

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Ivana Roksa

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, prosinac 2005.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Smjer: kemijsko inženjerstvo

Ivana Roksa

Biokonverzija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu cijelim
stanicama pekarskog kvasca

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Članovi ispitnog povjerenstva: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof.

Dr. sc. Antun Glasnović, red. prof.

Zagreb, prosinac 2005.

Zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Bruni Zeliću, doc. koji mi je svojim stručnim znanjem i brojnim savjetima omogućio realizaciju ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Đurđi Vasić-Rački, red. prof. na stručnoj potpori i pomoći u izradi ovog rada.

Velika hvala mr. sc. Ani Vrsalović Presečki na nesebičnom trudu i pomoći u izradi ovog rada, te mr. sc. Zvezdani Findrik na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela.

Najtoplije se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri Josipi i dečku Dubravku za svu pomoć i podršku pruženu tijekom školovanja.

Hvala brojnim prijateljima koji su me podržavali kroz sve godine studiranja, a posebno se zahvaljujem kolegicama Judith Siveri i Marijani Drmač na nesebičnom prijateljstvu, potpori i pomoći tijekom studiranja i izrade ovog rada.

SAŽETAK

L-jabučna kiselina, komponenta staničnog metabolizma, se upotrebljava u farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji kao konzervans (zamjena za limunsku kiselinu). Učinkovita je u liječenju bolesti jetre osobito hiperamonemije, a upotrebljava se i kao jedna od komponenata u infuzijskim otopinama s aminokiselinama.

U ovome radu proučavan je proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu s cijelim nerastućim stanicama pekarskog kvasca. Enzim fumaraza je sastavni dio staničnog metabolizma (prisutan u ciklusu limunske kiseline), a pekarski kvasac je dostupan i jeftin izvor tog enzima.

Provedena su dva tipa pokusa biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu: pokusi na tresilici i pokusi u laboratorijskom bioreaktoru. Na tresilici su provedeni pokusi s različitim koncentracijama otopine fumarne kiseline i različitim koncentracijama suspenzije permeabiliziranih stanica pekarskog kvasca kako bi se utvrdio utjecaj koncentracije fumarne kiseline i koncentracije kvasca na volumnu produktivnost i konverziju, te kako bi se procijenili kinetički parametri modela procesa biokonverzije fumarne kiseline. Proveden je i pokus s nepermeabiliziranim stanicama kvasca u svrhu utvrđivanja utjecaja procesa permeabilizacije na karakteristike procesa biokonverzije fumarne kiseline. Procesi biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru su provedeni kao: šaržni pokus, šaržni pokus s dotokom fumarne kiseline, te kontinuirani pokus s povratnim tokom biomase.

Postavljen je matematički model procesa biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu. Parametri modela su procijenjeni simpleks metodom ili metodom najmanjih kvadrata pomoću programskog paketa SCIENTIST. Rezultati simulacije procesa pomoću modela su uspoređeni sa eksperimentalnim rezultatima te je ustanovljeno njihovo dobro slaganje.

Ključne riječi: L-jabučna kiselina, fumarna kiselina, pekarski kvasac, matematički model procesa

SUMMARY

L-malic acid, an intermediate of cell metabolism, is used in pharmaceutical industry, as well as in food and cosmetic industries as an acidulent (a substitute for citric acid). It is very effective in treating liver diseases, especially hyperammonemia, and it is used as one of the components in amino acid infusions.

In this project, bioconversion of fumaric acid to L-malic acid by the whole cells of baker's yeast was studied. Enzyme fumarase is a constituent part of cell metabolism (present in the cycle of citric acid), and baker's yeast is an accessible and inexpensive source of that enzyme.

Two types of experiments of bioconversion of fumaric acid to L-malic acid were conducted: experiments on a shaker and experiments in a laboratory bioreactor. Experiments on a shaker were performed using different concentrations of fumaric acid solution and different concentrations of baker's yeast suspension. This procedure was utilized in order to determine the effect of concentration of fumaric acid and concentration of baker's yeast on volumetric productivity and conversion, and in order to estimate kinetic parameters of the process model. An experiment with non-permeabilized yeast was performed in order to determine the effect of permeabilization on process performances. Bioconversion of fumaric acid to L-malic acid in a laboratory bioreactor was conducted as batch, fed-batch, and a continuous experiment with biomass recycle.

A mathematical model of bioconversion of fumaric acid to L-malic acid was developed. Model parameters were estimated by simplex or least squares method using SCIENTIST software package. Model applicability was demonstrated by comparing experimental results with the results obtained from process model simulations.

Key words: L-malic acid, fumaric acid, baker's yeast, mathematical model of the process

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. BIOKONVERZIJA FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU.....	3
2.2. KVASCI	4
2.3. PEKARSKI KVASAC (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	5
2.4. PRIMJENA PEKARSKOG KVASCA U INDUSTRIJI	5
2.4.1. Industrijska proizvodnja etanola.....	6
2.4.2. Proizvodnja kvaščeve biomase.....	6
2.4.3. Pekarski kvasac kao izvor biokatalizatora.....	7
2.5. ENZIMI	7
2.5.1. Fumaraza	9
2.6. MATEMATIČKI MODELI PROCESA BIOKONVERZIJE.....	10
2.6.1. Kinetički modeli	10
2.6.2. Bilance tvari u bioreaktorima (reaktorski modeli)	13
2.6.2.1. Šaržni bioreaktor	13
2.6.2.2. Bioreaktor s dotokom	14
2.6.2.3. Protočno kotlasti bioreaktor	14
2.7. MATEMATIČKI MODEL BIOKONVERZIJE FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU	15
2.7.1. Kinetika reakcije biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu	15
2.7.2. Bilance tvari u šaržnom laboratorijskom bioreaktoru	16
2.7.3. Bilance tvari u laboratorijskom bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline	16
2.7.4. Bilance tvari u protočno kotlastom laboratorijskom bioreaktoru	16
3. MATERIJALI I METODE	18
3.1. MATERIJALI	18
3.1.1. Kemikalije	18
3.1.2. Priprema otopina	18

3.1.3. Priprema permeabiliziranih stanica pekarskog kvasca.....	19
3.2. APARATURA	19
3.2.1. Tresilica	19
3.2.2. Šaržni bioreaktor	19
3.2.3. Šaržni bioreaktor s dotokom fumarne kiseline.....	20
3.2.4. Protočno kotlasti bioreaktor	21
3.2.5. Centrifuga	23
3.2.6. Spektrofotometar	23
3.2.7. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC).....	23
3.3. ANALITIČKE METODE	23
3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima fumaraze u stanicama pekarskog kvasca.....	23
3.3.2. Određivanje koncentracije fumarne kiseline i L-jabučne kiseline.....	24
3.4. BIOKONVERZIJA FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU.....	25
3.4.1. Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu na tresilici .	25
3.4.2. Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru	25
3.4.3. Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline.....	26
3.4.4. Kontinuirani proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru s povratnim tokom biomase.....	26
3.5. OBRADA PODATAKA	26
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	28
4.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA FUMARAZE U STANICAMA PEKARSKOG KVASCA	28
4.2. BIOKONVERZIJA FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU: POKUSI NA TRESILICI.....	29
4.3. BIOKONVERZIJA FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU: POKUSI U LABORATORIJSKOM BIOREAKTORU	35
4.3.1. Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru	35
4.3.2. Proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline	36

4.3.3. Kontinuirani proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreктору s povratnim tokom biomase.....	37
5. ZAKLJUČAK.....	40
6. LITERATURA	41
7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA.....	43
7.1. Simboli	43
7.1.1. Grčki simboli	43
7.2. Skraćenice	44
8. PRILOZI.....	45
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

Priroda i različite vrste organizama i mikroorganizama u njoj predstavljaju veliki izvor još neiskorištenih, ali industrijski vrlo interesantnih enzima. Različitost prirodnih spojeva ukazuje na postojanje još neotkrivenih, potencijalnih biokatalizatora, čijim će se otkrićem i primjenom znatno proširiti spektar industrijske biokatalize¹.

Upotrebom mikroorganizma kao izvora biokatalizatora izbjegava se visoka cijena izolacije i pročišćavanja enzima. Mogu se koristiti imobilizirani na čvrstu podlogu ili u suspenziji kao i čisti enzimi. 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 poznavanjem.

Enzimi u cijeloj stanici pekarskog kvasca su privukli pažnju, kao potencijalni biokatalizatori, zbog niske cijene pekarskog kvasca, jednostavnog uzgoja stanica i nepatogenosti². Posebno je važna nepatogenost jer se u današnje vrijeme sve više pažnje poklanja zaštiti i očuvanju okoliša.

Katalitičko djelovanje enzima je u odnosu na kemijske katalizatore iznimno učinkovito i selektivno; enzimi daju veće reakcijske brzine, blaži su reakcijski uvjeti i imaju veću stereospecifičnost. Njihovom primjenom se povećava produktivnost procesa, smanjuje se potrošnja reaktanata, emisija u okoliš, količina nastalog otpada, ne koriste se toksične sirovine i nastaju proizvodi visoke kakvoće³. Sve ove prednosti rezultiraju smanjenjem troškova procesa i povećanjem konkurentnosti proizvoda, dajući prednost biotransformacijama pred tradicionalnim kemijskim načinima proizvodnje⁴. Osim brojnih prednosti oni posjeduju i nedostatke koji ponekad i onemogućuju njihovu primjenu. Nestabilni su izvan prirodnog okruženja, te su podložni deaktivaciji i inhibiciji; osim toga problem još uvijek predstavlja njihova relativno visoka cijena¹.

Danas je primjena enzima u kemijskoj industriji već učvrstila svoje mjesto. Uglavnom se nalazi u područjima proizvodnje organskih spojeva, lijekova, kemikalija, sredstava za čišćenje i plastičnih materijala. Zbog prednosti bioprocesa pred klasičnim kemijskim procesima, povećavanjem iskorištenja ili smanjenjem utroška sirovine, smanjenjem emisija i otpada, broj biokatalitičkih procesa u praksi će se nastaviti ubrzano povećavati. Prva zapreka, pouzdanost u nove tehnologije, je savladana i što se više procesa, tehnologija i infrastrukture primjenjuje, povećavat će se i naponi u biokatalitičkim istraživanjima i razvoju. Ovo će

dovesti do otkrića i primjene novih enzima i bioloških nadopuna tradicionalnim kemijskim reakcijama, te olakšati integraciju enzimskih procesa u višestupnjevite kemijske sinteze⁴.

Cilj ovog rada je provedba procesa biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu, te određivanje volumne produktivnosti i konverzije procesa pri različitim početnim koncentracijama otopine fumarne kiseline uz prisustvo permeabiliziranih i nepermeabiliziranih stanica pekarskog kvasca različitih koncentracija. Provedeni su pokusi s permeabiliziranim i nepermeabiliziranim stanicama kvasca da se ukaže na važnost procesa permeabilizacije u svrhu poboljšanja kvalitete procesa.

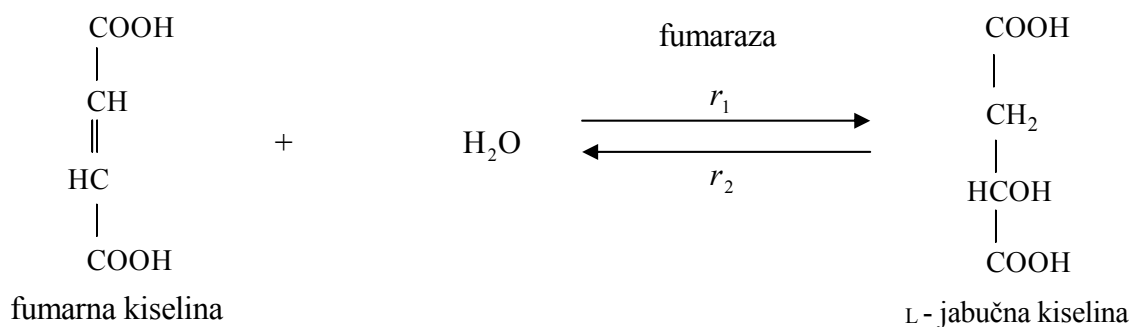
Proces biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu proveden je na tresilici, u šaržnom laboratorijskom bioreaktoru, u bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline i u protočno kotlastom bioreaktoru. Postavljen je matematički model procesa, a parametri modela su procijenjeni iz pokusa na tresilici. Rezultati simulacije procesa pomoću modela uspoređeni su sa dobivenim eksperimentalnim rezultatima.

2. OPĆI DIO

2.1. BIODONVERZIJA FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU

Jabučna kiselina spada u grupu visoko tonažnih kemikalija s potrošnjom od otprilike 40000 t godišnje. L-jabučna kiselina je komponenta staničnog metabolizma. Široko je rasprostranjena u prirodi gdje se pojavljuje u vrlo niskim koncentracijama. Ona je jedan od ključnih spojeva u ciklusu proizvodnje energije u stanicama znanom kao ciklus limunske kiseline ili Krebsov ciklus⁵. Uglavnom se upotrebljava u farmaceutskoj industriji, te u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji kao konzervans (zamjena za limunsku kiselinu). Učinkovita je u liječenju bolesti jetre osobito hiperamonemije, a upotrebljava se i kao jedna od komponenti u infuzijskim otopinama s aminokiselinama.

Tradicionalno se dobiva ekstrakcijom iz jabučnog soka. Ovaj postupak je neekonomičan jer jabučni sok sadrži svega oko 0,4 – 0,7 % L-jabučne kiseline. Kemijskom hidratacijom fumarne kiseline dobiva se racematna smjesa D,L-jabučne kiseline koja nema jednaka svojstva kao optički čista L-jabučna kiselina⁶. Industrijski se L-jabučna kiselina proizvodi biodonverzijom fumarne kiseline uz prisustvo enzima fumaraze⁷ (Slika 2.1.) porijeklom iz a) suspenzije cijelih stanica *Corynebacterium glutamicum* i b) imobiliziranih cijelih stanica *Brevibacterium flavum*^{8,9}.



Slika 2.1. Biodonverzija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu katalizirana enzimom fumarazom.

Proces biodonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu s cijelim nerastućim stanicama pekarskog kvasca je ekonomičan, jer je enzim fumaraza sastavni dio staničnog

metabolizma (prisutan u ciklusu limunske kiseline), a pekarski kvasac je dostupan i jeftin izvor tog enzima.

2.2. KVASCI

Kvasci pripadaju carstvu *Fungi*, zajedno sa plijesnima 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 adsorpcijom iz okoline.

Stanice kvasca su kuglastog ili jajolikog oblika, promjera 5-8 μm . Razmnožavaju se najčešće nespolnim načinom, tj. pupanjem. Na roditeljskoj stanici raste pup, jezgra se dijeli i jedna odlazi u pup, koji se otkida kada dostigne veličinu osnovne stanice^{5,10}.

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 uvjetima. 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 području. 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 kompleksnim².

2.3. 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 nisu sasvim objašnjeni. Kod procesa proizvodnje pekarskog kvasca mora se težiti optimiranju iskorištenja na kvaščevoj biomasi, dok se kod procesa proizvodnje alkoholnih pića zahtijeva smanjivanje 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^{2,11}.

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 5. Industrijski uzgoj pekarskog kvasca obično započinje 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 (vrijeme potrebno za udvostručenje početne populacije mikroorganizama) najkraće².

2.4. 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 produkte dobivene primjenom rekombinantne DNK^{2,12}. Većina kvasaca upotrebljivanih u nekim od gore navedenih procesa dobiveni su kao prirodni izolati koji su upotrebom tehnika genetičkog inženjerstva dalje mijenjani i selekcionirani u svrhu postizanja boljih karakteristika, odnosno

uklanjanja nepoželjnih svojstava. Malo je informacija dostupno o prirodnim nalazištima takvih kvasaca, te o vektorima odgovornim za njihovo raspoređivanje u prirodi².

2.4.1. 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. Etanol proizveden uzgojem pekarskog kvasca u industrijskom mjerilu upotrebljava se uglavnom za proizvodnju alkoholnih pića i octa, te kao gorivo u nekim zemljama².

2.4.2. Proizvodnja kvašćeve 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. 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 skladištenja².

2.4.3. Pekarski kvasac kao izvor biokatalizatora

Biotransformacije se u zadnjim desetljećima sve više upotrebljavaju za proizvodnju kemikalija. Mogu se provoditi na dva načina i to upotrebom enzima u cijelim stanicama ili sa izoliranim i pročišćenim enzimima. 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 otporan mikroorganizam^{2,13} koji se stoga može koristiti u industriji. Raste na definiranom, jednostavnom mediju, te nema potreba za nekim 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 razdoblja². Velika prednost pekarskog kvasca je ta što se smatra sigurnim odnosno nepatogenim mikroorganizmom za proizvodnju hrane i lijekova.

Cijele stanice pekarskog kvasca pokazuju nisku aktivnost. Zato se koriste različiti postupci kako bi se permeabilizirala stanična stjenka, te time smanjio otpor prijenosu tvari za reaktant i produkt i povećala aktivnost enzima u stanicama^{14,15}.

2.5. ENZIMI

Konverzija glukoze u etanol i ugljični dioksid u stanici kvasca je jedna od prvih detaljno proučavanih biokemijskih reakcija. Pretpostavka vezana za tu pretvorbu, da je katalizirana ekstraktom kvasca, dovela je do otkrića enzima i koenzima i tako postavila temelje moderne biokemije².

Enzimi su proteinske molekule koje kataliziraju kemijske reakcije u živom organizmu, te ih zbog toga nazivamo biokatalizatorima. 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. Uglavnom su velike molekularne mase, odnosno prirodni polimeri koji nastaju kondenzacijom monomernih blokova aminokiselina. Stanice sadrže tisuće različitih enzima, a do koje reakcije u stanici će doći ovisi prvenstveno o aktivnosti pojedinog enzima¹⁶. Aktivnost enzima se mijenja ovisno o uvjetima u njegovom okolišu, od kojih su najvažniji koncentracija supstrata, pH i temperatura. Pri ekstremnim

vrijednostima pH i temperature, te utjecaju drugih čimbenika dolazi do denaturacije proteina i gubitka njegove aktivnosti⁵.

Osnovne značajke biokatalizatora su:

- aktivnost (zbog složene strukture),
- visoka selektivnost i enantioselektivnost,
- stereospecifičnost,
- dobiveni iz obnovljivih izvora,
- djeluju u blagim uvjetima¹⁷.

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 otapala¹⁸. Da bi bili primjenjivi u industriji, moraju po svojstvima biti superiorni klasičnim kemijskim katalizatorima. To znači da moraju imati visoku aktivnost i stabilnost, te da mora postojati mogućnost njihove višekratne uporabe jer im je cijena previsoka, te u suprotnom nisu isplativi.

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, potrebno je razbiti staničnu stjenku, odnosno permeabilizirati ju primjenom mehaničkih, kemijskih ili mikrobioloških metoda. 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 stjenke².

Enzimi se mogu, osim u pročišćenom obliku, upotrijebiti i u cijelim stanicama, bilo živim ili neživim. Vrlo često se enzimi upotrebljavaju u imobiliziranom obliku. Imobilizirani enzimi se mogu višekratno upotrebljavati u procesu, stabilniji su u reakcijskoj smjesi, lakše se izdvajaju iz reakcijske smjese, te omogućuju kontinuiranu provedbu procesa¹⁹.

Imobilizacija je postupak pretvorbe homogenog enzima u heterogeni (heterogeni biokatalizatori). Prvobitno su imobilizirani čisti enzimi, te oni čine prvu generaciju heterogenih biokatalizatora. Drugu generaciju čine imobilizirane cijele stanice. 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 nosiocu². U imobiliziranom obliku se uglavnom koriste samo skupi enzimi, jer se imobilizacijom omogućuje učinkovito odvajanje produkta, recikliranje i ponovna uporaba skupog enzima²⁰.

Prednosti enzima pred klasičnim katalizatorima su:

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

Uz navedene prednosti, enzimi imaju i sljedeće nedostatke:

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

Iz prethodnog se zaključuje da su biokatalizatori veoma važni katalizatori jer omogućuju provedbu reakcija koje bi standardnim kemijskim postupcima bilo vrlo teško ili pak nemoguće provesti².

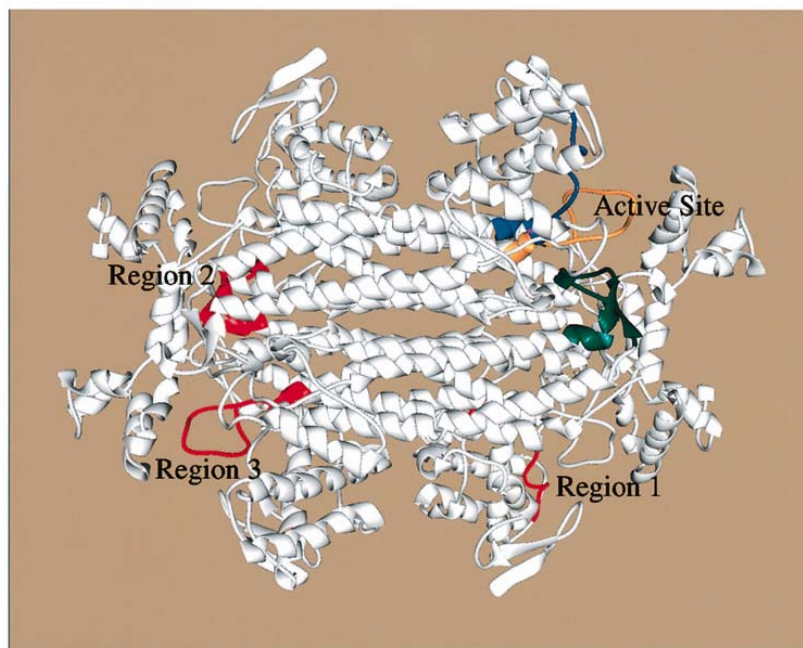
2.5.1. Fumaraza

Fumaraza (Slika 2.2.) je stereospecifičan enzim, koji djeluje samo na trans izomer. Pripada porodici homolognih enzima i koristi fumarate kao uobičajeni supstrat/produkt u svom reakcijskom putu. Fumaraze su svrstane u dvije grupe; fumaraze prve grupe se nalaze u prokariotima i one su dimerni enzimi, osjetljivi na temperaturu i ovisni o prisutnosti iona željeza, sa molekularnom masom od 120 kDa; fumaraze druge grupe su tetramerni enzimi, temperaturno stabilni i neovisni o prisutnosti željeza, s molekularnom masom od 200 kDa. Izvori fumaraza druge grupe su svinjsko srce, zečja jetra, kvasci i drugi mikroorganizmi²¹.

Fumaraza sudjeluje u ciklusu limunske kiseline katalizirajući povratnu reakciju pretvorbe fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu (Slika 2.1.)^{7,22}. Ovaj enzim posjeduje apsolutnu specifičnost za supstrate fumarnu i L-jabučnu kiselinu. Na pH 7 brža je reakcija pretvorbe fumarne kiseline u L-jabučnu, koja je 100 %-tna na pH 9.

Produkt ove reakcije, L-jabučna kiselina, se široko koristi u farmaceutskoj industriji i prehrambenoj industriji, što fumarazi daje veliku industrijsku važnost.

Na aktivnost fumaraze izrazito utječu temperatura kao i vrsta i koncentracija aniona u ispitivanoj smjesi²³.



Slika 2.2. Fumaraza

2.6. MATEMATIČKI MODELI PROCESA BIODONVERZIJE

Modeliranje kao načelo reakcijskog inženjerstva je pronašlo ulogu i u enzimskim reakcijama i očekuje se da će ta uloga rasti s uporabom biokatalizatora. Matematički modeli, osobito kad su povezani sa modernim kompjuterskim tehnikama, su se pokazali veoma učinkovitim u traženju optimalnih radnih uvjeta i stvaranju optimalnog mikrookoliša za biokatalizator s ciljem optimiranja produktivnosti²⁴.

Matematički model procesa uključuje kinetički model i reaktorski model, odnosno bilance tvari za svaku komponentu koje ovise o tipu reaktora. Za razvoj modela potrebno je odrediti kinetiku reakcije. Posebnu pažnju valja obratiti na: značajke reakcijskog sustava (pH, temperatura, koncentracije supstrata, produkta i enzima), značajke reakcije (termodinamičke konstante i kinetičke konstante), značajke biokatalizatora (mehanička čvrstoća, aktivnost, stabilnost, molekulska masa), te njihovu međusobnu zavisnost i utjecaj na proces¹⁷.

2.6.1. Kinetički modeli

Kinetički model reakcije je matematički izraz koji opisuje zavisnost brzine reakcije o reakcijskim veličinama i parametrima²⁵. Najjednostavniji kinetički model koji opisuje

ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata može se opisati Michaelis-Mentenovim (Slika 2.3.) izrazom:

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S} \quad (2.1.)$$

$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.2.)$$

gdje je:

r_S - brzina potrošnje supstrata, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$,

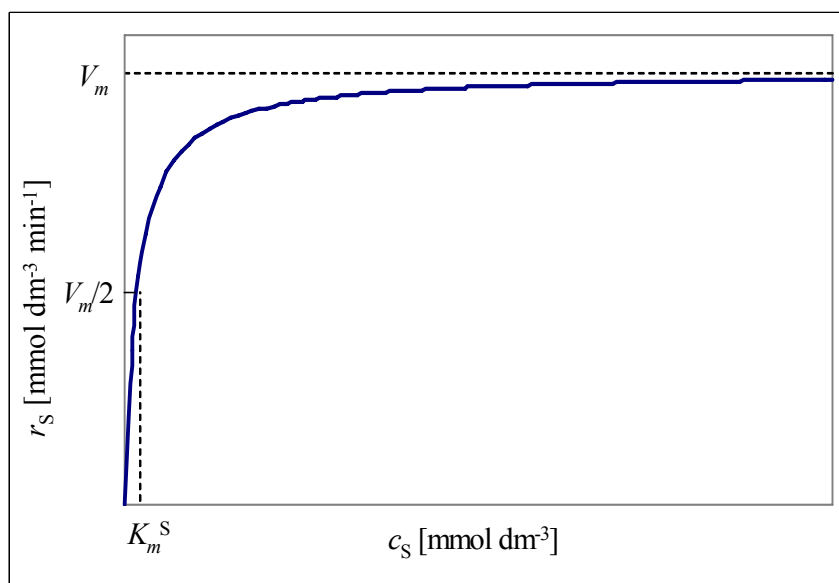
c_S - koncentracija supstrata, mmol dm^{-3} ,

V_m -maksimalna brzina reakcije, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$,

K_m^S - Michaelis-Mentenova konstanta, mmol dm^{-3} , koja je jednaka koncentraciji supstrata za reakcijsku brzinu jednaku polovini maksimalne brzine reakcije,

k_3 - katalitička konstanta enzima, min^{-1} ,

E_0 - početna koncentracija enzima, mmol dm^{-3} .



Slika 2.3. Ovisnost reakcijske brzine o početnoj koncentraciji supstrata za Michaelis-Mentenovu kinetiku.

Mehanizam enzimske kinetike može biti vrlo kompleksan, što ima za posljedicu kompleksne kinetičke izraze. Jedna od jednostavnijih jednadžbi je i Michaelis-Mentenova jednadžba za dvosupstratnu reakciju dana kao¹:

$$r_{S1} = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1})(K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (2.3.)$$

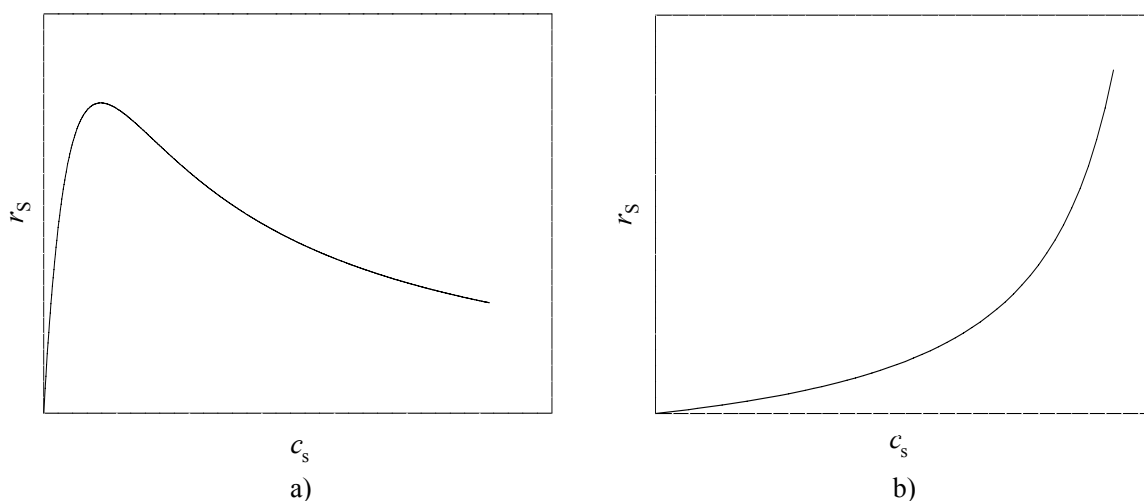
Prethodno navedeni modeli ne uključuju postojanje inhibicije supstratom i produktom. Do inhibicije dolazi kada pojedini kemijski spoj, inhibitor, svojom prisutnošću smanjuje brzinu enzimski katalizirane reakcije, obično zbog svog vezanja na aktivno mjesto enzima. U slučaju inhibicije samo supstratom (Slika 2.4., a) pri jednosupstratnoj reakciji model glasi:

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S + c_s + \frac{c_s^2}{K_i^S}} \quad (2.4.)$$

U slučaju inhibicije produktom (Slika 2.4., b) kod jednosupstratne reakcije vrijedi model¹⁷:

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

gdje je $K_i^{S(P)}$ - konstanta inhibicije supstratom (produktom), mol dm⁻³.



Slika 2.4. Grafički prikaz ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata: a) u slučaju inhibicije supstratom, b) u slučaju inhibicije produktom

Vrijednosti parametara u navedenim kinetičkim jednadžbama se mogu procijeniti linearnom i nelinearnom regresijom. Linearna regresija zahtijeva linearizaciju kinetičkog modela čime se dobiva Lineweaver-Burk-ov pravac, a koristi se i Levenspielova metoda u kojoj se Michaelis-Mentenova jednadžba integrira.

Nelinearna regresija obuhvaća procjenu vrijednosti parametara iz eksperimentalnih podataka uporabom modela u kojem je procjenjivana vrijednost odzivne varijable nelinearna funkcija jedne ili više nezavisnih varijabli (poput početne brzine enzimski katalizirane

reakcije o koncentraciji supstrata). Pri tome se može koristiti više metoda, primjerice simpleks metoda ili metoda najmanjih kvadrata.

2.6.2. Bilance tvari u bioreaktorima (reaktorski modeli)

Bioreaktori se koriste za proizvodnju biomase, bioprodukata pomoću mikroorganizama ili animalnih stanica i za biotransformaciju proizvoda pomoću enzima²⁶. Kako se širilo područje primjene biokatalizatora tako se povećavao izbor konfiguracija biokatalizator/bioreaktor. U literaturi se može naći opis cijelog niza najrazličitijih reaktorskih konfiguracija od kojih se u industriji primjenjuje samo nekoliko. Iako postoji cijeli niz različitih izvedbi reaktora za bioprocese izbor se u principu može provesti između tri temeljna tipa reaktora: kotlasti (šaržni), protočno kotlasti i kolonski i to najčešće s nepokretnim slojem biokatalizatora.

Kriteriji za izbor bioreaktora su: tip reakcijskog medija, tip kinetike i oblik biokatalizatora. Bioreaktor mora biti optimiran tako da se postigne visoka koncentracija produkata odnosno visoka produktivnost tj. da se proizvede što više produkata po jedinici reaktorskog volumena, jedinici enzimske aktivnosti primijenjenog biokatalizatora i jedinici vremena¹⁷. Optimalni tip, veličina i konfiguracija bioreaktora za industrijsku proizvodnju su konačno određeni ekonomskim parametrima, npr. cijenom proizvodnje produkta²⁶.

2.6.2.1. Šaržni bioreaktor

Šaržni (kotlasi ili *batch*) bioreaktor se često susreće u industriji za provedbu velikog broja reakcija, pretežno u kapljevitoj fazi. Kotlasti reaktor je zatvoreni sustav što znači da se za vrijeme reakcije s okolinom ne razmjenjuje reakcijska masa. Sastav reakcijske smjese je u svakoj točki isti (pretpostavka idealnog miješanja), te se bilance mogu postaviti za reaktor kao cjelinu, a ne samo za diferencijalni volumen. Zbog kemijske reakcije koja je vremenski proces, kotlasti reaktor je uvijek u nestacionarnom stanju²⁵.

Šaržni reaktor je općenito povoljna konfiguracija za reakcijske sustave koji nisu inhibirani niti supstratom niti produktom. Bilanca tvari uz pretpostavku idealnog miješanja za takav tip reaktora glasi:

$$\frac{d(V \cdot c_A)}{dt} = r_A \cdot V \quad (2.6.)$$

gdje je:

V - volumen reakcijske smjese u bioreaktoru, dm^3 ,

c_A - koncentracija komponente A, mmol dm^{-3} ,

r_A - brzina nastajanja komponente A, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$,

t - vrijeme, min.

Uz pretpostavku da je volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu tj. nema promjene gustoće, jednačba 2.6. glasi²⁶:

$$\frac{dc_A}{dt} = r_A \quad (2.7.)$$

2.6.2.2. Bioreaktor s dotokom

Bioreaktor s dotokom je bioreaktor u koji se kontinuirano ili povremeno uvodi reakcijska smjesa. Kako se ništa ne uklanja iz sustava, volumen smjese se povećava s vremenom, te je ovaj reaktor stalno u nestacionarnom stanju, odnosno veličine stanja unutar reaktora ovise o vremenu. Uz pretpostavku idealnog miješanja, sastav u reakcijskoj smjesi je u svakoj točki isti.

Ovaj tip reaktora se najčešće upotrebljava kada je supstrat inhibitor aktivnosti ili je toksičan te ga treba postepeno dovoditi u reaktor¹⁷.

Bilanca tvari komponente A za takav tip reaktora je dana sljedećom jednačbom²⁶:

$$\frac{d(V \cdot c_A)}{dt} = q \cdot c_{A,0} + r_A \cdot V \quad (2.8.)$$

gdje je:

q - protok, $\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$,

$c_{A,0}$ - početna koncentracija komponente A.

2.6.2.3. Protočno kotlasti bioreaktor

Protočni kotlasti bioreaktor je otvoreni sustav, što znači da se za vrijeme reakcije sa okolinom razmjenjuje reakcijska smjesa. Osnovna značajka "idealnog" protočno kotlastog reaktora je da u takav reaktor stalno ulazi ista masa tvari i ista masa izlazi iz njega, što znači da je reaktor u stacionarnom stanju, odnosno veličine stanja unutar reaktora su nezavisne o vremenu. Reakcijska smjesa je dobro miješana i prema tome je njen sastav u svakoj točki reakcijske smjese isti. Reaktor radi izotermno, a izotermnost se odnosi na jednakost

temperature i po reaktorskom prostoru i po vremenu, što je posljedica idealnog miješanja i stacionarnog rada²⁵. Budući da reakcijska masa stalno ulazi i izlazi iz reaktora u model se uvodi prostorno vrijeme (τ), koje je jednako srednjem vremenu zadržavanja molekula reakcijske smjese u reaktoru.

Protočni kotlasti reaktor predstavlja povoljnu konfiguraciju za reakcijske sustave inhibirane supstratom jer radi pri uvjetima izlazne koncentracije kod koje je koncentracija supstrata kod visokih konverzija niska¹.

Bilanca tvari protočno kotlastog bioreaktora za reaktant (A) i produkt (B) uz pretpostavku konstantnog volumena glasi²⁶:

$$\frac{dc_A}{dt} = \frac{c_{A,0} - c_A}{\tau} - r_A \quad (2.9.)$$

$$\frac{dc_B}{dt} = \frac{c_{B,0} - c_B}{\tau} + r_A \quad (2.10.)$$

gdje je τ - vrijeme zadržavanja (prostorno vrijeme), min.

2.7. MATEMATIČKI MODEL PROCESA BIOKONVERZIJE FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU

2.7.1. Kinetika reakcije biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu

Kinetika reakcije biokonverzije fumarne kiseline je opisana Michaelis-Mentenovom jednadžbom sa kompetitivnom inhibicijom produktom, L-jabučnom kiselinom.

Jednadžbe 2.11. i 2.12. su korištene za opis kinetike procesa biokonverzije fumarne kiseline u pokusima na tresilici, šaržnom pokusu u laboratorijskom bioreaktoru te pokusu u bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_K \cdot c_F}{K_{m1} \left(1 + c_J / K_i^J\right) + c_F} \quad (2.11.)$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot c_K \cdot c_J}{K_{m2} + c_J} \quad (2.12.)$$

Jednadžbe 2.13. i 2.14. su korištene za opis kinetike procesa biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u protočno kotlastom laboratorijskom bioreaktoru. Pri tome je u kinetički model uz inhibiciju produktom uključena i vremenski ovisna deaktivacija enzima, koja je opisana kinetikom prvog reda (integrirani oblik).

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_K \cdot e^{-k_d t} \cdot c_F}{K_{m1} \left(1 + c_K / K_i^J\right) + c_F} \quad (2.13.)$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot c_K \cdot e^{-k_d t} \cdot c_J}{K_{m2} + c_J} \quad (2.14.)$$

gdje je k_d – konstanta deaktivacije enzima, min^{-1} .

2.7.2. Bilance tvari u šaržnom laboratorijskom bioreaktoru

Matematički model za proces biokonverzije fumarne kiseline u šaržnom bioreaktoru sadrži kinetičke jednadžbe (jedn. 2.11. i 2.12.) i bilance tvari za fumarnu kiselinu i L-jabučnu kiselinu (jedn. 2.15. i 2.16.).

$$\frac{dc_F}{dt} = r_2 - r_1 \quad (2.15.)$$

$$\frac{dc_J}{dt} = r_1 - r_2 \quad (2.16.)$$

2.7.3. Bilance tvari u laboratorijskom bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline

Rezultati eksperimenta u laboratorijskom bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline su analizirani kinetičkim jednadžbama 2.11 i 2.12. koje uključuju inhibiciju produktom, uključene u bilancne jednadžbe 2.17. i 2.18.

$$\frac{dc_F}{dt} = \frac{-c_F + c_{F,0}}{V} \cdot q + r_2 - r_1 \quad (2.17.)$$

$$\frac{dc_J}{dt} = \frac{-c_J}{V} \cdot q + r_1 - r_2 \quad (2.18.)$$

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

2.7.4. Bilance tvari u protočno kotlastom laboratorijskom bioreaktoru

Rezultati eksperimenta provedenog u protočno kotlastom laboratorijskom bioreaktoru su analizirani kinetičkim jednadžbama 2.13. i 2.14. koje osim inhibicije produktom uključuju i vremensku deaktivaciju enzima, te su uključeni u bilancne jednadžbe 2.20. i 2.21. ili 2.23. i 2.24.

Bilancne jednadžbe 2.20. i 2.21. su korištene kada je volumen u reaktoru bio konstantan, odnosno kada je protok na ulazu bio jednak protoku na izlazu. Kada su protoci imali različite vrijednosti morala se uzeti u obzir promjena volumena, te su korištene jednadžbe 2.23. i 2.24.

ulaz = izlaz

$$\frac{dc_F}{dt} = \frac{c_{F,0} - c_F}{\tau} + r_2 - r_1 \quad (2.20.)$$

$$\frac{dc_J}{dt} = -\frac{c_J}{\tau} + r_1 - r_2 \quad (2.21.)$$

ulaz \neq izlaz

$$\frac{dV}{dt} = q_{ul} - q_{izl} \quad (2.22.)$$

$$\frac{dc_F}{dt} = \frac{c_{F,0}q_{ul} - c_Fq_{izl}}{V} + r_2 - r_1 \quad (2.23.)$$

$$\frac{dc_J}{dt} = -\frac{c_Jq_{izl}}{V} + r_1 - r_2 \quad (2.24.)$$

3. MATERIJALI I METODE

Biokonverzija fumarne u L-jabučnu kiselinu provedena je u šaržnim pokusima na tresilici pri različitim početnim koncentracijama fumarne kiseline uz prisustvo permeabiliziranih i nepermeabiliziranih stanica pekarskog kvasca različitim koncentracija. Potom su u laboratorijskom bioreaktoru provedeni šaržni pokus, šaržni pokus s dotokom fumarne kiseline, te kontinuirani pokus s povratnim tokom biomase (biomasa se pomoću ultrafiltracijskog modula zadržavala u sustavu, a proces je bio kontinuiran s obzirom na reaktante i produkte). Enzimskim testom je praćena aktivnost enzima fumaraze porijeklom iz pekarskog kvasca, a koncentracije reaktanta i produkta, fumarne kiseline i L-jabučne kiseline, određivane su kapljevinskom kromatografijom visokog učinka.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Tijekom provedbe pokusa su korištene sljedeće kemikalije:

- perklorna kiselina, HClO_4 , (*Merck*),
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , (*Kemika*),
- kalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 , (*Merck*),
- heksadeciltrimetil-amonijev bromid, CTAB, (*Fluka*),
- fumarna kiselina, $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$, (*Fluka*),
- L-jabučna kiselina, $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$, (*Fluka*),
- kalijev hidroksid, KOH , (*Kemika*),
- pekarski kvasac (*Kvasac d.d.*).

3.1.2. Priprema otopina

Pripremljene su otopine fumarne i L-jabučne kiseline u redestiliranoj vodi različitih koncentracija koje su korištene kao kromatografski standardi. Otopine fumarne kiseline različitih koncentracija korištene kao početni reakcijski medij u pokusima biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu pripremljene su u fosfatnom puferu $\text{pH} = 7$, $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Fosfatni pufer ($\text{pH} = 7$, $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$) pripremljen je otapanjem 10,71 g K_2HPO_4 i 5,24 g

KH_2PO_4 u 1 dm^3 redestilirane vode. Pokretna faza (eluent) za kapljevinsku kromatografiju visokog učinka (HPLC) je redestilirana voda kojoj je pH podešen između 2,10 i 2,15 dodatkom perklorne kiseline. 0,2 % otopina CTAB-a pripravljena je otapanjem 1,00 g CTAB-a u 500 cm^3 fosfatnog pufera ($\text{pH} = 7$, $c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$). Priprema otopina za provedbu enzimskog testa je opisana u poglavlju koje opisuje određivanje aktivnosti enzima fumaraze u stanicama pekarskog kvasca.

3.1.3. Priprema permeabiliziranih stanica pekarskog kvasca

U kivetu je izvagano 1g kvasca te je dodano 10 cm^3 0,2 %-tne otopine CTAB-a (jedn. 3.1.).

$$V_{0,2\% \text{CTAB}} [\text{cm}^3] = m_{\text{m.b.}} [\text{g}] \cdot k [\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}] \quad (k = 10 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (3.1.)$$

Permeabilizacija je provedena miješanjem na vortexu 15 min, te je nastala suspenzija centrifugirana 10 min pri $n = 5000 \text{ min}^{-1}$. Nastali kapljevinski ostatak je oddekantiran i bačen, a permeabilizirane stanice oprane sa približno 10 cm^3 fosfatnog pufera ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7$). Suspenzija permeabiliziranih stanica pekarskog kvasca je ponovno odcentrifugirana 10 min, $n = 5000 \text{ min}^{-1}$. Kapljevinski ostatak je bačen, a preostale stanice suspendirane u reakcijskoj smjesi (fumarne kiseline + fosfatni pufer) čim je aproksimiran početak pokusa biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu.

3.2. APARATURA

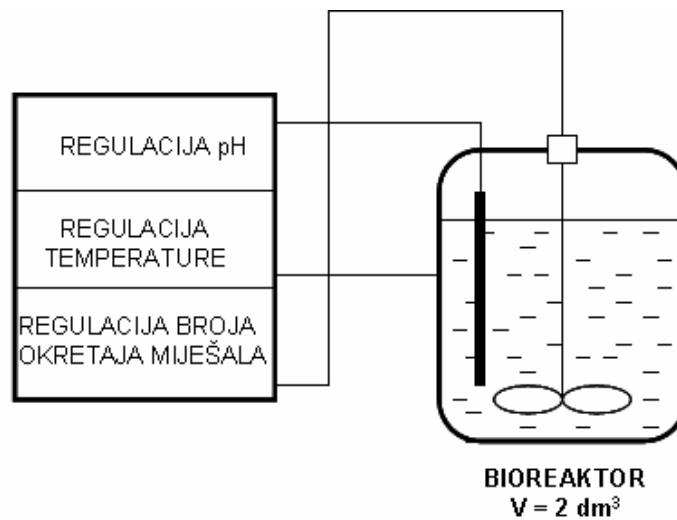
3.2.1. Tresilica

Šaržni pokusi biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu pri različitim koncentracijama fumarne kiseline i pekarskog kvasca provedeni su na tresilici *vibromix* 313 *EVT* proizvođača TEHTNICA (Slovenija).

3.2.2. Šaržni bioreaktor

Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu je proveden u laboratorijskom bioreaktoru (Biostat MD, B. BRAUN) volumena 2 dm^3 prikazanog na

slikama 3.1. i 3.2. Bioreaktor je bio opremljen sustavom za regulaciju pH i temperature, sustavom za regulaciju broja okretaja miješala, te sustavom za sterilno uzimanje uzorka.



Slika 3.1. Shema šaržnog bioreaktora.

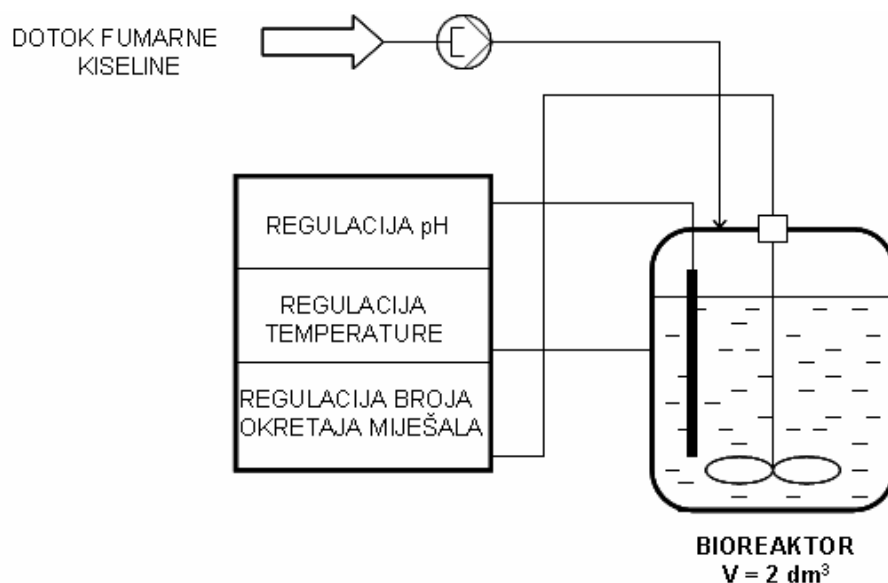


Slika 3.2. Laboratorijski bioreaktor.

3.2.3. Šaržni bioreaktor s dotokom fumarne kiseline

Šaržni pokus s dotokom fumarne kiseline biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu je proveden u laboratorijskom bioreaktoru (Biostat MD, B. BRAUN) s dodanim

sustavom za dobavu otopine fumarne kiseline u puferu (Slika 3.3.). Za dobavu otopine fumarne kiseline korištena je peristaltička pumpa (FE 411, B.Braun).



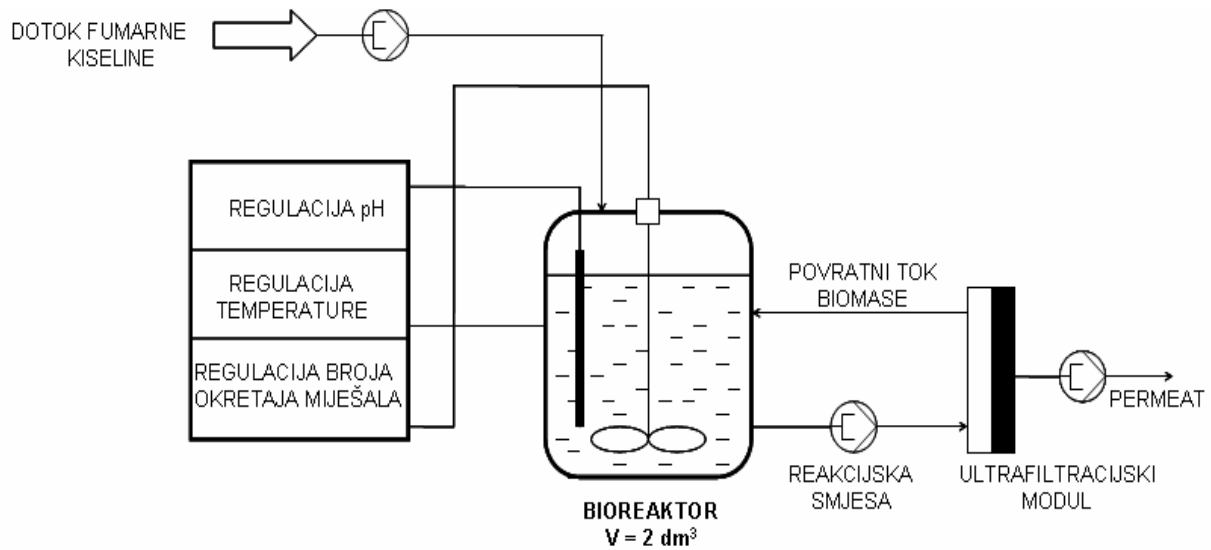
Slika 3.3. Shema šaržnog bioreaktora s dotokom fumarne kiseline.

3.2.4. Protočno kotlasti bioreaktor

Kontinuirani pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu s povratnim tokom biomase je proveden u protočno kotlastom laboratorijskom bioreaktoru (Biostat MD, B. BRAUN) volumena 2 dm^3 . Biomasa se pomoću ultrafiltracijskog modula zadržavala u sustavu, a proces je bio kontinuiran s obzirom na reaktante i produkte.

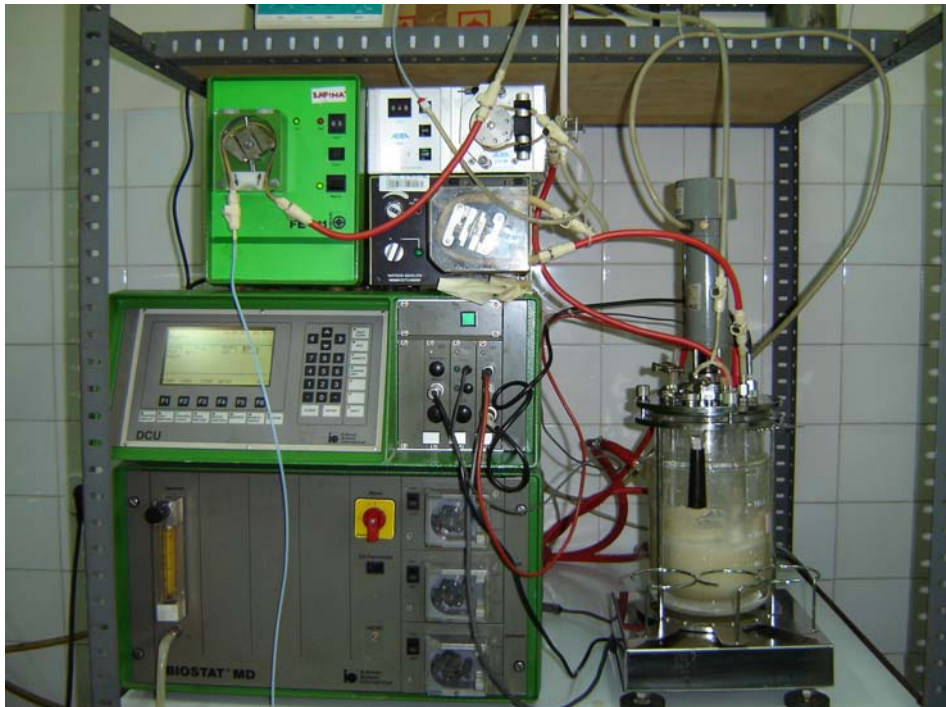
Reakcijska smjesa se pomoću peristaltičke pumpe (FE 411, B.Braun) uvodila u ultrafiltracijski modul (UF-30-E-3, $A = 0,07 \text{ m}^2$, $cut\ off = 30 \text{ kDa}$, Sempas Membrantechnik GmbH) u kojem se biomasa razdvajala od ostalih komponenata reakcijske smjese. Tako razdvojena biomasa se vraćala povratnim tokom u bioreaktor. Permeat koji je sadržavao druge komponente reakcijske smjese se pomoću druge peristaltičke pumpe (501 U, Watson-Marlow) odvodio iz ultrafiltracijskog modula. Protok permeata bio je jednak protoku svježe sirovine (otopini fumarne kiseline u puferu) koja se dovodila u bioreaktor (Slika 3.3.) pomoću treće peristaltičke pumpe (U1-M, Alitea). Protok struje permeata je bio kontroliran preko sustava za vođenje koji je sastavni dio bioreaktora Biostat MD tako da je održavana konstantna masa reakcijske smjese u bioreaktoru.

Shema protočno kotlastog bioreaktora je prikazana na slici 3.4.



Slika 3.4. Shema protočno kotlastog bioreaktora s ultrafiltracijskim modulom za recirkulaciju biomase.

Aparatura na kojoj je proveden proces kontinuirane biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu prikazana je na slici 3.5.



Slika 3.5. Aparatura za provedbu procesa kontinuirane biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu.

3.2.5. Centrifuga

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

3.2.6. Spektrofotometar

Mjerenje aktivnosti enzima fumaraze provedeno je uporabom enzimskog testa na dvoznačnom spektrofotometru (UV-1601, SHIMADZU).

3.2.7. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracije fumarne kiseline i L-jabučne kiseline su određene HPLC-om (Sykam, SHIMADZU) opremljenim sa UV-VIS detektorom (SPD-10A, SHIMADZU) na 210 nm, pri temperaturi od $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Uređaj je bio opremljen integratorom (C-R6A, Sykam) i termostatom (4110, Sykam).

3.3. ANALITIČKE METODE

Aktivnost enzima fumaraze iz pekarskog kvasca je praćena spektrofotometrijskim testom, a koncentracije supstrata fumarne kiseline i produkta L-jabučne kiseline su određene kapljevinskom kromatografijom visokog učinka.

3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima fumaraze u stanicama pekarskog kvasca

Aktivnost enzima fumaraze porijeklom iz pekarskog kvasca praćena je uobičajenim enzimskim testom na dvoznačnom spektrofotometru SHIMADZU UV-1601 (Japan). Sam test temelji se na reakciji biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu (jedn. 2.1.), pri čemu je količina fumarne kiseline potrošena u jedinici vremena mjera aktivnosti fumaraze. U sustavu se nalazila otopina fumarne kiseline, i suspenzija pekarskog kvasca, a tijekom reakcije je praćen pri $\lambda = 290 \text{ nm}$. Detaljan opis testa dan je u Boehringerovom priručniku [Biochemica information II]²⁷. Otopine potrebne za test su: fosfatni pufer, $\text{pH} = 7,0$, $c_{\text{pufera}} = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, otopina fumarne kiseline u fosfatnu puferu, $c_{\text{F}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$; suspenzija pekarskog kvasca

koncentracije $c_K \cong 0,01 \text{ g dm}^{-3}$. Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti volumena 3 cm^3 , a sastav testa je prikazan u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Sastav testa za određivanje aktivnosti enzima fumaraze u stanicama pekarskog kvasca.

Otopina	$V [\text{cm}^3]$
fumarna kiselina u fosfatnom puferu	2,9
suspenzija pekarskog kvasca	0,1

Nakon što su se komponente testa pomiješale pratila se promjena apsorbancije u vremenu te je iz njene promjene, $\Delta ABS/\Delta t$, određena volumna (jedn. 3.1.) i specifična aktivnost (jedn. 3.2.).

$$A_V = \frac{V_r}{\epsilon_{290} \cdot d \cdot V_K} \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (3.1.)$$

$$A_S = \frac{A_V}{c_K} \quad (3.2.)$$

gdje je:

V_r - ukupni volumen uzorka u kiveti, cm^3 ;

V_K - volumen dodanog kvasca, cm^3 ;

ϵ_{290} - ekstinkcijski koeficijent pri valnoj duljini $\lambda = 290 \text{ nm}$, $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$, ($\epsilon_{290} = 0,11 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$);

d - promjer kivete, cm , ($d = 1 \text{ cm}$);

$\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$ - promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca), min^{-1} ;

A_V - volumna aktivnost, U cm^{-3} ;

A_S - specifična aktivnost, U mg^{-1} ;

c_K - koncentracija kvasca, mg cm^{-3} .

3.3.2. Određivanje koncentracije fumarne kiseline i L-jabučne kiseline

Koncentracije fumarne kiseline i L-jabučne kiseline su određene kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC) sa UV detektorom pri valnoj duljini od 210 nm na

Hibar RT Pre-packed koloni s punilom LiChrosorb, RP-18 (5 μm). Kao mobilna faza je korištena redestilirana voda (pH = 2,10 - 2,15 podešen dodatkom perklorne kiseline) pri protoku eluenta od 0,7 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ i temperaturi od 30 $^\circ\text{C}$. Standardne otopine fumarne i L-jabučne kiseline su pripremljene otapanjem određenih masa standarda u redestiliranoj vodi. Na taj način su dobiveni baždarni pravci (Prilog 1. i 2.). Za te uvjete vrijeme zadržavanja fumarne kiseline je iznosilo 3,7 min, a L-jabučne kiseline 1,2 min.

3.4. BIOKONVERZIJA FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU

3.4.1. Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu na tresilici

Na tresilici je provedeno šest šaržnih pokusa s različitim početnim koncentracijama otopine fumarne kiseline (25 mmol dm^{-3} i 50 mmol dm^{-3}), te različitim početnim koncentracijama suspenzija permeabiliziranog ili nepermeabiliziranog kvasca (0,005 g cm^{-3} , 0,01 g cm^{-3} , 0,02 g cm^{-3} , 0,1 g cm^{-3}).

U tikvicu od 250 cm^3 je dodano 100 cm^3 otopine fumarne kiseline u fosfatnom puferu i suspenzija permeabiliziranog kvasca u fosfatnom puferu prema gore prikazanim početnim uvjetima. Biokonverzija fumarne u L-jabučnu kiselinu je provedena na tresilici pri $n = 200 \text{ min}^{-1}$ i temperaturi 30 $^\circ\text{C}$. Uzorci su uzimani u različitim vremenskim intervalima, centrifugirani te je koncentracija fumarne kiseline i L-jabučne kiseline određivana u supernatantu na prethodno opisan način.

3.4.2. Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru

1 dm^3 otopine fumarne kiseline u fosfatnom puferu koncentracije približno 50 mmol dm^{-3} je dodano u šaržni reaktor volumena 2 dm^3 i termostatirano na temperaturu od 30 $^\circ\text{C}$. Prije dodatka suspenzije permeabiliziranog kvasca uzet je početni uzorak iz reaktora i analiziran na HPLC-u. Početak pokusa aproksimiran je dodatkom suspenzije pekarskog kvasca tako da je njegova koncentracija u bioreaktoru bila približno 0,01 g cm^{-3} . Uzorci (približno 1 cm^3) su uzimani pomoću sustava za sterilno uzimanje uzorka u prethodno definiranim vremenskim intervalima i analizirani na prethodno navedeni način.

3.4.3. Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline

Pokus je u svom početku proveden na isti način kao i onaj u šaržnom reaktoru, s istom početnom koncentracijom otopine fumarne kiseline i suspenzije permeabiliziranog kvasca ($c_{F0} \cong 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_K \cong 0,01 \text{ g cm}^{-3}$). Nakon tri sata provedbe šaržnog procesa, odnosno kada su postignute ravnotežne koncentracije fumarne kiseline i L-jabučne kiseline, pomoću peristaltičke pumpe kontinuirano je dodavana otopina fumarne kiseline u fosfatnom puferu koncentracije 270 mmol dm^{-3} . Protok dotoka fumarne kiseline je bio $42 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$. Reakcija je praćena uzimanjem i analiziranjem uzoraka kao i u prethodno opisanom pokusu.

3.4.4. Kontinuirani proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru s povratnim tokom biomase

Pokus je na svom početku proveden na isti način kao i onaj proveden u šaržnom reaktoru, s istom početnom koncentracijom otopine fumarne kiseline i suspenzije permeabiliziranog kvasca. Nakon sat vremena započeta je kontinuirana dobava otopine fumarne kiseline u puferu koncentracije 270 mmol dm^{-3} pomoću peristaltičke pumpe. U isto vrijeme započeto je i sa odvođenjem reakcijskih produkata i recirkulacijom permeabiliziranih stanica pekarskog kvasca primjenom sustava za ultrafiltraciju. Pokus je proveden pri različitim vrijednostima ulaznih protoka ($q_{ul} = 0,81; 0,85; 1,11; 1,81; 10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$). Reakcija je praćena sedam dana pri čemu su praćene promjene koncentracija fumarne i L-jabučne kiseline kao i deaktivacija kvasca. Uzorci su uzimani u prethodno definiranim vremenskim intervalima i analizirani kao i u prethodno opisanim pokusima. Kako bi se održavao konstantan volumen reakcijske smjese u reaktoru izlazni protok je bio jednak vrijednostima ulaznog protoka. Za svaku vrijednost protoka računato je vrijeme zadržavanja te je pri konstantnim procesnim uvjetima biokonverzija provedena kroz vrijeme koje je iznosilo minimalno četiri vremena zadržavanja.

3.5. OBRADA PODATAKA

Na temelju eksperimentalnih podataka koji su dobiveni kao ovisnost promjene koncentracije supstrata i produkta u vremenu pokusima na tresilici procijenjeni su parametri modela biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu s permeabiliziranim stanicama kvasca.

Parametri modela su procijenjeni nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu ili metodu najmanjih kvadrata koje su sadržane u programskom paketu SCIENTIST. Rezultati dobiveni pomoću matematičkog modela su uspoređeni sa eksperimentalnim podacima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalna pogreška između eksperimentalnih i procijenjenih vrijednosti. Razlika između vrijednosti eksperimentalnih podataka i onih proračunatih pomoću modela je dana kao suma kvadrata pogreške. Za simulacije pomoću modela je korišten *Episode* algoritam za rješavanje krutih diferencijalnih jednačbi koji je sastavni dio programskog paketa SCIENTIST²⁸.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedena su dva tipa pokusa biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu: pokusi na tresilici i pokusi u laboratorijskom bioreaktoru. Šaržni pokusi na tresilici su provedeni pri različitim početnim koncentracijama fumarne kiseline uz prisustvo permeabiliziranih i nepermeabiliziranih stanica pekarskog kvasca različitim koncentracijama. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka su procijenjeni parametri modela biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu, te je izračunata volumna produktivnost ostvarena u ovim pokusima. Pri pokusima na tresilici enzimskim testom je praćena i aktivnost enzima fumaraze u stanicama pekarskog kvasca.

Procesi biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru su provedeni kao: šaržni pokus, šaržni pokus s dotokom fumarne kiseline, te kontinuirani pokus s povratnim tokom biomase. Za svaki od navedenih tipova procesa je izračunata volumna produktivnost i konverzija.

4.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA FUMARAZE U STANICAMA PEKARSKOG KVASCA

Aktivnost enzima fumaraze porijeklom iz pekarskog kvasca je izračunata uobičajenim enzimskim testom opisanom u 3.3.1. za različite koncentracije kvasca. Izračunate su volumna, A_v , i specifična, A_s , aktivnost (jedn. 3.1. i 3.2.), a rezultati su prikazani u tablici 4.1.

Kako bi se poboljšale karakteristike procesa biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu kvasac se prethodno permeabilizira detergentom kako bi se perforirala stanična stjenka, te smanjili otpori prijenosu tvari za reaktant i produkt. Iz rezultata provedbe ovih pokusa je vidljivo da za istu koncentraciju kvasca permeabilizirane stanice kvasaca imaju tri puta veću aktivnost od nepermeabiliziranih stanica, što upućuje na potrebu permeabilizacije pekarskog kvasca prije provedbe procesa biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu.

Iz rezultata pokusa (Tablica 4.1.) vidljivo je da se povećanjem koncentracije pekarskog kvasca u tretiranoj suspenziji smanjuje učinak permeabilizacije. Naime, pri koncentraciji pekarskog kvasca, $c_K = 20 \text{ g dm}^{-3}$, specifična aktivnost permeabiliziranih stanica jednaka je specifičnoj aktivnosti nepermeabiliziranih stanica kada je koncentracija pekarskog kvasca manja, $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$. Najmanja specifična aktivnost dobivena je pri najvećoj

promatranoj koncentraciji, $c_K = 100 \text{ g dm}^{-3}$, što upućuje ili na neprimjerenost primijenjene metode ili na potrebu dugotrajnijeg tretiranja koncentriranih suspenzija pekarskog kvasca.

Eksperimentalno je pokazano da koncentracija fumarne kiseline u otopini ne utječe na učinkovitost procesa permeabilizacije (Pokusi 5. i 6., Tablica 1.).

Tablica 4.1. Usporedba specifičnih i volumnih aktivnosti enzima fumaraze iz stanica pekarskog kvasca pri različitim početnim koncentracijama fumarne kiseline uz prisustvo permeabiliziranih i nepermeabiliziranih stanica kvasca različitih koncentracija.

Pokus br.	c_K [g dm ⁻³]	permeabilizirane stanice kvasca	c_{F0} [mmol dm ⁻³]	A_V [U cm ⁻³]	A_S [U mg ⁻¹]
1.	100	da	50	$0,3477 \pm 0,0798$	$0,0035 \pm 0,0008$
2.	20	da	50	$0,2455 \pm 0,1113$	$0,0123 \pm 0,0056$
3.	10	da	50	$0,3273 \pm 0,1589$	$0,0327 \pm 0,0159$
4.	10	ne	50	$0,1295 \pm 0,0856$	$0,0130 \pm 0,0086$
5.	5	da	50	$0,2455 \pm 0,1327$	$0,0491 \pm 0,0265$
6.	5	da	25	$0,2727 \pm 0,1155$	$0,0545 \pm 0,0231$

4.2. BIOKONVERZIJA FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU: POKUSI NA TRESILICI

Provedeni su pokusi s različitim koncentracijama otopine fumarne kiseline i različitim koncentracijama suspenzije permeabiliziranog pekarskog kvasca kako bi se ustanovio utjecaj koncentracije fumarne kiseline i koncentracije kvasca na volumnu produktivnost i konverziju te kako bi se procijenili kinetički parametri procesa biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu.

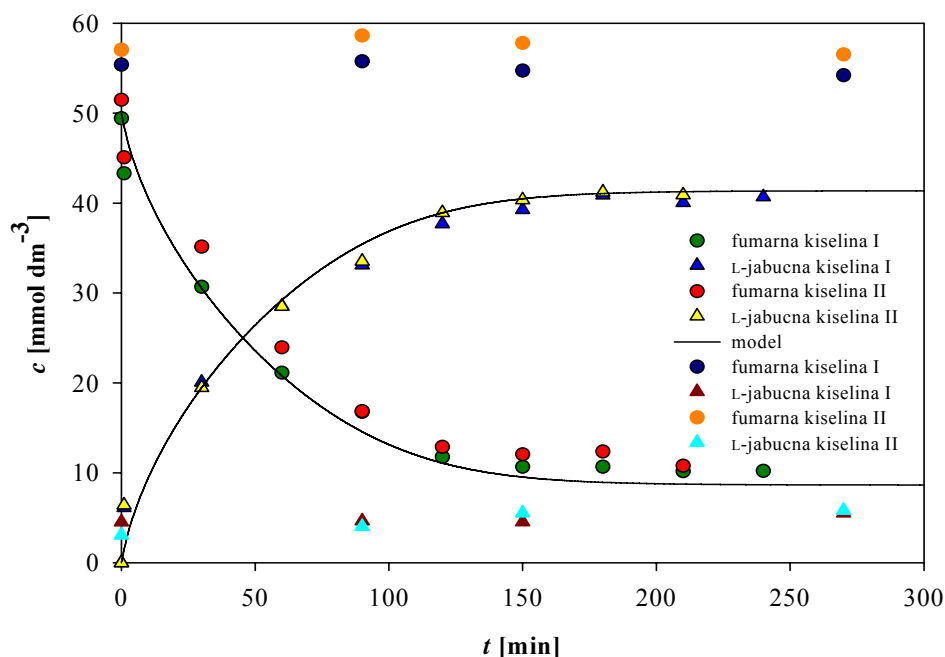
Za iste procesne uvjete pokusi su provedeni dva puta kako bi se utvrdila njihova ponovljivost.

Proveden je i pokus s nepermeabiliziranim kvascom u svrhu utvrđivanja utjecaja procesa permeabilizacije na karakteristike procesa biokonverzije. Na slici 4.1. su prikazani rezultati (promjena koncentracije fumarne i L-jabučne kiseline u ovisnosti o vremenu) šaržnih pokusa s permeabiliziranim i nepermeabiliziranim stanicama kvasca iste koncentracije, $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$, pri početnoj koncentraciji fumarne kiseline, $c_{F0} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Vidljivo su značajno manje ostvarene konverzije i volumne produktivnosti u pokusima s nepermeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca (Tablica 4.2.). Razlog tome je značajno

manja brzina reakcije biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu uzrokovana prvenstveno otporima prijenosu tvari za reaktant i produkt u pokusima s nepermeabiliziranim stanicama.

Pokusi su pokazali da je biokonverzija s nepermeabiliziranim stanicama moguća, ali zbog manje specifične aktivnosti ovih stanica i manje brzine biokonverzije neekonomična.



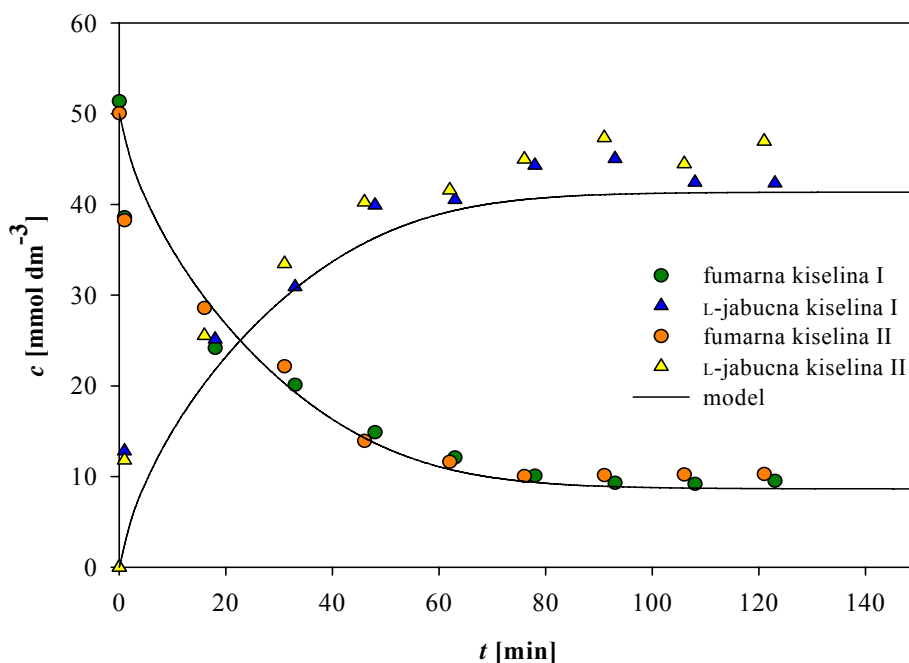
Slika 4.1. Procesi biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu provedeni na tresilici s permeabiliziranim i nepermeabiliziranim stanicama kvasca; $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $c_{F0} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Tablica 4.2. Maksimalne ostvarene konverzije i volumne produktivnosti za šaržne pokuse biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu provedene na tresilici s permeabiliziranim i nepermeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca, $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $c_{F0} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$.

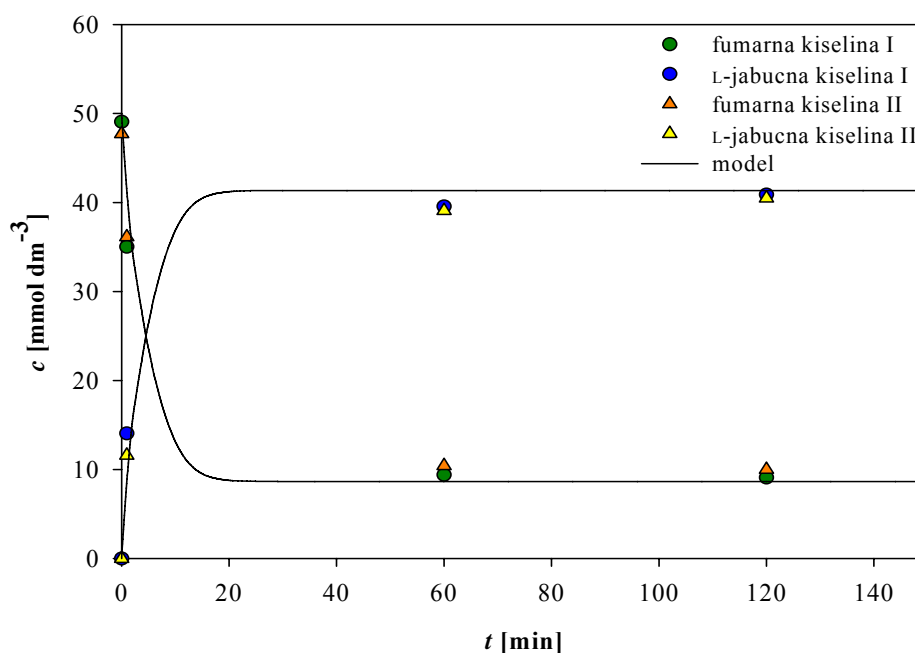
	$X_{\text{maks}} [\%]$	$q_v [\text{ g dm}^{-3} \text{ dan}^{-1}]$
pokusi s permeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca	79,43	39,59
	79,07	37,62
pokusi s nepermeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca	1,19	5,85
	0,90	4,16

Koncentracija suspenzije kvasca utječe na vrijeme potrebno za uspostavu ravnotežnog stanja i ostvarivanje maksimalne konverzije. Kod većih koncentracija suspenzije kvasca ($c_K =$

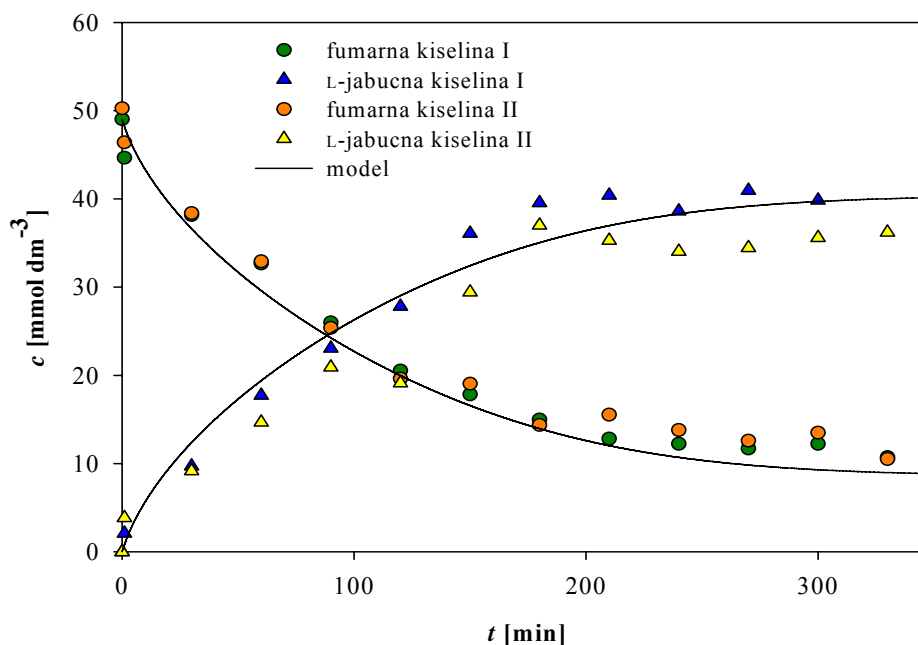
100 g dm⁻³) ovo vrijeme je puno kraće, što se vidi na slici 4.2. Usporedbom rezultata dobivenih provedbom pokusa s koncentracijama kvasca 20 g dm⁻³ i 100 g dm⁻³ (Slike 4.2. i 4.3.) vidljivo je da je vrijeme potrebno za postizanje maksimalne konverzije proporcionalno s koncentracijom kvasca. Uz koncentraciju kvasca i koncentracija fumarne kiseline utječe na vrijeme uspostave ravnoteže i postizanje maksimalne konverzije (Slike 4.4. i 4.5.).



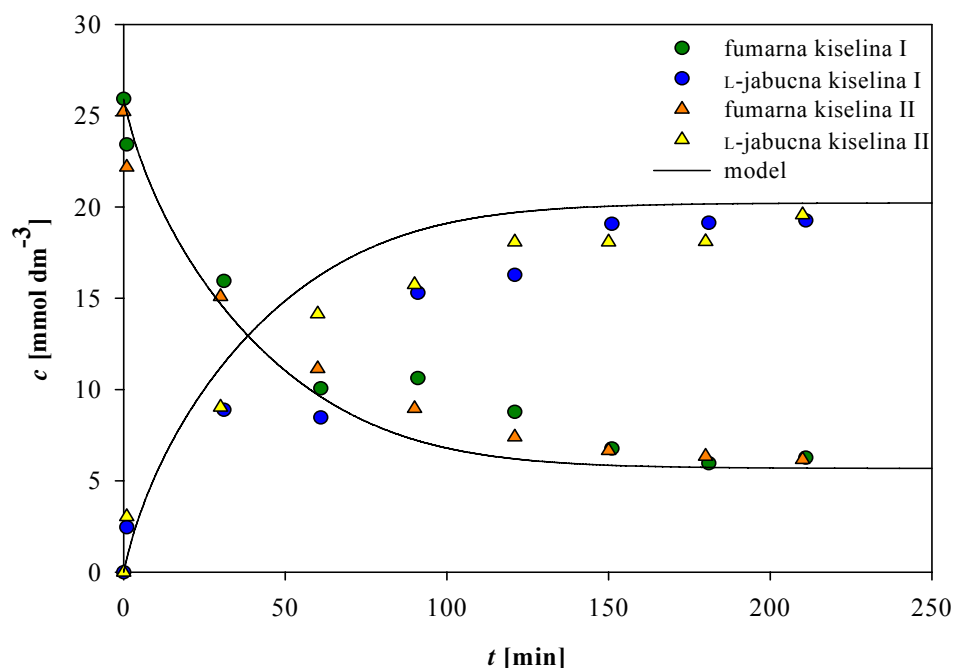
Slika 4.2. Proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu proveden na tresilici s permeabiliziranim stanicama kvasca; $c_K = 20 \text{ g dm}^{-3}$, $c_F = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$.



Slika 4.3. Proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu proveden na tresilici s permeabiliziranim stanicama kvasca; $c_K = 100 \text{ g dm}^{-3}$, $c_F = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$.



Slika 4.4. Proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu proveden na tresilici s permeabiliziranim stanicama kvasca; $c_K = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $c_F = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$.



Slika 4.5. Proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu proveden na tresilici s permeabiliziranim stanicama kvasca; $c_K = 5 \text{ g dm}^{-3}$, $c_F = 25 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Pokazalo se da je maksimalna ostvarena konverzija praktički neovisna o koncentraciji permeabiliziranih stanica pekarskog kvasca i početnoj koncentraciji fumarne kiseline i iznosi oko 80 % (Tablica 4.3.). Koncentracija permeabiliziranih stanica utječe na volumnu produktivnost (računatu na kraju pokusa i u trenutku postizanja maksimalne konverzije). Povećanjem koncentracije permeabiliziranih stanica iznad $c_K = 20 \text{ g dm}^{-3}$ nije postignuto povećanje volumne produktivnosti što je vjerojatno uzrokovano prethodno spomenutim nedovoljnim vremenom tretiranja suspenzije pekarskog kvasca viših koncentracija detergentom u svrhu njegove permeabilizacije.

Još jednom se pokazalo da i konverzija i volumna produktivnost ostvareni u pokusima s nepermeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca ne opravdavaju primjenu ovakvih stanica u procesu biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu (Tablica 4.3.).

Tablica 4.3. Maksimalne ostvarene konverzije i volumne produktivnosti za šaržne pokuse biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu provedene na tresilici (* pokus s nepermeabiliziranim stanicama kvasca).

Pokus br.	c_K [g dm ⁻³]	c_{F0} [mmoldm ⁻³]	X_{maks} [%]	q_v (za X_{maks}) [g dm ⁻³ dan ⁻¹]	q_v (za $t_{konačno}$) [g dm ⁻³ dan ⁻¹]
1.	100	50	81,49	65,77	65,77
			79,05	65,13	65,13
2.	20	50	82,12	75,85	66,48
			79,92	74,94	74,94
3.	10	50	79,43	39,59	32,73
			79,07	37,62	37,62
4.*	10	50	1,19	5,85	3,95
			0,90	4,16	4,16
5.	5	50	76,17	29,29	25,64
			79,10	21,19	21,19
6.	5	25	76,97	20,41	17,63
			75,54	17,99	17,99

Na temelju eksperimentalnih podataka koji su dobiveni kao ovisnost promjene koncentracije fumarne kiseline i L-jabučne kiseline u vremenu provedenim pokusima na tresilici procijenjeni su parametri modela biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu s permeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca. Zbog velike optičke gustoće kvasca i malog ekstinkcijskog koeficijenta ($\epsilon_{290} = 0,11 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$) parametri modela se ne mogu odrediti spektrofotometrijski pokusima u kivetu. U tablici 4.4. su prikazane vrijednosti parametara kinetičkog izraza (Slika 2.1.) procijenjene nelinearnom regresijom.

Pokazalo se da ovakav model može dobro opisati rezultate pokusa biokonverzije fumarne u L-jabučnu kiselinu za široko područje koncentracija permeabiliziranih stanica kvasca. Isto tako model može dobro opisati rezultate pokusa dobivene pri njihovoj provedbi za različite početne koncentracije fumarne kiseline (Slike 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5.).

Tablica 4.4. Procijenjene vrijednosti parametara pretpostavljenog modela biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu.

Parametri	Procijenjene vrijednosti
V_{m1} [U g ⁻¹]	179,960 ± 10,115
K_{m1} [mmol dm ⁻³]	2,320 ± 0,236
V_{m2} [U g ⁻¹]	158,661 ± 10,476
K_{m2} [mmol dm ⁻³]	4,886 ± 0,487
K_i^J [mmol dm ⁻³]	88,031 ± 5,071

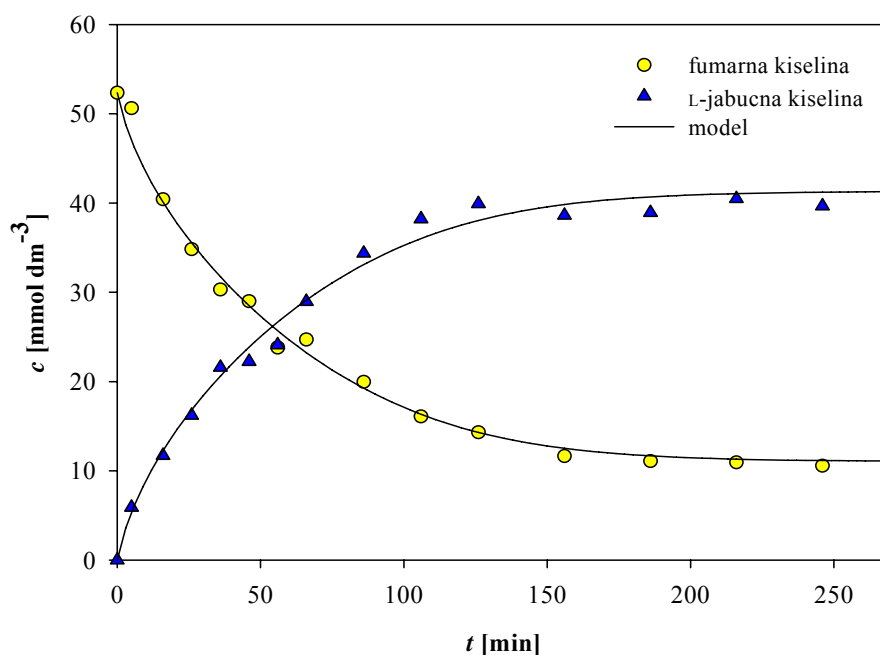
4.3. BIOKONVERZIJA FUMARNE KISELINE U L-JABUČNU KISELINU: POKUSI U LABORATORIJSKOM BIOREAKTORU

Procesi biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru su provedeni kao: šaržni pokus, šaržni pokus s dotokom fumarne kiseline, te kontinuirani pokus s povratnim tokom biomase.

4.3.1. Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru

Biokonverzija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu je provedena u šaržnom laboratorijskom bioreaktoru uz početnu koncentraciju fumarne kiseline $c_{F0} = 52,35$ mmol dm⁻³ u fosfatnom puferu ($c = 0,1$ mol dm⁻³, pH = 7) pri 30 °C. Koncentracija suspenzije permeabiliziranih stanica kvasca je iznosila $c_K = 10$ g dm⁻³. pH nije kontroliran jer produkt L-jabučna kiselina ima istu pKa vrijednost kao i reaktant fumarina kiselina.

Za opis biokonverzije fumarne kiseline je predložen kinetički model uz inhibiciju produktom (L-jabučnom kiselinom). Iz rezultata (Slika 4.6.) je vidljivo dobro slaganje eksperimentalnih podataka s podacima izračunatim pomoću modela. Postignuta je 80 %-tna konverzija fumarne u L-jabučnu kiselinu, a volumna produktivnost je $q_v = 31,14$ g dm⁻³ dan⁻¹.



Slika 4.6. Šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru; $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $c_{F0} = 52,35 \text{ mmol dm}^{-3}$.

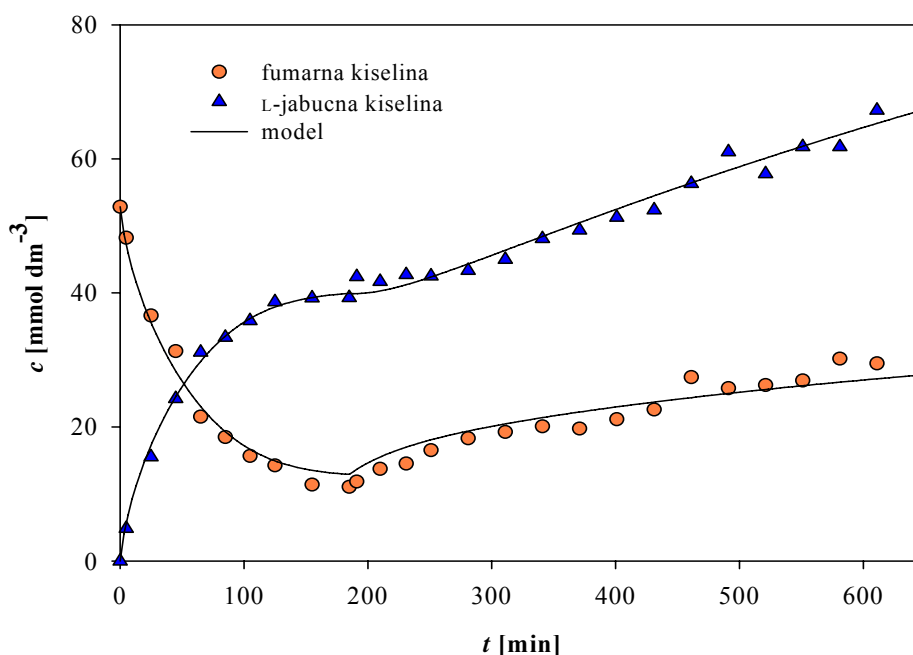
4.3.2. Proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline

U laboratorijskom bioreaktoru je proveden šaržni pokus biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu s dotokom fumarne kiseline u fosfatnom puferu ($c = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$, $\text{pH} = 7$) pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Početna koncentracija fumarne kiseline u puferu je bila $c_{F0} = 52,84 \text{ mmol dm}^{-3}$, a koncentracija suspenzije kvasca $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$.

Nakon tri sata provedbe šaržnog procesa, odnosno kada su postignute ravnotežne koncentracije fumarne kiseline i L-jabučne kiseline, kontinuirano je dodavana otopina fumarne kiseline u fosfatnom puferu koncentracije $c_{\text{dotok}} = 225,6 \text{ mmol dm}^{-3}$. Protok dotoka fumarne kiseline je bio konstantan i iznosio je $q = 42 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$.

Reakcija je provedena 611 min, a izračunata konverzija na kraju pokusa je $X = 68,12 \%$, volumna produktivnost $q_v = 21,25 \text{ g dm}^{-3} \text{ dan}^{-1}$.

Iz dobivenih rezultata praćenja koncentracija fumarne kiseline i L-jabučne kiseline tijekom eksperimenta prikazanih na slici 4.7. vidljivo je dobro slaganje rezultata pokusa sa rezultatima simulacije procesa pomoću prethodno postavljenog modela.



Slika 4.7. Biokonverzija fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru s dotokom fumarne kiseline; $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $c_{F0} = 52,84 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{dotok}} = 225,6 \text{ mmol dm}^{-3}$

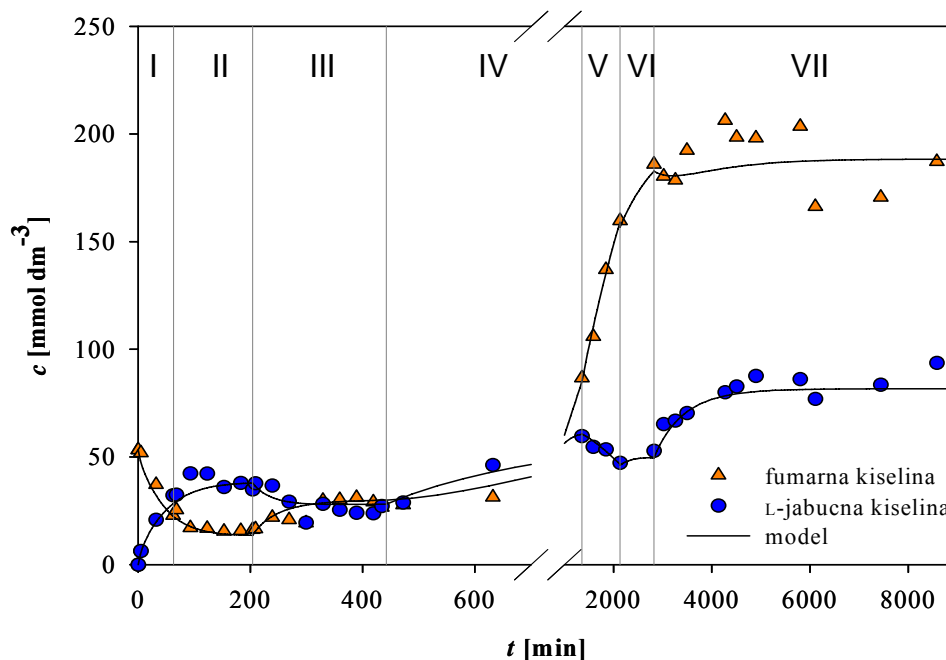
4.3.3. Kontinuirani proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru s povratnim tokom biomase

Kontinuirana reakcija biokonverzije fumarne kiseline je provedena u laboratorijskom bioreaktoru koji radi kao protočno kotlasti reaktor pri početnoj koncentraciji otopine fumarne kiseline $c_{F0} = 53,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ i koncentraciji suspenzije permeabiliziranih stanica kvasca $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$ pri $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

Pokus je proveden pri različitim vrijednostima ulaznih protoka ($q_{ul} = 0,81; 0,85; 1,11; 1,81; 10 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$), a reakcija je praćena sedam dana pri čemu su praćeni promjene koncentracija fumarne i L-jabučne kiseline kao i deaktivacija kvasca.

Eksperimentalni rezultati su opisani pomoću kinetičkog modela koji uključuje brzinu deaktivacije enzima fumaraze iz stanica pekarskog kvasca.

Dobiveni rezultati promjena koncentracija fumarne kiseline i L-jabučne kiseline tijekom eksperimenta su prikazani na slici 4.8.



Slika 4.8. Kontinuirani proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu u laboratorijskom bioreaktoru s povratnim tokom biomase; $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$, $c_{F0} = 53,3 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{F1} = 58,7 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{F2} = 270,0 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Pokus je proveden pri različitim vrijednostima ulaznih protoka, a kako bi se održavao konstantan volumen reakcijske smjese u reaktoru izlazni protok je bio jednak vrijednostima ulaznog protoka. U IV i V periodu zbog problema oko održavanja konstantnog protoka, povezanog s neadekvatnom regulacijom protoka, ulazni protok nije bio jednak izlaznom. Za svaku vrijednost protoka izračunato je vrijeme zadržavanja, čije su vrijednosti prikazane u tablici 4.5.

U kontinuiranom procesu dolazi do smanjenja brzine reakcije zbog smanjenja aktivnosti enzima fumaraze u stanicama kvasca uzrokovanog njegovom vremenskom deaktivacijom. U VI i VII periodu nije uočena pojava deaktivacije što se objašnjava postojanjem minimalne koncentracije enzima u permeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca koja nije podložna daljnjoj deaktivaciji.

Tablica 4.5. Izračunate vrijednosti vremena zadržavanja i konstante deaktivacije za različite periode provedbe procesa kontinuirane biokonverzije (* početna koncentracija fumarne kiseline).

Period	t [min]	c_F [mmol dm ⁻³]	τ [min]	q_{ul} [cm ³ min ⁻¹]	q_{iz} [cm ³ min ⁻¹]	k_d [min ⁻¹]
I	0-63	53,3*	-	-	-	0
II	63-204	58,7	1350	0,81	0,81	0
III	204-442	58,7	100	10	10	0
IV	442-1358	270,0	2251	0,81	0,55	0,0015
V	1358-2132	270,0	1178	0,85	0,85	0,0015
VI	2132-2824	270,0	434	1,81	2,00	0
VII	2824-8580	270,0	900	1,11	1,11	0

Iz rezultata u tablici 4.6. vidljivo je da pri jednakim koncentracijama kvasca, 10 g dm⁻³, u svim pokusima, u kontinuiranom procesu je volumna produktivnost najveća, što čini protočno kotlasti reaktor optimalnom konfiguracijom za promatrani proces biokonverzije fumarne kiseline. Do opadanja volumne produktivnosti pri kontinuiranom procesu dolazi zbog vremenske deaktivacije enzima fumaraze u stanicama pekarskog kvasca, te s tim povezane manje brzine reakcije.

Tablica 4.6. Izračunate vrijednosti konverzije i volumne produktivnosti za šaržni pokus na tresilici i za pokuse u laboratorijskom bioreaktoru pri $c_K = 10$ g dm⁻³.

Tip pokusa	t [min]	X [%]	q_v [g dm ⁻³ dan ⁻¹]
šaržni pokus na tresilici	210	79,43	39,59
	210	79,07	37,62
šaržni pokus u bioreaktoru	246	79,84	31,14
šaržni pokus s dotokom fumarne kiseline	611	68,12	21,25
kontinuirani pokus s povratnim tokom biomase	209	71,74	72,97
	434	54,66	52,57
	8580	27,97	21,12

5. ZAKLJUČAK

Na temelju eksperimentalnih podataka koji su dobiveni kao ovisnost promjene koncentracija fumarne kiseline i L-jabučne kiseline u vremenu u pokusima provedenim na tresilici procijenjeni su parametri Michaelis-Mentenovog kinetičkog izraza: $V_{m1} = 179,960 \pm 10,115 \text{ U g}^{-1}$, $K_{m1} = 2,320 \pm 0,236 \text{ mmol dm}^{-3}$, $V_{m2} = 158,661 \pm 10,476 \text{ U g}^{-1}$, $K_{m2} = 4,886 \pm 0,487 \text{ mmol dm}^{-3}$, $K_i^J = 88,031 \pm 5,071 \text{ mmol dm}^{-3}$.

Iz rezultata dobivenih određivanjem aktivnosti enzima fumaraze u stanicama pekarskog kvasca vidljivo je da za istu koncentraciju kvasca ($c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$) permeabilizirane stanice kvasaca imaju tri puta veću aktivnost od nepermeabiliziranih stanica ($A_{\text{Spermeab.}} = 0,0327 \pm 0,0159 \text{ U mg}^{-1}$; $A_{\text{Snepermeab.}} = 0,0130 \pm 0,0086 \text{ U mg}^{-1}$) što upućuje na potrebu permeabilizacije pekarskog kvasca prije provedbe procesa biokonverzije fumarne kiseline. Značajno manje ostvarene konverzije ($X_{\text{maks}} = 0,90; 1,19 \%$) i volumne produktivnosti ($q_v = 4,16; 5,85 \text{ g dm}^{-3} \text{ dan}^{-1}$) u pokusima s nepermeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca pokazuju da je biokonverzija s nepermeabiliziranim stanicama moguća, ali zbog manje specifične aktivnosti ovih stanica i manje brzine biokonverzije neekonomična.

Zbog ustanovljene inhibicije produktom osim pokusa na tresilici i u šaržnom bioreaktoru proveden je i kontinuirani pokus s povratnim tokom biomase u protočno kotlastom bioreaktoru. Iz rezultata je vidljivo da pri jednakim koncentracijama kvasca, $c_K = 10 \text{ g dm}^{-3}$, u svim pokusima, u kontinuiranom procesu je volumna produktivnost najveća, što čini protočno kotlasti reaktor optimalnom konfiguracijom za promatrani proces biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu.

Provedbom pokusa u protočno kotlastom bioreaktoru pokazalo se da duljom uporabom enzimi u stanicama pekarskog kvasca gube na aktivnosti, te dolazi do deaktivacije enzima $k_d = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ te zbog toga i do opadanja volumne produktivnosti tijekom provedbe procesa ($q_v = 72,97; 52,57; 21,12 \text{ g dm}^{-3} \text{ dan}^{-1}$).

Rezultati simulacija procesa biokonverzije fumarne kiseline u L-jabučnu kiselinu pomoću pretpostavljenog matematičkog modela dobro opisuju eksperimentalne podatke.

6. LITERATURA

1. **Findrik, Z.:** Biokatalitička oksidacija L-DOPE, magistarski rad, Zagreb, 2004.
2. **Vrsalović Presečki, A.:** Studij proces pridobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca, magistarski rad, Zagreb, 2003.
3. **Giorno, L.; Drioli, E.:** Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives, *Trends in Biotechnol.*, **18** (2000) 339.
4. **Schmid, A.; Hollmann, F.; Byung Park, J.; Bühler, B.:** The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13** (2002) 359.
5. **Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A.:** Microbiology, *McGraw-Hill*, 2000, str. 161, 554, 1006.
6. **Wang, X.; Gong, C.S.; Tsao, G.T.:** L-malic acid production from fumaric acid by a laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strain SHY2, *Bio. Letters*, **18** (1996) 1441, 1442.
7. **Marconi, W.; Faiola, F.; Piozzi, A.:** Catalytic activity of immobilized fumarase, *Journal of Molecular Catalysis*, **15** (2001) 93.
8. **Rosenberg, M.; Mikova, H.; Krištofikova, L.:** Formation of L-malic acid by yeasts of the genus *Dipodascus*, *Letters in Applied Microbiology*, **29** (1999.) 221.
9. **Oliveira, E.A.; Costa, A.A.R.; Figueiredo, Z.M.B.; Carvalho, L.B.:** L-Malic Acid Production by Entrapped *Saccharomyces cerevisiae* into Polyacrylamide Gel Beads, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **47** (1994) 65,66.
10. **Duraković, S.:** Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996, str. 231,232.
11. **Ratledge, C.:** Yeast Physiology – a Micro-Synopsis, *Bioprocess Eng.*, **6** (1991) 195-203.
12. **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.
13. **Sonnleitner, B.:** Dynamics of Yeast Metabolism and Regulation, *Bioprocess. Eng.*, **6** (1991) 187-193.
14. **Sekhar, S.; Bhat, N.; Bhat, S.G.:** Preparation of detergent permeabilized Bakers' yeast whole cell catalase, *Process Biochemistry*, **34** (1999) 349,350.
15. **Bhat, N.; Naina, N.S.; Gowda, L.R.; Bhat S.G.:** Detergent permeabilized yeast cells as the source of intracellular enzymes for estimation of biomolecules, *Enzyme Microb. Technol.*, **15** (1993) 796-798.

16. **Cooper, G.M.:** The Cell: A Molecular Approach, ASM Press, Sinauer Assoc, 2000, str. 56.
17. **Vasić-Rački, Đ.:** Biokemijsko inženjerstvo, *Kem. Ind.*, **39** (1990) 459-467
18. **Vasić-Rački, Đ.; Wandrey C.:** Ultrafiltracija i biokatalizatori, Zbornik: Seperacijski procesi v heterogenih sistemih, Maribor, 1992, 82-93
19. **Vasić-Rački, Đ.:** Osnovne značajke heterogenih biokatalizatora, *Kem. Ind.*, **35** (11) (1986) 603.
20. **Cao, L.; Langen, L.; Sheldon, R.:** Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14** (2003) 387.
21. **Belafi-Bako, K.; Nemestothy, N.; Gubicza, L.:** A study of applications of membrane techniques in bioconversion of fumaric acid to L-malic acid, *Desalination*, **162** (2004) 301-303.
22. **Figueiredo, Z.M.B.; Carvalho, L.B.:** L-Malic Acid Production Using Immobilized *Saccharomyces cerevisie*, *Applied Biochemistry and biotechnology*, **30** (1990) 217,218.
23. **Giorno, L.; Drioli, E.; Carvoli, G.;Cassano, A.; Donato, L.:** Study of an Enzyme Membrane Reactor with Immobilized Fumarase for Production of L-Malic Acid, *Biotechnology and Bioengineering*, **72** (2001) 77, 78.
24. **Vasić-Rački, Đ.; Kragl, U.; Liese, A.:** Benefits of Enzyme Kinetics Modelling, *Chem. Biochem. Eng.*, **17** (2003) 7.
25. **Gomzi, Z.:** Kemijski reaktori, *HINUS*, Zagreb, 1998, str. 36-55.
26. **Zelić, B.:** Study of the Process Development for *Eschericia coli* Based Pyruvate Production, doktorska diz., Zagreb, 2003.
27. Biochemica information II, Boehringer Mannheim, GmbH, Germany,1973, pp.45.
28. SCIENTIST handbook, Micromath[®], Salt Lake City, 1986-1995.

7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

7.1. Simboli

A	površina, m^2
A_S	specifična aktivnost, $U\ mg^{-1}$
A_V	volumna aktivnost, $U\ cm^{-3}$;
c	koncentracija, $mmol\ dm^{-3}$ ili $g\ dm^{-3}$
d	promjer kivete, cm
E_0	početna koncentracija enzima, $mmol\ dm^{-3}$
k_d	konstanta deaktivacije enzima, min^{-1}
k_3	katalitička konstanta enzima, min^{-1}
K_i	konstanta inhibicije, $mol\ dm^{-3}$
K_m^S	Michaelis-Menten-ova konstanta, $mmol\ dm^{-3}$
$m_{m.b.}$	masa mokre biomase, g
n	broj okretaja, min^{-1}
q	protok, $cm^3\ min^{-1}$
q_v	volumna produktivnost, $g\ dm^{-3}\ dan^{-1}$
r	brzina reakcije, $mmol\ dm^{-3}\ min^{-1}$
t	vrijeme, min
T	temperatura, $^{\circ}C$
V	volumen, dm^3
V_m	maksimalna brzina reakcije, $mmol\ dm^{-3}\ min^{-1}$
X	konverzija, -

7.1.1. Grčki simboli

ϵ_{290}	ekstinkcijski koeficijent fumarne kiseline pri 290 nm, $cm^2\ \mu mol^{-1}$ ($\epsilon_{290} = 0,11\ cm^2\ \mu mol^{-1}$)
λ	valna duljina, nm
τ	vrijeme zadržavanja, min

7.2. Skraćenice

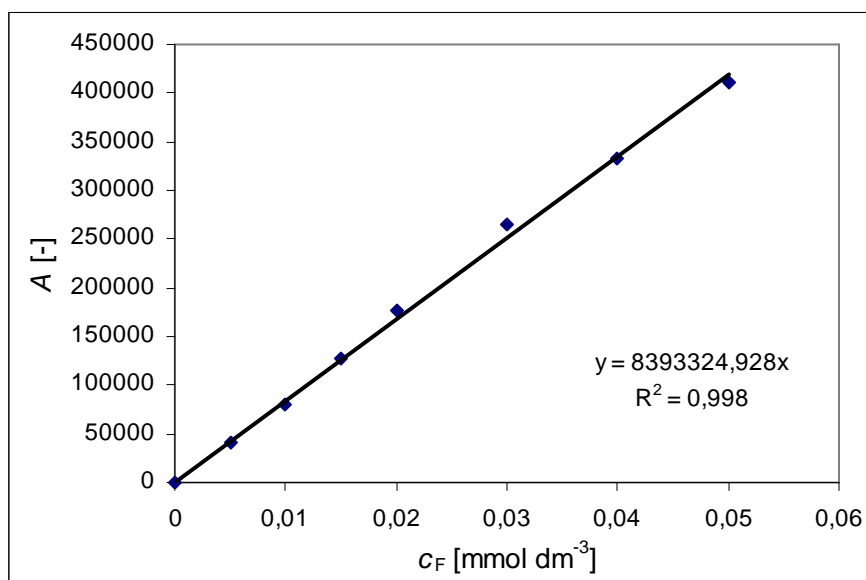
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
CTAB	heksadeciltrimetil-amonijev bromid
F	fumarna kiselina
J	L-jabučna kiselina
K	kvasac
P	produkt
S	supstrat
0	početni uvjeti

8. PRILOZI

PRILOG 1.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije fumarne kiseline.

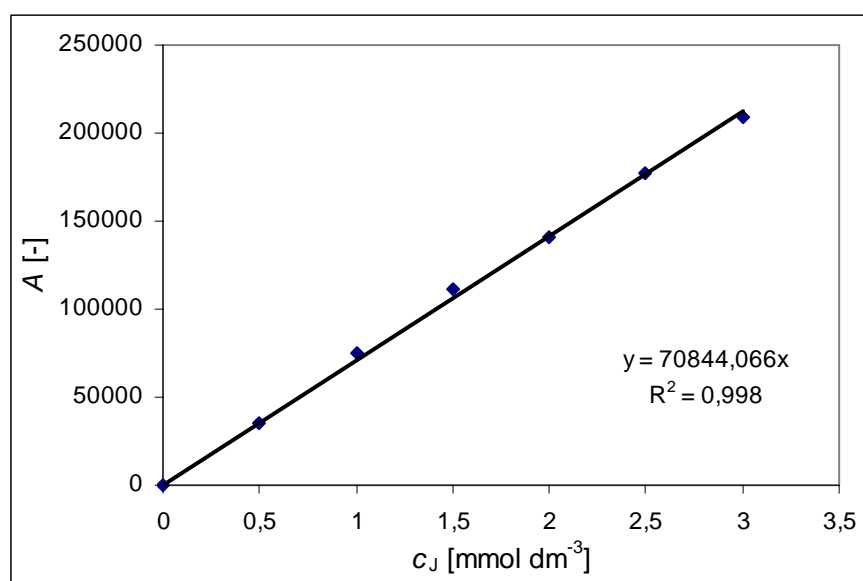
PRILOG 2.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije L-jabučne kiseline.

PRILOG 1.



Slika 8.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije fumarne kiseline.

PRILOG 2.



Slika 8.2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije L-jabučne kiseline.

ŽIVOTOPIS

Ivana Roksa je rođena 23. listopada 1981. u Sisku. Završila je Opću gimnaziju u Petrinji 2000. godine s odličnim uspjehom. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu je upisala 2000. godine. Dobitnica je Rektorove nagrade 2004./2005. za najbolji studentski rad. Tijekom studija je primala Državnu stipendiju koju dodjeljuje Ministarstvo znanosti i tehnologije za studente koji pripadaju među 10 % najboljih studenata, te na posljednjoj godini studija dobiva Stipendiju Sveučilišta u Zagrebu. Sudjelovala je sa znanstvenim radom na Prvom susretu studenata i nastavnika na temu: "Primjenjena biokataliza" u Mariboru, na 2. Hrvatsko–Njemačkoj Konferenciji "Enzyme Reaction Engineering" u Cavtatu, te na IX. Hrvatskoj tehnologijadi s međunarodnim sudjelovanjem u Zatonu. Koautor je rada na XIX. hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera održanom u Opatiji 2005. godine. Sudjelovala je u projektu VIII. Hrvatska tehnologijada s međunarodnim sudjelovanjem, održanom u Rovinju 2004., kao predsjednik Organizacijskog odbora. Tijekom studija bila je zamjenik predsjednika Podružnice studentskog zbora Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, te višegodišnji predstavnik studenata u Fakultetskom Vijeću. Tijekom studiranja je bila demonstrator na mnogim kolegijima na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu i na Zavodu za toplinsko i procesno inženjerstvo. 2005. godine završava Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.