

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tatjana Kovačević

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj, 2008.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tatjana Kovačević

BIOKATALITIČKA RAZGRADNJA LIGNOCELULOZE

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: dr.sc. Bruno Zelić, izv. prof.
Članovi ispitne komisije:

Zagreb, srpanj, 2008.

SAŽETAK

Istraživanja enzimske modifikacije lignina su brojna [Bourbonnais, R., 1995., Varniaté, R., 2002., Crestini, C., 1998., Srebotnik, E., 2000., Farrel, R.K., 1987., Tsujiyama, S., 2005.]. Poznati proizvođači ligninolitičkih enzima su gljive bijelog truljenja, a lakaze su vrlo važni enzimi u procesu delignifikacije [Tsujiyama, S., 2005.]. U svrhu boljeg razumijevanja enzimske modifikacije lignina, u ovom radu je ispitivana oksidacija koniferilnog alkohola katalizirana lakazom porijeklom iz *Trametes versicolor* u vodenom mediju. Koniferilni alkohol, zajedno sa *p*-kumarilnim i sinapilnim alkoholom, čini glavnu podjedinicu lignina. Eksperimentalno su određeni optimalni pH = 6,6 i temperatura 35 °C za provedbu oksidacije koniferilnog alkohola lakazom. Na osnovi rezultata pokusa ovisnosti specifične enzimske aktivnosti o koncentraciji supstrata, procijenjeni su kinetički parametri Michaelis-Menteničinog izraza $V_{max} = 4,3872 \text{ U mg}^{-1}$ i $K_m = 0,0254 \text{ mmol dm}^{-3}$. Oksidacija koniferilnog alkohola lakazom je provedena u kotlastom reaktoru, a provedena ocjena valjanosti matematičkog modela procesa ukazala je na neprikladnost metode početnih brzina u kinetičkoj karakterizaciji enzima lakaze. Zbog toga je razvijen matematički model procesa koji uključuje dvosupstratni (koniferilni alkohol i kisik) Michaelis-Menteničin kinetički model i bilancu tvari za koniferilni alkohol. Iz rezultata pokusa u kotlastom reaktoru procijenjeni su parametri modele te je provedena ocjena valjanosti ovako razvijenog matematičkog modela procesa. Pokazalo se da rezultati simulacije modificiranog modela procesa dobro opisuju eksperimentalne rezultate pokusa provednog u kotlastom reaktoru.

Ključne riječi: koniferilni alkohol, lakaza, oksidacija, Michaelis-Menteničin kinetički model

SUMMARY

Numerous researches have been done in the field of enzymatic lignin modification [Bourbonnais, R., 1995., Varniaté, R., 2002., Crestini, C., 1998., Srebotnik, E., 2000., Farrel, R.K., 1987., Tsujiyama, S., 2005.]. White – rot fungi are well known producers of ligninolytic enzymes. One of the most important enzymes in the field of delignification is laccase. [Tsujiyama, S., 2005.]. . In order to understand enzymatic lignin modification better, oxidation of coniferyl alcohol catalyzed by laccase originating from *Trametes versicolor* has been performed in the aqueous media. Together with *p*-coumaryl and sinnapyl alcohol, coniferyl alcohol creates the main subunits of lignin. Optimal oxidation conditions (pH = 6,6 , T = 35 °C) have been determined experimentally. According to the dependence of specific enzyme activity of substrate concentrations, kinetic parameters of Michaelis-Menten's term $V_{max} = 4,3872 \text{ U mg}^{-1}$ i $K_m = 0,0254 \text{ mmol dm}^{-3}$, have been estimated. The oxidation of coniferyl alcohol catalyzed by laccase was performed in a batch reactor and the performed evaluation of the mathematic model validity of the process has shown impropriety of the method of initial speed in kinetic characterisation of the laccase enzyme. That is why a mathematical model of the process comprised of double substrate Michaelis-Menten kinetics and mass balance for coniferyl alcohol has been developed. The model fits experimental data well.

Key words: coniferyl alcohol, laccase, oxidation, Michaelis-Menten kinetics

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Enzimi	2
2.1.1. Lakaza	3
2.2. Lignin	3
2.3. Kinetika enzimske reakcije	5
2.4. Kotlasti reaktor	7
2.5. Matematički model procesa oksidacije koniferilnog alkohola lakazom	8
3.1. MATERIJALI	9
3.1.1. Kemikalije	9
3.1.2. Priprema otopina	9
3.2. APARATURA	10
3.2.1. Spektrofotometar	10
3.2.2. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)	10
3.2.3. Kotlasti reaktor	11
3.3. ANALITIČKE METODE	12
3.3.1. Određivanje koncentracije koniferilnog alkohola	12
3.3.2. Određivanje kinetike reakcije metodom početnih brzina	12
3.4. PROVEDBA MJERENJA	13
3.4.1. Ispitivanje ovisnosti enzimske aktivnosti u reakciji oksidacije koniferilnog alkohola o pH vrijednosti i temperaturi	13

3.4.2. Istraživanje kinetike enzimske oksidacije koniferilnog alkohola metodom početnih brzina	13
3.4.3. Provedba pokusa enzimske oksidacije koniferilnog alkohola u kotlastom reaktoru	14
3.4.4. Provedba pokusa oksidacije koniferilnog alkohola u kotlastom reaktoru bez dodatka enzima	14
4. REZULTATI I RASPRAVA	15
4.1. Istraživanje ovisnosti enzimske aktivnosti o pH i temperaturi	15
4.2. Istraživanje kinetike enzimske oksidacije koniferilnog alkohola metodom početnih brzina	16
4.3. Rezultati enzimske oksidacije koniferilnog alkohola u kotlastom reaktoru.....	18
5. ZAKLJUČCI	21
6. LITERATURA.....	22
7. POPIS SIMBOLA	24
7.1. Simboli.....	24
7.1.1. Grčki simboli.....	24
8. PRILOG	26
ŽIVOTOPIS	

1. UVOD

Za razliku od reakcija kataliziranih kemijskim katalizatorima, enzimski katalizirane reakcije se mogu provoditi u vodenim otopinama, pri sobnim temperaturama i neutralnom pH, bez uporabe visokih tlakova i ekstremnih uvjeta, uz minimalni utrošak energije [Vasić-Rački, Đ., 2006]. Zahvaljujući velikom spektru reakcija koje kataliziraju, relativno čistoj tehnologiji, te kiralnoj i stereospecifičnoj selektivnosti, enzimi imaju veliku primjenu u industriji.

Lakaze (EC 1.10.3.2) su enzimi koji kataliziraju oksidaciju različitih organskih spojeva kao što su metoksifenoli, fenoli, *o*- i *p*- difenoli, aminofenoli, polifenoli, poliamini, te molekule slične ligninu [Claus, H., 2004; Mayer A.M, 2002; Riva, S., 2006; Burton, S.G., 2003]. Lakaze su do sada izolirane iz raznih izvora: viših biljaka, gljiva, prokariota i insekata [Claus, H., 2004], a najviše su proučavane lakaze izolirane iz gljiva. Vrlo su dobri biokatalizatori zbog toga što kao kofaktor koriste kisik, posjeduju vrlo velike reakcijske brzine i široku specifičnost prema supstratima [Kurniawati, S., 2006].

Lakaze u prirodi sudjeluju u procesima polimerizacije supstrata koji dovode do nastanka lignina, ali i procesima depolimerizacije lignina [Kobayashi, S., 2003]. Lignin je trodimenzionalni aromatski polimer [Coll, P.M., 1993, Bahri, H. 2006, Xia, Z. et al, 2003].

U svrhu boljeg razumijevanja enzimske modifikacije lignina, u ovom radu je ispitivana oksidacija koniferilnog alkohola katalizirana lakazom u vodenom mediju. Koniferilni alkohol, zajedno sa *p*-kumarilnim i sinapilnim alkoholom, čini glavnu podjedinicu lignina.

Cilj ovog rada je bio ispitati aktivnost lakaze porijeklom iz *Trametes versicolor* na koniferilnom alkoholu, te provesti reakciju oksidacije koniferilnog alkohola uz lakazu u kotlastom reaktoru.

2. OPĆI DIO

2.1. Enzimi

Enzimi su katalizatori biološkog porijekla, koloidne prirode. Po kemijskoj strukturi su jednostavni ili složeni proteini (polipeptidi), koji omogućuju tok i odigravanje biokemijskih procesa u organizmu kao što su primjerice disanje, pretvorba i prenošenje energije između živih sustava, te sinteza različitih makromolekula i staničnih komponenata. Poznato je i opisano oko 2000 različitih enzima [Bailey, J. E., 1977.].

Enzimski katalizirane reakcije se ponašaju prema istim zakonima termodinamike i kinetike kao i kemijske reakcije. Kao i kemijski katalizatori, enzimi funkcioniraju na način da snižavaju energiju aktivacije pojedine reakcije, te je na taj način ubrzavaju i do nekoliko milijuna puta. Enzimi, za razliku od kemijskih katalizatora, zahvaljujući svom obliku, strukturi, gustoći, hidrofilnim i hidrofobnim svojstvima, pokazuju specifičnost u pogledu stereokemije [<http://hr.wikipedia.org/wiki/Enzim>]. Budući da se radi o prirodnim molekulama, ta specifičnost je rezultat evolucije [Bailey, J. E., 1977.].

Katalitičko djelovanje enzima zasniva se na privremenom povezivanju (stvaranju kompleksa) sa supstratom. Kompleks enzim-supstrat povezan je obično van der Waalsovima, elektrostatskim ili vodikovim vezama, a rijetko jačim kovalentnim vezama, što omogućava lagano razdvajanje po završetku reakcije. Područje na kojem dolazi do izravnog spoja enzima i molekule se naziva aktivno mjesto. Veći broj enzima ima i dodatna područja za kofaktore koji su potrebni pri kataliziranju reakcije. Kontakti između molekula na koje djeluju i postojećih kofaktora po potrebi smanjuju ili povećavaju aktivnost enzima. Specifičnost vezanja enzim-supstrat opisuje se mehanizmom ključa i brave, obzirom da je svaki ključ specifičan za bravu koju otključava. Svaka molekula na koju određeni enzim utječe, ima točno određeni oblik, pomoću kojeg se pak molekula veže na točno određeni enzim [Bailey, J. E., 1977.].

Na aktivnost enzima mogu utjecati različite molekule. Inhibitori, koji mogu biti prirodni ili umjetni, su molekule koje umanjuju aktivnost enzima ili ga potpuno inaktiviraju. Aktivatori su molekule koje povećavaju aktivnost enzima. Inhibitori samoubojice su inhibitori koji se sami ugrade u enzim i zauvijek ga deaktiviraju. Mnogi lijekovi su ustvari inhibitori enzima [<http://hr.wikipedia.org/wiki/Enzim>].

Nazivi enzima se obično tvore tako da se korijenu naziva koji govori o njegovom djelovanju dodaje nastavak -aza. Enzimi se mogu podijeliti u šest osnovnih skupina: (1) oksidoreduktaze koje kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije; (2) transferaze koje kataliziraju reakcije koje uključuju premještanje grupa atoma između molekula; (3) hidrolaze koje kataliziraju reakcije hidrolize molekula; (4) liaze koje kataliziraju reakcije uklanjanja grupa s ciljem formiranja dvostrukih veza ili reakcije adicije grupa na dvostruku vezu; (5) izomeraze koje kataliziraju reakcije izomerizacije; (6) ligaze koje kataliziraju formiranje veze između dvaju molekula upotrebom energije adenzin-trifosfata (ATP-a) [Bailey, J.E., 1977.]

Enzimi se mogu koristiti: suspendirani u otopini ili imobilizirani u ili na membrani kao nosiocu [Drmač M, 2004.].

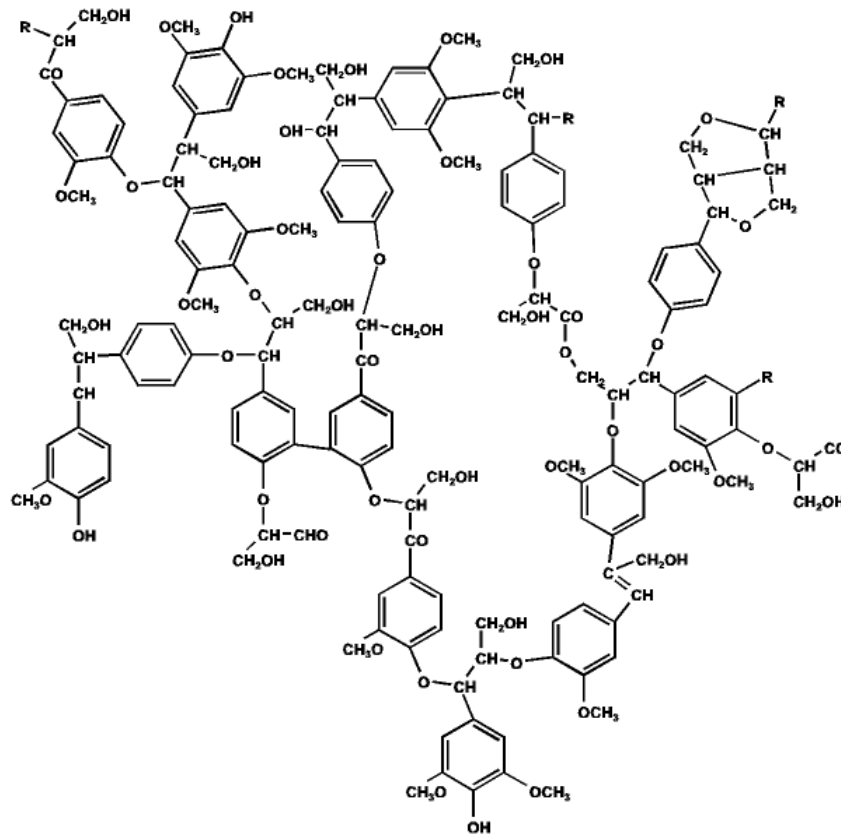
2.1.1. Lakaza

Lakaze su enzimi koji pripadaju skupini oksidoreduktaza. Obzirom da na aktivnom mjestu sadrže atome bakra, pripadaju skupini metaloenzima. Također, oni su glikoproteini pri čemu ugljikohidratni dio doprinosi stabilnosti enzima. Mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: lakaze porijeklom iz viših biljaka i lakaze porijeklom iz gljiva (znatno zastupljenija i raširenija skupina). Za razliku od većine enzima, lakaze ne posjeduju svojstvo specifičnosti prema točno određenom supstratu te svojstvo stereospecifičnosti, već one djeluju na velik broj različitih supstrata. Poznato je da lakaze sudjeluju u morfogenezi organizma domaćina, u procesu nastajanja melanina, procesu sklerotizacije kod kukaca, zaštiti biljaka protiv kukaca i mikroorganizama, oksidaciji voća i povrća. Lakaze kataliziraju biorazgradnju lignina gdje uglavnom oksidiraju fenolne podjedinice lignina koje čine 10-15% lignina, ali sudjeluju i u biosintezi lignina [Tišma M., 2008.].

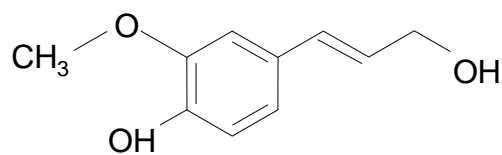
2.2. Lignin

Naziv lignin je prvi put upotrijebio 1819. De Candolle, a izveden je prema latinskom izrazu *lignum* što znači šuma [http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin]. Lignin (Slika 2.1.) je trodimenzionalni, netopljivi aromatski polimer [D'Acunzo F., 2002]. Sastoji se od fenilpropanskih podjedinica koniferilnog (Slika 2.2.), kumarilnog i sinapilnog alkohola. Uz

celulozu i hemicelulozu, sastavni je dio lignoceluloznog materijala koji se nalazi u drvenim dijelovima biljaka i travi [Howard R. L., 2003].



Slika 2.1. Strukturna formula lignina



Slika 2.2. Strukturna formula koniferilnog alkohola

U prirodi postoje gljive bijelog truljenja koje ekstracelularno izlučuju različite oksidaze: lignin-peroksidaze, mangan-peroksidaze i lakaze. Ovi enzimi sudjeluju u procesima delignifikacije [D'Acunzo F., 2002].

2.3. Kinetika enzimske reakcije

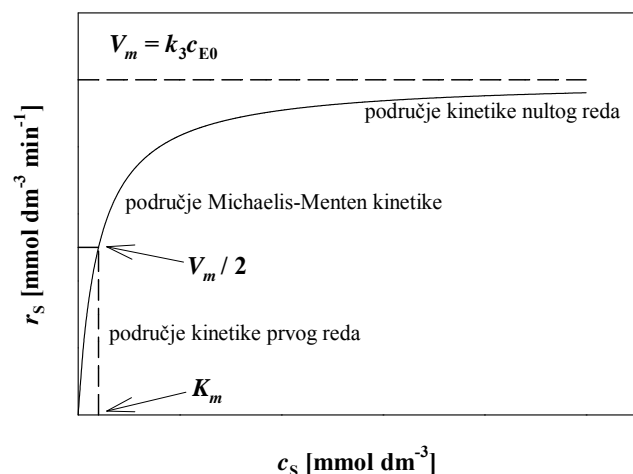
Kinetički model neke kemijske reakcije je matematički izraz koji izražava vezu između brzina kemijske reakcije i reakcijskih veličina stanja i parametara, a određuje se na osnovi eksperimentalnih kinetičkih istraživanja. Enzimski kinetički model se razvija kroz slijedeće korake: eksperimentalno određivanje početne brzine kemijske reakcije pri različitim koncentracijama supstrata, matematička obrada dobivenih rezultata ili formuliranje izraza za brzinu reakcije, procjenjivanje parametara, matematičko formuliranje ukupne brzine reakcije, eksperimentalno potvrđivanje razvijenog modela, kombiniranje sa konfiguracijom reaktora kako bi se pronašla veza između brzine reakcije i koncentracije reaktanata, i napokon izračunavanje i predviđanje parametara na temelju razvijenog modela procesa.

Najjednostavniji kinetički model koji opisuje ovisnost brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata može se opisati Michaelis – Menteničnim izrazom [Bailey, J. E., 1977.]:

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

gdje r_s predstavlja brzinu reakcije ($\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$), c_s koncentraciju supstrata (mmol dm^{-3}), V_m maksimalnu brzinu reakcije ($\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$), a K_m^s Michaelis-Menteničinu konstantu (mmol dm^{-3}) koja je jednaka koncentraciji supstrata pri kojoj je reakcijska brzina jednaka polovici maksimalne brzine reakcije.

Dijagram ovisnosti brzine enzimske katalizirane reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis-Menteničinu kinetiku dan je hiperbolnom krivuljom (Slika 2.3.).



Slika 2.3. Ovisnost reakcijske brzine o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menteničine kinetike.

Michaelis-Menteničina jednadžba pokazuje tri različita područja brzine reakcije (Slika 2.3). Za vrlo niske i vrlo visoke koncentracije reakcijska brzina r_s linerano je ovisna o koncentraciji supstrata c_s . Područje niskih koncentracija supstrata ($c_s \ll K_m^S$) se stoga može aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda, a područje visokih koncentracija supstrata ($c_s \gg K_m^S$) se može aproksimirati kinetikom reakcije nultog reda.

Kod reakcija u kojima sudjeluju dva supstrata dolazi do vezanja oba supstrata za enzim pri čemu se oni mogu vezati nasumično ili određenim redoslijedom (mehanizmom tercijarnog kompleksa). Za dvosupstratne reakcije kod kojih dolazi do nasumičnog vezanja supstrata za enzim vrijedi slijedeći kinetički model:

$$r_s = V_m \cdot \frac{c_{S_1} \cdot c_{S_2}}{(K_m^{S_1} + c_{S_1}) \cdot (K_m^{S_2} + c_{S_2})} \quad (2.2.)$$

gdje c_{S_1} i c_{S_2} predstavljaju koncentracije supstrata, a $K_m^{S_1}$ i $K_m^{S_2}$ Michaelis-Menteničine konstante za pojedine supstrate pri čemu vrijedi da je $K_m^{S_1}$ neovisna o c_{S_2} , odnosno da je $K_m^{S_2}$ neovisna o c_{S_1} .

2.4. Kotlasti reaktor

Kotlasti reaktor je konstruktivno izveden najčešće u obliku zatvorenog kotla, opremljenog miješalicom, sa otvorima kroz koje se reakcijska smjesa unosi, odnosno odvodi, plaštem (ili zmijačom) za izmjenu topline, zagrijavanje ili hlađenje. Karakteristike kotlastog reaktora su da tijekom reakcije nema izmjene tvari s okolinom, što znači da sve što nastane reakcijom ostaje u reaktoru. Ovaj tip reaktora je pogodan za istraživanje kinetike u kapljevitaj fazi, a nije pogodan za istraživanje kinetike u plinovitoj fazi te reakcija pri visokim temperaturama i tlakovima [Gomzi Z., 1998.]. Matematički model kotlastog reaktora je moguće izvesti uz pretpostavku da je u reaktoru idealno miješanje što znači da je reakcijska smjesa homogena. Bilanca supstrata u kotlastom reaktoru je definirana slijedećom jednađbom:

$$(-r_s) \cdot V = -\frac{dN_s}{dt} \quad (2.3.)$$

Integriranjem ove jednađbe dobije se izraz za reakcijsko vrijeme

$$t = -\frac{1}{V} \cdot \int_{N_{s_0}}^{N_s} \frac{dN_s}{(-r_s)} \quad (2.4.)$$

gdje t predstavlja reakcijsko vrijeme, V reakcijski volumen, r_s reakcijsku brzinu, N_{s_0} broj molova supstrata na početku reakcije, a N_s na kraju reakcije [Gomzi Z., 1998.]. Obzirom da je $c_s = \frac{N_s}{V}$, vrijedi da je

$$t = -\int_{c_{s_0}}^{c_s} \frac{dc_s}{(-r_s)} \quad (2.5.)$$

Ukratko, u kotlastom reaktoru u kojem postoji jedan supstrat, bilancu tvari opisuje slijedeća jednađba uz pretpostavku da supstrat nestaje brzinom reakcije r_s :

$$\frac{dc_s}{dt} = -r_s \quad (2.6.)$$

2.5. Matematički model procesa oksidacije koniferilnog alkohola lakazom

Matematički model procesa oksidacije koniferilnog alkohola lakazom sastoji se od kinetičkog modela i bilance tvari u kotlastom reaktoru. Kinetika reakcije opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednažbom (2.7.):

$$r = \frac{V_m \cdot c_{KA} \cdot c_{KISIK} \cdot c_{lakaza}}{\left(K_m^{KA} + c_{KA}\right) \cdot \left(K_m^{KISIK} + c_{KISIK}\right)} \quad (2.7.)$$

Bilanca koniferilnog alkohola u kotlastom reaktoru opisana je slijedećom jednažbom:

$$\frac{dc_{KA}}{dt} = -r \quad (2.8.)$$

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Tijekom provedbe pokusa korištene su slijedeće kemikalije:

- enzim lakaza porijeklom iz gljive bijelog truljenja *Trametes versicolor* (Fluka BioChemie, Steinheim, Švicarska)
- koniferilni alkohol (Fluka BioChemie, Steinheim, Švicarska)
- metanol, CH₃OH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Švicarska)
- natrij-hidrogenfosfat, Na₂HPO₄, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- kalij-dihidrogenfosfat, KH₂PO₄, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- amonij-sulfat, (NH₄)₂SO₄, (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

3.1.2. Priprema otopina

Otopine koniferilnog alkohola su pripremljene u fosfatnom puferu ($c = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) pH 6,6. Fosfatni pufer je pripremljen otapanjem 10,894 g KH₂PO₄ u 0,3 dm³ destilirane vode i 11,367 g Na₂HPO₄ u 0,3 dm³ destilirane vode te njihovim miješanjem u volumnom omjeru 7,8:12,2.

3.2. APARATURA

3.2.1. Spektrofotometar

Određivanje kinetike reakcije metodom početnih brzina provedeno je na dvozračnom spektrofotometru (UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan, Slika 3.1.).



Slika 3.1.. Spektrofotometar

3.2.2. Kapljevinski kromatograf visokog učinka (HPLC)

Za mjerenje koncentracija koniferilnog alkohola korišten je kapljevinski kromatograf visokog učinka (Shimadzu, Kyoto, Japan, Slika 3.2.) koji se sastojao od pumpe (LC-10 AT), UV detektora (SPD -10A), injektora (RHEODYEN), degazera (DGU-20A3), termostata za kolonu (SYKAM 4110), te računala. Uzorci su mjereni pri valnoj duljini 260 nm na koloni LiChrospher® 100 (reverzna faza C₁₈, 5 μm, dimenzija 250 mm · 0,4 mm).



Slika 3.2. Kapljevinski kromatograf visokog učinka (HPLC)

3.2.3. Kotlasti reaktor

U kotlastom reaktoru provedena je enzimska oksidacija koniferilnog alkohola. Kotlasti reaktor se sastojao od reakcijske posude opremljene magnetskim miješalom smještene u termostat za održavanje konstantne temperature.

3.3. ANALITIČKE METODE

3.3.1. Određivanje koncentracije koniferilnog alkohola

Koncentracija koniferilnog alkohola određivana je kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC) sa UV detektorom pri valnoj duljini od 260 nm na koloni LiChrospher® 100 (reverzna faza C₁₈, 5 μm, dimenzija 250 mm · 0,4 mm). Mobilna faza korištena za određivanje koncentracije koniferilnog alkohola je bila smjesa redestilirane vode i metanola u omjeru 80:20. U svrhu određivanja baždarne krivulje, otapanjem koniferilnog alkohola u metanolu, pripremljene su standardne otopine koniferilnog alkohola (Prilog 1).

Prije analize na HPLC-u uzorci uzeti iz reaktora pri provedbi šaržnog pokusa otopljeni su u metanolu i profiltrirani kroz filter CHROMAFIL CA-20/25 da bi se uklonio enzim i zaustavila reakcija.

Vrijeme zadržavanja koniferilnog alkohola na koloni je bilo 8,9 min.

3.3.2. Određivanje kinetike reakcije metodom početnih brzina

Spektrofotometrijski je određivana aktivnost enzima pri različitim vrijednostima pH i temperature. Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm³ pri valnoj duljini 260 nm. Dobivena je promjena apsorbancije s vremenom, a iz tih vrijednosti je izračunata volumna i specifična aktivnost enzima prema jednadžbama (3.1) i (3.2).

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3.1)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_E} \quad (3.2)$$

gdje su V_r ukupni volumen uzorka u kiveti (cm³), V_E volumen dodanog enzima (cm³), ε ekstinkcijski koeficijent ($\varepsilon_{404} = 0,034 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$, $\varepsilon_{389} = 0,4795 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$, $\varepsilon_{472} = 3,37 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$), d promjer kivete ($d = 1 \text{ cm}$), $\frac{\Delta A}{\Delta t}$ promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca), (min⁻¹), $V.A.$ volumna aktivnost (U cm⁻³), $S.A.$ specifična aktivnost, (U mg⁻¹), γ_E masena koncentracija enzima (mg cm⁻³).

3.4. PROVEDBA MJERENJA

3.4.1.1. Ispitivanje utjecaja pH na aktivnost enzima lakaze u reakciji oksidacije koniferilnog alkohola

Ispitivanje utjecaja pH na aktivnost enzima lakaze u reakciji oksidacije koniferilnog alkohola je provedeno u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm^3 . Sva mjerenja provedena su u fosfatnom puferu [Rausher, K. et. al., 1972] koncentracije $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$. Ispitivan je utjecaj pH u intervalu od pH 5,6 -7,4, pri temperaturi $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Iz dobivene promjene apsorbancije s vremenom, izračunati su volumna i specifična aktivnost.

3.4.1.2. Ispitivanje utjecaja temperature na aktivnost enzima lakaze u reakciji oksidacije koniferilnog alkohola

Ispitivanje utjecaja temperature na aktivnost enzima lakaze u reakciji oksidacije koniferilnog alkohola provedeno je u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm^3 . Sva mjerenja provedena su u fosfatnom puferu koncentracije $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$. Ispitivan je utjecaj temperature u intervalu od $20 - 70 \text{ }^\circ\text{C}$, pri pH = 6,6. Iz dobivene promjene apsorbancije s vremenom, izračunati su volumna i specifična aktivnost.

3.4.2. Istraživanje kinetike enzimske oksidacije koniferilnog alkohola metodom početnih brzina

Istraživanje kinetike enzimske oksidacije koniferilnog alkohola metodom početnih brzina je provedeno u $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ fosfatnom puferu pH = 6,6. Ispitivan je utjecaj različitih početnih koncentracija koniferilnog alkohola ($0 - 0,17 \text{ mmol dm}^{-3}$) na brzinu reakcije. Sva mjerenja su provedena pri temperaturi $35 \text{ }^\circ\text{C}$, a koncentracija lakaze u kiveti je iznosila $0,099 \text{ mg cm}^{-3}$. Praćena je promjena apsorbancije u vremenu za prvih 100 s trajanja reakcije u spektrofotometru na valnoj duljini 260 nm .

3.4.3. Provedba pokusa enzimске oksidacije koniferilnog alkohola u kotlastom reaktoru

10,1 cm³ otopine koniferilnog alkohola u fosfatnom puferu pH = 6,6 koncentracije 0,2 mmol dm⁻³ je stavljeno u kotlasti reaktor volumena 15 cm³ i termostatirano pri temperaturi 35 °C. Prije dodatka enzima, uzet je početni uzorak iz reaktora i analiziran na HPLC-u. Nakon analize početnog uzorka dodano je 0,1 cm³ lakaze $\gamma = 10 \text{ mg cm}^{-3}$, tako da je njena koncentracija u reaktoru bila 0,132 mg cm⁻³. Daljnji uzorci (0,01 cm³) su uzimani u prethodno definiranim vremenskim intervalima te razrjeđivani dodatkom 0,990 cm³ metanola. Tako pripremljeni uzorak je potom profiltriran kroz filtar CHROMAFIL CA-20/25 S da bi se uklonio enzim i zaustavila reakcija, te su uzorci analizirani na HPLC-u.

3.4.4. Provedba pokusa oksidacije koniferilnog alkohola u kotlastom reaktoru bez dodatka enzima

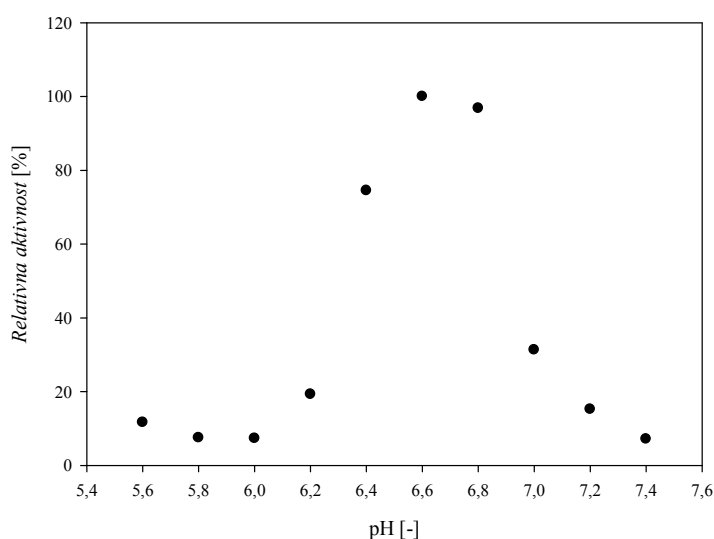
U kotlasti reaktor volumena 15 cm³ dodano je 10,1 cm³ otopine koniferilnog alkohola u fosfatnom puferu pH = 6,6 koncentracije 0,2 mmol dm⁻³ i termostatirano pri temperaturi 35 °C. Uzorci (0,01 cm³) su uzimani u prethodno definiranim vremenskim intervalima, razrjeđivani dodatkom 0,990 cm³ metanola te analizirani na HPLC-u.

4. REZULTATI I RASPRAVA

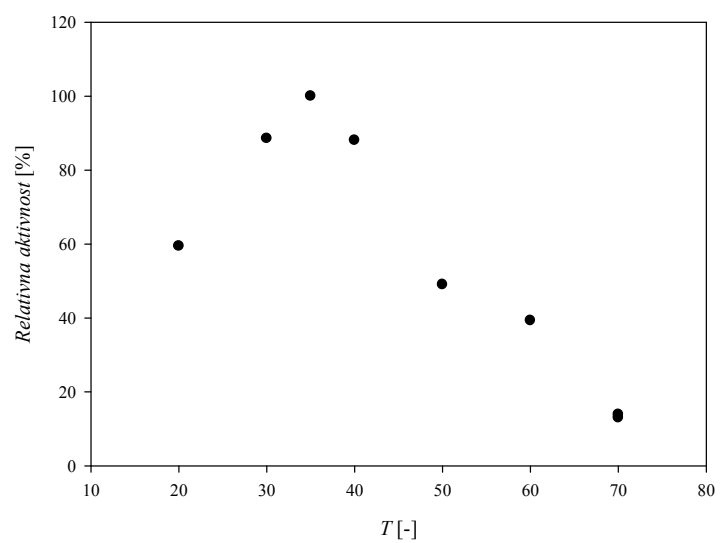
U ovom poglavlju su prikazani rezultati istraživanja ovisnosti aktivnosti enzima lakaze o pH i temperaturi, rezultati istraživanja kinetike enzimske oksidacije koniferilnog alkohola, te rezultati pokusa enzimske oksidacije koniferilnog alkohola provedenog u kotlastom reaktoru.

4.1. Istraživanje ovisnosti aktivnosti enzima lakaze o pH i temperaturi

Ispitana je ovisnost aktivnosti enzima lakaze u reakciji oksidacije koniferilnog alkohola pri različitim vrijednostima pH i temperature. Specifične aktivnosti enzima lakaze su prikazane kao relativne vrijednosti [%]. Maksimalna aktivnost enzima lakaze u reakciji oksidacije koniferilnog alkohola postignuta je pri pH 6,6 (slika 4.1.) te pri temperaturi 35 °C (slika 4.2.).



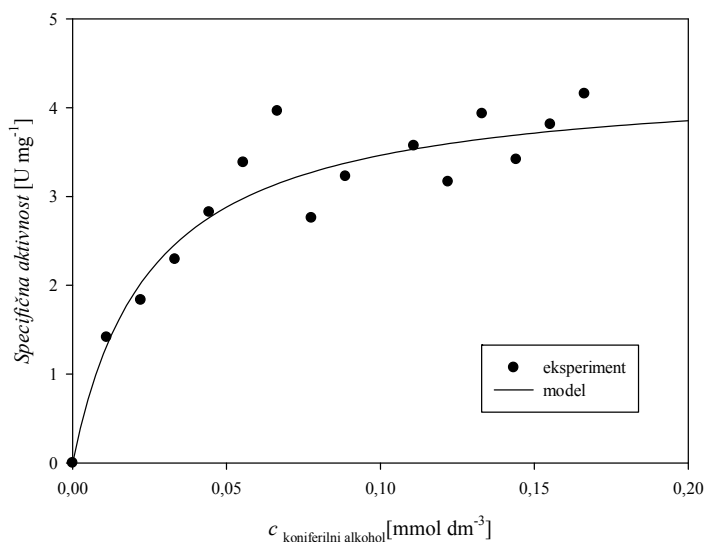
Slika 4.1. Ovisnost relativne aktivnosti enzima lakaze u reakciji oksidacije koniferilnog alkohola o pH vrijednosti pri temperaturi 30 °C ($\gamma_{\text{lakaza}} = 0,099 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{koniferilni alkohol}} = 0,095 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Slika 4.2. Ovisnost relativne aktivnosti enzima lakaze u reakciji oksidacije koniferilnog alkohola o temperaturi pri pH 6,6 ($\gamma_{\text{lakaza}} = 0,099 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{koniferilni alkohol}} = 0,095 \text{ mmol dm}^{-3}$)

4.2. Istraživanje kinetike enzimske oksidacije koniferilnog alkohola metodom početnih brzina

Rezultati ovisnosti specifične aktivnosti enzima o koncentraciji koniferilnog alkohola su prikazani na slici 4.3. Kinetička ispitivanja su provedena pri prethodno određenim optimalnim vrijednostima pH i temperature.



Slika 4.3. Ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji koniferilnog alkohola u reakciji oksidacije katalizirane lakazom ($\gamma_{\text{lakaza}} = 0,099 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 6,6, $T = 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

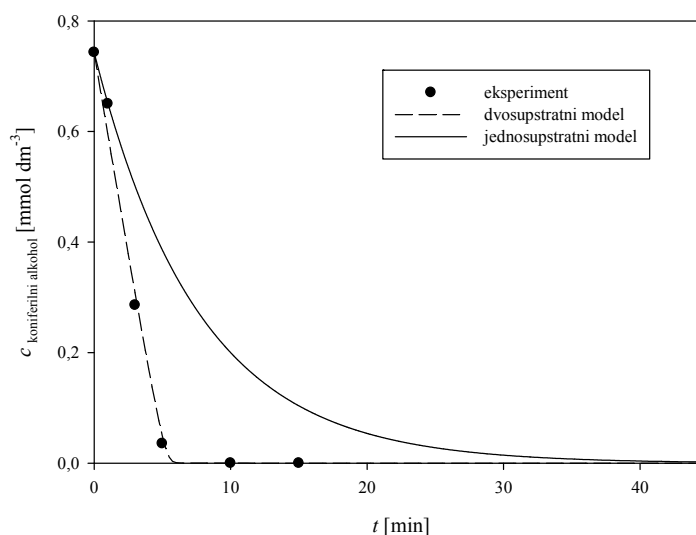
Vrijednosti Michaelis-Mentenične konstante K_m i maksimalne brzine reakcije V_{max} procijenjene su nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu i metodu najmanjih kvadrata sadržane u programskom paketu Scientist (MicroMath®). Njihove vrijednosti prikazane u tablici 4.1. Niska vrijednost procijenjene konstante K_m ukazuje na visoku specifičnost ovog enzima na koniferilni alkohol.

Tablica 4.1. Rezultati procjene kinetičkih parametara za reakciju oksidacije koniferilnog alkohola lakazom

Parametar	Jedinica	Vrijednost
K_m	mmol dm ⁻³	0,0254 ± 0,0069
V_{max}	U mg ⁻¹	4,3872 ± 0,3032

4.3. Rezultati enzimske oksidacije koniferilnog alkohola u kotlastom reaktoru

Biokatalitička oksidacija koniferilnog alkohola provedena je u kotlastom reaktoru pri početnoj koncentraciji koniferilnog alkohola od 0,743 mmol dm⁻³. Reakcija je provedena pri prethodno određenim optimalnim uvjetima u fosfatnom puferu ($c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 6,6) pri 35 °C. Koncentracija lakaze u reaktoru je iznosila 0,132 mg cm⁻³. Rezultati pokusa prikazani su na slici 4.4. Iz rezultata pokusa vidljivo je da je 100 %-tna konverzija supstrata postignuta nakon 7 minuta.



Slika 4.4. Enzimska oksidacija koniferilnog alkohola u kotlastom reaktoru ($\gamma_{\text{lakaza}} = 0,132 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 6,6, $T = 35 \text{ °C}$, $V_r = 10,2 \text{ cm}^3$)

_____ jednosupstratni Michaelis-Menten kinetički model

----- dvosupstratni Michaelis-Menten kinetički model

Temeljem rezultata pokusa oksidacije koniferilnog alkohola katalizirane lakazom provedena je ocjena valjanosti pretpostavljenog matematičkog modela procesa (jednadžbe 2.1. i 2.8). Pokazalo se da jednosupstratni model ne može zadovoljavajuće opisati rezultate pokusa.

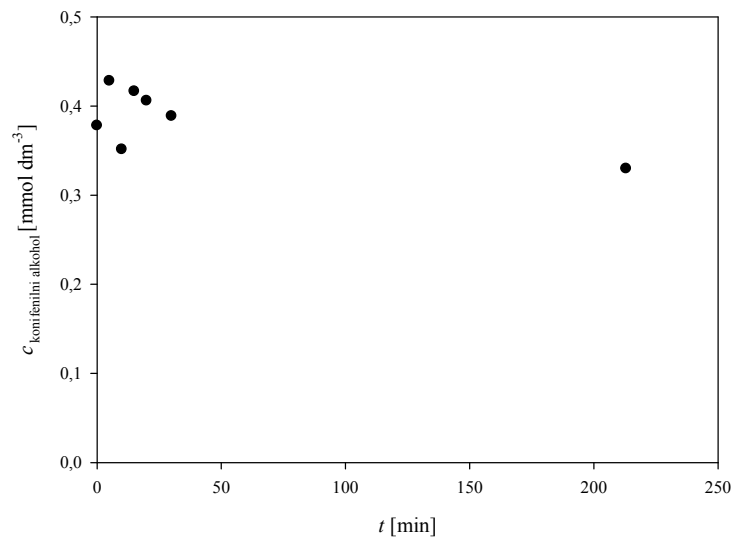
Iz literature je poznato [Tišma, M., 2008] da je za provedbu oksidacije uz enzim lakazu potrebno osigurati i zadovoljavajuću količinu kisika. Prilikom određivanja kinetičkog modela procesa metodom početnih brzina nemoguće je procijeniti možebitni utjecaj koncentracije kisika na kinetiku reakcije jer je u tim pokusima kisik u velikom suvišku. Ovo nije slučaj u reakciji provedenoj u kotlastom reaktoru, gdje kisik postaje limitirajuću reaktant, te je stvarna brzina reakcije znatno manja od one procijenjene metodom početnih brzina. Zbog toga je prvotno pretpostavljeni matematički model procesa modificiran na taj način da je za opis enzimske oksidacije koniferilnog alkohola korišten dvosupstratni Michaelis-Menteničin model (jednadžba 2.7.) te bilanca tvari za koniferilni alkohol u kotlastom reaktoru (jednadžba 2.8.). Za ocjenu valjanosti ovog modela korišteni su K_m^{KA} , prethodno procijenjen metodom početnih brzina (Tablica 4.1), i K_m^{kisik} preuzeta iz literature [Tišma, M., 2008]. Maksimalna brzina reakcije V_{max} , je procijenjena iz rezultata pokusa provedenog u kotlastom reaktoru (Tablica 4.2.) Iz prikazanog grafa promjene koncentracije koniferilnog alkohola s vremenom (Slika 4.4.) vidljivo je da ovako modificirani matematički model procesa dobro opisuje rezultate pokusa.

Tablica 4.2. Kinetički parametri enzimske oksidacije koniferilnog alkohola korišteni u matematičkom modelu procesa s pretpostavljenom dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom

Parametar	Jedinica	Vrijednost
K_m^{KA}	mmol dm ⁻³	0,0254 ± 0,0069
V_m	U mg ⁻¹	14,0527 ± 1,222
K_m^{kisik}	mmol dm ⁻³	0,1

Kako bi se utvrdila stabilnost vodene otopine koniferilnog alkohola praćena je promjena njegove koncentracije u kotlastom reaktoru bez dodatka enzima. Početna

koncentracija koniferilnog alkohola otopljenog u fosfatnom puferu ($c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 6,6, $T = 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$) je bila $0,284 \text{ mmol dm}^{-3}$. Rezultati pokusa prikazani su na slici 4.5. Vidljivo je da je koniferilni alkohol stabilan u puferskoj otopini tijekom 220 minuta čime je pokazano da je njegova razgradnja u kotlastom reaktoru posljedica isključivo djelovanja enzima lakaze.



Slika 4.5. Oksidacija koniferilnog alkohola u kotlastom reaktoru bez prisustva enzima ($c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 6,6, $T = 35 \text{ }^{\circ}\text{C}$)

5. ZAKLJUČCI

1. Rezultati ispitivanja kinetike enzimske reakcije oksidacije koniferilnog alkohola katalizirane enzimom lakaza iz *Trametes versicolor* ukazuju na visoku specifičnost spomenutog enzima na koniferilni alkohol kao supstrat, što je vidljivo iz niske K_m vrijednosti ($K_m^{KA} = 0,0254 \pm 0,0069 \text{ mmol dm}^{-3}$).
2. U kotlastom reaktoru postignuta je 100 %- tna konverzija u vremenu od 7 minuta.
3. Pretpostavljeni matematički model procesa u kotlastom reaktoru koji se sastojao od dvosupstratnog Michaelis-Menteničnog kinetičkog modela i bilance tvari za koniferilni alkohol pokazuje dobro slaganje s rezultatima pokusa.

6. LITERATURA

1. Bahri, H., Dignac, M.F., Rumpel, C., Rasse, D.P., Chenu, C., Mariotti A.: Lignin turnover kinetics in an agricultural soil is monomer specific, *Soil Biology & Biochemistry*, 2006.
2. Bailey, J. E., Ollis, D. F.: *Biochemical Engineering Fundamentals*; Clarc, B. J., Tokay, B., Bradley, J.W. (ur.), McGraw-hill, Inc. (1977).
3. Bourbonnais, R., Paice M.G., Lanthier P., Yaguchi, M.: Lignin oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,2'-Azinobis (3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization, *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1995: 1876-1880.
4. Burton, S.G.: Laccases and Phenol Oxidases in Organic Syntheses – a Review, *Curr Org Chem* 7 (2003): 1317-1331.
5. Claus, H.: Laccases: structure, reactions, distributions, *Micron* 35 (2004): 93-96.
6. Coll, P.M., Fernández-Abolos, Villanueva, J.R., Santamaria, R., Perez, P.: Purification and characterization of a Phenoloxidase (Laccase) from Lignin-Degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971), *Appl Env Microb* 59 (1993): 2607-2613.
7. Crestini, C., Argyropoulos, D.S.: The Early Oxidative Biodegradation Steps of Residual Kraft Lignin Models with Laccase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 6, 1998: 2161-2169.
8. D'Acunzo, F., Galli, C., Masci, B.: Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems, Solubility and steric issues. *European Journal of Biochemistry* 269 (2002), 5330-5335.
9. Drmač, M.: Biotransformacija L-fenilalanina katalizirana oksidazom L-amino kiselina, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (2004.) : 3-4.
10. Farrell, R.K., Kirk, T.K., Tien, M.: Novel enzymes which catalyze the degradation and modification of lignin, US Patent 4.687,741 (1987).
11. Gomzi, Z.: *Kemijski reaktori*, Hinus, Zagreb (1998): 48, 93-96.
12. Howard, R. L. et. al.: Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. *African Journal of Biotechnology* 2 (2003),602-619.
13. <http://en.wikipedia.org/wiki/Lignin>
14. <http://hr.wikipedia.org/wiki/Enzim>

15. Kobayashi, S., Higashimura H.: Oxidative polymerization of phenols revisited, *Prog Polym Sci* 28 (2003): 1015-1048.
16. Kurniawati, S., Nicell, J.A.: A pseudo-steady state model of the kinetics of laccase-catalysed oxidation of aqueous phenol, *J Chem Technol Biot* 81 (2006): 1198-1298.
17. Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (ur.), *Industrial Biotransformation*, Wilvy-VCH, Weinheim (2006): 1-36
18. Mayer, A.M, Staples, R.C.: Laccase: new function for an old enzyme. *Phytochemistry* 60 (2002): 551-565.
19. Rausher, K., Voigt, J., Wilke, I., Wilke, K.-Th.: *Chemische Tabellen und Rechentafeln für die analytische Praxis*, WEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, (1972): 144-145.
20. Riva, S.: Laccases. Blue enzymes for green chemistry, *Trends in Biotechnology* 24 (2006): 219.-226.
21. Srebotnik, E., Hammel, K.: Degradation of nonphenolic lignin by laccase/1-hydroxybenzotriazole system, *Journal of Biotechnology* 81, 2000: 179-188.
22. Tišma M.: Oksidacija fenolnih spojeva lakazom iz *Trametes versicolor* u različitim tipovima reaktora, Magistarski rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu (2008.): 2-4.
23. Tsujiyama, S., Minami, M.: Production of phenol-oxidizing enzymes in the interaction between white-rot fungi, *Mycoscience* 46, 2005: 268-271.
24. Varniaté, R.: Enzymatic lignin degradation by micromycetes in plant remnants, *Biologija* 2, 2002: 23-25.
25. Vasić-Rački, Đ.: History of Industrial Biotransformation – Dreams and realities; Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. (ur.), *Industrial Biotransformation*, Wilvy-VCH, Weinheim (2006): 1-36
26. Xia, Z., Yoshida, T., Funaoka M.: Enzymatic degradation of highly phenolic lignin-based polymers (lignophenols), *Eur Polym J* 39 (2003): 909-914.

7. Popis simbola

7.1. Simboli

A – apsorbancija, -

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

d – promjer kivete spektrofotometra, cm

K_m – Michaelis-Menteničina konstanta, mmol dm^{-3}

K_m^S – Michaelis-Menteničina konstant za supstrat, mmol dm^{-3}

K_m^{KA} – Michaelis-Menteničina konstant za koniferilni alkohol, mmol dm^{-3}

K_m^{kisik} – Michaelis-Menteničina konstant za kisik, mmol dm^{-3}

N_{S0} – broj molova supstrata na početku reakcije, mol

N_S – broj molova supstrata na kraju reakcije, mol

r_s – brzinu reakcije, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$

$S.A.$ – specifična aktivnost, U mg^{-1}

t – reakcijsko vrijeme, min

V – reakcijski volumen, cm^3

$V.A.$ – volumna aktivnost, U cm^{-3}

V_E – volumen dodanog enzima, cm^3

V_m – maksimalnu brzinu reakcije, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$

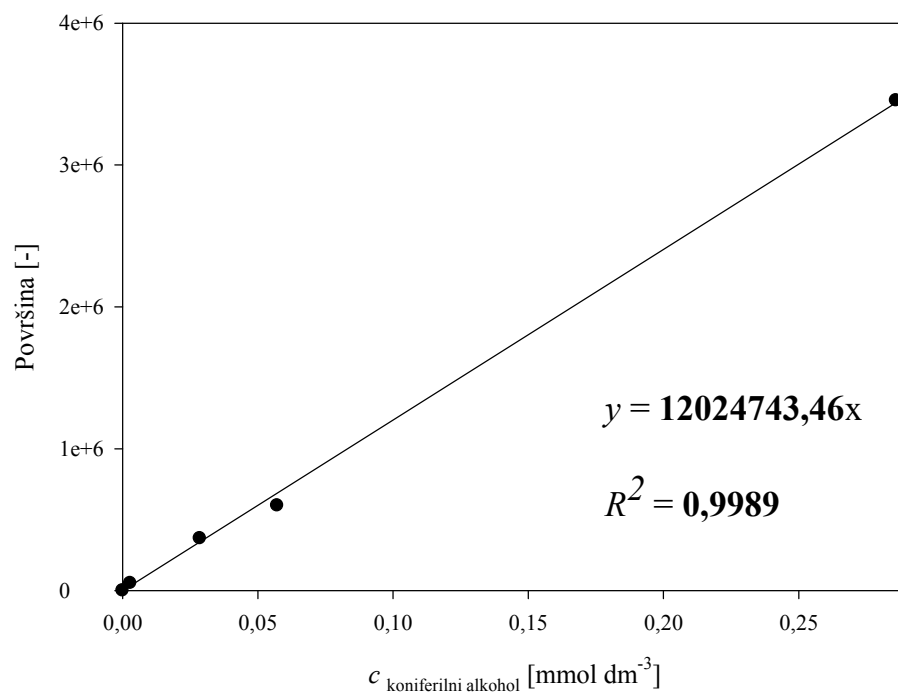
V_r – ukupni volumen uzorka u kivetu, cm^3

7.1.1. Grčki simboli

ε – ekstinkcijski koeficijent $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$,

γ_E – masena koncentracija enzima, mg cm^{-3}

8. PRILOG



Slika 8.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije koniferilnog alkohola

ŽIVOTOPIS

Tatjana Kovačević rođena je 12. studenog 1986. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađa u Gradecu. Nakon završene osnovne škole upisuje program opće gimnazije u Srednjoj školi Vrbovec. 2005. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Sudjelovala je na Applied Biocatalysis 4th meeting of students and university professors.