

Oksidacija heksanola katalizirana cijelim stanicama pekarskog kvasca u vodenom i dvofaznom sustavu

Hexanol oxidation catalyzed by baker's yeast cells in the water and two phase system

Vlatka Matun, Ana Vrsalović Presečki

**Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Marulićev trg 1910000 Zagreb (e-mail: avrsalov@fkit.hr).*

***Colorado State University, Fort Collins, CO 80523 USA (e-mail:author@lamar.colostate.edu)*

**** Electrical Engineering Department, Seoul National University, Seoul, Korea, (e-mail: author@snu.ac.kr)}*

Sažetak: U ovom radu provedena je biokatalitička oksidacija heksanola pomoću cijelih stanica pekarskog kvasca. Reakcija je katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom (ADH) koji je u stanici kvasca odgovoran za reakciju redukcije acetaldehida. Enzim alkohol dehidrogenaza pripada skupini oksidoreduktaza, te je za provođenje reakcije oksidacije nužno prisustvo koenzima NAD^+ . Regeneracija koenzima se provodila dodatkom kisika koji omogućuje respiratornom lancu stanica kvasca nastajanje oksidiranog kofaktora. Reakcija oksidacije heksanola provedena je uz permeabilizirane i nepermeabilizirane stanicame u vodenom i dvofaznom (heksan-voda) sustavu. Postavljen je matematički model biokatalitičke oksidacije heksanola i regeneracije koenzima. Eksperimenti su provedeni u kotlastom reaktoru. Produkti biokatalitičke oksidacije heksanola katalizirane pekarskim kvascem su bili heksanal i heksan kiselina. U vodenom mediju postignuta je 100% konverzija heksanola kod permeabiliziranih i nepermeabiliziranih stanica. Konverzija heksanola u dvofaznom mediju korištenjem ne-permeabiliziranih stanica je cca 40%, dok je s permeabiliziranim stanicama oko 50%. U svim slučajevima iskorištenje na heksanalu je bilo izuzetno nisko, a heksan kiselina je detektirana kao glavni produkt reakcije.

Ključne riječi: biotransformacija; heksanol; pekarski kvasac; alkohol dehidrogenaza; regeneracija NAD^+ ; modeliranje

Abstract: Hexanol oxidation catalyzed by whole cells of baker's yeast has been performed in this work. The reaction is catalyzed by the enzyme alcohol dehydrogenase (ADH) that is in yeast cell responsible for the reaction of the acetaldehyde reduction. Enzyme alcohol dehydrogenase belongs to oxidoreductase which means that for its action requires a presence of coenzyme. NAD^+ regeneration has been performed by the addition of oxygen that allows the respiratory chain of yeast cell to provide oxidized cofactor. The reaction of hexanol oxidation was performed by permeabilized and non-permeabilized cells in the water and biphasic (hexane-water) medium. Mathematical models for both biocatalytic hexanol oxidation and regeneration of coenzyme were proposed. Experiments were conducted in the batch mode. Hexanal and hexanoic acid can be detected as the products of biocatalytical hexanol oxidation catalyzed by baker's yeast. In the water medium 100 % hexanol conversion was achieved by permeabilized and non-permeabilized cells. Hexanol conversion in the biphasic medium using non-permeabilized cells was cca 40 %, while with permeabilized cells it was around 50 %. In all cases the yield on hexanal was extremely low, and hexanoic acid was the main product of the reaction.

Key words: biotransformation; hexanol; baker's yeast; alcohol dehydrogenase; NAD^+ regeneration; modeling

1. UVOD

Postoje dva načina provođenja biotransformacija: u obliku cijelih stanica ili kao izolirani enzimi. Oba se upotrebljavaju u industriji kao katalizatori. Priprema cijelih stanica je jednostavnija i bez visokih troškova u usporedbi s izoliranim enzimima s kojima se s druge strane postiže veća selektivnost i čistoća produkata. Prednosti upotrebe biokatalizatora u obliku cijelih stanica su zaštićenost od vanjskih utjecaja, stabilnost kroz duži period, te raznolikost i jednostavnost upotrebe (Ishige *et al.* 2005). Nedostaci upotrebe su otežana difuzija supstrata i produkata kroz staničnu membranu zbog slabe permeabilnosti, te stvaranje neželjenih sporednih reakcija zbog prisutnosti drugih enzima (D'Souza 2001). Tretiranjem cijelih stanica s površinski aktivnim tvarima povećava se permeabilnost stanične membrane. Time se uklanja zapreka difuziji supstrata i produkata kroz membranu, a istovremeno se stanica isprazni od koenzima i ostalih molekula male molekulske mase čime se smanjuje mogućnost nastajanja sporednih produkata (D'Souza 1999).

Upotreba kvasaca kao biokatalizatora u obliku cijelih stanica u organskim sintezama, cilj je istraživanja već skoro cijelo stoljeće, te se ovaj mikroorganizam smatra najpopularnijim biokatalizatorom u obliku cijele stanice (Rodríguez *et al.*, 2011; Arifin *et al.*, 2011; Bencze *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010).

Produkti biokatalitičke oksidacije heksanola katalizirane pekarskim kvascem su heksanal i heksan kiselina. Prvi spoj pripada skupini "green-note" kemikalija koje su vrlo važni zbog svoje primjene u prehrambenoj i kozmetičkoj industriji (Schade *et al.* 2003). Potrošnja ovih proizvoda dobivenih prirodnim putem se procjenjuje na 5-10 tona godišnje (Muller *et al.* 1995). Heksan kiselina se koriste u organskoj sintezi, izradi parfema, farmaceutskoj, prehrambenoj industriji, mastima za podmazivanje, te u proizvodnji gume i boja (Becerra *et al.* 1995).

U ovom radu provedena je biokatalitička oksidacija heksanola pomoću cijelih stanica (permeabilizirane, ne-permeabilizirane) pekarskog kvasca. Navedena reakcija je katalizirana enzimom alkohol dehidrogenaza (ADH) koji je u stanici kvasca odgovoran za reakciju redukcije acetaldehida. Ovaj enzim spada u skupinu oksidoreduktaza, te je za provođenje reakcije oksidacije nužno prisustvo koenzima NAD^+ . Za regeneraciju koenzima odnosno oksidaciju NADH korišten je lanac prijenosa elektrona unutar stanica kvasca uz dodatak kisika (Verachert & De Mot 1990, Bakker *et al.* 2001).

Na temelju podataka iz literature pretpostavljeno je da u vodenom mediju dolazi do oksidacije heksanola u heksanal uz enzim alkohol dehidrogenazu, te do daljnje oksidacije heksanala u heksan kiselinu, uz enzim aldehid dehidrogenazu koji se također nalazi unutar stanice kvasca (Kometani *et al.* 1998). U obje reakcije nužna je prisutnost istog koenzima NAD^+ . U literaturi je pronađeno da je nastajanje heksan kiseline moguće izbjeci provođenjem oksidacije heksanola u dvofaznom sustavu, obzirom da su heksanol i heksanal bolje topivi u heksanu, a enzim i koenzim u vodi (Capparet & Larroche 2004). Stoga je u ovom radu navedena reakcija provedena u vodenom mediju i dvofaznom sustavu heksan-voda.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Kemikalije

Tijekom provođenja eksperimenta korištene su slijedeće kemikalije: heksadeciltrimetil-amonijev bromid - CTAB (*Fluka*), heksanol (*Merck*), heksanal (*Fluka*), heksan kiselina (*Acrös*), NAD^+ (*Juelich fine chemicals*), NADH (*Juelich fine chemicals*), heksan (*Merck*), cikloheksanon (*Carlo Erba*), acetonitril (*Merck*), glicin pirofosfatni pufer (*Merck*), natrij pirofosfat (*Kemika*), kalijev dihidrogenfosfat (*Kemika*), kalijev hidrogenfosfat (*Merck*), svježi pekarski kvasac (Kvasac d.o.o.; Hrvatska).

2.2. Priprema permeabiliziranih stanica kvasca

Za permeabilizaciju stanice kvasca su miješane s 0,2% otopinom detergenta CTAB u omjeru $m_{\text{kvasca}} [\text{g}] : V_{\text{detergent}} [\text{cm}^3] = 1 : 10$ (Gowda *et al.* 1991) na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta. Nakon procesa permeabilizacije uklonjen je detergent (0,2 %-tni CTAB) u svrhu izbjegavanja denaturacije proteina. Stanice su oprane u fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7)

2.3. Analitičke metode

Koncentracije heksanola, heksanala i heksan kiseline su određivane plinskom kromatografijom sa plameno-ionizacijskim detektorom, korištenjem helija kao plina nosioca, na polarnoj koloni ZB-WAX ($l = 30 \text{ m}$; ID = 0,53 mm; df = 1 μm). Koncentracije heksanola i heksanala su praćene pri slijedećim uvjetima (Karra-Chaabouni *et al.* 2002): injektor: $T = 280 \text{ }^\circ\text{C}$, linearna brzina = 25 cm/s, kolona: $T_0 = 50 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 min), $dT/dt = 10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 180 \text{ }^\circ\text{C}$ (2 min), detektor: $T = 240 \text{ }^\circ\text{C}$. Za ekstrakciju heksanola i heksanala iz vodene otopine je korišten heksan. Vremena zadržavanja heksana, heksanala i heksanola su bila slijedeća: 2,1 min, 5,8 min i 9,6 min. Koncentracija heksan kiseline određivana je pri slijedećim uvjetima na GC-u

(Yang & Choong 2001): injektor: $T = 280\text{ }^{\circ}\text{C}$, linearna brzina = 24,5 cm/s, kolona: $T_0 = 75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min), $dT/dt = 6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 180\text{ }^{\circ}\text{C}$, $dT/dt = 10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 230\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min), detektor: $T = 240\text{ }^{\circ}\text{C}$. Koncentracija ispitivane kiseline mjerena je u vodenoj otopini. Uzorci iz reakcija su prije mjerenja profiltrirani kroz filter (*Sartorius*, veličina 5H/N) radi odvajanja biokatalizatora. Vrijeme zadržavanja heksan kiseline je 19,5 min.

2.4. Provedba biokatalitičke oksidacije heksanola u kotlastom reaktoru

Oksidacije heksanola su bile provedene u staklenom šaržnom reaktoru ukupnog volumena 50 cm^3 . Radni volumeni reaktora bio je 40 cm^3 . Nakon pripreme reakcijske otopine određene koncentracije supstrata, uzimao se početni uzorak nakon dodavanja biokatalizatora koji se odmah analizirao na GC-u na prethodno opisani način. Daljnje uzorkovanje bilo je nastavljeno u pravilnim vremenskim razmacima dok sav supstrat nije bio potrošen. Volumeni uzoraka su iznosili od 10 – 100 μl .

2.5. Obrada podataka

Eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu SCIENTIST (SCIENTIST handbook). Parametri su procijenjeni nelinearnom regresijom pomoću metode najmanjih kvadrata i simpleks metode koje sadrži navedeni paket. Metode procjene parametara imaju za cilj pronaći minimalni zbroj kvadrata greške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela. Na temelju izračunate sume kvadrata greške parametri se ponovno proračunavaju sve dok se ne postigne minimalna pogreška između seta eksperimentalnih i izračunatih vrijednosti (SCIENTIST handbook). Na temelju napisanog modela i procijenjenih parametara provodila se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi korištenjem Episode algoritma.

Parametri kao što su maksimalna brzina reakcije, Michaelis-Menteničina konstanta i konstanta inhibicije procijenjeni su iz kinetičkih mjerenja tj. ovisnosti početne brzine o koncentraciji. Ovi parametri su korišteni za simulacije pomoću modela, odnosno za predviđanje promjena koncentracija produkata i reaktanata s vremenom u različitim reaktorskim sustavima. Parametri kao što su konstante brzine reakcija 1. i 2. reda, nisu se mogli procijeniti iz zasebnih kinetičkih mjerenja. Stoga su određivani iz podataka koncentracija-vrijeme izmjerenih u reaktorskim eksperimentima.

2.6. Određivanje koeficijenta raspodjele i koeficijenta prijenosa mase

Koeficijent raspodjele je ravnotežna konstanta raspodjele molekula između dviju faza, a računa se prema omjeru ravnotežnih koncentracija pojedinih komponenti u vodenoj i organskoj fazi prema izrazu 1.

$$K = \frac{c_{\text{org}}}{c_{\text{aq}}} \quad (1)$$

Za određivanje koeficijenta raspodjele heksanola i heksanala miješano je 10 cm^3 otopine navedenih komponenata poznate koncentracije u heksanu sa 10 cm^3 pufera tijekom 24 h na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon 24 h određena je koncentracija komponenta u organskoj fazi, koja predstavlja ravnotežnu koncentraciju. Iz razlike koncentracija u organskoj fazi na početku i na kraju miješanja procijenjena je ravnotežna koncentracija heksanola i heksanala u vodenoj fazi. Koeficijent prijenosa mase se procjenjivao iz izraza za difuziju komponente iz vodene u organsku fazu (jedm. 2) i obrnuto (jedm. 3).

$$\frac{dc_{\text{org}}}{dt} = -\frac{k_s \cdot A}{V_{\text{org}}} (c_{\text{org}} - K \cdot c_{\text{aq}}) \quad (2)$$

$$\frac{dc_{\text{aq}}}{dt} = \frac{k_s \cdot A}{V_{\text{aq}}} (c_{\text{org}} - K \cdot c_{\text{aq}}) \quad (3)$$

Za njegovo određivanje praćen je pad koncentracije heksanola i heksanala u organskoj fazi u ovisnosti o vremenu. Mjerenja su rađena na $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ u reaktoru volumena 20 cm^3 pri broju okretaja miješala od 400 rpm. Omjer vodene faze i organske je bio 50:50.

2.7. Matematičko modeliranje procesa

Matematički modeli reaktora, sastoje se od bilancnih i kinetičkih jednadžbi. Obzirom da su procijenjeni kinetički parametri modela, kao i koeficijenti raspodjele i koeficijenti prijenosa mase za heksanol i heksanal bilo je moguće razviti matematički model reakcije oksidacije heksanola u vodenom mediju i dvofaznom sustavu heksan-voda za kotlasti reaktor.

2.7.1. Matematički model biokatalitičke oksidacije heksanola u vodenom sustavu

Reakcija biokatalitičke oksidacije heksanola je ravnotežna reakcija. Opisana je dvosupstratnom Michaelis–Menteničinom kinetikom u koju je uključena kompetitivna inhibicija produktima (jedm. 4), kao i povratna reakcije odnosno reakcija redukcije heksanala (jedm. 5). Kinetički parametri ovih jednadžbi određeni su eksperimentalno, te su publicirani u prethodnom radu (Presečki & Vasić-Rački 2009) i prikazani u tablici 1. Pored navedenih kinetičkih jednadžbi kinetički model sadrži jednadžbu za oksidaciju heksanala uz aldehid dehidrogenazu (jedm. 6), redukciju heksan kiseline uz aldehid dehidrogenazu (jedm. 7), NADH oksidaciju uz respiratorni lanac stanica pekarskog kvasca (jedm. 8) i NAD⁺ redukciju uz stanice pekarskog kvasca (jedm. 9)

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_{kvasac} \cdot c_{heksanol} \cdot c_{NAD^+}}{\left(c_{heksanol} + K_m^{heksanol} \left(1 + \frac{c_{heksanal}}{K_{i1}^{heksanal}} \right) \right) \cdot \left(c_{NAD^+} + K_{m1}^{NAD^+} \left(1 + \frac{c_{NADH}}{K_{i1}^{NADH}} \right) \right)} \quad (4)$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot c_{kvasac} \cdot c_{heksanal} \cdot c_{NADH}}{\left(c_{heksanal} + K_m^{heksanal} \right) \cdot \left(c_{NADH} + K_{m2}^{NADH} \left(1 + \frac{c_{NAD^+}}{K_{i2}^{NAD^+}} \right) \right)} \quad (5)$$

Tablica 1. Kinetički parametri u reakciji biokatalitičke oksidacije heksanola i redukcije heksanala uz permeabilizirane stanice pekarskog kvasca *Saccharomyces* sp.

Parametar	Vrijednost
oksidacija heksanola	
V_{m1} [U g _{ww} ⁻¹]	37,800 ± 1,271
$K_m^{heksanol}$ [mmol dm ⁻³]	1,360 ± 0,165
$K_{m1}^{NAD^+}$ [mmol dm ⁻³]	0,689 ± 0,104
$K_{i1}^{heksanal}$ [mmol dm ⁻³]	0,024 ± 0,003
K_{i1}^{NADH} [mmol dm ⁻³]	0,015 ± 0,002
redukcija heksanala	
V_{m2} [U g _{ww} ⁻¹]	21,981 ± 2,537
$K_m^{heksanal}$ [mmol dm ⁻³]	0,334 ± 0,098
K_{m2}^{NADH} [mmol dm ⁻³]	0,041 ± 0,194
$K_{i2}^{NAD^+}$ [mmol dm ⁻³]	1,063 ± 0,210

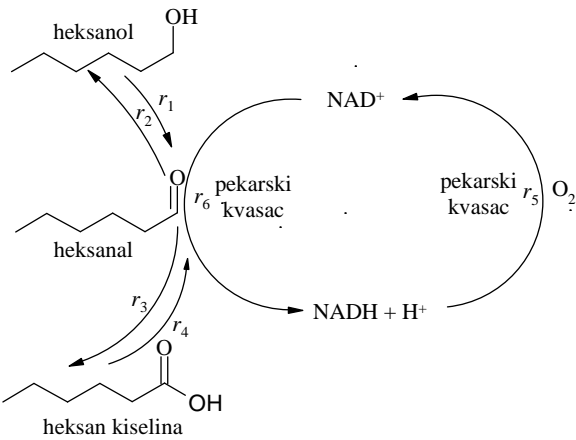
$$r_3 = k_1 \cdot c_{kvasac} \cdot c_{heksanal} \cdot c_{NAD^+} \quad (6)$$

$$r_4 = k_2 \cdot c_{kvasac} \cdot c_{heksan\ kiseline} \cdot c_{NADH} \quad (7)$$

$$r_5 = k_3 \cdot c_{NADH}^n \quad (8)$$

$$r_6 = k_4 \cdot c_{NAD^+} \quad (9)$$

Matematički model u ovom sustavu uz spomenute kinetičke jednadžbe sadrži i bilancne jednadžbe (jedm. 10 - 14) za kotlasti reaktor koje su postavljene na temelju sheme procesa (slika 1)



Slika 1. Shema biokatalitičke oksidacije heksanola uz stanice pekarskog kvasca uz regeneraciju koenzima

$$\frac{dc_{\text{heksanal}}}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 + r_4 \quad (10)$$

$$\frac{dc_{\text{heksanol}}}{dt} = r_2 - r_1 \quad (11)$$

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = r_1 - r_2 + r_3 - r_4 - r_5 + r_6 \quad (12)$$

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = r_2 - r_1 - r_3 + r_4 + r_5 - r_6 \quad (13)$$

$$\frac{dc_{\text{heksan kiselina}}}{dt} = r_3 - r_4 \quad (14)$$

2.7.2. Matematički model biokatalitičke oksidacije heksanola u dvofaznom sustavu heksan-voda

Jednadžbe kinetičkog modela biokatalitičke oksidacije heksanola uz stanice pekarskog kvasca i regeneraciju koenzima u dvofaznom sustavu heksan-voda su jednake onima postavljenim za vodeni sustav (jedn. 4 -9). Reaktorski model se sastoji od bilancnih jednadžbi za NADH, NAD⁺ i heksan kiselinu koje su identične onima u vodenom mediju (jedn. 12 - 14), te od bilanci za promjenu koncentracije heksanola i heksanala u vodenom i organskom mediju prikazanim jednadžbama 15-18.

$$\frac{dc_{\text{heksanol, org}}}{dt} = -\frac{ks_{\text{m,heksanol}} \cdot A}{V_{\text{org}}} (c_{\text{heksanol, org}} - K_{\text{heksanol}} \cdot c_{\text{heksanol, aq}}) \quad (15)$$

$$\frac{dc_{\text{heksanol, aq}}}{dt} = \frac{ks_{\text{m,heksanol}} \cdot A}{V_{\text{aq}}} (c_{\text{heksanol, org}} - K_{\text{heksanol}} \cdot c_{\text{heksanol, aq}}) - r_1 + r_2 \quad (16)$$

$$\frac{dc_{\text{heksanal, org}}}{dt} = -\frac{ks_{\text{m,heksanal}} \cdot A}{V_{\text{org}}} (c_{\text{heksanal, org}} - K_{\text{heksanal}} \cdot c_{\text{heksanal, aq}}) \quad (17)$$

$$\frac{dc_{\text{heksanal, aq}}}{dt} = \frac{ks_{\text{m,heksanal}} \cdot A}{V_{\text{aq}}} (c_{\text{heksanal, org}} - K_{\text{heksanal}} \cdot c_{\text{heksanal, aq}}) + r_1 - r_2 - r_3 + r_4 \quad (18)$$

3. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj rada je bila usporedba raspodjele produkata u biokatalitičkoj reakciji oksidacije heksanola uz permeabilizirane i nepermeabilizirane stanice pekarskog kvasca u vodenom mediju i dvofaznom sustavu heksan-voda. Obzirom da je navedena reakcija katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom koji za svoju aktivnost u reakcijama oksidacije zahtijeva prisutnost koenzima NAD⁺ ispitana je njegova regeneracija korištenjem respiratornog sustava stanice dodatkom kisika iz zraka (Verachert & De Mot 1990, Bakker *et al.* 2001).

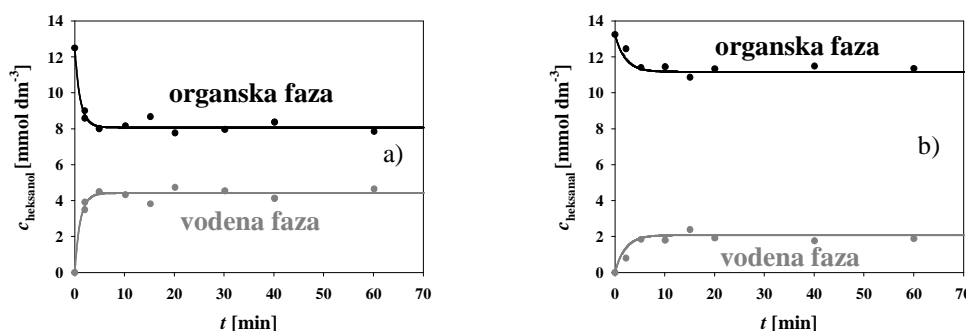
3.1. Određivanje koeficijenta raspodjele i koeficijenta prijenosa mase

Da bi mogli modelirati reakciju oksidacije heksanola u dvofaznom sustavu bilo je potrebno odrediti koeficijent raspodjele i prijenosa mase za heksanol i heksanal iz organskog u vodeni dio gdje se odvija reakcija i obrnuto. Koeficijent raspodjele možemo definirati kao ravnotežnu konstantu raspodjele molekula između dviju faza (heksan-voda), te računati prema omjeru ravnotežnih koncentracija pojedinih komponenti u vodenoj i organskoj fazi prema izrazu (1). Iz rezultata eksperimenta prikazanih u tablici 2. vidimo da je koeficijent raspodjele veći za heksanal (5,37) nego za heksanol (1,82). Na temelju tih podataka može se zaključiti da je heksanal slabije topiv u vodi.

Tablica 2. Prikaz koeficijenta raspodjele za heksanol i heksanal

Komponenta	Vrijednost koeficijenta raspodjele, <i>K</i>
Heksanol	1,82
Heksanal	5,37

Koeficijent prijenosa mase procjenjivao se pri istim uvjetima i na isti način (temperatura, oblik reaktora, broj okretaja miješala, omjer volumena vodene i organske faze) na koji se provodio reaktorski eksperiment (Slika 2). Umnožak koeficijenta prijenosa mase i međufazne površine (*k_{sm} · A*) procjenjivao se nelinearnom regresijom korištenjem jednadžbe 2 i 3.



Slika 2. Promjena koncentracije a) heksanola i b) heksanala u organskoj i vodenoj fazi u vremenu (*V*(heksanola i heksanala u heksanu) = 10 cm³, *V*(glicin-pirofosfatni pufer) = 10 cm³, *T* = 25 °C, 400 rpm)Procijenjene vrijednosti umnoška koeficijenta prijenosa mase i međufazne površine dane su u tablici 3.

Tablica 3. Umnožak koeficijenta prijenosa mase i međufazne površine za heksanol i heksanal

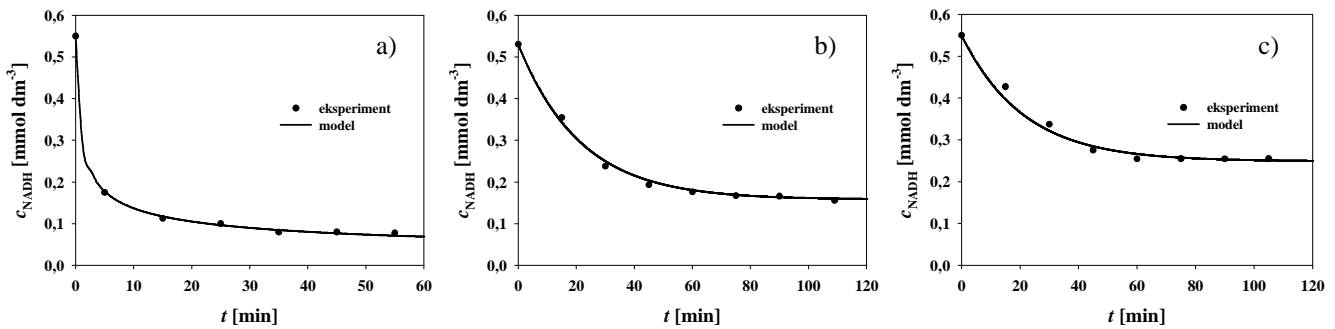
Komponenta	<i>k_{sm} · A</i> [cm ³ min ⁻¹]
Heksanol	3,204
Heksanal	0,772

Vidljivo je da je koeficijent prijenosa mase za heksanol (3,204 cm³min⁻¹) oko četiri puta veći nego za heksanal (0,772 cm³min⁻¹). Iz navedenog se može zaključiti da je heksanal i slabije topiv u vodenoj fazi i da je njegova brzina difuzije iz organske u vodenu fazu vrlo niska. Time se očekivalo da prilikom provedbe biokatalitičke reakcije oksidacije heksanola u dvofaznom sustavu koncentracija heksanala ne bi trebala biti dostatna za daljnju oksidaciju u heksan kiselinu.

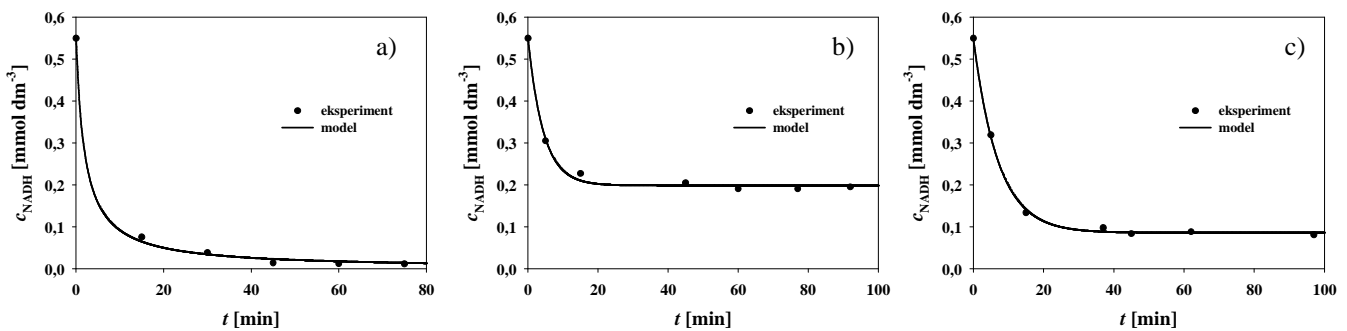
3.2. Oksidacija NADH pomoću stanica pekarskog kvasca uz dodatak kisika

Obzirom na kinetičke parametre prikazane u tablici 1, te na rezultate dobivene u prethodnim istraživanjima (Presečki *et al.* 2011) može se vidjeti da ravnoteža oksidacije heksanola nije pomaknuta u željenom smjeru. Stoga je za provedbu ove reakcije nužna regeneracija koenzima (NAD⁺), ne samo zbog njegove visoke cijene nego i zbog pomicanja ravnoteže. U ovom radu se

ispitivala mogućnost njegove regeneracije uz pomoć respiratornog sustava stanice (Verachert & De Mot 1990). Prije provedbe samih eksperimenata ispitana je oksidacija koenzima NADH uz stanice kvasca dodatkom zraka u svrhu određivanja kinetike te reakcije. Reakcija je provedena korištenjem permeabiliziranih i nepermeabiliziranih stanica pekarskog kvasca pri različitim omjerima vodene i organske faze. Rezultati oksidacije NADH provedenih sa nepermeabiliziranim i permeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca pri različitim omjerima vodene i organske faze prikazani su na slikama 3. i 4.



Slika 3. Oksidacija NADH katalizirana nepermeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca (glicin pirofosfatni pufer pH = 9, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $q_{\text{zrak}} = 30\text{ dm}^3\text{ h}^{-1}$, $c_{\text{kvasac}} = 200\text{ g dm}^{-3}$): a) vodena faza; b) heksan: vodena faza = 7:3, c) heksan: vodena faza = 5:5



Slika 4. Oksidacija NADH katalizirana permeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca (glicin pirofosfatni pufer pH = 9, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, $q_{\text{zrak}} = 30\text{ dm}^3\text{ h}^{-1}$, $c_{\text{kvasac}} = 200\text{ g dm}^{-3}$): a) vodena faza; b) heksan: vodena faza = 7:3, c) heksan: vodena faza = 5:5

Kinetika reakcije oksidacije NADH opisana je kinetikom drugog reda u vodenom sustavu, dok je u dvofaznom sustavu ista opisana kinetikom prvog reda (jedn. 8). U dvofaznom sustavu i uz permeabilizirane i uz nepermeabilizirane stanice kvasca dolazi do povratne reakcije, tj. do reakcije redukcije NAD^+ (jedn. 9). Parametri navedenih reakcija su procijenjeni iz gore prikazanih eksperimenata i prikazani su u tablici 4.

Tablica 4. Kinetički parametri u reakciji oksidacije NADH katalizirane stanicama pekarskog kvasca

stanice	voda:heksan	$k_3\text{ [min}^{-1}\text{]}$	$k_4\text{ [min}^{-1}\text{]}$
nepermeabilizirane	1:0	0,517	0
	5:5	0,0328	0,0140
	3:7	0,0260	0,0215
permeabilizirane	1:0	0,908	0
	5:5	0,1460	0,0828
	3:7	0,1195	0,0221

Ono što se može primijetiti iz dobivenih parametara je da je reakcija oksidacije NADH znatno brža uz permeabilizirane stanice kvasca. Brzina iste reakcije katalizirane i sa permeabiliziranim i nepermeabiliziranim stanicama kvasca opada sa porastom udjela heksana u sustavu. Navedeno se može objasniti slabijim otapanje kisika u prisutnosti veće količine organske faze u sustavu.

3.3. Biokatalitička oksidacija heksanola u kotlastom reaktoru

Za biokatalitičku oksidaciju heksanola uz regeneraciju koenzima korištenjem respiratornog sustava stanice postavljen je matematički model koji je prikazan u prethodnom poglavlju na temelju sheme reakcija (slika 1). Kinetički parametri u reakciji oksidacije heksanola kao i redukcije heksanala katalizirane permeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca procijenjeni su nezavisnim mjerenjima metodom početnih brzina i prikazana su u tablici 1. Parametri kao što su maksimalna brzina reakcije (V_{m1} i V_{m2}) u navedenim reakcijama koje su katalizirane nepermeabiliziranim stanicama pekarskog kvasca su procijenjene iz reaktorskih eksperimenata. Naime pretpostavka je da je zbog slabe propusnosti membrane reakcija nešto sporija. U slučaju nepermeabiliziranih stanica pretpostavka je da su parametri kao što su Michaelis-Menteničina konstanta i konstante inhibicija istih vrijednosti kao i kod permeabiliziranih stanica.

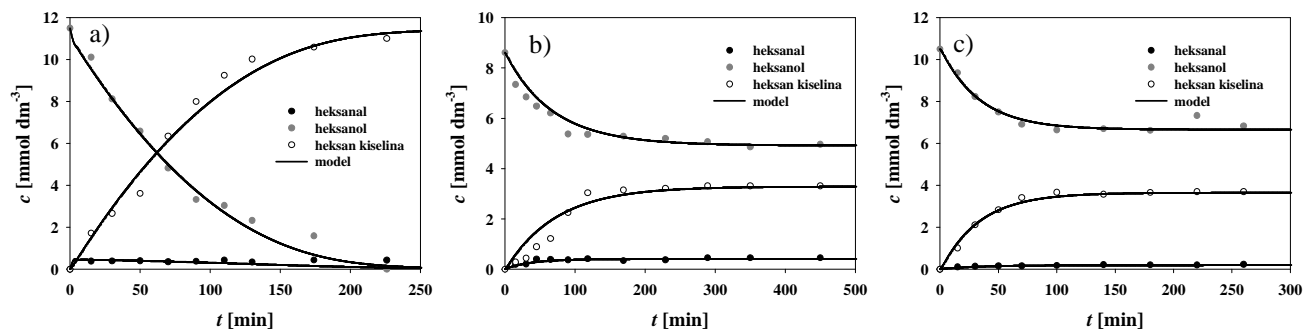
Kinetika reakcije oksidacije heksanala i redukcije heksan kiseline (jedn. 6 i 7) nije posebno ispitana zbog kompleksnosti sustava unutar stanice i interferencije ostalih reakcija na točnost određivanja parametara. Stoga su kinetike ovih reakcija opisane kinetikom drugog reda, te su parametri jednadžbe procijenjeni iz reaktorskih eksperimenata. Kinetički parametri u reakcijama oksidacije NADH i redukcije NAD^+ (jedn. 8 i 9) određeni su pomoću nezavisnih eksperimenata prikazanih u prethodnom poglavlju (tablica 4)

Produkti biokatalitičke oksidacije heksanola katalizirane pomoću cijelih stanica pekarskog kvasca su heksanol i heksan kiseline.

Nastajanje heksan kiseline je moguće izbjeći provođenjem oksidacije heksanola u dvofaznom sustavu (Capparet & Larroche 2004), te je u ti svrhu u ovom radu navedena reakcija provedena u vodenom mediju i dvofaznom sustavu heksan-voda korištenjem različitih omjera.

3.3.1. Biokatalitička oksidacija heksanola pomoću nepermeabiliziranih stanica pekarskog kvasca

Eksperimenti provedeni pomoću nepermeabiliziranih stanica pekarskog kvasca prikazani su na slici 5. Svi prikazani eksperimenti provedeni su pri protoku zraka od $30 \text{ dm}^3\text{h}^{-1}$ iz razloga, što je pri nižim protoku reakcija bila znatno sporija (rezultati nisu prikazani). Uzrok tome je brzina reakcije regeneracije NAD^+ korištenjem respiratornog sustava stanice koja je bila znatno niža (cca 10 puta) pri protoku zraka od $10 \text{ dm}^3\text{h}^{-1}$ ($k_3 = 0,047 \text{ min}^{-1}$). Naime brzina te reakcije je proporcionalna koncentraciji kisika u mediju koja je pri nižem protoku vjerojatno bila preniska. Koncentraciju kisika nije bilo moguće mjeriti s kisikovom elektrodom zbog previsoke koncentracije stanica kvasca u sustavu. Stoga je u ovom eksperimentu ukupna brzina reakcije oksidacije heksanola bila limitirana brzinom regeneracije koenzima.



Slika 5. Biokatalitička oksidacija heksanola uz nepermeabilizirane ($C_{NAD^+} = 0,55 \text{ mM}$; $C_{kvasac} = 200 \text{ g/L}$) stanice pekarskog kvasca uz regeneraciju koenzima dodatkom kisika ($V_{reaktora} = 40 \text{ mL}$, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, glicin pirofosfatni pufer $\text{pH} = 9$, $V_{pufer} = 40 \text{ mL}$, $q_{zrak} = 30 \text{ dm}^3\text{h}^{-1}$) a) vodena faza; b) heksan: vodena faza = 7:3, c) heksan: vodena faza = 5:5

Najviša konverzija heksanola od 100% je postignuta u vodenom mediju (Slika 5 a) što je u skladu sa rezultatima dobivenim prilikom ispitivanja oksidacije NADH katalizirane sa cijelim stanicama kvasca. Naime jedino u vodenom mediju nije došlo do povratne reakcije redukcije NAD^+ (tablica 5). To znači da je u ovom sustavu uz konstantan dovod zraka koncentracija NADH uvijek približno jednaka nuli što dovodi do pomicanja ravnoteže u smjeru oksidacije heksanola. Konverzija heksanola u sustavima sa heksanom je iznosila oko 40 % (slika 5.6 b-c). U svim eksperimentima kao glavni produkt je detektirana heksan kiseline što znači da odabrani dvofazni sustav nije uspio spriječiti daljnju oksidaciju heksanala u heksan kiselinu.

Matematički model je dobro opisao provedene eksperimente te su parametri kao što se maksimalne brzine reakcija (V_{m1} i V_{m2}) i konstante brzine reakcija katalizirane enzimom AIDH (k_1 i k_2) procijenjeni iz eksperimenata prikazanih na slici 5 dani u tablici 5.

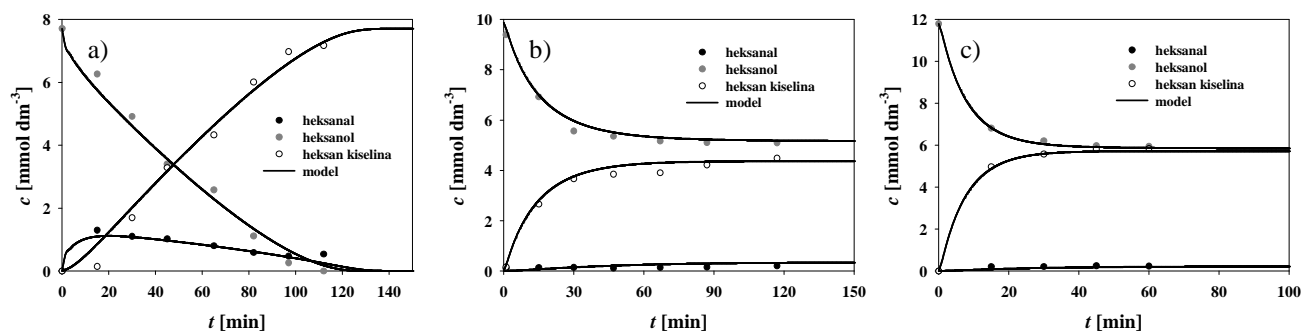
Tablica 5. Kinetički parametri u reakciji biokatalitičke oksidacije heksanola katalizirane ADH i reakciji oksidacije heksanala uz ALDH - nepermeabilizirane stanice pekarskog kvasca *Saccharomyces* sp.

Parametar	Vrijednost
V_{m1} [U g _{ww} ⁻¹]	21,356
V_{m2} [U g _{ww} ⁻¹]	17,545
k_1 [min ⁻¹]	7,249
k_2 [min ⁻¹]	0,098

Iz procijenjenih parametara vidi se brzina reakcije oksidacije heksanola uz nepermeabilizirane stanice oko dva puta sporija nego uz permeabilizirane (tablica 1.). Također može se zaključiti da je reakcija oksidacije heksanola uz enzim AIDH pomaknuta u smjeru nastajanja heksan kiseline što je u skladu s dobivenim rezultatima obzirom da je ona glavni produkt reakcije.

3.3.2. Biokatalitička oksidacija heksanola pomoću permeabiliziranih stanica pekarskog kvasca

Eksperimenti provedeni pomoću permeabiliziranih stanica pekarskog kvasca prikazani su na slici 6. Da se izbjegne limitiranost kisikom u sustavu svi prikazani eksperimenti provedeni su pri protoku zraka od 30 dm³h⁻¹.



Slika 6. Biokatalitička oksidacija heksanola uz permeabilizirane ($C_{NAD^+} = 0,55$ mM; $C_{kvasac} = 200$ g/L) stanice pekarskog kvasca uz regeneraciju koenzima dodatkom kisika ($V_{reaktora} = 40$ mL, $T = 25$ °C, glicin pirofosfatni pufer pH = 9, $V_{pufer} = 40$ mL, $q_{zrak} = 30$ dm³h⁻¹) a) vodena faza; b) heksan: vodena faza = 7:3, c) heksan: vodena faza = 5:5

Kao i uz nepermeabilizirane stanice najviša konverzija od 100 % je postignuta prilikom oksidacije heksanola u vodenom mediju. U dvofaznom sustavu ista je bila oko 50 %, tj. oko 10 % viša nego uz nepermeabilizirane stanice. Proces permeabilizacije je doprinio povećanju brzine reakcije te su ravnotežne konverzije postignute i do u dva puta kraćem vremenu nego uz nepermeabilizirane stanice (slika 5). Navedeno je u skladu sa procijenjenim parametrima maksimalne brzine reakcije (V_{m1} , V_{m2} , tablica 1 i 5) za obje vrste korištenih stanica. Matematički model pokazuje dobro slaganje sa eksperimentalnim podacima. Parametri u reakciji oksidacije heksanala (k_1 i k_2) katalizirane sa enzimom AIDH iz pekarskog kvasca su isti kao i kod nepermeabiliziranih stanica (tablica 5).

3.4. Usporedba eksperimentalnih rezultata

Biokatalitička oksidacija heksanola provedena je pomoću permeabiliziranih i nepermeabiliziranih stanica kvasca sa regeneracijom koenzima (NAD⁺) dodatkom kisika. Reakcija se provodila u vodenom i dvofaznom sustavu heksan-voda, a kao produkti reakcije detektirani su heksanal i heksan kiseline

Usporedba provedenih eksperimenata na bazi dobivenih konverzija heksanola, te iskorištenja na heksanalu i heksan kiselinu su prikazani u tablici 6.

Tablica 6. Usporedba rezultata biokatalitičke oksidacije heksanola pomoću nerastućih stanica pekarskog kvasca

stanice	voda:heksan	$X_{heksanol}$	$I_{heksanal}$	$I_{heksan\ kiseline}$
---------	-------------	----------------	----------------	------------------------

nepermeabilizirane	1:0	99,3	0,5	99,5
	5:5	36,6	5,0	95,0
	3:7	42,8	11,0	89,0
permeabilizirane	1:0	100	0	100
	5:5	50,4	3,7	96,3
	3:7	47,7	7,16	92,8

Može se vidjeti se da je najviša konverzija heksanola i najveće iskorištenje na heksan kiseline dobiveno u vodenom sustavu uz permeabilizirane stanice pekarskog kvasca (100 %). Bez obzira što se nije mogla izbjeći proizvodnja heksan kiseline u odabranom dvofaznom sustavu, može se vidjeti da dobivena iskorištenja na heksanalu rastu sa porastom udjela heksana u sustavu. Navedeno ukazuje da je heksan ipak u manjoj mjeri uspio spriječiti oksidaciju heksanala. Najviše iskorištenje na heksanalu (11 %) dobiveno je u dvofaznom sustavu heksan:voda=3:7 uz nepermeabilizirane stanice pekarskog kvasca.

4. ZAKLJUČAK

Biokatalitička oksidacija heksanola uz enzim ADH iz pekarskog kvasca je ravnotežna reakcija. Ravnoteža reakcije je pomaknuta u lijevo, te je iz tog razloga nužno naći efektivan sustav za regeneraciju koenzima. Produkti biokatalitičke oksidacije heksanola uz pekarski kvasac su heksanal i heksan kiseline. Regeneracija koenzima dodatkom kisika korištenjem respiratornog sustava stanice pokazala se kao učinkovita metoda u ovom sustavu. Oksidacija heksanola uz permeabilizirane stanice kvasca je znatno brža nego uz nepermeabilizirane.

U vodenom sustavu postignuta je 100 %-tna konverzija heksanola. U dvofaznim sustavima uzrok niže konverzije heksanola je spontana reakcija redukcije koenzima NAD^+ katalizirane sa stanicama kvasca u reakciji regeneracije koenzima dodatkom kisika. Iskorištenje na heksanalu u dvofaznom sustavu raste sa porastom udjela heksana u sustavu. Izbor heksana kao organskog otapala u dvofaznom sustavu se nije pokazao dobar jer nije izbjegnuta daljnja oksidacija heksanala u heksan kiselinu. Pretpostavljeni matematički model biokatalitičke oksidacije heksanola uz permeabilizirane i nepermeabilizirane stanice kvasca dobro je opisao pokuse provedene u vodenom i dvofaznom sustavu.

SIMBOLI

c	molarna koncentracija [mmol dm^{-3}]
d	promjer kivete spektrofotometra [cm]
I	iskorištenje [-, %]
k	konstanta brzine reakcije prvog ili drugog reda [min^{-1} , $\text{mmol}^{-1}\text{dm}^3\text{min}^{-1}$]
K	koeficijent raspodjele [-]
K_i	konstanta inhibicije [mmol dm^{-3}]
K_m	Michaelis-Menteničina konstanta [mmol dm^{-3}]
k_{sm}	koeficijent prijenosa mase [cm min^{-1}]
q_{zrak}	volumni protok zraka [dm^3h^{-1}]
r	reakcijska brzina [U cm^{-3} , U dm^{-3}]
V	volumen [cm^3]
V_m	maksimalna brzina reakcije [U mg^{-1} , U g_{ww}^{-1}]
t	vrijeme [min]
T	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
X	konverzija [-, %]

LITERATURA

Arifin A.A., M.M. Don and M.H. Uzir (2011). Baker's yeast mediated biotransformation of geraniol into citronellol using a continuous closed-gas-loop bioreactor (CCGLB) system. *Biochem Eng J*, **56**, 219–224.

- Bakker, B. M., K.M. Overkamp, A.J.A. van Maris, P. Kotter, M.A.H. Luttik, J.P. van Dijken and J. T. Pronk (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 15-37
- Becerra A.J., R. Martinez, M.C. Huff and M.A. Barteau (2005). Catalytic synthesis of butylketene and hexylketene from hexanoic acid and octanoic acid on functionalized silica monoliths at short contact times. *Catal Today*, **107-108**, 244-249.
- Bencze L.C., C. Paizs, M.I. and Toşa, F.D. Irimie (2010). Substituent effects on the stereochemical outcome of the baker's yeast-mediated biotransformation of α -hydroxy- and α -acetoxymethyl-5-phenylfuran-2-yl-ethanones. *Tetrahedron: Asymmetry*, **21**, 356-364.
- Capparet, L. and C. Larroche (2004). Oxidation of a mixture of 2-(R) and 2-(S)-heptanol to 2-heptanone by *Saccharomyces cerevisiae* in biphasic system. *Biocatal Biotransform*, **22**, 291-296.
- D'Souza, S.F. (1999). Immobilized enzymes in bioprocess. *Curr Sci India*, **77**, 69-79.
- D'Souza, S.F. (2001). Microbial biosensors. *Biosens Bioelektron*, **16**, 337-353.
- Gowda, L.R., N. Bachhawat and S.G. Bhat (1991). Permeabilization of baker's yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. *Enzyme Microb Tech*, **13**, 154-157.
- Ishige, T., K. Honda and S. Shimizu (2005). Whole organism biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol*, **9**, 174-180.
- Karra-Chaabouni, M., S. Pulvin, A. Meziani, D. Thomas, D. Touraud, W. Kunz (2003). Biooxidation of n-hexanol by alcohol oxidase and catalase in biphasic micellar systems without solvent. *Biotechnol Bioeng*, **81**, 27-32.
- Kometani T., Y. Sakai, H. Urai, M. Goto and R. Matsuno (1998). Effect of aeration conditions on aldehyde dehydrogenase activity in yeast cultivation. *J Ferment Bioeng*, **86**, 617-619.
- Muller B.L., C. Dean and I.M. Whitehead (1995) *The industrial use of plant enzymes for the production of natural "green note" flavour compounds*. In: Etievant P, Schreier P, eds. *Bioflavour 95*, Dijon (France).
- Rodríguez P., B. Reyes, M. Barton, C. Coronel, P. Menéndez, D. Gonzalez and S. Rodríguez (2011). Stereoselective biotransformation of α -alkyl- β -keto esters by endophytic bacteria and yeast. *J Mol Catal B: Enzym*, **71**, 90-94.
- Schade, F., J.E. Thompson and R.L. Legge (2003). Use of a plant-derived enzyme template for the production of the green-note volatile hexanal. *Biotechnol Bioeng*, **84**, 265-273.
- SCIENTIST handbook, (1986—1995). 110–300, Micromath®; Salt Lake City.
- V.D. Silva, B.U. Stambuk and M.G. Nascimento (2010) Efficient chemoselective biohydrogenation of 1,3-diaryl-2-propen-1-ones catalyzed by *Saccharomyces cerevisiae* yeasts in biphasic system. *J Mol Catal B: Enzym*, **63**, 157–163.
- Verachert H and R. De Mot (1990) *Yeasts: Biotechnology and Biocatalysis*, 112-113, Marcel Dekker, New York.
- Vrsalović Presečki, A. and Đ. Vasić-Rački (2009). Mathematical modelling of the dehydrogenase catalyzed hexanol oxidation with coenzyme regeneration by NADH oxidase. *Process Biochem*, **44**, 54-61.
- Vrsalović Presečki, A., K. Makovšek and Đ. Vasić-Rački (2012). Coenzyme regeneration in hexanol oxidation catalyzed by alcohol dehydrogenase. *Appl. Biochem. Biotechnol*, **167**, 595-611.
- Yang, M.H. and Y.M. Choong (2001). A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C₂-C₁₂) volatile organic acids in food. *Food Chem*, **75**, 101-108.
- Bakker, B. M., K.M. Overkamp, A.J.A. van Maris, P. Kotter, M.A.H. Luttik, J.P. van Dijken and J. T. Pronk (2001). Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 15-37