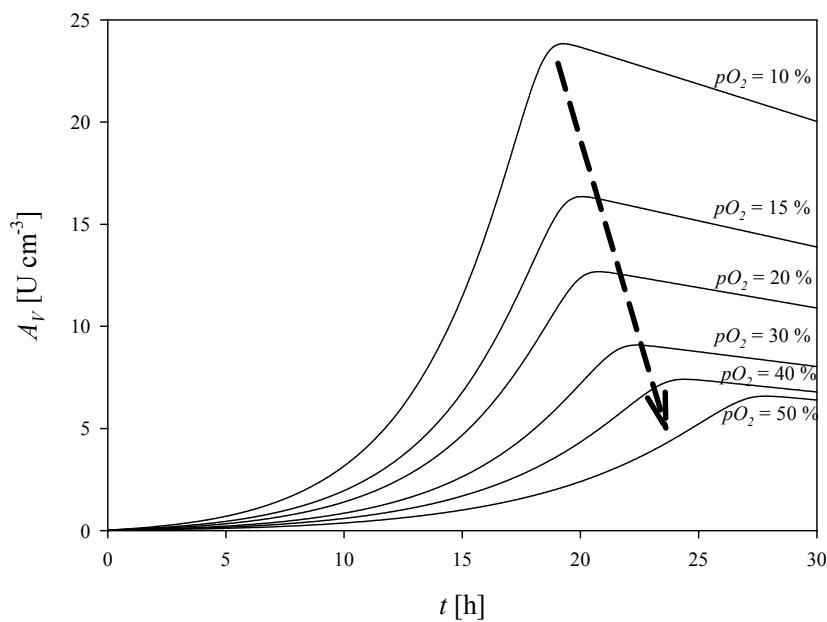
Slika 5.29. Ovisnost parametara a i b o koncentraciji kisika u mediju

Na temelju prepostavljenih parametara a i b i prethodno procijenjenih parametra, napravljene su simulacije vremenskih promjena volumnih aktivnosti enzima ADH pri različitim koncentracijama kisika u mediju za dvije početne koncentracije glukoze (slika 5.30. i 5.31.). Vidljivo je da se najveća volumna aktivnost enzima dobiva pri najnižoj koncentraciji kisika, te da opada porastom njegove koncentracije. Pri mikroaerofilnim uvjetima, odnosno pri proizvodnji kvasca sa minimalnim dotokom zraka, dolazi do proizvodnje etanola u većim koncentracijama koji tada inhibira rast biomase. Obzirom da je proizvodnja enzima vezana uz rast stanica, dolazi i do inhibicije njegove proizvodnje, te iz tog razloga simulacije pri nižim koncentracijama kisika nisu napravljene.

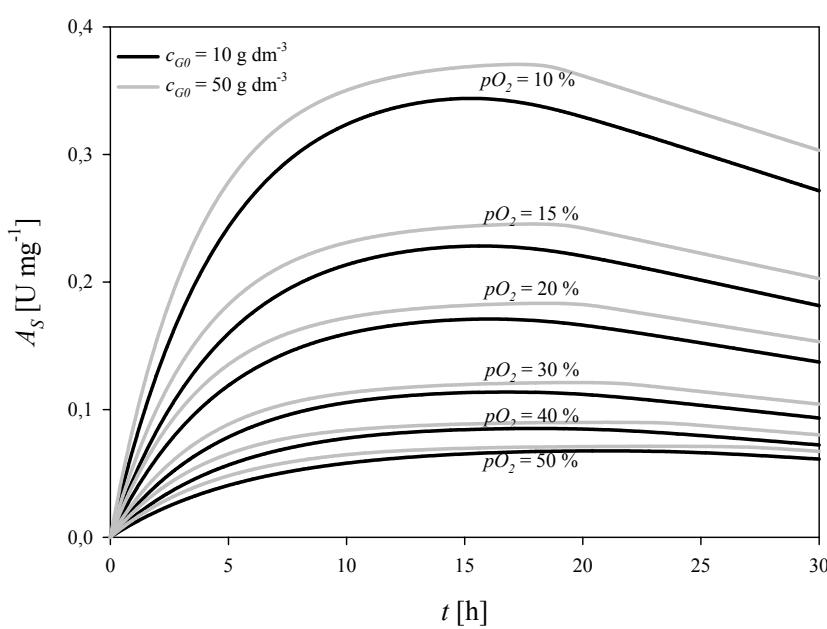


Slika 5.30. Simulacije vremenskih promjena volumne aktivnosti enzima ADH pomoću modela pri različitim koncentracijama kisika u mediju ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$)

Na slici 5.32. prikazana je ovisnost specifične aktivnosti (jedn 3.4.) o količini kisika za dvije početne koncentracije glukoze. Vidljivo je da se aktivnost enzima u stanici smanjuje sa porastom koncentracije kisika, dok početna koncentracija glukoze nema značajnijeg utjecaja na promjenu aktivnosti alkohol dehidrogenaze u stanici kvasca.



Slika 5.31. Simulacije vremenskih promjena volumne aktivnosti enzima ADH pomoću modela pri različitim koncentracijama kisika u mediju ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$)



Slika 5.32. Simulacije vremenskih promjena specifične aktivnosti enzima ADH pomoću modela pri različitim koncentracijama kisika u mediju za dvije početne koncentracije glukoze

5.6. PREDVIĐANJE PROIZVODNJE ENZIMA ADH U RAZLIČITIM VOLUMENIMA REAKCIJSKE SMJESE

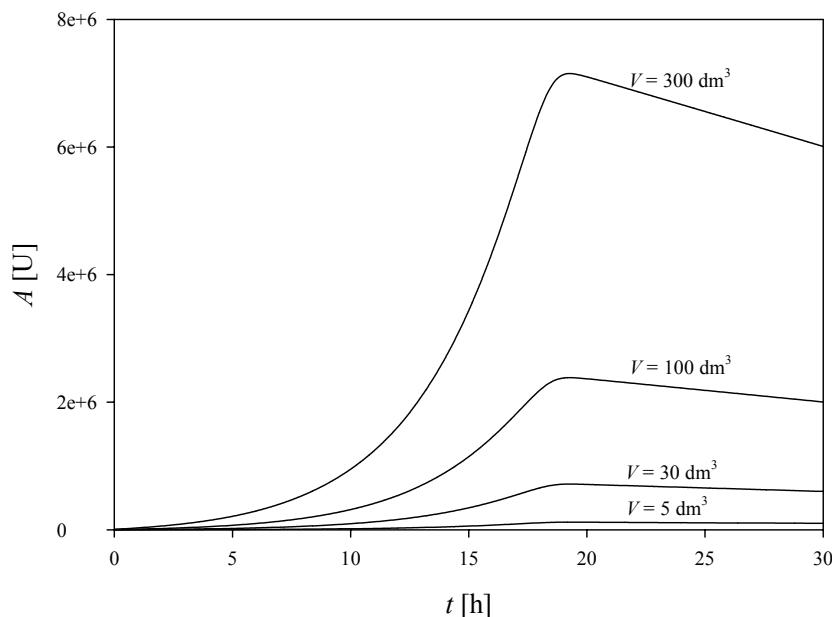
Da bi se predvidjela proizvodnja enzima ADH u različitim volumenima reaktora, odnosno različitim volumenima reakcijske smjese jednadžba 4.5. se može napisati u obliku:

$$\frac{dA}{dt} = a(\mu_{OX} + \mu_{RED} + \mu_{Et})c_x \cdot V - bc_x \cdot V \quad 5.3.$$

gdje je V volumen reakcijske smjese. Potreban volumen bioreaktora se može procijeniti po jednadžbi:

$$V_R \approx \frac{4}{3}V \quad 5.4.$$

Obzirom da se iz eksperimentalnih rezultata i simulacija pomoću modela vidi da je maksimalna proizvodnja enzima postignuta pri početnoj koncentraciji glukoze $c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$ i koncentraciji kisika u mediju $pO_2 = 10 \%$, pri tim su uvjetima napravljene simulacijske krivulje proizvodnje enzima u različitim volumenima reakcijske smjese (slika 5.33.).



Slika 5.33. Rezultati simulacije vremenskih promjena aktivnosti enzima ADH pomoću modela u različitim volumenima reakcijske smjese ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$, $pO_2 = 10 \%$)

Na temelju ovih rezultata može se predvidjeti da je u reakcijskom volumenu od 300 dm^3 što odgovara volumenu bioreaktora od $V_R \approx 400 \text{ dm}^3$, moguće proizvesti oko 7 000 000 U (jedinica enzimske aktivnosti) alkohol dehidrogenaze. Ako se prepostavi da je iskorištenje, pri provedbi procesa izolacije enzima iz stanica kvasca 5 %, u bioreaktoru volumena 400 dm^3 će se proizvesti oko 350 000 U enzima alkohol dehidrogenaze.

Na temelju postavljenog modela i ovih razmatranja može se zaključiti da se pomoću modela mogu predvidjeti procesni uvjeti (koncentracija glukoze i kisika), te proizvodni kapacitet prema raspoloživoj procesnoj opremi.

6. ZAKLJUČAK

Radi smanjivanja faze prilagodbe prilikom provođenja eksperimenata optimiran je uzgoj inokuluma određivanjem optimalne početne koncentracije glukoze ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$).

Pri mikraerofilnim uvjetima kvasac raste u uvjetima limitiranosti kisikom, što rezultira reduktivnim metabolizmom, odnosno proizvodnjom etanola koji inducira nastajanje enzima ADH.

Volumna aktivnost enzima ADH ovisi o količini nastale biomase. Visoka volumna aktivnost se postiže pri visokim koncentracijama biomase.

Pri većim početnim koncentracijama glukoze dobivena je veća volumna aktivnost enzima ADH.

Statističkom ocjenom valjanosti modela pokazano je da postavljeni matematički model za uzgoj pekarskog kvasca u bioreaktoru pokazuje dobro slaganje s rezultatima pokusa.

Ocjenom valjanosti modela pri mikraerofilnim uvjetima, ali pri različitim početnim koncentracijama glukoze pokazano je da matematički model vrijedi u rasponu početnih koncentracija glukoze $c_{G0} = 5 - 50 \text{ g dm}^{-3}$.

Predloženi model dobro opisuje nastajanje biomase, potrošnju glukoze te promjenu koncentracije etanola tijekom pokusa i pri aerobnim uvjetima

Manja volumna aktivnost enzima ADH dobivena je pri aerobnim uvjetima.

Parametri a i b u predloženom modelu koji su direktno vezani za volumnu aktivnost, ovisni su o raspoloživoj količini kisika.

7. LITERATURA

1. Fowler, M., W.: **Enzyme Technology**, Biotechnology for Engineers, Ed Scragg, A., J. Wiley & Sons, 1988.str. 180
2. Chibata, I.: **Immobilized Microbial Cells**, *Appl. Biochem. Bioeng.*, Academic Press, 1983, str.6.
3. Servi, S.: **Baker's Yeast as a Reagent in Organic Solvents**, *Synthesis*, 1990, 1-25.
4. Liese, A.; Seelbach, K.; Wandrey, C.: **Industrial Biotransformations**, Willey-VCH, Weinheim, 2000.
5. Sonnleitner, B.; Käppeli, O.: **Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled by Its Limited Respiration Capacity: Formulation and Verification of a Hypothesis**, *Biotech. Bioeng.*, **28**, 1986, 927-937.
6. Sweere, A.P.J.; Giesselbach, J.; Barendse, R.; de Krieger, R.; Honderd, G.; Luyben, K.C.A.M.: **Modelling the Dynamic Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* and its Application in Control Experiments**, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 1988, 116-127.
7. Jones, R.P.; Greenfield, P.F.: **Kinetics of Apparent Cell Death in Yeasts Induced by Ethanol**, *Biotechnol. Letters*, **6**, 1984, 471-476.
8. Barford, J.P.; Hall, R.J.: **A Mathematical Model for the Aerobic Growth of *S. cerevisiae* with a Saturated Respiratory Capacity**, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1981, 1735-1762.
9. Pamment, N.B.; Hall, R.J.; Barford, J.P.: **Mathematical Modelling of Lag Phases in Microbial Growth**, *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1978, 349-381.
10. Coppella, S.J.; Dhurjati, P.: **A Mathematical Description of Recombinant Yeast**, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1990, 356-374.
11. Grosz, R.; Stephanopoulos, G.: **Physiological, Biochemical and Mathematical Studies of Micro-Aerobic Continuous Ethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. II: Intracellular Metabolite and Enzyme Assays at Steady State Chemostat Cultures**, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 1990, 1020-1029.
12. Rizzi, M.; Baltes, M.; Theobald, U.; Reuss, M.: **In Vivo Analysis of Metabolic Dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: II. Mathematical Model**, *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 1997, 592-608.
13. Duraković, S.: **Opća mikrobiologija**, Prehrambeno tehnološki inženjerstvo, Zagreb, 1996, str. 231-232.

14. Visser, W; Scheffers, W.A., Baterburg-van der Vegte, W.H.; Dijken, J.P.: **Oxygen Requirements of Yeasts**, *Appl. Env. Micr.*, **56**, 1990, 3785-3792.
15. Hinnen, A.; Hicks, J.B.; Fink, G.R.: **Transformation of Yeast**, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **75**, 1978, 1929-1933.
16. Kingsman, S.M.; Kingsman, A.J.; Mellor, J.: **The Production of Mammalian Proteins in *Saccharomyces cerevisiae***, *Trends Biotechnol.*, **5**, 1987, 53-57.
17. Petrik, M; Kapelli, O.; Fiechter, A.: **An Expanded Concept for the Glucose Effect in the Yeast: Involvement of Short- and Long-term Regulation**, *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1983, 43-49.
18. Postma, E.; Verdyn, C.; Scheffers, W.A.; van Dijken, J.P.: **Enzymatic Analysis of the Crabtree Effect in Glucose-limited Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae***, *Appl. Env. Microbiol.*, **55**, 1989, 468-477.
19. Ratledge, C: **Yeast Physiology – a Micro-Synopsis**, *Bioprocess Eng.*, **6**, 1991, 195-203
20. Prescott; Dunn : **Industrial Microbiology**, **4**, AVI Publishing Company inc.,1983, 595-610.
21. von Franz, B: **Investigation of the Energy Metabolism of *Saccharomyces Cerevisiae*, an Interpretation of the Pasteur Effect**, *Branntweinwirtschaft*, **104**,1964., 468-470.
22. Görts, C.P.M.: **Effect of Different Carbon Sources on the Regulation of Carbohydrate Metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae***, *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* **33**, 1967, 451-463.
23. Reed G.: **Industrial Microbiology**, Avi. Pub.Comp., Inc., Westport Conncticut,1983, str. 593
24. Sols, A.; Gancedo, G.; Dela Fuente G.: **In The Yeast**, A. H., Krebs, J., S.,Harrison, Eds. *AcademicPress*, **2**, 1971, 271.
25. Fichter, A.; Prescott, D.M.: **Methods in Cell Biology**, Ed. *AcademicPress*, **11**, 1975, str. 97.
26. Leão, C.; van Uden, N.: **Effects of Ethanol and Other Alkanols on the Glucose Transport System of *Saccharomyces cerevisiae***, *Biotech. Bioeng.*, **24**, 1982, 2601-2604.
27. Fatile, I.A.: **Rheological Behavior of Concentrated Yeast Suspension**, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **35B**, 1985, 94-100.
28. Bailey J.E., Ollis D.F.: **Biochemical Engineering Fundamentals**, McGraw–Hill Book Company, New York, 1977, str. 90
29. Phaff, H.J.: **Ecology of Yeasts with Actual and Potential Value in Biotechnology**, *Microb. Ecol.*, **12**, 1986, 31-42.

30. Andreasen, A.A.; Stier, T.J.B.: **Anaerobic Nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*: II. Unsaturated Fatty Acid Requirement for Growth in a Defined Medium**, *J. Cell Comp. Physiol.*, **41**, 1954, 271-281.
31. Wiemken, A.: **Trehalose in Yeast, Stress Protectant Rather than Reserve Carbohydrate**, *J. Microbiol.*, **58**, 1990, 209-217.
32. Roberts, S.M.: **Biocatalyst for Fine Chemical Synthesis**, J. Wiley & Sons, Chichester, 1999, str. 4-15.
33. Sonnleitner, B.: **Dynamics of Yeast Metabolism and Regulation**, *Bioprocess. Eng.*, **6**, 1991, 187-193.
34. Hoffman, N.: **Bäckerhefe – ein lebendes Reagens für die organisch-chemische Synthese**, *Chemie in unserer Zeit*, **4**, 1996, 201-213
35. Kometani, T.; Yoshii, H.; Matsuno, R.: **Large-scale Production of Chiral Alcohols with Baker's yeast**, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **1**, 1996, 45-52.
36. D'Arrigo, P.; Fuganti, C.; Fantoni, G.P.; Servi, S.: **Extractive Biocatalysis: a Powerful Tool in Selectivity Control in Yeast Biotransformation**, *Tetrahedron*, **54**, 1998, 15017-15026.
37. Chin-Joe, I.; Haberland, J.; Straathof, A.J.J.; Jongejan, J.A.; Liese, A.; Heijnen, J.J.: **Reduction of Ethyl 3-Oxobutaonate Using Non-growing Baker's Yeast in a Continuously Operated Reactor with Cell Retention**, *Enzyme Microb. Techno.*, **31**, 2002, 665-672.
38. Wendhausen, R.; Moran, P.J.S.; Joekes, I.; Rodrigues, J.A.R.: **Continuous Process for Large-scale Preparation of Chiral Alcohols with Baker's Yeast Immobilized on Chrysotile Fibers**, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **5**, 1998, 69-73.
39. Bertau, M.; Scheller, D.: **Equilibrium-Dependent Hydration of Ethyl 4,4,4-trifluoroacetate in Aqueous Solutions and Consequences for the Whole-cell Biotransformation with *Saccharomyces cerevisiae***, *Enzyme Microb. Techno.*, **32**, 2003, 491-497.
40. Kometani, T.; Sakai, Y.; Matsumae, H.; Shibatani, T.; Matsuno R.: **Production of (2S,3S)-2,3-Dihydro-3-hydroxy-2-(4-methoxyphenyl)-1,5-benzothiazepin-4(5H)-one, a Key Intermediate for Diltiazem Synthesis, by Baker's Yeast-Mediated Reduction**, *J. Ferment. Bioeng.*, **84**, 1997, 195-199.
41. Long, A.; James, P.; Ward, O.P.: **Aromatic Aldehydes as Substrates for Yeast and Yeast Alcohol Dehydrogenase**, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**, 1989, 657-660.

42. Long, A.; Ward, O.P.: **Biotransformation of Benzaldehyde by *Saccharomyces cerevisiae*: Characterization of the Fermentation and Toxicity Effects of Substrates and Products**, *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1989, 933-941.
43. Laurence, G.; Smallridge, A.J.; Trewella, M.A.: **Lactate as an Alternative to Pyruvate in the Yeast Mediated Preparation of PAC**, *J. Mol. Cat. B: Enzym.*, **19-20**, 2002, 399-403.
44. Nikolova P.; Ward, O.P.: **Production of L-Phenylacetyl Carbinol by Biotransformation: Product and By-Product Formation and Activities of the Key Enzymes in Wild-Type and ADH Isoenzyme Mutants of *Saccharomyces cervisiae***, *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1991, 493-498.
45. van Dam, K.: **Role of Glucose in Yeast Metabolism**, *Biotech. Bioeng.*, **52**, 1996, 161-165.
46. Vasić- Rački, Đ.; Wandrey C.: **Ultrafiltracija i biokatalizatori**, Zbornik: Separacijski procesi v heterogenih sistemih, Maribor, 1992, 82-93.
47. Vasić-Rački, Đ.: **Biokemijsko Inženjerstvo**, *Kem. Ind.*, **39**, 1990, 459-467
48. Chibata, I.: **Immobilized Enzymes**, J. Wiley, New York, 1978., str: 5-7
49. Chibata, I.: **Immobilized Microbial Cells**, *Appl. Biochem. Bioeng.*, Academic Press, 1983, str. 6.
50. Vasić- Rački, Đ.: **Reaktori s Enzimskim Katalizatorima**, *Kem. Ind.*, **28**, 1979, 313-317
51. Leskovac, V.; Trivić S.; Peričin, D.: **The Three Zinc-containing Alcohol Dehydrogenase from Baker's Yeast, *Saccharomyces cerevisiae***, *FEMS Yeast Research*, **2**, 2002, 481-494.
52. Wills, C.; Jörnvall, H.: **The Two Major Isoenzymes of Yeast Alcohol Dehydrogenase**, *Eur. J. Biochem.*, **99**, 1979 , 323-331.
53. Drewkw, C.; Ciriacy, M.: **Overexpression, Purification and Properties of Alcohol Dehydrogenase 3 from *Saccharomyces cerevisiae***, *Biochim. Biophys. Acta*, **951**, 1988, 54-60.
54. Wills, C.; Phelps, J.: **A Technique for the Isolation of Yeast Alcohol Dehydrogenase Mutants with Altered Substrate Specificity**, *Arch. Biochem.Biophys.* **167**, 1975, 627-637.
55. Shibata, T, Ishii, Y., Noguchi, Y: **Purification and Molecular Characterization of a Quinoprotein Alcohol Dehydrogenase from *Pseudogluconobacter saccharoketogenes***, *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 2001, 524-531.

56. Harris, J., I: **Structure and Catalytic Activity of Alcohol Dehydrogenase**, *Nature*, **203**, 1964, 30-34
57. Biellmann, J.; Jung, M., J.; **Mechanism of the Alcohol Dehydrogenases from Yeast and Horse Liver**, *Eur. J. Biochem.*, **19**, 1971, 130-134.
58. Barron, E., S., G.; Levine S.: **Oxidation of Alcohols by Yeast Alcohol Dehydrogenase and by Living Cells. The Thiol Groups of The Enzyme**, *Arch. Biochem.*, **41**, 1959, 175.
59. Bae, W.; Rittmann, B. E.: **A Structured Model of Dual-limitation Kinetics**, *Biotechnol and Bioeng*, **49**, 1996, 683-689.
60. Nielsen, J.; Nikolajsen, K.; Villadsen, J.: **Structured Modelling of a Microbial System: I. A Theoretical Study of Lactic Acid Fermentation**, *Biotechnol and Bioeng*, **38**, 1991, 1-10.
61. Esener, A. A.; Roels, J. A.; Kossen, N. W. F.: **Theory and Applications of Unstructured Growth Models: Kinetic and Energetic Aspects**, *Biotechnol. Bioeng*, **25**, 1983, 2803-2841.
62. Augusto, E. F. P.; Barbosa, N. S.; Mattos, M. N.; Magossi, L. R.: **Unstructured Model Proposal for the Microbial Oxidation of D-Sorbitol to L-Sorbose**. *J. Biotechnol.*, **31**, 1993, 39-59.
63. Blanch, H.W., Clark, D.S.: **Biochemical Engineering**, Marcel Dekker, Inc., New York, 1997, str.202-204.
64. Kekos, D., Marcis, B.J: **Kinetic Studies of Amylase and Biomass Production by *Calvatia gigantea***, *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1987, 681-684.
65. Santos, M., Teixeira, J., Rodrigues, A.: **Production of Dextransucrose, Dextran and Fructose from Sucrose Using *Leuconostoc mesenteroides***, *Biochem. Eng. J.*, **4**, 2000, 177-188.
66. Miron, J., Gonzalez, M.P., Pastrana, L., Murado, M.A.: **Diauxic Production of Glucose oxidase by *Aspergillus niger* in Submerged Culture**, *Enzyme. Microb. Techno.*, **31**, 2002, 615-620.
67. Pasari, A.B., Korus, R.A.: **Catabolite Repression of Amylase synthesis in Yeast**, *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 1987, 363-367.
68. Tamerler, C., Ulgen, K., Kirdar, B., Onsan, Z.I.: **A Structured Model for Intracellular EcoRI Endonuclease Production by Recombinant *E. Coli*** **294**, *Proc. Biochem.*, **36**, 2001, 621-627.
69. Bijkerk, A.H.E.; Hall, R.J.: **A Mechanistic Model of the Aerobic Growth of *Saccharomyces cerevisiae***, *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1977, 267-296.

70. Thatipamala, R.; Rohani, S; Hill a.: **Effects of High Product and Substrate Inhibitions on the Kinetics and Biomass and Product Yields during Ethanol batch Fermentation**, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1992, 289-297.
71. Thatipamala, R.; Rohani, S.; Hill, G.A.: **Spectrophotometric Method for High Biomass Concentration Measurements**, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1991, 1007-1011.
72. Bhat, N.; Bhat, S., G.; Gowda, L., R.; Nana N., S.: **Detergent Permeabilized Yeast Cells as the Source of Intracellular Enzymes for Estimation of Biomolecules**, *Enzyme Microb. Technology*, **15**, 1993, 796-800.
73. Gierer, A.: **On the Temperature Independence and Mechanism of Action of Alcohol dehydrogenase**, *Biochimica Et Biophysica acta*, **17**, 1955, 125-132.
74. **Biochemica information**, Boehringer Manheim, GmbH, W Germany, 1973, str. 132-133.
75. Pertev, C.; Türker, M.; Berber, R.: **Dynamic Modelling Sensitivity Analysis and Parameter Estimation of Industrial Yeast Fermenters**, *Comp. Chem. Eng.*, **21**, 1997, 5739-5744.
76. Kristiansen, B.: **Integrated Design of Fermentation Plant: The Production of Baker's Yeast**, VCH, NY, 1989.
77. Plavljanić, Č.: **Utjecaj miješanja na brzinu prijenosa kisika pri bioprocесима**, Magistarski rad, 1994, str 62-68
78. Himmelblau, D.M.: **Process Analysis by Statistical Methods**, Wiley & Sons, New York, 1970, str.176-182.
79. Nelder, J., Mead, R.: **A Simplex Method for Function Minimization**, *Comput. J.*, **7**, 1965, 308-331.
80. **MicroMath SCIENTIST 2.0 for Windows**, User manual, MicroMath Inc., 1995

8. PRILOZI

PRILOG 1.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze.

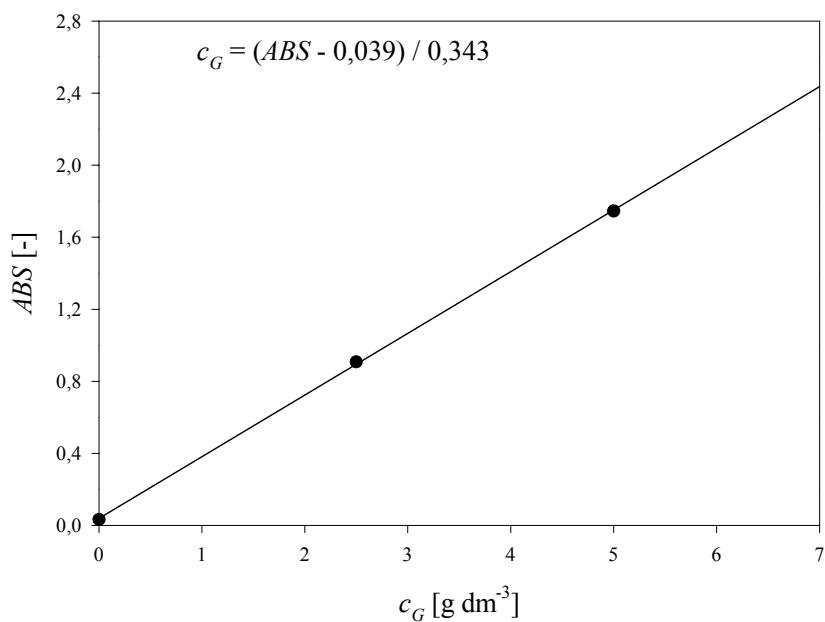
PRILOG 2.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina.

PRILOG 3.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije biomase.

PRILOG 4.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije etanola.

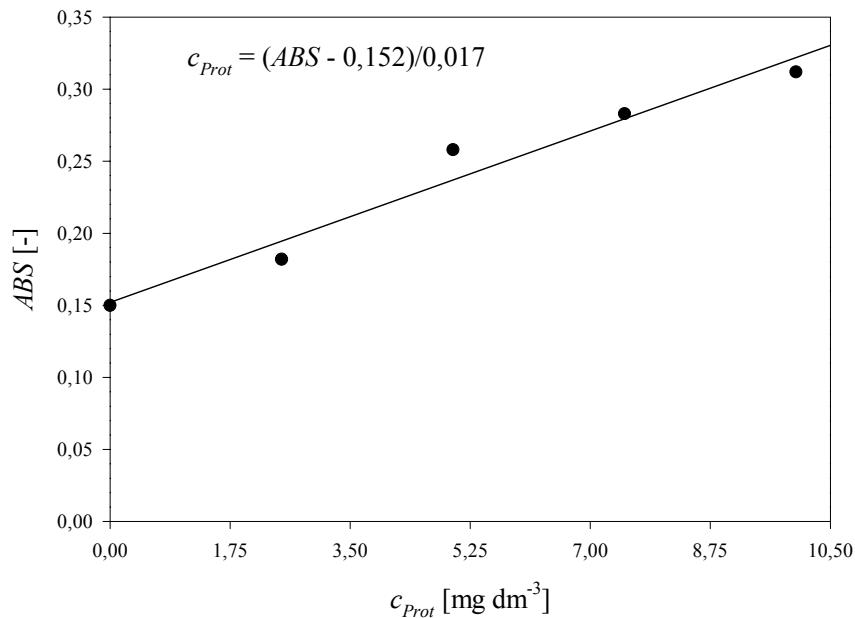
PRILOG 5.: Vremenske promjene koncentracije proteina.

PRILOG 1.

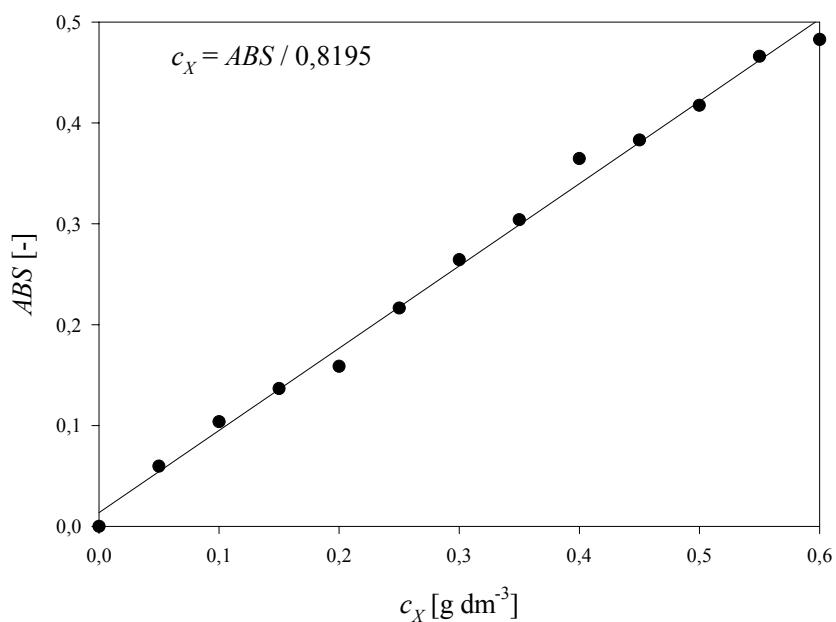


Slika 8.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije glukoze

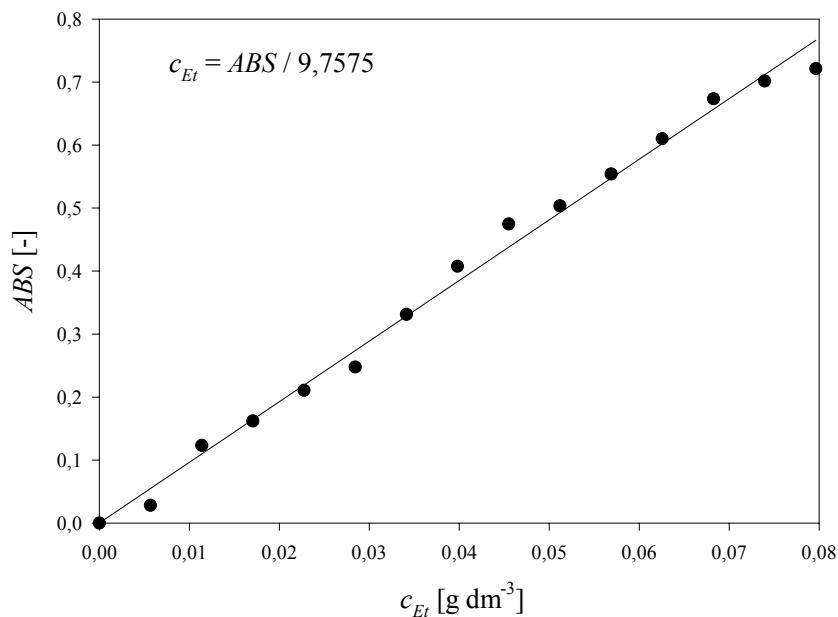
PRILOG 2.

**Slika 8.2.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina

PRILOG 3.

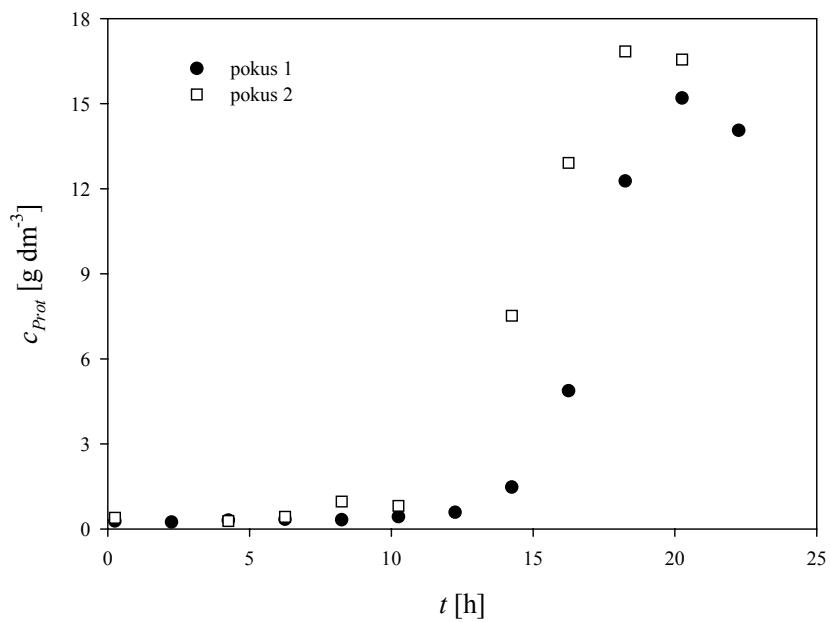
**Slika 8.3.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije biomase

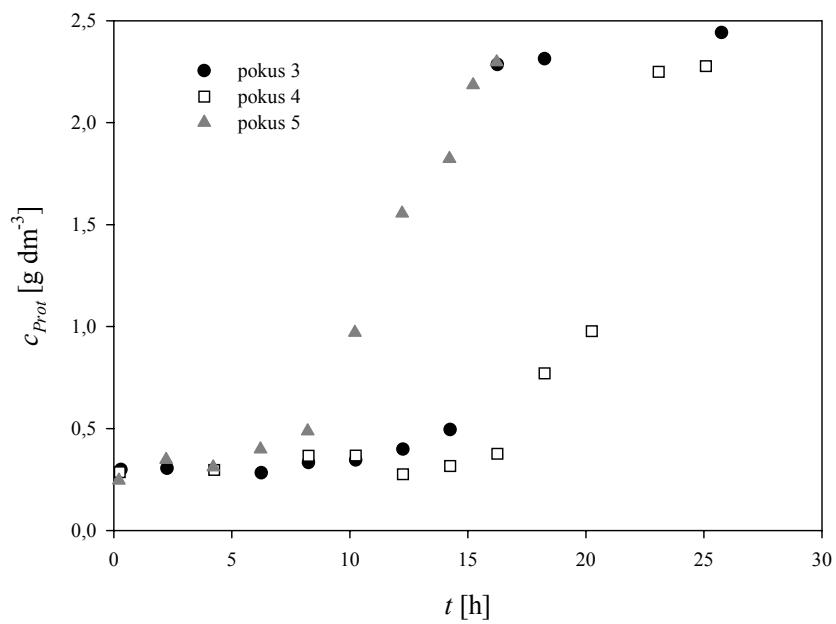
PRILOG 4.



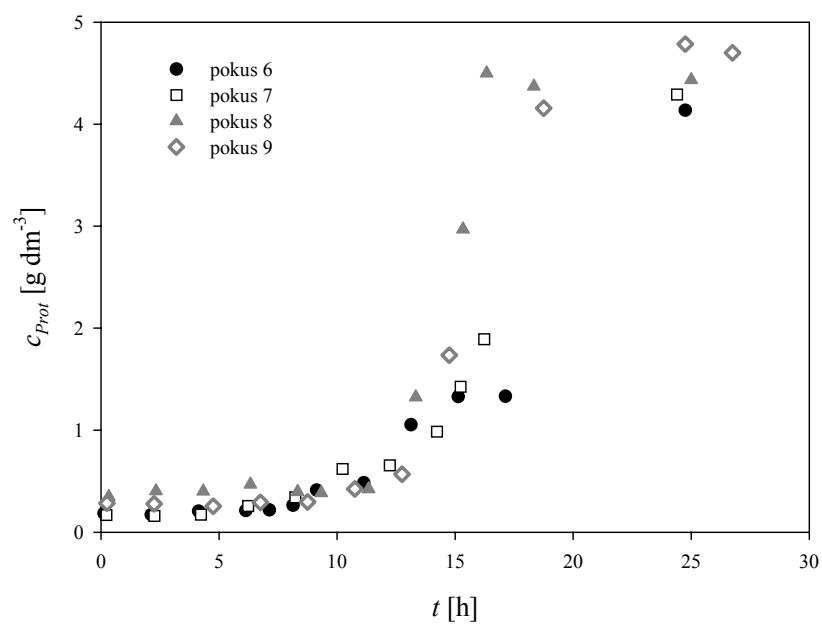
Slika 8.4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije etanola

PRILOG 5.

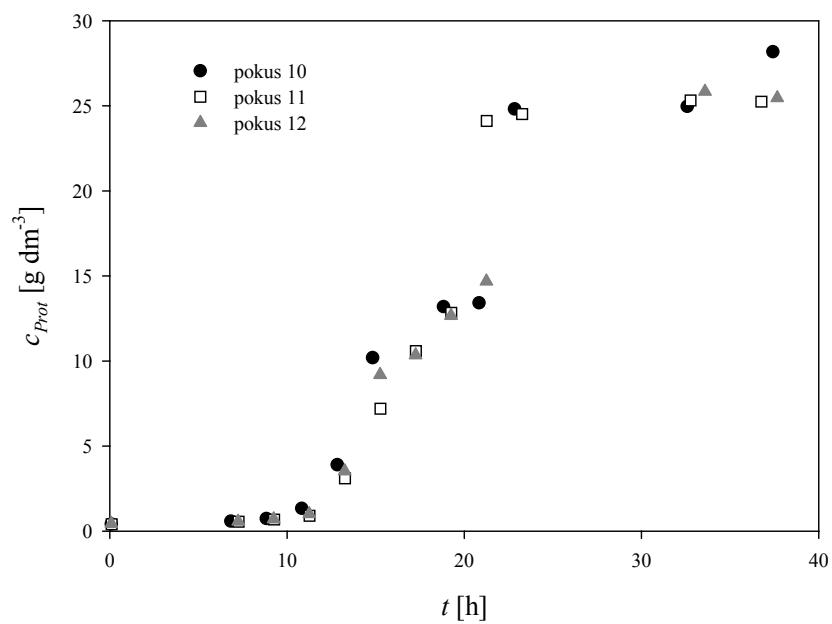
Slika 8.5. Vremenska promjena koncentracije proteina ($c_{G0} = 30 \text{ g dm}^{-3}$, mikroaerofilni uvjeti)



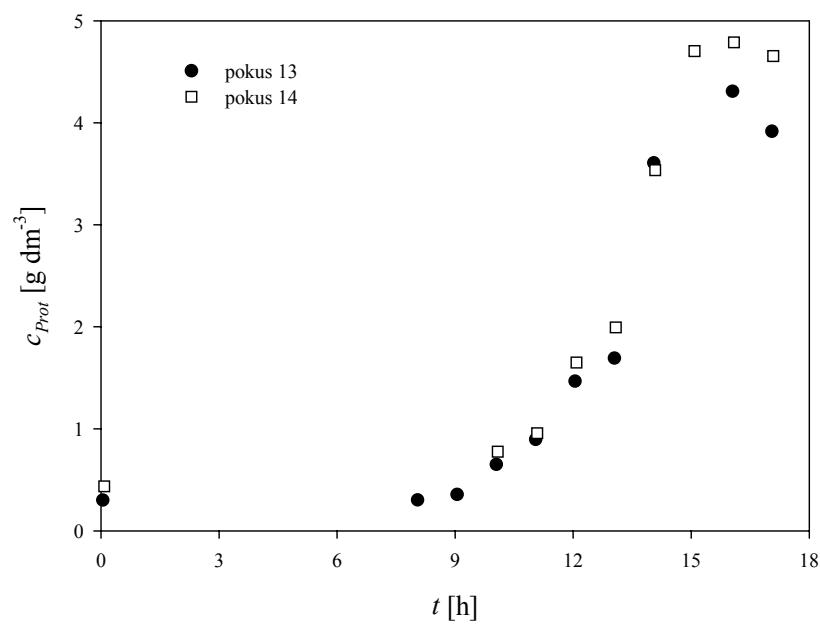
Slika 8.6. Vremenska promjena koncentracije proteina ($c_{G0} = 5 \text{ g dm}^{-3}$, mikroaerofilni uvjeti)



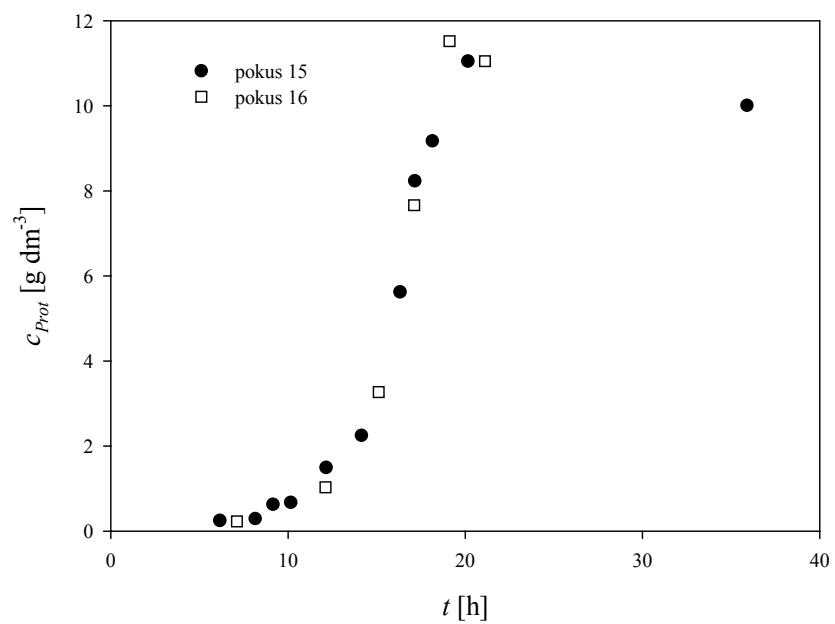
Slika 8.7. Vremenska promjena koncentracije proteina ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, mikroaerofilni uvjeti)



Slika 8.8. Vremenska promjena koncentracije proteina ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$, mikroaerofilni uvjeti)



Slika 8.9. Vremenska promjena koncentracije proteina ($c_{G0} = 10 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti)



Slika 8.10. Vremenska promjena koncentracije proteina ($c_{G0} = 50 \text{ g dm}^{-3}$, aerobni uvjeti)

SIMBOLI

a	parametar modela proizvodnje enzima (jedn. 4.5) [U g ⁻¹]
A	aktivnost [U cm ⁻³]
A_S	specifična aktivnost enzima ADH [U mg ⁻¹]
A_V	volumna aktivnost enzima ADH [U cm ⁻³]
ABS	apsorbancija uzorka [-]
b	parametar modela proizvodnje enzima (jedn 4.5) [U g ⁻¹ h ⁻¹]
c_{Ald}	koncentracija aldehida [g dm ⁻³]
c_{Et}	koncentracija etanola [g dm ⁻³]
c_G	koncentracija glukoze [g dm ⁻³]
c_{GAL}	koncentracija galaktoze [g dm ⁻³]
c_{H2O2}	koncentracija vodikovog peroksida [g dm ⁻³]
c_{NADH}	koncentracija koenzima NADH [g dm ⁻³]
c_O	koncentracija otopljenog kisika u reaktoru [g dm ⁻³]
$c_{O,ZAS}$	koncentracija zasićenja kisikom pri uvjetima uzgoja u reaktoru [g dm ⁻³]
c_P	koncentracija produkta [mol dm ⁻³]
c_{Prot}	koncentracija proteina [g dm ⁻³]
c_S	koncentracija supstrata [mol dm ⁻³]
c_x	koncentracija biomase [g dm ⁻³]
d	promjer kivete [cm]
D_r	promjer bioreaktora [m]
E	koncentracija enzima [U dm ⁻³]
Fr	faktor razrjeđenja otopine [-]
G	protok zraka [m ³ h ⁻¹]
k	koeficijent smjera baždarnog pravca (jedn. 3.1 i 3.5)
k, k_E	konstante modela nastajanja enzima (tablica 2.6)
k_1, k_2	konstante modela nastajanja enzima (tablica 2.6)
k_{DE}	konstanta deaktivacije enzima [h ⁻¹]
K_{Et}	konstanta zasićenja etanolom [g dm ⁻³]
K_G	konstanta zasićenja glukozom [g dm ⁻³]
K_i^P	konstanta inhibicije produktom [mol dm ⁻³]
K_i^S	konstanta inhibicije supstratom [mol dm ⁻³]

k_{La}	ukupni volumni koeficijent prijenosa kisika [h^{-1}]
K_O	konstanta zasićenja kisikom [g dm^{-3}]
K_S	konstanta zasićenja supstratom [mol dm^{-3}]
M	koncentracija m-RNK [g dm^{-3}]
P	snaga miješala [kW]
pO_2	relativna koncentracija otopljenog kisika [%]
Q	katabolička represija [-]
R	koncentracija represora [g dm^{-3}]
r	brzina reakcije [$\text{mol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$]
r_{DE}	brzina deaktivacije enzima [U dm^{-3}]
$r_{Et,OX}$	specifična brzina oksidacije etanola [h^{-1}]
$r_{Et,pr}$	specifična brzina nastajanja etanola [h^{-1}]
$r_{Et,up}$	specifična brzina potrošnje etanola [h^{-1}]
r_G	specifična brzina potrošnje glukoze [h^{-1}]
r_O	specifična brzina potrošnje kisika [h^{-1}]
r_P	specifična brzina nastajanja produkta [h^{-1}]
T	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
t	vrijeme [h]
t_L	vrijeme trajanja perioda indukcije [h]
t_m	vrijeme potrebno da se enzim počne sintetizirati [h]
U	koeficijent transporta supstrata u stanicu [h^{-1}]
V	volumen reakcijske smjese [dm^{-3}]
V_m	maksimalna brzina reakcije [$\text{mol dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$]
V_{plin}	volumen plinske faze u reaktoru [m^3]
V_r	ukupni dodani volumen reaktanta [cm^3]
V_R	volumen reaktora [dm^3]
X	koncentracija biomase [g dm^{-3}]
$Y_{Et/G}$	iskorištenje na etanolu u reakciji njegovog nastanka iz glukoze [g g^{-1}]
$Y_{O/Et}$	iskorištenje kisika na etanolu [g g^{-1}];
$Y_{O/G}$	iskorištenje kisika na glukozi [g g^{-1}];
$Y_{X/Et}$	iskorištenje u procesu nastajanja biomase iz etanola [g g^{-1}]
$Y_{X/G}^{OX}$	iskorištenje u procesu nastajanja biomase iz glukoze u aerobnim uvjetima [g g^{-1}]

Simboli

$Y_{X/G}^{RED}$ iskorištenje puta pretvorbe glukoze u biomasu u uvjetima limitiranosti koncentracijom kisika [g g^{-1}]

Grčki simboli:

α, β konstante modela nastajanja produkata

Δ promjena

ε_{340} molarni ekstincijski koeficijent pri valnoj duljini od 340 nm [$\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$]

μ specifična brzina rasta biomase [h^{-1}]

μ_{Et} specifična brzina rasta biomase uz etanol kao supstrat [h^{-1}]

μ_{max} maksimalna specifična brzina rasta biomase [h^{-1}]

μ_{OX} specifična brzinu rasta biomase u aerobnim uvjetima [h^{-1}]

μ_{RED} specifična brzina rasta biomase u uvjetima limitiranim koncentracijom kisika [h^{-1}]

SKRAĆENICE

ADH	enzim alkohol dehidrogenaza
ADP	adenin difosfat
Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kiselina
ATP	adenin trifosfat
Cys	cistein
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
ee	enantiomerski suvišak
Glu	glutaminska kiselina
Gly	glicin
His	histidin
Ile	izoleucin
Leu	leucin
Met	metionin
mRNK	transportna ribonukleinska kiselina
NAD ⁺	nikotin adenin dinukleotid
NADH	reducirani oblik nikotin adenin dinukleotida
Phe	fenilalanin
RNK	ribonukleinska kiselina
Ser	sein
Thr	treonin
Trp	tryptofan
Tyr	tirozin
YADH	kvaščeva alkohol dehidrogenaza