

# Kinetička karakterizacija oksidoreduktaze u reakciji redukcije acetona

---

**Kolić, Barbara**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2018**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:978929>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Kolić

# ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Kolić

KINETIČKA KARAKTERIZACIJA OKSIDOREDUKTAZE U REAKCIJI REDUKCIJE  
ACETONA

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki  
dr. sc. Martina Sudar, znanstveni suradnik  
prof. dr. sc. Jasna Prlić Kardum

Zagreb, rujan 2018.

*Hvala!*

*Od srca, mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki, na strpljenju i pomoći u izradi ovog rada! Mojim roditeljima i sestri, na velikoj podršci i ohrabrenjima kada je bilo teško! Mojim prijateljima i kolegama, koji su uvijek uz mene i uveseljavaju mi ove studentske dane!*

## SAŽETAK

### KINETIČKA KARAKTERIZACIJA OKSIDOREDUKTAZE U REAKCIJI REDUKCIJE ACETONA

Oksidoreduktaze su vrsta enzima koji za svoje katalitičko djelovanje zahtijevaju prisutnost koenzima. Zbog visoke cijene koenzima važno je istražiti učinkovit način regeneracije koenzima kako bi se smanjili troškovi u industrijskim procesima. U ovom radu ispitana je mogućnost regeneracije koenzima NADP<sup>+</sup> reakcijom redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom. Reakcija redukcije acetona je ravnotežna reakcija. Kinetika ketoreduktaze u reakciji redukcije acetona ispitana je metodom početnih brzina za naprednu i povratnu reakciju, redukciju acetona i oksidaciju izopropanola. Kinetika obje reakcije je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom. Na temelju postavljenog matematičkog modela i procijenjenih parametara, pomoću programskog paketa *Scientist* simulirana je vremenska ovisnost koncentracije reaktanata i produkata reakcije redukcije acetona u kotlastom reaktoru. Dobivena ravnotežna konverzija acetona iznosila je 54,24 %.

**Ključne riječi:** koenzim, NADP<sup>+</sup>, regeneracija, ketoreduktaza, aceton, matematički model, simulacija

## ABSTRACT

### KINETIC CHARACTERIZATION OF OXIDOREDUCTASE IN THE REACTION OF ACETONE REDUCTION

Oxidoreductases belong to a class of enzymes which require coenzyme for catalytic activity. Because of a high cost of coenzyme, it is very important to investigate an efficient method of coenzyme regeneration to reduce these costs in industrial processes. In this work, the possibility of regeneration of coenzyme  $\text{NADP}^+$  was examined by the reaction of acetone reduction catalyzed by ketoreductase. The reaction of acetone reduction is reversible. Ketoreductase was kinetically characterized by determining the initial enzyme reaction rate for both directions of reversible reaction - acetone reduction and isopropanol oxidation. Kinetics of both reactions is described with a two-substrate Michaelis-Menten kinetics. The time dependent concentration of reactants and products was simulated by *Scientist*, software program, for a batch reactor, based on mathematical model and estimated parameters. The equilibrium conversion of acetone was 54,24 %.

**Key words:** coenzyme,  $\text{NADP}^+$ , regeneration, ketoreductase, acetone, mathematical model, simulation

## SADRŽAJ:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	2
<b>2.1. ENZIMI</b> .....	2
<b>2.1.1. Princip rada enzima</b> .....	3
<b>2.1.2. Značajke i podjela enzima</b> .....	3
<b>2.2. OKSIDOREDUKTAZE</b> .....	4
<b>2.3. KOENZIMI</b> .....	5
<b>2.4. REGENERACIJA KOENZIMA</b> .....	6
<b>2.5. MODELIRANJE BIOTRANSFORMACIJA</b> .....	6
<b>2.5.1. Enzimski reakcijska kinetika</b> .....	7
<b>2.5.2. Reaktorski model</b> .....	9
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	11
<b>3.1. APARATURA</b> .....	11
<b>3.1.1. Analitička vaga</b> .....	11
<b>3.1.2. Spektrofotometar</b> .....	11
<b>3.2. ANALITIČKE METODE</b> .....	12
<b>3.2.1. Određivanje aktivnosti enzima u reakciji redukcije acetona</b> .....	12
<b>3.2.2. Kinetička karakterizacija ketoreduktaze u reakciji redukcije acetona</b> .....	13
<b>3.3. OBRADA PODATAKA</b> .....	15
<b>4. MATEMATIČKI MODEL</b> .....	16
<b>4.1. KINETIČKI MODEL</b> .....	16
<b>4.2. REKTORSKI MODEL</b> .....	16
<b>5. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	18
<b>5.1. TESTIRANJE AKTIVNOSTI ENZIMA U REAKCIJI REDUKCIJE ACETONA</b> ....	18
<b>5.2. KINETIČKA KARAKTERIZACIJA OKSIDOREDUKTAZE U REAKCIJI REDUKCIJE ACETONA</b> .....	19
<b>5.2.1. Redukcija acetona</b> .....	19
<b>5.2.2. Oksidacija izopropanola</b> .....	22
<b>5.3. SIMULACIJA REAKCIJE REDUKCIJE ACETONA UZ REGENERACIJU KOENZIMA NADP<sup>+</sup></b> .....	25
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	27
<b>7. LITERATURA</b> .....	28
<b>8. SIMBOLI I SKRAĆENICE</b> .....	30

<b>9. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>32</b>
--------------------------	-----------



# 1. UVOD

Biotehnologija je iskorištavanje mogućnosti živih organizama ili njihovih dijelova u bioindustriji i zaštiti okoliša povezivanjem različitih prirodnih i tehničkih znanosti. Zbog uporabe obnovljivih izvora sirovina biotehnologija doprinosi očuvanju okoliša. (Findrik Blažević, 2017)

Enzimi, katalizatori reakcija u metaboličkim procesima, imaju sve veću prednost u industriji u odnosu na kemijske katalizatore zbog visoke katalitičke aktivnosti u blagim procesnim uvjetima i selektivnosti. Osim prednosti enzima postoje i poteškoće u njihovom korištenju kao što su nestabilnost i denaturacija kao posljedica neodgovarajućih uvjeta temperature i pH vrijednosti (May et al, 1983), te inhibicije supstratom i produktima.

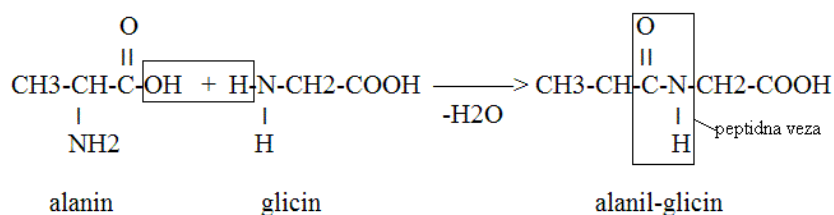
Razvijanje matematičkih modela za reakcije katalizirane enzimima od velike je važnosti za industrijske procese jer omogućuju pronalazak optimalnih uvjeta za rad enzimskih reaktora. (Illanes, 2008) Matematički model se sastoji od kinetičkog i reaktorskog modela. Kinetika enzimske reakcije najčešće se opisuje Michaelis-Menteničinom kinetikom.

Oksidoreduktaze su enzimi koji za svoju katalitičku aktivnost zahtijevaju prisutnost koenzima. U ovom radu ispitana je regeneracija koenzima NADP<sup>+</sup> reakcijom redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. ENZIMI

Enzimi su katalizatori koji ubrzavaju reakcije u stanicama živih organizama. Svaka biokemijska reakcija katalizirana je specifičnim enzimom. Po kemijskoj strukturi enzimi su proteini velike molekulske mase, a nastaju povezivanjem velikog broja aminokiselina peptidnim vezama tvoreći trodimenzionalnu strukturu. Peptidna veza (slika 1.) nastaje spajanjem ugljikovog atoma karboksilne skupine jedne aminokiseline i dušikovog atoma  $\alpha$ -amino grupe druge aminokiseline. (Illanes, 2008) Enzimi se također nazivaju i biokatalizatorima jer nastaju i djeluju u živim organizmima. (Peran et al, 2013)



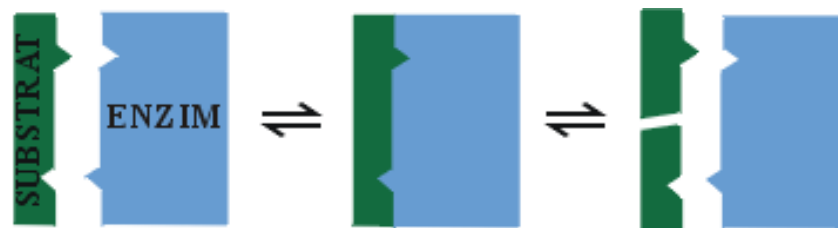
Slika 1. Shematski prikaz nastajanja peptidne veze

Prema strukturi enzimi se mogu podijeliti na četiri nivoa: primarna, sekundarna, tercijarna i kvartarna struktura. Povezivanjem aminokiselina određenim redoslijedom nastaju peptidni lanci koji čine primarnu strukturu enzima. Promjenom redoslijeda povezivanja aminokiselina mijenjaju se ujedno funkcija i struktura enzima. Kada se peptidni lanci dodatno povežu vodikovim vezama, nastaje sekundarna struktura. Dva su načina povezivanja peptidnih lanaca u sekundarnu strukturu: planarna struktura i struktura uzvojnice. Tercijarna struktura, koja se naziva i fibrilna struktura, nastaje preklapanjem peptidnih lanaca i povezivanjem istih kovalentnim vezama. Najsloženija struktura enzima je kvartarna struktura koju čini nekoliko peptidnih lanaca kao podjedinice strukture te je stabilizirana disulfidnim mostovima i sekundarnim valencijskim silama. (Findrik Blažević, 2012)

### 2.1.1. Princip rada enzima

Kao što je rečeno, enzimi nastaju i djeluju u stanicama živih organizama pa su stoga i uvjeti pod kojima djeluju blagi. Kako bi se njihovo djelovanje moglo iskoristiti i izvan žive stanice, uvjeti pri kojima se provodi reakcija (bioproces) moraju biti što sličniji onima u živoj stanici. Ti uvjeti, koji se nazivaju fiziološkim uvjetima, podrazumijevaju temperaturu 20-50°C, pH vrijednosti blizu neutralnih, normalni atmosferski tlak te razrijeđene vodene otopine. (Findrik Blažević, 2012)

Enzimi djeluju na način tako da povećavaju brzinu reakcije sniženjem energije aktivacije ( $E_a$ ). Energija aktivacije je energija koju je potrebno dovesti molekulama kako bi mogle reagirati. Ako je energija aktivacije velika, molekule će reagirati sporo. Prisutstvo enzima snizit će energiju aktivacije i reakcija će se odvijati brže. Enzimi ne utječu na ravnotežu reakcije i ne sudjeluju u reakciji stoga nakon reakcije ostaju nepromijenjeni. Tvar na koju djeluje enzim naziva se supstrat. (Leaković,2018) Supstrat se veže za aktivno mjesto enzima gdje se odvija reakcija i pritom supstrat prelazi u produkt. Nakon reakcije produkt se otpušta. Aktivno mjesto enzima ima točno određeni oblik stoga će enzim reagirati sa supstratom samo ako mu supstrat odgovara komplementarnim oblikom. Ovaj princip djelovanja enzima i supstrata nazvan je modelom ključ-brava (slika 2.) kojeg je predložio Emil Fischer 1894. godine. (Illanes, 2008)



Slika 2. Shematski prikaz djelovanja enzima prema modelu ključ-brava

### 2.1.2. Značajke i podjela enzima

Jedno od važnih svojstava enzima je mogućnost kristalizacije. Svaki enzim kristalizira u određenom obliku prema čemu ih je moguće razlikovati. U svojoj strukturi enzim može sadržavati i ione metala. Takvi enzimi nazivaju se metaloenzimi. Neke reakcije se ne bi mogle

odvijati bez prisutnih metalnih iona pa je tako za ljudski organizam bitan unos određenih minerala hranom. Za farmaceutsku industriju je jako bitno svojstvo enantioselektivnosti. Ovo svojstvo vrlo je bitno jer određuje način djelovanja lijeka na organizam. (Findrik Blažević, 2017)

Enzimi se mogu podijeliti prema vrsti reakcije koju kataliziraju (Peran et al, 2013):

- Oksidoreduktaze- kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije u bioprocima
- Transferaze- kataliziraju reakcije u kojima dolazi do premještanja različitih skupina s jedne strane molekule na drugu
- Hidrolaze- kataliziraju cijepanje C-O, C-N, C-C veze i dr.
- Liaze- kataliziraju reakcije u kojima se supstrat raspada na dvije komponente i reakcije eliminacije uz stvaranje dvostruke veze ili adicije na dvostruku vezu
- Izomeraze- kataliziraju pregradnju unutar molekula
- Ligaze- kataliziraju reakcije u kojima dolazi do nastajanja novih spojeva uz pomoć energije neke treće komponente koja se oslobađa raspadom te komponente

## **2.2. OKSIDOREDUKTAZE**

Kao što je navedeno u prethodnom poglavlju (2.1.2.), oksidoreduktaze su vrsta enzima koji kataliziraju redoks reakcije u bioprocima. Oksidoreduktaze možemo podijeliti u tri grupe: dehidrogenaze, oksidaze i oksigenaze. (May et al, 1983) Sudjeluju u reakcijama redukcije karbonilnih spojeva, kiselina, alkena, nitro spojeva te spojeva sa višestrukim C-N vezama. (Wang et al, 2017) Da bi oksidoreduktaze imale sposobnost kataliziranja reakcija, zahtijevaju prisutnost koenzima koji imaju veliku cijenu na tržištu i stoga je vrlo važno istražiti mogućnost regeneracije koenzima u procesu. (May et al, 1983)

Ovu vrstu enzima sadrže gljive koje sudjeluju u procesu razgradnje lignoceluloze. Kao kofaktore koriste hemo skupinu, flavin te metalne ione. (Martinez et al, 2017)

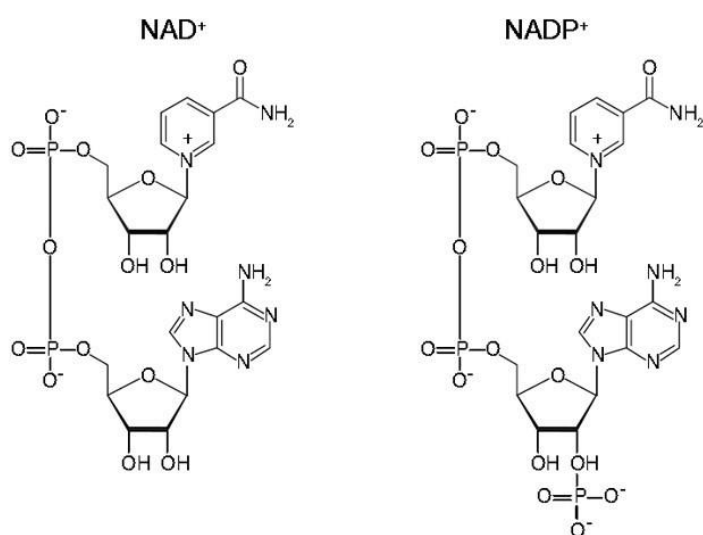
Mnogi kemijski i biokemijski procesi uključuju reakcije oksidacije i redukcije stoga oksidoreduktaze pronalaze veliku primjenu u biotehnologiji. Koriste se u proizvodnji

farmaceutika, sintezi polimera, razgradnji onečišćujućih tvari u okolišu, proizvodnji biosenzora te u medicinske svrhe kao npr. u detekcijskim testovima uzročnika malarije. (May, 1999)

### 2.3. KOENZIMI

Koenzimi su organske molekule male molekulske mase koje se povezuju s enzimom u procesu katalize. Većina enzima ne bi bila aktivna bez prisutnosti ovih malih molekula. Koenzimi nisu sastavni dio strukture enzima, ali se s njim povezuju i sudjeluju u reakciji koja se katalizira te se stoga ponekad nazivaju i kosupstratima. Sudjeluju u prijenosu elektrona, atoma i funkcionalnih grupa. (Illanes, 2008) Glavni predstavnici grupe koenzima koji prenose vodik su nikotinamid-adenin-dinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) i nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat ( $\text{NADP}^+$ ). (Leaković, 2017)

Nikotinamidni koenzimi imaju veliki značaj jer 80 % oksidoreduktaza za svoju aktivnost zahtijeva koenzim  $\text{NAD(H)}$ , dok njih 10 % zahtijeva prisutnost koenzima  $\text{NADP(H)}$ . Ova dva koenzima se razlikuju samo u prisutnosti dodatne fosfatne skupine vezane za ribozu kod koenzima  $\text{NADP(H)}$ .  $\text{NADH}$  i  $\text{NADPH}$  su reducirane forme od  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  (slika 3.). (Hong et al, 2013)



**Slika 3.** Molekulske strukture koenzima  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$

## **2.4. REGENERACIJA KOENZIMA**

S obzirom na visoku cijenu koenzima njihova primjena u stehiometrijskom odnosu nije ekonomski isplativa i stoga je učinkoviti sustav regeneracije koenzima neophodan kako bi se omogućila njihova primjena u većoj mjeri. Upravo je ovo glavni razlog zašto mnoge industrije izbjegavaju primjenu enzima koji zahtijevaju prisutnost koenzima u procesu. (Wang et al, 2017)

Regeneracija koenzima rezultira pomicanjem ravnoteže reakcije u željenom smjeru jer se nastali nepoželjni oblik koenzima konvertira u oblik poželjan u glavnoj reakciji i time se omogućuje manja potrošnja koenzima u procesu proizvodnje. (Findrik Blažević, 2012)

Primjer unutarstanične regeneracije je proces fermentacije gdje stanice same proizvode enzime potrebne za pretvorbu supstrata i regeneraciju koenzima. Nikotinamidni koenzimi se sintetiziraju i regeneriraju u sklopu staničnog metabolizma. Kako bi se koenzimi mogli regenerirati izvan stanice, potrebno je koristiti dodatne reakcijske mehanizme koji uključuju oksidirajuće i reducirajuće reagense, enzime, fotokemijske aktivatore ili elektrode. (Chenault et al, 1986)

## **2.5. MODELIRANJE BIOTRANSFORMACIJA**

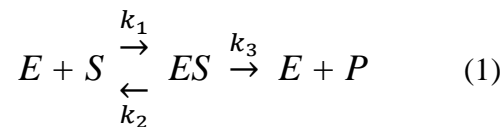
Modeliranje je pristup koji pokušava stvarne i vjerojatne procese u bioreaktorima opisati u matematičkom obliku. Kako bi se model mogao izraditi potrebno je poznavati varijable koje međusobno utječu jedna na drugu kao i na cjelokupan proces. Model koji dobijemo služi nam za predviđanje odvijanja procesa pod utjecajem različitih uvjeta te za optimizaciju, kontrolu i dizajniranje procesa. (Dunn et al, 2003)

U razvijanju enzimatskog modela potrebno je odrediti kinetičke karakteristike kataliziranog procesa i faktore koji utječu na kinetiku te karakteristike reaktora u kojem se odvija proces. (Illanes, 2008) Kinetičkim modelom se određuje tip enzimske reakcije i procjenjuju se kinetički parametri, a reaktorskim modelom se odabire najpovoljniji tip reaktora za odabranu kataliziranu reakciju. (Leaković, 2018)

### 2.5.1. Enzimski reakcijska kinetika

Za razliku od kemijske reakcijske kinetike gdje se govori o reakcijama prvog reda, drugog reda itd., kod enzimski reakcijske kinetike govori se o Michaelis-Menteničinom tipu kinetike. (Findrik Blažević, 2017) Michaelis i Menten su 1913. godine predložili hipotezu za enzimatski kataliziranu reakciju koja se odvija u dva slijedna koraka. U prvom koraku supstrat se veže za aktivno mjesto enzima u povratnoj reakciji pri čemu nastaje međukompleks ES. U sljedećem koraku supstrat se pretvara u produkt te ga enzim otpušta, a enzim je spreman za novi ciklus reakcije katalize. (Illanes, 2008.)

Mehanizam enzimski reakcije prema Michaelis-Menteničinom modelu prikazan je sljedećom jednačinom:



Slovo  $S$  označava supstrat,  $E$  enzim,  $ES$  međukompleks, a  $P$  produkt. Konstante brzine reakcija označene su slovom  $k$ :  $k_1$  je konstanta brzine nastajanja međuprodukta  $ES$ ,  $k_2$  je konstanta povratne reakcije nestajanja međukompleksa  $ES$ , a  $k_3$  je konstanta nastajanja produkta  $P$ . Iz bilančnih jednačbi za supstrat, međukompleks i produkt za kotlasti reaktor dobiva se konačan izraz za Michaelis-Menteničinu kinetiku:

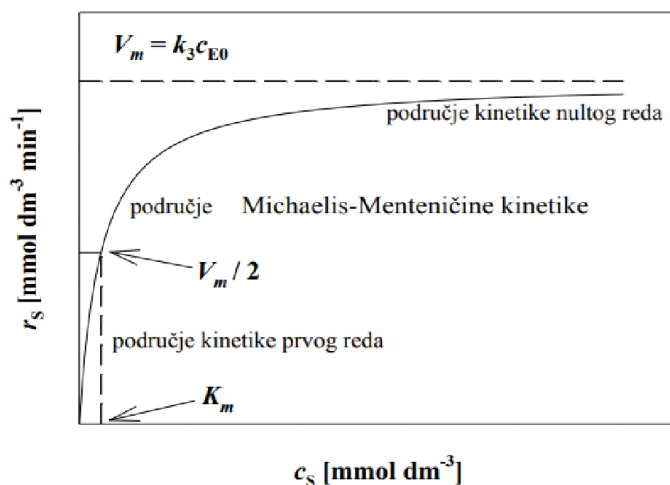
$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s} \quad (2)$$

Parametar  $V_m$  označava maksimalnu brzinu reakcije, a jednaka je umnošku katalitičke konstante enzima ( $k_3$ ) i početne koncentracije enzima  $c_{e0}$  (jedn. 3). Parametar  $K_m$  je omjer kinetičkih konstanti ( $k_1$ ,  $k_2$ , i  $k_3$ ) (jedn. 4). Ako je vrijednost  $K_m$  velika to znači da enzim nema dobar afinitet prema supstratu. Vrijednost  $K_m$  također se opisuje i kao koncentracija supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne što je vidljivo na slici 4.

$$V_m = k_3 \cdot c_{e0} \quad (3)$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (4)$$

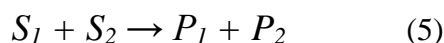
Grafom je prikazana ovisnost brzine reakcije  $r_s$  o koncentraciji supstrata  $c_s$ .



**Slika 4.** Graf ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata

Vidljivo je da graf ima oblik hiperbole koja se može podijeliti u tri dijela. Kod niskih koncentracija supstrata brzina reakcije proporcionalno raste s koncentracijom supstrata što se opisuje kinetikom prvog reda, a kod visokih koncentracija supstrata brzina reakcije gotovo niti ne mijenja vrijednost što se opisuje kinetikom nultog reda. Između ova dva područja nalazi se područje koje se opisuje pomoću Michaelis-Menteničine kinetike. (Findrik Blažević, 2017)

Kada u enzimatskoj reakciji sudjeluje više supstrata, izraz za Michaelis-Menteničinu kinetiku postaje složeniji. Većina enzimatskih reakcija je dvosupstratna, a Michaelis-Menteničina jednadžba za dvosupstratnu kinetiku ima sljedeći oblik (jedm. 6) (Leaković, 2018):



$$r_s = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) \cdot (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (6)$$

Do smanjenja aktivnosti enzima koja se očituje smanjenjem brzine reakcije dolazi zbog prisutnosti tvari koje ometaju njihovo djelovanje. Te tvari nazivaju se inhibitori, a to može biti supstrat ili produkt. Postoje tri vrste inhibicije: kompetitivna, nekompetitivna i antikompetitivna. Kompetitivna inhibicija nastaje kada se inhibitor veže za aktivno mjesto



enzima i time onemogućuje vezanje supstrata na enzim, dakle supstrat i inhibitor se natječu za aktivno mjesto enzima (jedn. 7). Nekompetitivna inhibicija nastaje kada se inhibitor veže na bilo koje mjesto na enzimu i time ometa vezanje supstrata na aktivno mjesto (jedn. 8). Antikompetitivna inhibicija je kombinacija kompetitivne i nekompetitivne inhibicije (jedn. 9). (Pintarić, 2015). Inhibicija supstratom opisana je jednačinom 10. (Findrik Blažević, 2017)

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s} \quad (7)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(K_m^s + c_s) \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (8)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (9)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s + \frac{c_s^2}{K_{is}}} \quad (10)$$

### 2.5.2. Reaktorski model

Reaktori su procesni uređaji u kojima se provodi kemijska reakcija, dok se u bioreaktorima provodi bioproces. Obzirom na način proizvodnje, bioreaktore dijelimo na fermentore i enzimске reaktore. U fermentorima se proizvodnja odvija pomoću živih mikroorganizama ili njihovih dijelova (stanica), a u enzimskim reaktorima reakcija se odvija pomoću enzima. Bioreaktori za razliku od kemijskih reaktora zahtijevaju sterilnost jer se radi sa živim organizmima. Također su različite i vrste separacije proizvoda jer u bioreaktorima često nastaju osjetljive organske molekule poput proteina. (Findrik Blažević, 2017)

Osnovni tipovi bioreaktora su: kotlasti (šaržni), protočno kotlasti i cijevni reaktor. Kriteriji prema kojima se odabire tip reaktora su tip reakcijskog medija, tip kinetike i oblik biokatalizatora. Cilj proizvodnje je što veća produktivnost odnosno što veća količina produkta po jedinici reaktorskog volumena, jedinici enzimске aktivnosti biokatalizatora i jedinici vremena. (Leaković, 2017)

### 2.5.2.1. Kotlasti reaktor

Kotlasti reaktor je česti tip reaktora u industriji u kojem se za vrijeme reakcije reakcijska smjesa ne izmjenjuje s okolinom. Obično je izveden u obliku kotla sa miješalom i plaštom za grijanje i hlađenje. Idealnim miješanjem u reaktoru pretpostavlja se da su vrijednosti svih parametara jednake u bilo kojoj točki volumena reaktora. Parametri kotlastog reaktora su ovisni o vremenu što znači da kotlasti reaktor radi u nestacionarnom stanju. (Kosar, 2017)

Uz navedene pretpostavke slijedi bilanca za množinu tvari (jedm. 11).

$$r_A \cdot V = - \frac{dn_A}{dt} \quad (11)$$

A uz pretpostavku da je i volumen reaktora konstantan slijedi jednačba (12).

$$r_A = - \frac{dc_A}{dt} \quad (12)$$

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. APARATURA

##### 3.1.1. Analitička vaga

Za mjerenje mase čvrste tvari koja se koristila u svrhu eksperimenta korištena je analitička vaga *Shimadzu* (slika 5.).



Slika 5. Analitička vaga *Shimadzu*

##### 3.1.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar je uređaj koji mjeri količinu apsorbiranog zračenja. Određene tvari apsorbiraju elektromagnetsko zračenje, stoga je intenzitet izlazne svjetlosti manji od intenziteta ulazne svjetlosti. Apsorpcija se matematički opisuje Lambert-Beerovim zakonom koji je prikazan sljedećim izrazom (jedn. 13),

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (13)$$

Intenzitet ulazne svjetlosti  $I_0$  smanjuje se prolaskom kroz otopinu određene koncentracije tvari  $c$  koja apsorbira elektromagnetsko zračenje. Apsorpcija zračenja ovisi o koncentraciji otopine,  $c$ , duljini puta prolaska svjetlosti,  $b$  i molarnom apsorpcijskom koeficijentu,  $\varepsilon$ , koji je specifičan za svaku tvar i mijenja se valnom duljinom. (Leaković, 2017)

U svrhu eksperimenta korišten je UV-VIS spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* (slika 6.).



**Slika 6.** Spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

## **3.2. ANALITIČKE METODE**

### **3.2.1. Određivanje aktivnosti enzima u reakciji redukcije acetona**

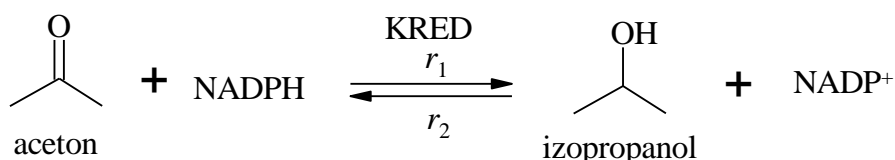
Da bi se odabrao enzim koji pokazuje najveću aktivnost u reakciji redukcije acetona, ispitana je aktivnost za 24 enzima za navedenu reakciju. Na spektrofotometru je ispitana ovisnost apsorbancije o vremenu za koenzim NADPH pri valnoj duljini od 340 nm.

Volumen testa je bio 1 mL. Test je uključivao aceton koncentracije  $c_{\text{ACETON}} = 340$  mM, NADPH koncentracije  $c_{\text{NADPH}} = 0,12$  mM i enzim koncentracije  $\gamma_{\text{ENZIM}} = 1$  mg/mL. Mjerenja su provedena u 100 mM fosfatnom puferu pH vrijednosti 8, pri sobnoj temperaturi.

Da bi se potvrdila točnost mjerenja, za dva enzima, koja su pokazivala najveću apsorbanciju u vremenu, ponovljena su mjerenja sa deset puta manjom koncentracijom enzima.

### 3.2.2. Kinetička karakterizacija ketoreduktaze u reakciji redukcije acetona

Reakcija redukcije acetona je ravnotežna reakcija. Supstrati u navedenoj reakciji su aceton i koenzim NADPH, a produkti su izopropanol i NADP<sup>+</sup>. U ovom radu kinetika enzima (ketoreduktaze) određena je u naprednoj i povratnoj reakciji redukcije acetona.



Slika 7. Shema reakcije redukcije acetona

#### 3.2.2.1. Redukcija acetona

Na temelju prethodnih mjerenja odabran je enzim sa najvećom aktivnošću za određivanje kinetike u reakciji redukcije acetona.

Kinetika enzima u reakciji redukcije acetona uz istovremenu oksidaciju koenzima NADP<sup>+</sup> ispitana je spektrofotometrijski metodom početnih brzina. Sva mjerenja su provedena u fosfatnom puferu koncentracije  $c_{\text{FOSFATNI PUFER}}=100$  mM i pH vrijednosti 8 pri sobnoj temperaturi. Svaki test sadržavao je enzim koncentracije  $\gamma_{\text{ENZIM}}=0,1$  mg/mL. Ukupan volumen komponenti u kiveti iznosio je 1 mL.

Za određivanje kinetike enzima u reakciji redukcije acetona bilo je potrebno ispitati utjecaj koncentracije oba supstrata. Prvo je ispitan utjecaj acetona variranjem koncentracije u rasponu od 7 mM do 1600 mM, dok je koncentracija NADPH bila konstantna,  $c_{\text{NADPH}}=0,1$  mM. Potom je ispitan utjecaj drugog supstrata, NADPH, variranjem koncentracije u rasponu od 0,0005 mM do 0,2597 mM, dok je koncentracija acetona bila konstantna,  $c_{\text{ACETON}}=300$  mM.

Također su provedena mjerenja kako bi se ispitao utjecaj oba produkta, izopropanola i NADP<sup>+</sup>, na aktivnost enzima. Utjecaj izopropanola na aktivnost enzima ispitan je variranjem koncentracije izopropanola u rasponu od 0 mM do 800 mM. Koncentracije oba supstrata su bile konstantne,  $c_{\text{ACETON}}=300$  mM,  $c_{\text{NADPH}}=0,1$  mM. Utjecaj produkta NADP<sup>+</sup> na aktivnost enzima ispitan je variranjem koncentracije NADP<sup>+</sup> u rasponu od 0 mM do 24,64 mM. Koncentracije oba supstrata, acetona i NADPH, su bile konstantne,  $c_{\text{ACETON}}=300$  mM,  $c_{\text{NADPH}}=0,1$  mM.

Na temelju mjernih podataka, ovisnosti apsorbancije o vremenu, izračunata je specifična aktivnost za svaku koncentraciju prema navedenim izrazima za volumnu i specifičnu aktivnost (jedn. 14 i 15).

$$A_V = \frac{V_r}{\epsilon_{340} \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (14)$$

$$A_S = \frac{A_V}{\gamma_E} \quad (15)$$

U jednadžbama (14) i (15)  $V_r$  predstavlja ukupni volumen u kvarcnoj kiveti [mL],  $\epsilon_{340}$  ekstinkcijski koeficijent pri  $\lambda=340$  nm [6,22 cm<sup>2</sup>/μmol],  $d$  je promjer kvarcne kivete [cm],  $V_E$  je volumen dodanog enzima [mL],  $\gamma_E$  je koncentracija dodanog enzima [mg/mL], a  $\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$  je promjena apsorbancije u vremenu [min<sup>-1</sup>].

### 3.2.2.2. Oksidacija izopropanola

Osim napredne reakcije, redukcije acetona, ispitana je i kinetika povratne reakcije, oksidacije izopropanola. Kao i kod napredne reakcije mjerenja su provedena na spektrofotometru metodom početnih brzina u puferu koncentracije  $c_{\text{FOSFATNI PUFER}} = 100$  mM, pH vrijednosti 8, pri sobnoj temperaturi i konstantnoj koncentraciji enzima  $\gamma_{\text{ENZIM}} = 0,1$  mg/mL. Ukupni volumen otopine iznosio je 1 mL.

Prvo je ispitan utjecaj oba supstrata na kinetiku reakcije. Koncentracija izopropanola varirana je u rasponu od 13 mM do 2603 mM dok je koncentracija drugog supstrata, NADP<sup>+</sup>, bila konstantna,  $c_{\text{NADP}^+} = 4,9$  mM. Potom je ispitan utjecaj drugog supstrata, NADP<sup>+</sup>. Koncentracija NADP<sup>+</sup> varirana je u rasponu od 0,005 mM do 7,4 mM, dok je koncentracija izopropanola bila konstantna,  $c_{\text{IZOPROPANOL}} = 1301$  mM.

Kako bi se ispitaio utjecaj promjene koncentracije produkata na aktivnost enzima provedena su mjerenja sa variranjem koncentracije oba produkta. Prvo je ispitan utjecaj acetona variranjem koncentracije u rasponu od 0 mM do 2724 mM uz konstantne koncentracije supstrata izopropanola,  $c_{\text{IZOPROPANOL}} = 1301$  mM i NADP<sup>+</sup>,  $c_{\text{NADP}^+} = 0,2$  mM. Potom je ispitan utjecaj drugog produkta, NADPH, na aktivnost enzima variranjem koncentracije u rasponu od

0 mM do 0,240 mM, dok su koncentracije supstrata izopropanola i  $\text{NADP}^+$  bile konstantne,  $c_{\text{IZOPROPANOL}} = 1301 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 0,2 \text{ mM}$ .

Na temelju mjernih podataka, ovisnosti apsorbancije o vremenu, izračunate su specifične aktivnosti prema prethodno navedenim izrazima (jedn. 14 i 15).

### **3.3. OBRADA PODATAKA**

Eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu *Scientist*. Na temelju matematičkog modela i procijenjenih parametara provedena je simulacija u istom programu. Parametri su procijenjeni nelinearnom regresijom pomoću metode najmanjih kvadrata i simpleks metode. Ove metode za cilj imaju pronaći minimalni zbroj kvadrata greške između seta podataka izračunatih pomoću modela i seta eksperimentalnih podataka. Simulacija se provodi rješavanjem diferencijalnih jednadžbi određenog modela.

Parametri kao što su Michaelis-Menteničina konstanta, maksimalna brzina reakcije i konstante inhibicije procijenjeni su iz seta eksperimentalnih podataka, odnosno ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata i produkata. Ovi parametri su korišteni za simulaciju pomoću modela koji omogućuje predviđanje vremenske ovisnosti koncentracije reaktanata i produkata u kotlastom reaktoru.

## 4. MATEMATIČKI MODEL

Matematički model reakcije redukcije acetona uz istovremenu regeneraciju koenzima  $\text{NADP}^+$  sastoji se od kinetičkog i reaktorskog modela.

### 4.1. KINETIČKI MODEL

Reakcija redukcije acetona je ravnotežna reakcija. Kinetički model sastoji se od jednačbe (16) za redukciju acetona (napredne reakcije) i jednačbe (17) za oksidaciju izopropanola (povratne reakcije). Obje reakcije opisane su dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom sa uključenom kompetitivnom inhibicijom. Kinetika reakcije redukcije acetona uključuje kompetitivnu inhibiciju produktima, izopropanolom i  $\text{NADP}^+$ , te inhibiciju supstratom, acetonom. Kinetika reakcije oksidacije izopropanola uključuje kompetitivnu inhibiciju produktima,  $\text{NADPH}$  i acetonom.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot \gamma_{enzim} \cdot c_{aceton} \cdot c_{NADPH}}{\left( K_m^{aceton} \cdot \left( 1 + \frac{c_{izopropanol}}{K_i^{izopropanol}} \right) + c_{aceton} + \frac{c_{aceton}^2}{K_{is}^{aceton}} \right) \cdot \left( c_{NADPH} + K_m^{NADPH} \cdot \left( 1 + \frac{c_{NADP^+}}{K_i^{NADP^+}} \right) \right)} \quad (16)$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot \gamma_{enzim} \cdot c_{izopropanol} \cdot c_{NADP^+}}{\left( K_m^{izopropanol} \cdot \left( 1 + \frac{c_{aceton}}{K_i^{aceton}} \right) + c_{izopropanol} \right) \cdot \left( K_m^{NADP^+} \cdot \left( 1 + \frac{c_{NADPH}}{K_i^{NADPH}} \right) + c_{NADP^+} \right)} \quad (17)$$

### 4.2. REAKTORSKI MODEL

Reaktorski model ravnotežne reakcije redukcije acetona se sastoji od bilancnih jednačbi promjene koncentracija reaktanata i produkata s vremenom za kotlasti reaktor (jedn. 18, 19, 20 i 21). Bilance su napisane na temelju sheme reakcije redukcije acetona (slika 7.).

$$\frac{dc_{aceton}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (18)$$



$$\frac{dc_{\text{izopropanol}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (19)$$

$$\frac{dc_{\text{NADPH}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (20)$$

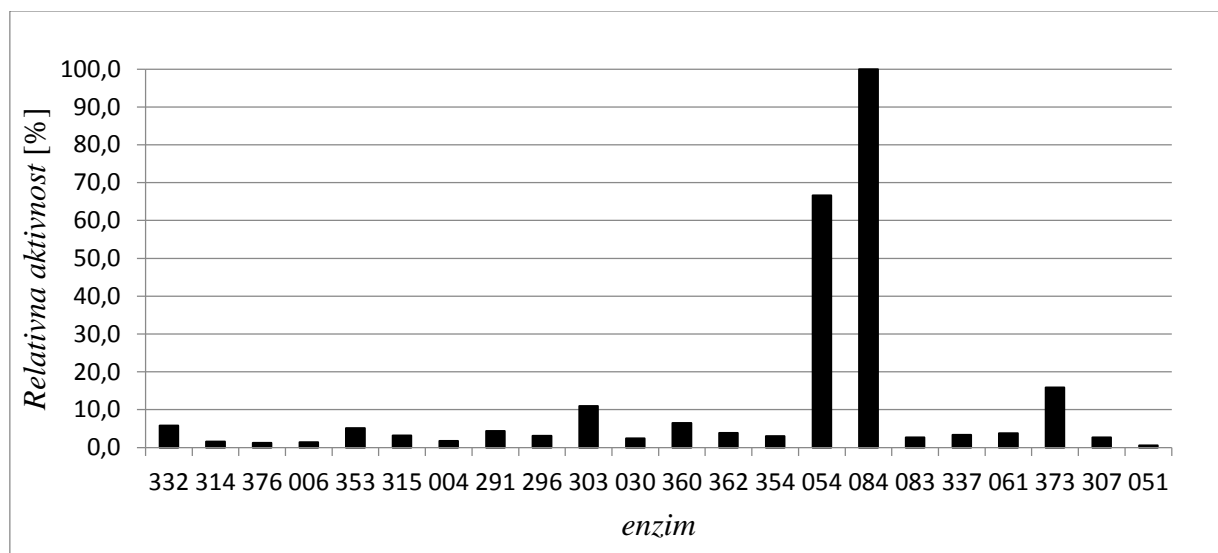
$$\frac{dc_{\text{NADP}^+}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (21)$$

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

U reakcijama koje kataliziraju ketoreduktaze koje za svoju aktivnost zahtijevaju prisutnost koenzima nužno je pronaći adekvatnu metodu regeneracije koenzima. U okviru ovog rada ispitala se reakcija redukcije acetona katalizirana ketoreduktazom kao potencijalna metoda za regeneraciju koenzima NADP<sup>+</sup>. Prisutnost navedenog koenzima je nužna u reakcijama oksidacije alkohola ili aldehida kataliziranim oksidoreduktazama. U svrhu ispitivanja potencijalne metode regeneracije kinetički je karakteriziran enzim, te je postavljen matematički model redukcije acetona u kotlastom reaktoru.

### 5.1. TESTIRANJE AKTIVNOSTI ENZIMA U REAKCIJI REDUKCIJE ACETONA

U svrhu ispitivanja reakcije redukcije acetona kao metode regeneracije koenzima testirane su 24 ketoreduktaze proizvođača Prozomix (slika 8.). Enzim 084 pokazao je najveću aktivnost u reakciji redukcije acetona, te je ovaj enzim odabran za daljnja ispitivanja.



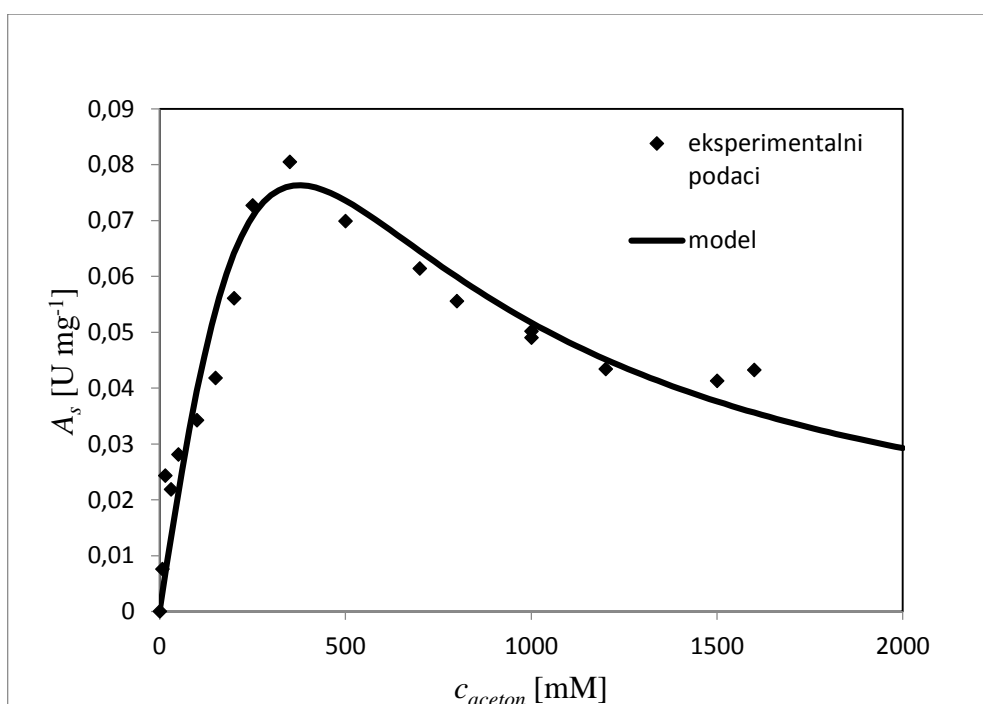
Slika 8. Graf relativne aktivnosti za testirane enzime u reakciji redukcije acetona

## 5.2. KINETIČKA KARAKTERIZACIJA OKSIDOREDUKTAZE U REAKCIJI REDUKCIJE ACETONA

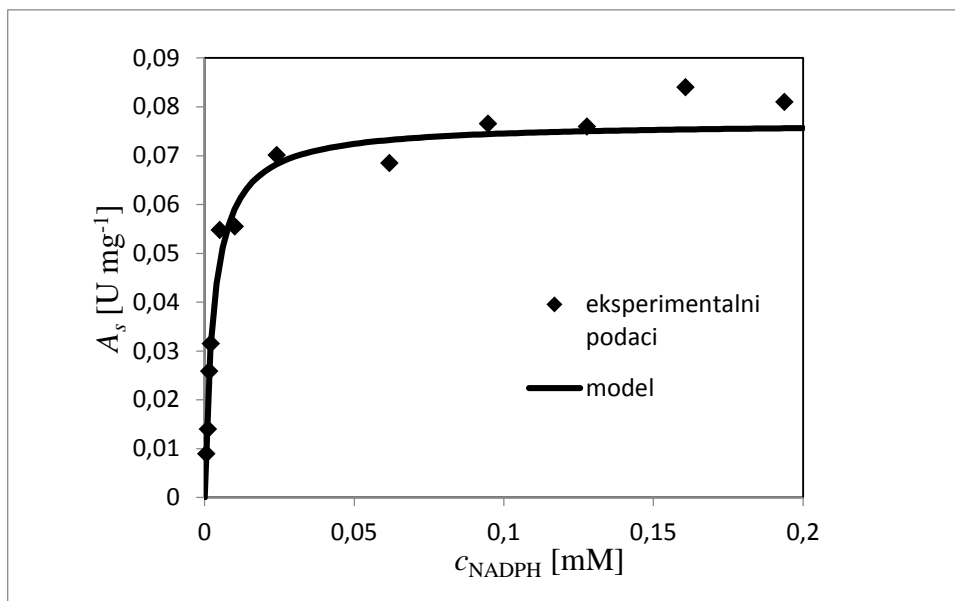
Za ispitivanje kinetike enzima za ravnotežnu reakciju redukcije acetona odabran je enzim 084 koji je pokazao najveću aktivnost. Kinetika ketoreduktaze ispitana je za naprednu reakciju, redukciju acetona te za povratnu reakciju, oksidaciju izopropanola. Kinetika enzima ispitana je metodom početnih brzina na spektrofotometru te su rezultati prikazani kao ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata te o koncentraciji produkata.

### 5.2.1. Redukcija acetona

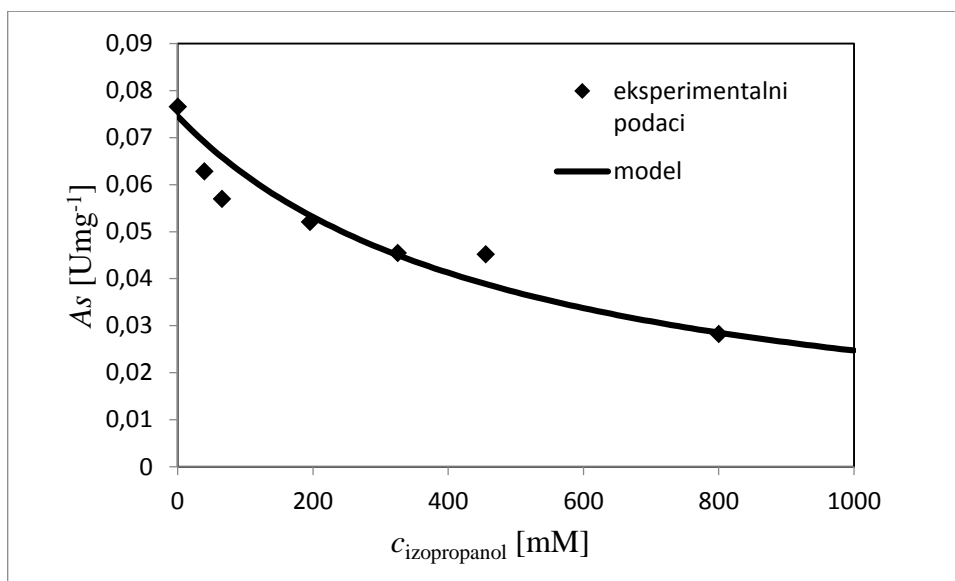
U reakciji redukcije acetona supstrati su aceton i koenzim NADPH, a produkti reakcije su izopropanol i NADP<sup>+</sup>. Kinetika ketoreduktaze u reakciji ispitana je metodom početnih brzina i prikazana kao ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, acetona i NADPH (slike 9. i 10.), te produkata, izopropanola i NADP<sup>+</sup> (slike 11. i 12.).



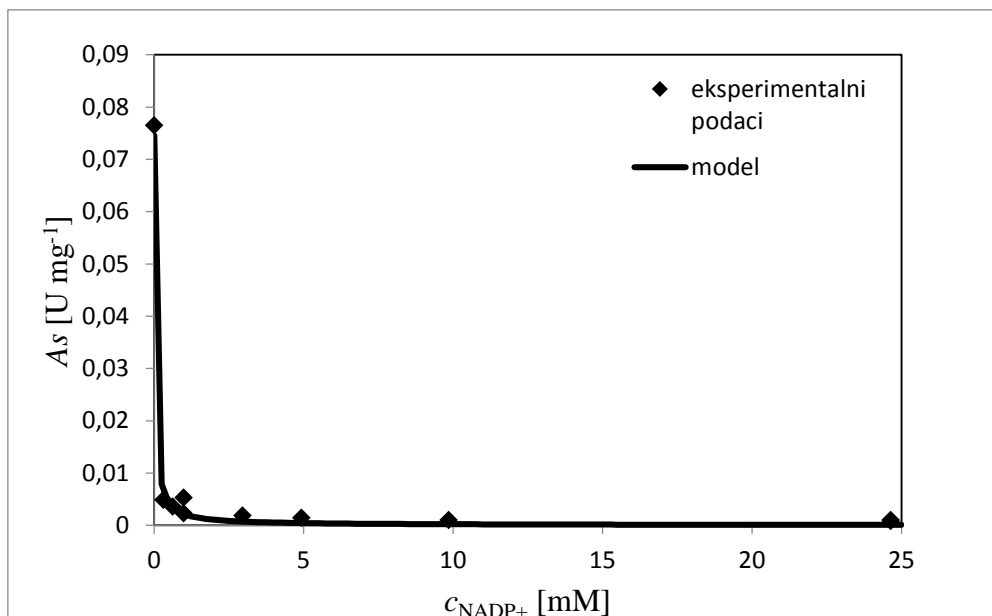
**Slika 9.** Ovisnost početne brzine reakcije redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom o koncentraciji acetona ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $C_{\text{fosfatni puffer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1 \text{ mg/mL}$ ,  $C_{\text{NADPH}} = 0,1 \text{ mM}$ ,  $C_{\text{aceton}} = 7 - 1600 \text{ mM}$ )



**Slika 10.** Ovisnost početne brzine reakcije redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom o koncentraciji NADPH ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{aceton}} = 300 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 0,0005 - 0,2597 \text{ mM}$ )



**Slika 11.** Utjecaj izopropanola na početnu brzinu reakcije redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{aceton}} = 300 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 0,1 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{izopropanol}} = 0 - 800 \text{ mM}$ )



**Slika 12.** Utjecaj  $\text{NADP}^+$  na početnu brzinu reakcije redukcije acetona katalizirane oksidoreduktazom ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{acetone}} = 300 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 0,1 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 0 - 24,64 \text{ mM}$ )

Ispitivanjem utjecaja koncentracije acetona na početnu brzinu reakcije redukcije acetona uz ketoreduktazu iz slike 9 je vidljivo da je reakcija inhibirana supstratom. Također je ispitivanjem utjecaja koncentracije izopropanola i  $\text{NADP}^+$  na kinetiku reakcije redukcije acetona utvrđena inhibicija sa oba produkta, izopropanolom (slika 11.) i  $\text{NADP}^+$  (slika 12.).

Kinetika reakcije redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom sa uključenom inhibicijom supstratom, acetonom, te kompetitivnom inhibicijom produktima, izopropanolom i  $\text{NADP}^+$  (jedn. 16). Vrijednosti parametara modela (tablica 1.), maksimalne brzine reakcije ( $V_{m1}$ ), Michaelis-Menteničine konstante za acetone ( $K_m^{\text{acetone}}$ ) i  $\text{NADPH}$  ( $K_m^{\text{NADPH}}$ ), konstante inhibicije za supstrat ( $K_i^{\text{supstrat}}$ ) i produkte izopropanol ( $K_i^{\text{izopropanol}}$ ) i  $\text{NADP}^+$  ( $K_i^{\text{NADP}^+}$ ) procijenjenje su nelinearnom regresijom iz eksperimentalnih podataka (slike 9-12).

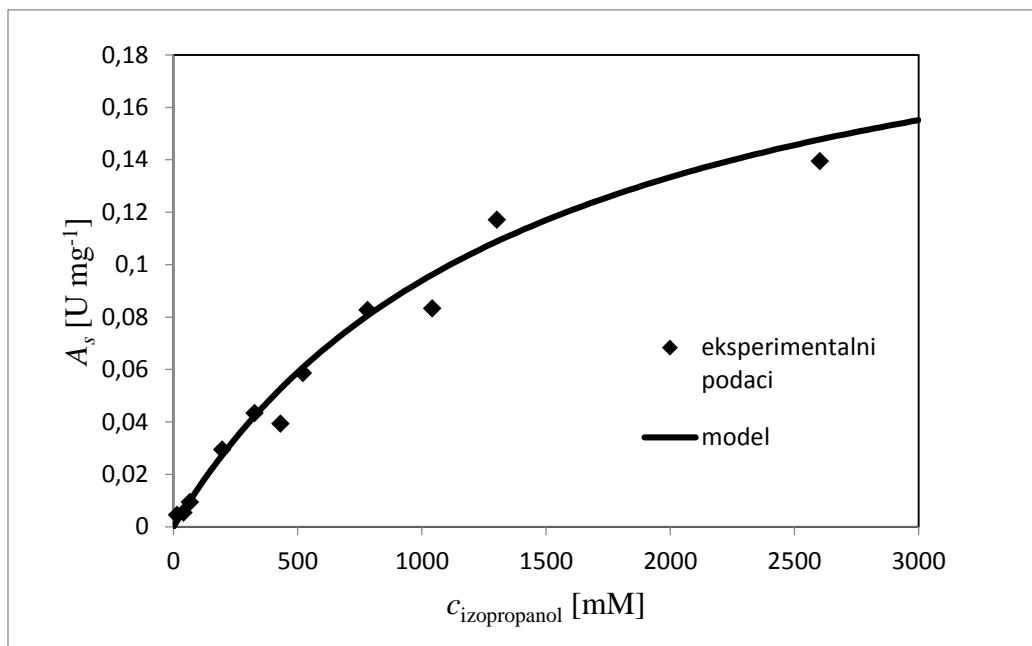
**Tablica 1.** Kinetički parametri u reakciji redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom

Parametar	Vrijednost
$V_{m1} [\text{U mg}^{-1}]$	$0,991 \pm 1,874$
$K_m^{aceton} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$2185,094 \pm 4484,036$
$K_m^{NADPH} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$0,003 \pm 0,001$
$K_{is}^{aceton} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$64,907 \pm 130,564$
$K_i^{izopropanol} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$279,919 \pm 41,084$
$K_i^{NADP^+} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$0,001 \pm 0,000$

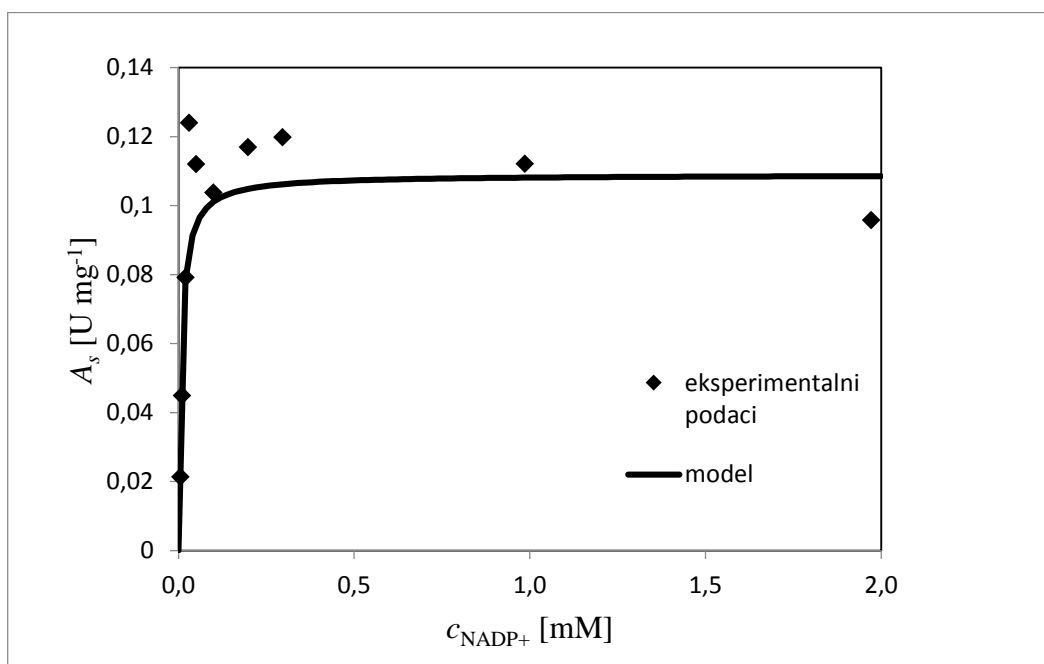
Vrijednost Michaelis-Menteničine konstante nam govori o afinitetu enzima prema supstratu, stoga iz procijenjenih vrijednosti konstante  $K_m$  za aceton i NADPH (tablica 1.) vidljivo je da je afinitet enzima znatno veći prema NADPH u odnosu na aceton. Iz procijenjenih vrijednosti konstante inhibicije za supstrat i produkte može se zaključiti da je reakcija redukcije acetona katalizirana ketoreduktazom značajno inhibirana produktom  $\text{NADP}^+$ .

### 5.2.2. Oksidacija izopropanola

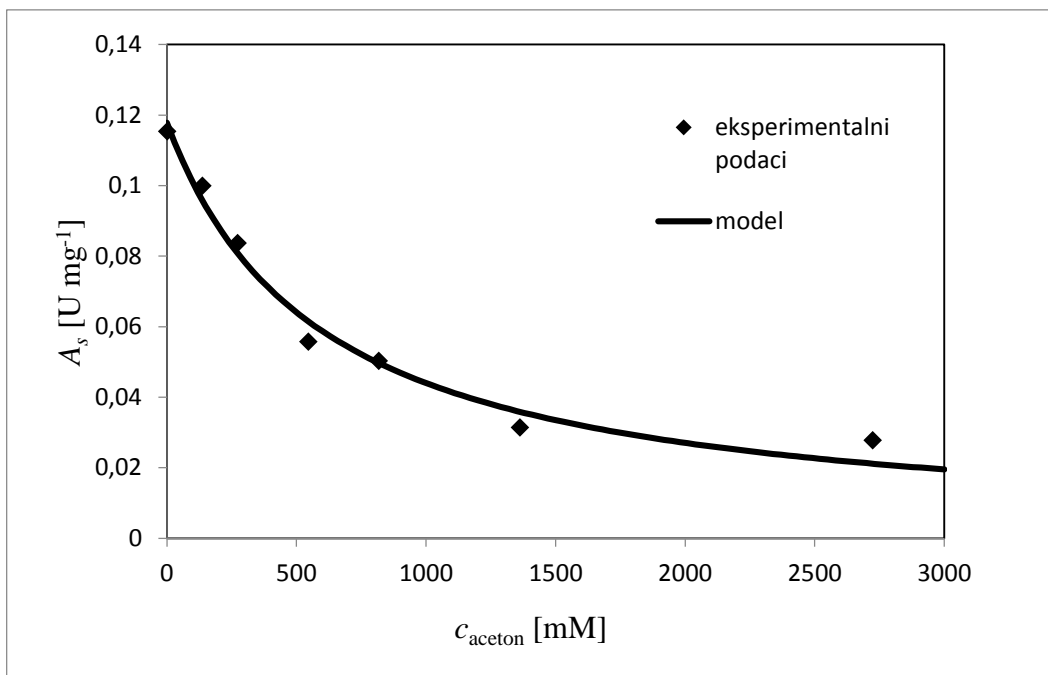
Oksidacija izopropanola je povratna reakcija redukcije acetona. Reaktanti su izopropanol i koenzim  $\text{NADP}^+$ , a produkti reakcije su aceton i reducirani oblik koenzima, NADPH. Za određivanje kinetike reakcije ispitan je utjecaj koncentracije supstrata, izopropanola i  $\text{NADP}^+$  (slike 13 i 14), na početnu brzinu reakcije te utjecaj koncentracije produkata, acetona i NADPH (slike 15 i 16), na aktivnost enzima.



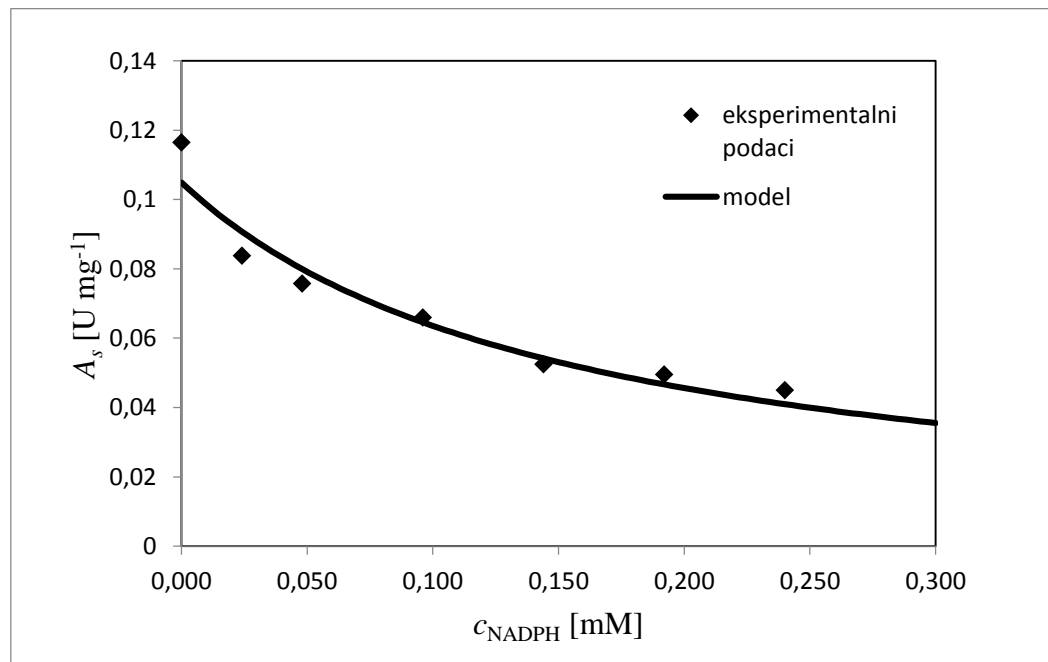
**Slika 13.** Ovisnost početne brzine reakcije oksidacije izopropanola katalizirane ketoreduktazom o koncentraciji izopropanola ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 4,9 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{izopropanol}} = 13 - 2603 \text{ mM}$ )



**Slika 14.** Ovisnost početne brzine reakcije oksidacije izopropanola katalizirane ketoreduktazom o koncentraciji  $\text{NADP}^+$  ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{izopropanol}} = 1301 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 0,005 - 7,4 \text{ mM}$ )



**Slika 15.** Utjecaj acetona na početnu brzinu reakcije oksidacije izopropanola katalizirane ketoreduktazom ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{izopropanol}} = 1301 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 0,2 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{acetone}} = 0 - 2724 \text{ mM}$ )



**Slika 16.** Utjecaj NADPH na početnu brzinu reakcije oksidacije izopropanola katalizirane ketoreduktazom ( $T = 25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\text{pH} = 8$ ,  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1 \text{ mg/mL}$ ,  $c_{\text{izopropanol}} = 1301 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 0,2 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 0 - 0,240 \text{ mM}$ )



Ispitivanjem utjecaja koncentracije produkata, acetona i NADPH, na početnu brzinu reakcije oksidacije izopropanola katalizirane ketoreduktazom iz slika 15. i 16. je vidljivo da oba produkta smanjuju aktivnost enzima, odnosno inhibiraju ga.

Kinetika reakcije oksidacije izopropanola katalizirane ketoreduktazom opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom sa uključenom kompetitivnom inhibicijom produktima, acetonom i NADPH (jedin. 17).

Procijenjeni kinetički parametri, maksimalna brzina reakcije ( $V_{m2}$ ), Michaelis-Menteničina konstanta za izopropanol ( $K_m^{izopropanol}$ ) i  $NADP^+$  ( $K_m^{NADP^+}$ ) te konstanta inhibicije za aceton ( $K_i^{aceton}$ ) i NADPH ( $K_i^{NADPH}$ ) dani su u tablici 2.

**Tablica 2.** Kinetički parametri u reakciji oksidacije izopropanola katalizirane ketoreduktazom

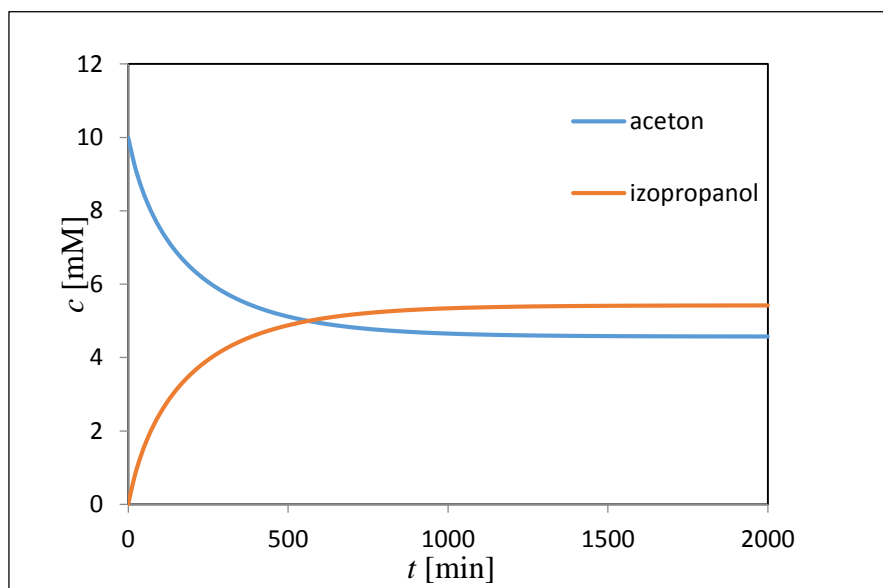
Parametar	Vrijednost
$V_{m2}$ [U mg <sup>-1</sup> ]	0,230 ± 0,046
$K_m^{izopropanol}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	1448,879 ± 542,582
$K_m^{NADP^+}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	0,008 ± 0,002
$K_i^{aceton}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	314,127 ± 37,872
$K_i^{NADPH}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	0,006 ± 0,000

Obzirom na vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante za izopropanol ( $K_m^{izopropanol}$ ) i  $NADP^+$  ( $K_m^{NADP^+}$ ) dane u tablici 2. vidljivo je da enzim ima veći afinitet prema  $NADP^+$  u odnosu na izopropanol. Kao što je vidljivo iz slika 15. i 16. ovisnosti početne brzine reakcije o koncentracijama produkata, acetona i NADPH, te njihovih procijenjenih konstanti inhibicije danih u tablici 2. može se zaključiti da je reakcija oksidacije izopropanola katalizirana ketoreduktazom značajno inhibirana produktom NADPH.

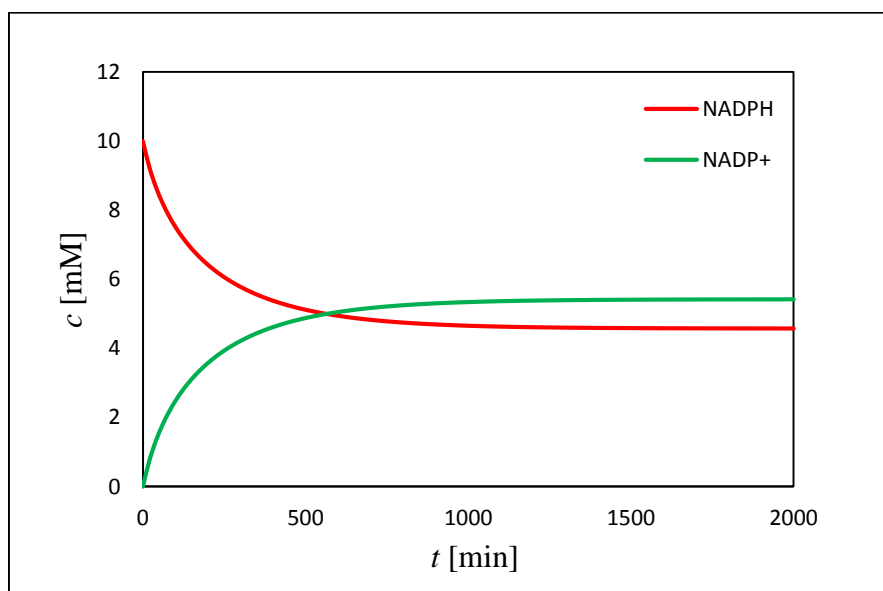
### 5.3. SIMULACIJA REAKCIJE REDUKCIJE ACETONA UZ REGENERACIJU KOENZIMA $NADP^+$

Simulacija reakcije redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom uz regeneraciju koenzima  $NADP^+$  za kotlasti reaktor provedena je u programskom paketu *Scientist* na temelju

napisanog matematičkog modela (poglavljje 4) i procijenjenih kinetičkih parametara (tablica 1. i 2.). Simulacija (slika 17.) opisuje vremensku ovisnost koncentracije reaktanata, acetona i NADPH, kao i produkata, izopropanola i NADP<sup>+</sup>. Postignuta ravnotežna konverzija acetona je 54,24 %.



a)



b)

**Slika 17.** Simulacija reakcije redukcije acetona uz regeneraciju koenzima NADPH u kotlastom reaktoru: a) vremenska ovisnost koncentracije acetona i izopropanola, b) vremenska ovisnost koncentracije NADPH i NADP<sup>+</sup> ( $\gamma_{ENZIM} = 10 \text{ mg/mL}$ )

## 6. ZAKLJUČAK

Reakcija redukcije acetona katalizirana ketoreduktazom uz regeneraciju koenzima  $\text{NADP}^+$  je ravnotežna reakcija. Kinetika ketoreduktaze ispitana je u naprednoj i povratnoj reakciji, redukciji acetona i oksidaciji izopropanola. Kinetika napredne reakcije opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom sa uključenom inhibicijom supstratom (acetonom) i kompetitivnom inhibicijom produktima (izopropanolom i  $\text{NADP}^+$ ). Kinetika povratne reakcije, oksidacije izopropanola, također je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom sa uključenom kompetitivnom inhibicijom produktima (acetonom i  $\text{NADPH}$ ).

Pomoću programskog paketa *Scientist* simulirana je vremenska ovisnost koncentracije reaktanata i produkata na temelju postavljenog matematičkog modela i procijenjenih parametara za kotlasti reaktor. Postignuta ravnotežna konverzija acetona iznosila je 54,24%.

## 7. LITERATURA

1. Chenault H.K., Whitesides G.M., Regeneration of Nicotinamide Cofactors for use in Organic Synthesis, review, *Applied Biochemistry and Biotechnology* 14 (1987), 147-197
2. Dunn I.J., Heinzle E., Ingham J., Prenosil J.E., *Biological Reaction Engineering, Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples*, Second, Completely Revised Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2003)
3. Findrik Blažević Z., *Bioreakcijska tehnika 1*, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2012)
4. Findrik Blažević Z., *Bioreaktori*, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017)
5. Hong W., Chunyong T., Xiaokai S., Chuang L., Dong Y., Zhongyi J., Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes, critical review, *Green chemistry* 15 (2013), 1773-1789
6. Illanes A., *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*, Springer (2008), 1-56
7. Kosar V., *Reaktori i bioreaktori, nastavni tekstovi*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017)
8. Leaković E., *Optimiranje reakcijskih uvjeta enzimatski katalizirane oksidacije  $\alpha$ -kloroaldehida*, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2018)
9. Martinez A.T., Ruis-Duenas F.J., Camarero S., Serrano A., Linde D., Lund H., Vind J., Tovborg M., Herold-Majumdar O.M., Hofrichter M., Liers C., Ullrich R., Scheibner K., Sannia G., Piscitelli A., Pezzella C., Sener M.E., Kilic S., Berkel W., Guallar V., Lucas M.F., Zuhse R., Ludwig R., Hollmann F., Fernandez-Fueyo E., Record E., Faulds C.B., Tortajada M., Winckelmann I., Rasmussen J., Gelo-Pujic M., Gutierrez A., Rio J., Rencoret J., Alcalde M., *Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations, reseach review paper*, *Biotechnology advances* 35, Elsevier (2017), 815-831
10. May S.W., *Applications of oxidoreductases*, *Current Opinion in Biotechnology* 10, Elsevier Science (1999), 370-375
11. May S.W., Padgett R.S., *Oxidoreductase Enzymes in Biotechnology: current status and future potential*, review article, *Bio/Technology* 1 (1983), 677-686

12. Peran J., Pušić T., Enzimi-bioinovatori u pranju rublja, Tekstilno-tehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2013)
13. Pintarić L., Proizvodnja optički aktivnog diola korištenjem višeenzimskog sustava, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2015)
14. Wang X., Saba T., Yiu H.P., Howe F.R., Anderson J.A., Shi J., Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways, Chem 2 (2017), 621-654

## 8. SIMBOLI I SKRAĆENICE

### GRČKI SIMBOLI

$\gamma$  – masena koncentracija enzima [mg/mL]

$\Delta$  - promjena

$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent [ $\text{cm}^2/\mu\text{mol}$ ]

$\lambda$  – valna duljina [nm]

### SIMBOLI

$A_S$  - specifična aktivnost biokatalizatora [ $\text{U mg}^{-1}$ ]

$A_V$  – volumna aktivnost biokatalizatora [ $\text{U mL}^{-1}$ ]

$b$  – duljina puta elektromagnetskog zračenja kroz uzorak [cm]

$c$  – koncentracija komponente [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]

$d$  – promjer kvarcne kivete [cm]

$k$  – konstanta brzine reakcije [ $\text{min}^{-1}$ ]

$K_i$  – konstanta inhibicije [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]

$K_m^S$  – Michaelis-Menteničina konstanta [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]

$n$  – množina tvari [mol]

pH – negativni logaritam koncentracije  $\text{H}^+$  iona u otopini

$r$  – brzina potrošnje supstrata (brzina reakcije) [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ]

$t$  – vrijeme [min]

$V$  – volumen [ $\text{dm}^3$ ]

$V_E$  – volumen dodanog enzima [mL]

$V_m$  – maksimalna brzina enzimatski katalizirane reakcije [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ]

$V_r$  – ukupan volumen u kvarcnoj kiveti [mL]

$X$  – konverzija [%]

## SKRAĆENICE

ABS – apsorbacija

E – enzim

ES – enzim-supstratski kompleks

$\text{NAD}^+$  - nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH – reducirani oblik  $\text{NAD}^+$

$\text{NADP}^+$  - nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

NADPH – reducirani oblik  $\text{NADP}^+$

P – produkt

S – supstrat

## 9. ŽIVOTOPIS

Barbara Kolić [REDACTED] Osnovno obrazovanje stječe u Osnovnoj školi „Eugen Kvaternik“ u Rakovici te se potom upisuje u Srednju školu Slunj, smjer opća gimnazija i završava ju 2014. godine. Iste godine upisuje preddiplomski studij Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Za vrijeme studija odradila je stručnu praksu u Znanstveno-stručnom centru „Dr. Ivo Pevalek“ u sklopu Nacionalnog parka Plitvička jezera.