

Matematički model aldolne adicije katalizirane D-fruktoza-6-fosfat aldolazom

Skendrović, Dino

Master's thesis / Diplomski 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:149:547336>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dino Skendrović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dino Skendrović

MATEMATIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE KATALIZIRANE D-
FRUKTOZA-6-FOSFAT ALDOLAZOM

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitne komisije:

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2018.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement No 635595

ZAHVALA

U prvom redu bih se zahvalio svojoj mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević koja mi je pisanje ovog diplomskog rada učinila puno lakšim zadatkom od očekivanog sa svojim stručnim savjetima i ispravicima, te svojom pristupačnošću i zainteresiranošću.

Zahvaljujem se i asistentici mag. ing. oecing. Morani Česnik na strpljivosti za sva moja pitanja i usmjeravanju tijekom eksperimentalnog dijela rada.

Zahvalio bih se i svojim roditeljima na stalnoj potpori tijekom svih ovih godina studiranja, te svojim prijateljima i kolegama koji su te godine učinili puno ugodnijima i zabavnijima.

Moram se zahvaliti i velikom znanstveniku, piscu i vizionaru Carl Saganu, bez čijih se knjiga u mojem umu nikada nebi ni izrodila ideja o upisivanju fakulteta tehničko-znanstvenog usmjerenja s 23 godine života i bez tračka srednjoškolskog predznanja, na šok i nevjericu svojih roditelja, prijatelja i samog sebe, koji su se srećom pokazali neosnovanima.

Sažetak

U ovom radu je proučavana aldolna adicija formaldehida i propanala katalizirana enzimom D-fruktoza-6-fosfat aldolazom. Pri tome su korištene tri varijante enzima od kojih je za Var I provedena ekspresija u transformiranim stanicama bakterije *Escherichia coli* M15.

Određena je kinetika aldolne adicije formaldehida i propanala u aldolni produkt 3-hidroksi-2-metilpropanal katalizirana sa tri varijante enzima D-fruktoza-6-fosfat aldolaze, te su na osnovu toga procijenjeni kinetički parametri reakcije.

Ispitan je utjecaj različitih koncentracija varijanti enzima FSA na nastajanje aldola u promatranoj reakciji aldolne adicije u kotlastom i kotlastom reaktoru uz dotok supstrata. Ispitan je i utjecaj metanola te povratne reakcije raspada aldola na nastajanje aldolnog produkta te specifičnu aktivnost varijanti enzima FSA. Rezultati su pokazali da je Var I najbolji kandidat za provođenje reakcije po pitanju kinetičkih konstanti i postignute koncentracije aldolnog produkta.

Ključne riječi: aldolna adicija, enzimi, D-fruktoza-6-fosfat aldolaza, kotlasti reaktor, kinetički parametri

Abstract

Examination of aldol addition of formaldehyde and propanal catalyzed by enzyme D-fructose-6-phosphate aldolase was carried out in this work. Three variants of enzyme were used, of which Var I was expressed in transformed cells of bacteria *Escherichia coli* M15 in this work.

Kinetics of aldol addition of formaldehyde and propanal into aldol adduct 3-hydroxy-2-methylpropanal catalyzed with three variants of enzyme D-fructose-6-phosphate aldolase was determined, and kinetic parameters of reaction were estimated.

The effect of different concentrations of FSA enzyme variants on aldol formation in observed reaction of aldol addition was tested in batch and fed-batch reactor.

The influence of reverse aldol reaction and methanol presence on formation of aldol adduct and specific activity of FSA variants was tested.

The overall results showed that Var I is the best candidate for carrying out examined reaction of aldol addition.

Key words: aldol addition, enzymes, D-fructose-6-phosphate aldolase, batch reactor, kinetic parameters

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	2
2.1. Enzimi	2
2.1.1. Enzimi općenito	2
2.1.2. Klasifikacija enzima	3
2.1.3. Aldolaze.....	4
2.1.4. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza.....	4
2.1.5. Primjena biokatalizatora u industriji.....	5
2.2. Aldolna adicija	7
2.3. Matematičko modeliranje.....	8
3. Eksperimentalni dio	10
3.1. Aparatura i kemikalije.....	10
3.1.1. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC).....	10
3.1.2. Magnetska miješalica	10
3.1.3. Aparatura za provođenje eksperimenta u kotlastom reaktoru s dotokom	11
3.1.4. Homogenizator	11
3.1.5. Analitička vaga	12
3.1.6. Centrifuga	12
3.1.7. Termostat.....	13
3.1.8. pH metar	13
3.1.9. Spektrofotometar	14
3.1.10. Inkubatorska tresilica.....	14
3.1.11. Ultrazvuk	15
3.1.12. Vodena kupelj.....	15
3.1.13. Sterilizator	16
3.1.14. Kemikalije	16
3.2. Analitičke metode.....	17
3.2.1. Mjerenje koncentracije reaktanata i produkata kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC)	17
3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima	18
3.2.3. Određivanje utjecaja pH vrijednosti na aktivnost enzima FSA	18
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	19
3.3. Ekspresija enzima FSA VarI iz transformiranih stanica M15	19
3.4. Ispitivanje utjecaja koncentracije formaldehida i propanala na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII u reakciji aldolne adicije.....	21
3.5. Ispitivanje utjecaja koncentracije enzima FSA VarI, VarII i VarIII na nastajanje aldola u kotlastom reaktoru	22
3.6. Ispitivanje utjecaja metanola na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII	23
3.7. Praćenje deaktivacije enzima FSA VarII i VarIII tijekom inkubacije s formaldehidom.....	23

3.8. Ispitivanje utjecaja enzima FSA VarII na reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru s dotokom	24
3.9. Ispitivanje povratne reakcije raspada aldola uz enzim FSA VarII i VarIII	25
4. Rezultati i rasprava.....	26
4.1. Ekspresija FSA VarI iz transformiranih stanica M15.....	26
4.2. Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost ADH iz konjske jetre	26
4.3. Utjecaj koncentracije formaldehida i propanala na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII u reakciji aldolne adicije.....	27
4.4. Utjecaj koncentracije enzima FSA VarI, VarII i VarIII na nastajanje aldola u kotlastom reaktoru	30
4.5. Deaktivacija enzima FSA VarII i VarIII tijekom inkubacije s formaldehidom.....	31
4.6. Utjecaj enzima FSA VarII na reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru s dotokom.....	33
4.7. Utjecaj metanola na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII.....	34
4.8. Utjecaj enzima FSA VarII i VarIII na povratnu reakciju raspada aldola.....	35
5. Zaključak.....	36
6. Prilozi.....	37
7. Popis simbola	41
8. Literatura	42
9. Životopis.....	45

1. Uvod

U današnjem svijetu se na enzimsku biokatalizu gleda sve povoljnije u pogledu kompetitivne i isplative alternative klasičnim kemijskim metodama za proizvodnju finih kemikalija, farmaceutika i agrokemijskih intermedijera. Enzimi imaju veliki potencijal u području katalize zbog mogućnosti velikih prinosa po jedinici biokatalizatora, kao i izražene razine selektivnosti, pogotovo u sintezi spojeva s jednim enantiomerom. Kroz prošlost korištenja biokatalize, većina uspješnih industrijskih primjena enzima bila je ograničena na hidrolitičke enzime kao što su lipaze i esteraze. To se u zadnje vrijeme mijenja, te u primjenu sve više ulaze enzimi koji mogu vršiti veliki raspon transformacija, uključujući asimetričnu redukciju, oksidaciju te formiranje ugljik-ugljik veza (Rubin-Pitel et al., 2003).

Matematički modeli enzimskih reakcija, naročito u kombinaciji s računalnim tehnologijama, su vrlo efikasno sredstvo za pronalazak optimalnih operacijskih uvjeta i okoliša za biokatalizator kako bi njegovu produktivnost doveli na najvišu moguću razinu. Iz tog razloga su proučavanje kinetike enzimskih i reakcijskih sustava i njihovo optimiranje od velike važnosti za praktičnu primjenu biokatalizatora (Vasić-Rački et al., 2003).

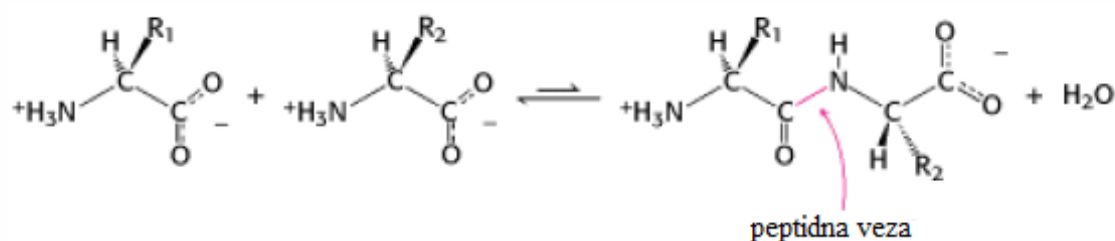
2. Opći dio

2.1. Enzimi

2.1.1. Enzimi općenito

Enzimi su biološki katalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije bez trajnih promjena na sebi samima. Velika većina enzima su proteini ili konjugirani proteini, iako su otkrivene i neke katalitički aktivne ribonukleinske kiseline. U usporedbi s klasičnim kemijskim katalizatorima, enzime karakterizira veća mogućnost ubrzavanja reakcije, efektivnost pri blažim reakcijskim uvjetima te izraženija reakcijska specifičnost prema reaktantima i produktima (DeLuca et al., 2001).

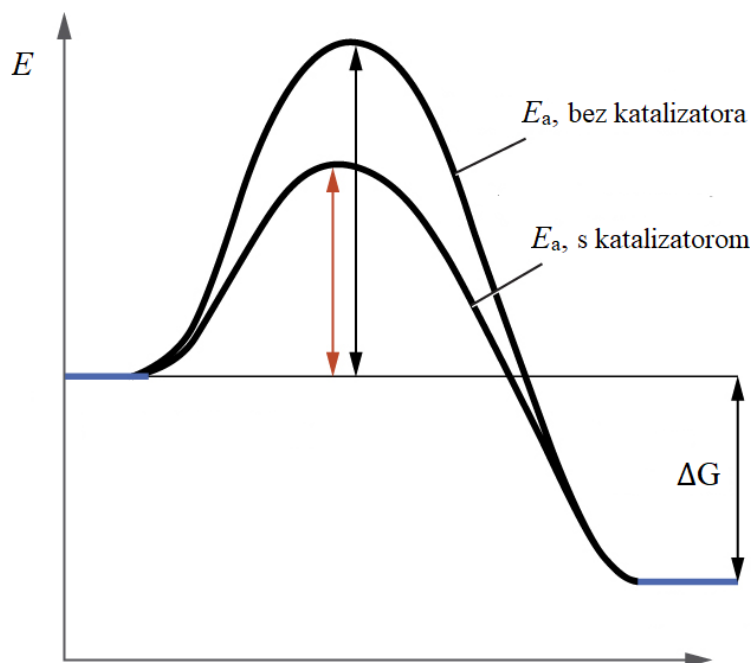
Struktura enzima kao proteina sastoji se od niza povezanih aminokiselina, gdje se α -karboksilna skupina jedne aminokiseline veže s α -amino skupinom druge aminokiseline tzv. peptidnom vezom. Ovisno o tome koja organska skupina se nalazi na kraju takvog polipeptidnog lanca, aminokiseline mogu biti polarne ili nepolarne (Berg et al., 2002).



Slika 2.1. Formiranje peptidne veze između dvaju aminokiselina

Katalitička aktivnost enzima odvija se na tzv. "aktivnom mjestu", koje čini 10-20 % ukupnog volumena enzima. Aktivno mjesto je najčešće hidrofilna šupljina koja sadrži mnoštvo bočnih lanaca aminokiselina koji vežu supstrate te provode enzymatsku reakciju. Aktivno mjesto može sadržavati i kofaktore koji pomažu pri katalizi određenih tipova reakcija. Obzirom da je aktivno mjesto enzima kiralno, prisutna je visoka selektivnost prema supstratima. Interakcije između enzima i supstrata mogu se odvijati preko elektrostatskih veza, vodikovih veza, Van der Waalsovih interakcija te hidrofobnih interakcija. Nakon vezanja sa supstratom, enzim katalizira specifičnu kemijsku reakciju, te produkt reakcije vraća natrag u otopinu (Bugg, 2004).

Sama mehanika katalize zasniva se na tome da katalizator, nakon što na sebe veže reaktante, nudi alternativni put reakcije u kojem je energija aktivacije potrebna da reaktanti prijeđu u produkte znatno niža nego u slučaju nekatalizirane reakcije, što je prikazano na slici 2.2. (Chorkendorff et al., 2003).



Slika 2.2. Energetski dijagram katalize

2.1.2. Klasifikacija enzima

Trenutno je poznato više od 2000 enzima, te je shodno tome razvijen sistem njihove klasifikacije koji u obzir uzima specifičnost enzima prema supstratu i tipu reakcije. Dije se u niže navedenih šest glavnih skupina (Saibi et al., 2012).

1. Oksidoreduktaze – enzimi koji kataliziraju oksidoredukcijske reakcije koje uključuju prijenos elektrona ili vodikovih i kisikovih atoma. Sadrže 22 podskupine te zahtijevaju koenzime.
2. Transferaze – enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalne skupine od donora do prikladnog akceptora. Postoji 9 podskupina, ovisno o kemijskoj prirode funkcionalne skupine koja se prenosi. Ovi enzimi imaju ključnu ulogu u staničnom metabolizmu.
3. Hidrolaze – enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize. Postoji 12 podskupina ovisno o tipu veze prisutnom u reakciji hidrolize. Ključne su za stanični katabolizam.

4. Liaze – enzimi koji kataliziraju reakcije ne-hidrolitičkog i ne-oksidativnog cijepanja kemijske veze. Dije se u 7 podskupina, ovisno o tipu prihvatljive kemijske veze koja se cijepa. Sve češća je njihova primjena u industriji.
5. Izomeraze – enzimi koji kataliziraju reakciju konverzije supstrata u izomer. Postoji 6 podskupina, ovisno o tome koji tip izomera nastaje u reakciji. Često nisu tehnološki iskoristive, izuzev glukoza izomeraze.
6. Ligaze – enzimi koji kataliziraju reakcije kovalentnog povezivanja molekula. Dije se u 6 podskupina, ovisno o tome koji tip kovalentne veze nastaje. Zaslužne su za stanični anabolizam (Illanes, 2008).

2.1.3. Aldolaze

Formacije ugljik-ugljik veza su jedna od najvažnijih reakcija u području sintetske organske kemije. Aldolaze su specifična grupa liaza koje kataliziraju reverzibilnu formaciju C-C veza preko aldolne adicije nukleofilnog donora, tipično ketona, na elektrofilni aldehid akceptor. Istodobno je stereokemija novo formiranih stereo centara u većini slučajeva striktno kontrolirana enzimom. Ovo čini aldolaze privlačnim alatom u područje sinteze kiralnih kompleksa i bioaktivnih spojeva (Clapés, 2009).

Iako su aldolaze vrlo specifične prema donorskoj komponenti, veliki broj aldehida može biti korišten kao akceptor, što daje širok raspon mogućim prirodnim ili sintetskim strukturama kao produktima. Reakcije s aldolazama su stereospecifične te daju produkte visoke optičke čistoće (Takayama et al., 1997).

Prema katalitičkom mehanizmu, razlikujemo dva tipa aldolaza: Tip I aldolaze koje formiraju Schiff baza intermedijer na aktivnom mjestu s supstratom donorom, te tip II aldolaze koje koriste Zn^{2+} kao kofaktor koji djeluje kao Lewisova kiselina na aktivnom mjestu. Tip I aldolaze se najčešće nalaze u životinjama, dok je tip II najčešće prisutan u bakterijama (Marsh et al., 1992).

2.1.4. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza

Jedna od većih limitacija enzima kao biokatalizatora, a pogotovo aldolaza, je vrlo stroga specifičnost prema supstratu. Supstrati često trebaju biti fosforilirani, a male promjene u strukturi supstrata često dovode do značajnog smanjenja aktivnosti. Nedostatak općenitosti i nemogućnost korištenja dostupnih supstrata je ograničila praktičnost aldolaza kao katalizatora

u organskoj sintezi. Jedna velika iznimka tom pravilu je nedavno otkrivena D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA), koja se funkcionalno razlikuje od poznatih aldolaza po svojoj toleranciji kako različitih supstrata donora, tako i supstrata akceptora (Sugiyama et al., 2007).

D-fruktoza-6-fosfat aldolaza dobiva se izolacijom iz stanica bakterije *Escherichia coli*, pripada tipu I aldolaza (formacija Schiff baza intermedijera s donorom na aktivnom mjestu) te pokazuje visoku aktivnost pri širokom rasponu pH i temperatura (Schürmann et al., 2001).

2.1.5. Primjena biokatalizatora u industriji

Ljudi su nesvjesno iskorištivali enzime tisućama godina u procesima fermentacije kojima su proizvodili i konzervirali prehrambene proizvode. U modernijoj povijesti, prvi veliki korak na području biokatalize napravio je Louis Pasteur 1858. kada je vodenu otopinu racemične tartarne kiseline i amonijevih soli tretirao s kulturom plijesni *Penicilium glaucum*, što je dovelo do trošenja (+)-tartarne kiseline i posljedičnog obogaćenja (-)-enantiomera. Ovaj postupak se smatra začetkom enzimski kataliziranih industrijskih procesa te je danas u širokoj upotrebi kako u akademskom, tako i industrijskom svijetu (Reetz, 2013).

U današnje vrijeme, iskoristivost biotransformacija u industrijskom okruženju je u stalnom porastu. Iako se procesi biotransformacije najčešće koriste za proizvodnju finih kemikalija, postoji nekoliko svijetlih primjera proizvodnje uobičajenih naširoko korištenih kemikalija. Jedan od njih je proizvodnja akrilamida uz pomoć nitril hidrataze iz bakterije *Rhodococcus rhodochrous*, koji tvrtka Mistubishi Rayon iz Japana proizvodi u količini od 30,000 tona godišnje. U pogledu same količine dobivenog produkta, vodeći primjer je svakako glukoza dobivena uz pomoć glukoza izomeraze, čija se proizvedena količina na globalnoj skali penje iznad 1,000,000 tona godišnje (Liese et al., 1999).

Neke od prednosti biokatalizatora naspram klasičnih kemijskih katalizatora, kako u industriji, tako i općenito, su sljedeće:

- Brzina katalize – u većini slučajeva, brzina procesa kataliziranih enzimima je 10^8 - 10^{10} brža od istih reakcija bez prisutnosti katalizatora, u nekim slučajevima i do 10^{17} puta, što nadaleko premašuje brzine koje postižu klasični kemijski katalizatori (Wolfenden, 2001).

- Prihvatljivost za okoliš – obzirom da su u potpunosti biorazgradivi, enzimi predstavljaju puno manju opasnost za okoliš od klasičnih kemijskih katalizatora, i stvaraju manje otpadnog materijala (Jeganthan et al., 2013).
- Djelovanje pri blagim reakcijskim uvjetima – enzimi najčešće djeluju u pH rasponu 5-8, te temperaturnom rasponu 20-40 °C. Takvi uvjeti umanjuju mogućnost neželjenih sporednih reakcija (Faber, 2011).
- Međusobna kompatibilnost – obzirom da enzimi općenito djeluju pri istim ili sličnim reakcijskim uvjetima, moguće je provoditi reakcijsku kaskadu od više biokatalitičkih reakcija u istom reaktoru (Faber, 2011).
- Velik raspon selektivnosti – osjetno najveća prednost biokatalizatora, naročito za farmaceutsku industriju, je njihova izvrsna regioselektivnost i stereoselektivnost koja omogućava zaobilazak mnogih teških i skupih koraka u sintezi farmaceutika (Pollard et al., 2006).

Naravno, enzimi uz sve svoje prednosti imaju i neke osjetne nedostatke od kojih su najznačajniji:

- Enantiomerni oblik – za razliku od kiralnih kemijskih katalizatora, kod pojedinačnih enzima nemožemo mijenjati njihov željeni enantiomerni oblik (Mugford et al., 2008).
- Uski raspon reakcijskih parametara – prednost enzima za rad pri blagim reakcijskim uvjetima ponekad može biti i nedostatak, u smislu da ako se reakcija odvija presporo pri odabranim vrijednostima pH i temperature, operacijski raspon u kojem s tim parametrima možemo varirati vrlo je uzak jer povišene temperature i neprikladan pH dovode do deaktivacije proteina (Faber, 2011).
- Korištenje vode kao reakcijskog otapala – enzimi najvišu katalitičku aktivnost pokazuju u vodi, koja je često najlošiji izbor otapala za organske reakcije zbog svoje visoke temperature vrelišta, nemogućnosti otapanja mnogih organskih spojeva te pojave neželjenih sporednih reakcija. Enzimske reakcije moguće je provoditi u organskom otapalu, ali to vrlo često dovodi do osjetnog pada katalitičke aktivnosti (Klibanov, 1990).
- Sklonost inhibiciji – mnoge enzimatske reakcije su sklone inhibiciji supstratom i/ili produktom, što dovodi do pada brzine reakcije, te posljedično do manje efikasnosti procesa. Iako se inhibicija supstratom može zaobići relativno jednostavno,

održavanjem niske koncentracije supstrata korištenjem reaktora s kontinuiranim dotokom, inhibicija produktom je puno ozbiljniji problem (Faber, 2011).

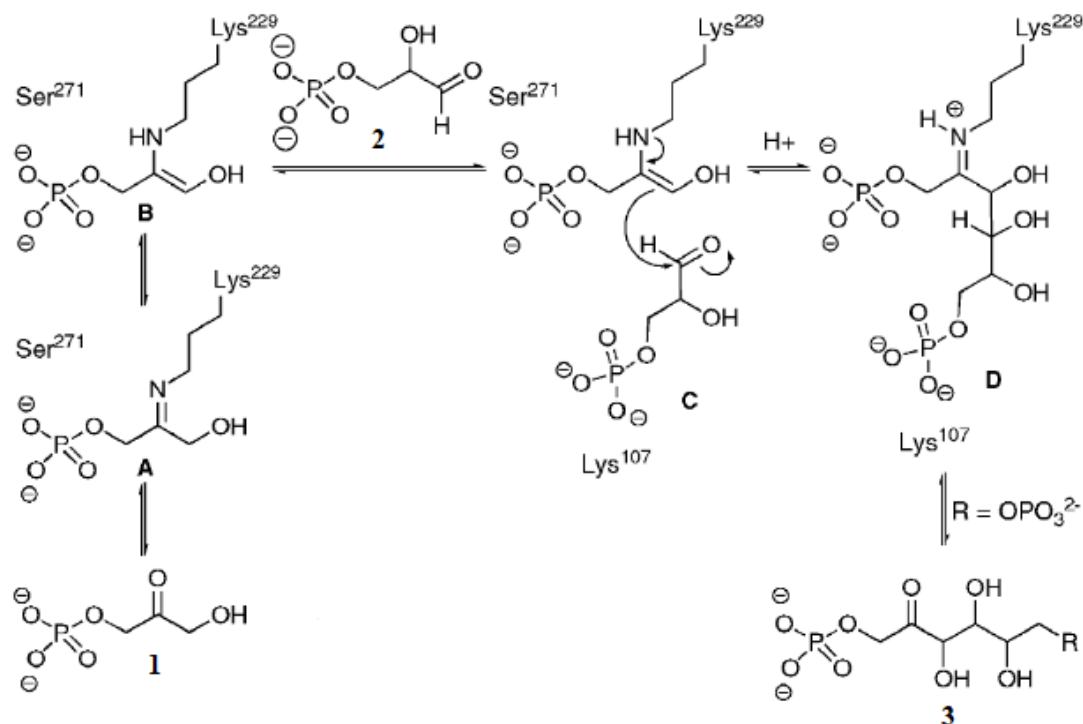
Globalno gledajući, tržište za praktičnu primjenu enzima u industriji i medicini je u konstantnom porastu, od područja prehrane, detergenata i biogoriva do područja medicinske dijagnostike i organske sinteze finih farmaceutskih kemikalija. Perspektiva budućnosti enzimske primjene je svakako obećavajuća i realno je za očekivati da će biti u konstantnom porastu narednih par desetljeća (Illanes et al., 2014).

2.2. Aldolna adicija

Reakcije aldolne adicije su jedan od najčešće korištenih tipova reakcija koji se baziraju na stvaranju C-C veze. Široki raspon mogućnosti koju ova reakcija pruža polazi iz njene korisnosti u formiranju kiralnih centara (putem stereoselektivnog nastanka C-C veze) koji su prvi korak u sintezi strukturno kompleksnih molekula. Reakcije aldolne adicije kombiniraju nukleofilnu adiciju, koja je katalizirana kiselinom, s enolizacijom, koja može biti katalizirana i s Lewisovim i s Brønstedovim kiselinama i bazama (Mukherjee et al., 2007).

Aldehidi se smatraju vrlo svestranim izborom donora za reakcije aldolne adicije, iz razloga što su njihovi produkti također aldehidi koji se onda mogu koristiti u naknadnim reakcijama aldolne adicije za konstrukciju kompleksnih polifunkcionalnih molekulskih okvira (Garrabou et al., 2009).

Mehanizam reakcije aldolne adicije za aldolaze tipa I kojoj pripada i D-fruktoza-6-fosfat aldolaza ispitivana u ovom radu je prikazan na slici 2.3. Lizin na aktivnom mjestu enzima reagira s donorskom komponentom **1** kako bi proizveo nukleofilni enamin (**B**) na aktivnom mjestu enzima. Taj enamin potom reagira (**C**) s akceptorskim elektrofilom (**2**) te dolazi do stvaranja iminskog produkta **D**. Nakon toga slijedi hidroliza kojom dolazi do otpuštanja supstrata s enzima te se oslobađa aldolni produkt **3** (Trost et al., 2010).



Slika 2.3. Mehanizam reakcije aldolne adicije za aldolaze tipa I (Trost et al., 2010)

2.3. Matematičko modeliranje

Određivanje reakcijske kinetike i procjena kinetičkih konstanti su jedni od najvažnijih faktora u području proučavanja i iskorištavanja enzimski kataliziranih reakcija. U istraživačkom smislu, kod otkrivanja novog enzima ili modifikacije enzima, potrebno je odrediti reakcijsku kinetiku novog enzima, ili promjenu reakcijske kinetike/kinetičkih konstanti nakon modifikacije enzima. U inženjerskom smislu, potrebno je poznavati reakcijsku kinetiku kako bi se postavila bilanca tvari (Bas et al., 2007).

Matematičko modeliranje nam omogućava da kompleksne enzimске interakcije kvalitativno i kvantitativno pojednostavimo. Simuliranje i optimizacija procesa pomoću matematičkih modela može iznimno pridonijeti smanjenju troškova procesa te skraćivanju razvojnog vremena procesa (Brass et al., 1997).

Okviri specifičnog matematičkog modela se mogu klasificirati prema raznim kriterijima kao što su matematička struktura (deterministički ili empirijski), kompleksnost (jednostavan ili kompleksan), prostorni opseg (nano-, mikro-, makro-), vremenski opseg (stacionarni ili dinamički) te sama svrha primjene modela (dizajn, analiza, kontrola ili optimizacija) (Sin et al., 2009).

Pojednostavljeni prikaz razvoja matematičkog modela za enzimске reakcije prati iduće korake (Vasić-Rački et al., 2011):

- Karakterizacija ovisnosti biokatalizatora o pH, temperaturi i supstratu – vrlo važno za sustave s više enzima, gdje je potrebno pronaći optimalan kompromis pH i temperaturnih vrijednosti za iste.
- Prikupljanje eksperimentalnih podataka – ključno za procjenu kinetičkih parametara, najčešće se radi metodom početnih brzina koja je najjednostavnija, rjeđe integralnom metodom.
- Procjena parametara – točnost procijenjenih parametara dobivenih iz eksperimentalnih podataka je od ključne važnosti za validaciju modela. Parametri se procjenjuju nelinearnom regresijom, te se optimiraju korištenjem algoritama.
- Validacija modela – razvijeni kinetički model se udružuje s reaktorskim bilancama masa, te se eksperimentalno potvrđuje pri različitim koncentracijama supstrata i/ili enzima.
- Primjena modela – nakon što je uspostavljen točan kinetičko-reaktorski model, simulacije modela bi trebale omogućiti optimizaciju koncentracija enzima i supstrata u različitim tipovima reaktora.

3. Eksperimentalni dio

3.1. Aparatura i kemikalije

3.1.1. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracije uzoraka reaktanata i produkata određivane su pomoću HPLC uređaja s UV detektorom proizvođača *Shimadzu*, prikazanom na slici 3.1.



Slika 3.1. HPLC

3.1.2. Magnetska miješalica

Miješanje uzoraka provedeno je na magnetskoj miješalici *Technica MM-540* prikazanoj na slici 3.2.



Slika 3.2. Magnetska miješalica

3.1.3. Aparatura za provođenje eksperimenta u kotlastom reaktoru s dotokom

Za provođenje eksperimenata u kotlastom reaktoru s dotokom korištene su dvije klipne pumpe *Harvard Apparatus PHD 4400*, te tresilica *Tehnica Vibromix 313 EVT*. Aparatura je prikazana na slici 3.3.



Slika 3.3. Aparatura za provođenje eksperimenta u kotlastom reaktoru s dotokom koja se sastoji od: 1) klipnih pumpi, 2) tikvica, 3) tresilica

3.1.4. Homogenizator

Za homogeniziranje uzoraka korišten je uređaj *MS2 Minishaker IKA* prikazan na slici 3.4.



Slika 3.4. Homogenizator

3.1.5. Analitička vaga

Uzorci korišteni u provedbi eksperimenata vagani su na analitičkoj vagi proizvođača *Shimadzu* prikazanoj na slici 3.5.



Slika 3.5. Analitička vaga

3.1.6. Centrifuga

Za centrifugiranje uzoraka korištena je centrifuga *Hettich Universal 320 R* prikazana na slici 3.6.



Slika 3.6. Centrifuga

3.1.7. Termostat

Za termostatiranje uzoraka korišten je termostat *Eppendorf ThermoMixer C* prikazan na slici 3.7.



Slika 3.7. Termostat

3.1.8. pH metar

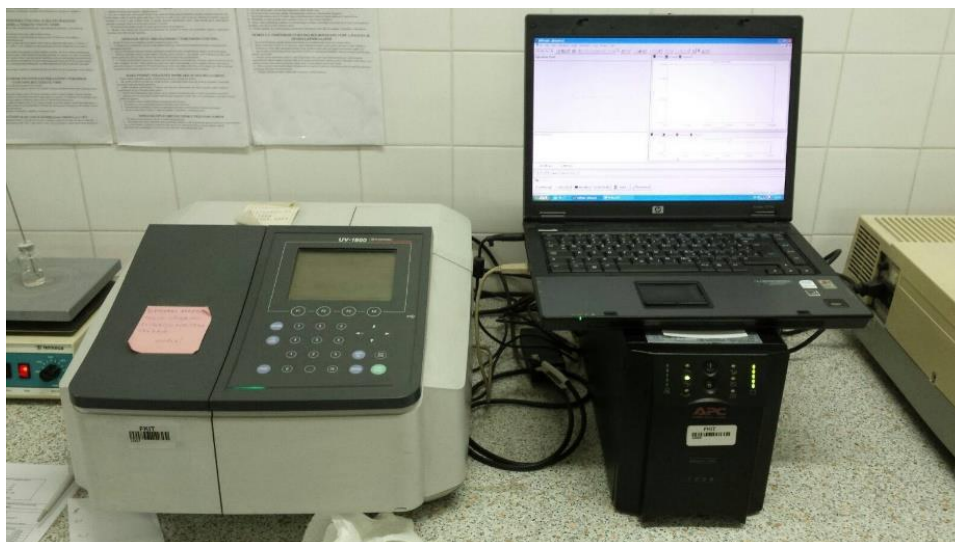
Za pripremu pufera podešavanjem pH vrijednosti korišten je pH metar proizvođača *Schott* prikazan na slici 3.8.



Slika 3.8. pH metar

3.1.9. Spektrofotometar

Za određivanje koncentracije proteina mjerenjem apsorbancije korišten je spektrofotometar UV 1701 proizvođača *Shimadzu* prikazan na slici 3.9.



Slika 3.9. Spektrofotometar

3.1.10. Inkubatorska tresilica

Za inkubaciju uzoraka u tikvicama u procesu ekspresije enzima FSA VarI korištena je inkubatorska tresilica proizvođača *mrc* prikazana na slici 3.10.



Slika 3.10. Inkubatorska tresilica

3.1.11. Ultrazvuk

Za razbijanje transformiranih stanica u procesu ekspresije enzima FSA VarI korišten je ultrazvuk *Bandelin Sonopuls HD 3100* prikazan na slici 3.11.



Slika 3.11. Ultrazvuk

3.1.12. Vodena kupelj

Za termostatiranje supernatanta u procesu ekspresije enzima FSA VarI korištena je vodena kupelj *Thermomix 1420* prikazana na slici 3.12.



Slika 3.12. Vodena kupelj

3.1.13. Sterilizator

Za sterilizaciju tikvica s hranjivom podlogom nakon završetka procesa ekspresije enzima FSA VarI korišten je sterilizator proizvođača *Sutjeska*, prikazan na slici 3.13.



Slika 3.13. Sterilizator

3.1.14. Kemikalije

Tijekom provedbe eksperimenata korištene su slijedeće kemikalije:

- formaldehid, 36%-tni, *T.T.T. Ltd.*
- propanal, 97%-tni, *Alfa Aesar*
- metanol (MeOH), *J.T. Baker*
- trietanolamin (TEA), *Sigma Aldrich*
- tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS), *Sigma Aldrich*
- trifluorooctena kiselina (TFA), *Sigma Aldrich*
- acetonitril, *Sigma Aldrich*
- O-benzilhidroksilamin hidroklorid ($\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$), *Acros Organics*
- piridin, *Acros Organics*
- Coomasie Brilliant Blue, *Fluka*
- D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA) VarI, sintetizirana za potrebe ovog rada postupkom ekspresije enzima obrađenim u poglavlju 3.3. Plazmid je dobiven od prof. Clapés s Institute of Advanced Chemistry of Catalonia, Biotransformation and Bioactive Molecules Group, IQAC-CSIC (Barcelona, Španjolska).

- D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA) VarII je dobivena iz *Technische Universität Darmstadt*, Institute for Organic Chemistry and Biochemistry od prof. Fessnera.
- D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA) VarIII je dobivena iz *Technische Universität Darmstadt*, Institute for Organic Chemistry and Biochemistry od prof. Fessnera.

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Mjerenje koncentracije reaktanata i produkata kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC)

U ovom radu se za analizu i separaciju molekula primjenjivala kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC). Proces separacije započinje injektiranjem uzorka u mobilnu fazu koja se potom pod visokim tlakom kreće kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom. Na učinkovitost separacije prvenstveno utječe brzina protoka mobilne faze kroz kolonu, te primjena odgovarajuće stacionarne i mobilne faze.

Korišten je HPLC s UV detekcijom pri 215 nm. Prije početka analize, uzorke koji sadrže tražene reaktante i produkte potrebno je derivatizirati s O-benzilhidroksilamin hidrokloridom (BnONH₂·HCl) kako bi bili vidljivi na UV području (Garrabou et al., 2009). 5 µL uzorka pomiješalo se s 50 µL derivatizacijske otopine koja sadrži BnONH₂·HCl (130 mM BnONH₂ u omjeru piridin/metanol/voda = 33:15:2 v/v). Nakon 5 minuta inkubacije uzoraka pri 25 °C, u njih je dodano 500 µL metanola te su stavljeni na centrifugu pri 14000 okr/min i 4 °C tijekom 5 minuta. Na dnu Eppendorf epruvete istaložio se enzim, a s vrha Eppendorf epruvete otpipetirano je 400 µL u staklenu vialu za analizu. Uzorci su bili analizirani na koloni Phenomenex Kinetex® C18 (5 µm, 4,6 × 250 mm), a analiza jednog uzorka trajala je 16 minuta. Mobilna faza A je acetonitril/voda/TFA u omjeru 80:20:0.095 v/v dok je mobilna faza B voda s 0.1% TFA.

Analiza je provedena gradijentnom metodom mijenjanjem koncentracije eluenta B od 90% do 0% tijekom 10 minuta, koje slijedi zadržavanje koncentracije eluenta B 2 minute pri koncentraciji 0%, zatim promjena koncentracije eluenta B 0 - 90% tijekom 3 minute, te se konačno zadržava na 90% 1 minutu. Protok eluenta iznosio je 1,5 mL min⁻¹.

Retencijska vremena analiziranih supstrata i produkata nalaze se u tablici 3.1. Kromatogrami i primjeri baždarnih pravaca prikazani su u priložima 4.1. - 4.6. na slikama 6.1. - 6.6.

Tablica 3.1. Retencijska vremena supstrata i produkata

Analit	Retencijsko vrijeme [min]
3-hidroksi-2-metilpropanal	7,8
formaldehid	8,7
propanal	10,1

3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima

Specifična aktivnost varijanti enzima FSA u ovom radu određivana je reakcijom formaldehida i propanala u kotlastom reaktoru volumena 500 mL, početnih koncentracija oba supstrata od 100 mM. Koncentracija enzima FSA u reakciji je $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, a korišteni pufer je TEA HCl pH 8.0. Specifična aktivnost računata je iz eksperimentalnih podataka prikupljenih metodom početnih brzina (jednadžba 1), koja podrazumijeva da je konverzija supstrata manja od 10 % i promatra se linearni porast koncentracije produkta. Nagib pravca procijenjen je iz promjene koncentracije aldolnog produkta, te se koristi za računanje specifične aktivnosti enzima u jednadžbi (1).

$$S.A. = \frac{dc_{3\text{-hidroksi-2-metilpropanal}}}{dt} \cdot \frac{1}{\gamma_{\text{FSA}}} \quad [\text{U mg}^{-1}] \quad (1)$$

U navedenoj jednadžbi $S.A.$ prikazuje specifičnu aktivnost enzima, $dc_{3\text{-hidroksi-2-metilpropanal}}/dt$ je nagib pravca dobiven HPLC analizom, a γ_{FSA} je masena koncentracija enzima u reaktoru.

3.2.3. Određivanje utjecaja pH vrijednosti na aktivnost enzima FSA

Specifična aktivnost enzima FSA određena je u različitim puferima i pri različitim pH vrijednostima. Reakcijska smjesa korištena prilikom mjerenja prikazana je u tablici 3.2., a korišteni puferi i njihove pH vrijednosti u tablici 3.3.

Tablica 3.2. Sastav reakcijske smjese u Eppendorf epruveti prilikom određivanja utjecaja pH vrijednosti na aktivnost enzima FSA

Otopina	V [μL]	c [mM]
formaldehid	50,01	100
propanal	50,02	100
pufer	399,97	50
FSA VarI	25	$0,5 \text{ mg mL}^{-1}$

Tablica 3.3. Testirani puferi i njihove pH vrijednosti

Pufer	pH [-]
Tris HCl, 50 mM	6,6
TEA HCl, 50 mM	7
TEA HCl, 50 mM	7,5
TEA HCl, 50 mM	8
boratni, 50 mM	8,5
boratni, 50 mM	9
Glicin NaOH, 50 mM	9

3.2.4. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina određivana je spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Postupak određivanja provodi se s količinom uzorka od 800 μL kojem je dodano 200 μL reagensa. Reagens je pripremljen miješanjem 100 mg *Coomasie Brilliant Blue G 250* reagensa proizvođača *Fluka* s 50 mL etanola, 100 mL H_3PO_4 (85%-tna) i 850 mL redestilirane vode. Prije mjerenja koncentracije proteina u nepoznatim uzorcima napravljen je baždarni pravac mjerenjem apsorbancija poznatih koncentracija otopine albumina iz goveđeg seruma (BSA). Pripremljena je temeljna otopina koncentracije BSA 0,1 g mL^{-1} , a navedene poznate koncentracije za izradu baždarnog pravca su 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 2,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 7,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ i 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Sva mjerenja su provođena pri valnoj duljini od 595 nm koliko iznosi i apsorpcijski maksimum reagensa.

Koncentracija proteina određena je s količinom uzorka od 800 μL te 200 μL reagensa. Plavo obojenje nastalo je nakon 5 minuta inkubacije uzorka pri sobnoj temperaturi, te je pri valnoj duljini od 595 nm izmjerena apsorbancija uzorka i određena koncentracija proteina.

Jednadžba pravca potrebna za računanje koncentracije proteina dobivena je iz ovisnosti apsorbancije o poznatoj koncentraciji proteina.

Primjer baždarnog pravca nalazi se u prilogu 7 na slici 6.7.

3.3. Ekspresija enzima FSA VarI iz transformiranih stanica M15

Transformirane stanice su stanice bakterije *Escherichia coli* M15 u koje je unesen gen koji sadrži informaciju za ekspresiju enzima koji se koristi u reakcijama ovog rada, FSA VarI. Transformirane stanice M15 nalazile su se na agar podlozi jer su u tom obliku dostavljene od strane projektne grupe koja je genetskim modificiranjem razvila ovaj novi biokatalizator. Stanice su prenesene u 150 mL tekuće hranjive podloge kako bi se umnožile i na taj način uspješnije prenijele u još veću količinu hranjive podloge. Hranjiva podloga sastava 1 %

baktotripton, 0,5 % ekstrakta kvasca i 1 % NaCl se nakon pripreme sterilizirala te su u nju nakon hlađenja dodani antibiotici koji sprječavaju rast ostalih mikroorganizama, a stanice *E.coli* M15 posjeduju rezistentnost na antibiotike. Dodano je 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ampicilina i 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamicina. Hranjiva podloga je nakon dodavanja bakterija ostavljena na tresilici 16 h, pri 200 okr min^{-1} i 37 °C.

Sljedeći se dan pripremi 2 L tekuće hranjive podloge na isti prethodno opisani način. Ta je hranjiva podloga raspodijeljena u 8 tikvica po 250 mL. U svaku tikvicu dodano je 6,25 mL hranjive podloge s naraslom bakterijskom kulturom. U ovom stupnju se vrši dodatni uzgoj stanica te istovremeno prekomjerna ekspresija enzima FSA VarI. Tikvice su stavljene na tresilicu pri 200 okr min^{-1} i 37 °C tijekom 2,5 h. Nakon toga je u svaku tikvicu dodano po 125 μL 1 M otopine izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid (IPTG). Potom je temperatura na tresilici bila snižena na 30 °C pri 200 okr min^{-1} te su tikvice bile ostavljene na tresilici preko noći. U tom periodu odvija se prekomjerna ekspresija proteina. IPTG služi kao okidač prekomjerne ekspresije proteina.

Idući dan sadržaj tikvica je prenesen u plastične epruvete sa čepom, koji su potom bile centrifugirane te se nakon toga odlila hranjiva podloga. Stanice su potom bile zamrznute pri -20 °C. Pripremljen je pufer glicin-glicin ditiotritol (glygly-DTT), sadržaja 500 mM glicin-glicin, 10 mM 1,4-ditiotritol, pH vrijednosti 7,5. Stanice su otopljene u 10x razrijeđenom glygly-DTT puferu, te su nakon toga podvrgnute razbijanju na ultrazvuku u trajanju 10 min. Nakon razbijanja suspenzija je bila centrifugirana tijekom 30 min, te je supernatant, u kojem se nalaze enzimi, odvojen u epruvete koje su potom bile stavljene u vodenu kupelj pri 70 °C poradi termostatiranja. S obzirom da je FSA je termostabilan enzim, ovaj korak je služio tome da se denaturiraju ostali enzimi. Nakon termostatiranja, epruvete su bile stavljene na centrifugu tijekom 30 min.

Idući korak je bila dijaliza čija je svrha pročišćavanje enzima od soli i nečistoća. Izvršena je pomoću crijeva za dijalizu D0530 100FT, proizvođača *Sigma-Aldrich*. Pripremljeno je 2 L glygly-DTT pufera razrijeđenog 100x u staklenoj boci na magnetskoj miješalici, u koju je bilo stavljeno crijevo za dijalizu sa čvorom na jednom kraju, te se u crijevo potom ulio sav sadržaj epruveta. Miješalica se nalazila u frižideru pri 5 °C (slika 3.14.) poradi stabilnosti enzima, a dijaliza se odvijala tijekom 24 sata uz lagano miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon 24 sata u drugoj boci je nanovo pripremljeno 2 L glygly-DTT pufera, te se crijevo za dijalizu premjestilo u tu bocu za dodatnu 24-satnu dijalizu.



Slika 3.14. Staklena boca na miješalici u frižideru

Nakon dijalize, sadržaj iz crijeva je prenesen u dvije epruvete od 50 mL, koje su potom stavljene na liofilizaciju pri $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 48 sati. Na kraju postupka dobiven je suhi liofilizirani enzim FSA VarI (Slika 3.15.) spreman za korištenje u reakcijama.

Po završetku ekspresije enzima, koncentracija proteina u dobivenoj liofiliziranoj smjesi se mjeri metodom po Bradfordu koja je opisana u poglavlju 3.2.4.



Slika 3.15. Liofilizirani enzim u epruvetama.

3.4. Ispitivanje utjecaja koncentracije formaldehida i propanala na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII u reakciji aldolne adicije

Mjerenja su provedena s enzimima FSA VarII i VarIII, na način da je koncentracija jednog supstrata bila konstantna u svim mjerenjima, dok je koncentracija drugog supstrata varirana od neke minimalne do maksimalne vrijednosti. Korišteni pufer je 50 mM TEA HCl pH 8,0. Mjerenje se provodilo 30 minuta, tijekom kojih su u određenim vremenskim intervalima uzimani uzorci za analizu na HPLC-u. Sastav reakcijske smjese u Eppendorf epruvetama prilikom variranja koncentracije formaldehida prikazan je u tablici 3.4., a prilikom variranja koncentracije propanala u tablici 3.5.

Tablica 3.4. Sastav reakcijske smjese prilikom variranja koncentracije formaldehida

Otopina	V [μL]	c [mM]
formaldehid	5-400,08	10-1750
propanal	50,02	100
pufer	24,90-419,98	50
FSA VarII ili VarIII	25	0,5 mg mL ⁻¹

Tablica 3.5. Sastav reakcijske smjese prilikom variranja koncentracije propanala

Otopina	V [μL]	c [mM]
formaldehid	50,01	100
propanal	5-400,18	10-2000
pufer	24,81-419,98	50
FSA VarII ili VarIII	25	0,5 mg mL ⁻¹

3.5. Ispitivanje utjecaja koncentracije enzima FSA VarI, VarII i VarIII na nastajanje aldola u kotlastom reaktoru

Ispitan je utjecaj 3 različite koncentracije enzima FSA VarII i VarIII, te jedne koncentracije enzima FSA VarI, na nastajanje aldola u reakciji aldolne adicije formaldehida i propanala. Reakcija se provodila u 50 mM TEA HCl puferu pH 8,0 i pratila 21 sat, tijekom kojih su u određenim vremenskim intervalima uzimani uzorci za analizu na HPLC-u. Sastavi reakcijskih smjesa u Eppendorf epruveti prilikom ispitivanja utjecaja enzima FSA VarI, VarII i VarIII na reakciju aldolne adicije prikazani su u tablici 3.6.

Tablica 3.6. Sastav reakcijske smjese u Eppendorf epruveti pri ispitivanju utjecaja koncentracije enzima FSA VarI, VarII ili VarIII na nastajanje aldola u kotlastom reaktoru

Otopina	V [μL]	c [mM]
formaldehid	50,01	100
propanal	50,02	100
pufer	149,97-349,97	50
FSA VarI	250	5 mg mL ⁻¹
FSA VarII ili VarIII	50-250	1-5 mg mL ⁻¹

3.6. Ispitivanje utjecaja metanola na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII

Utjecaj metanola na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII u reakciji aldolne adicije ispitan je jer komercijalno dostupan formaldehid korišten za izradu otopina formaldehida u ovom radu sadrži 7 % metanola koji služi kao stabilizator. Ispitan je utjecaj 8 različitih koncentracija metanola. Mjerenja su provedena u puferu 50 mM TEA HCl pH 8,0, u trajanju od 30 minuta, tijekom kojih su u određenim vremenskim intervalima uzimani uzorci za analizu na HPLC-u. Sastav početnih reakcijskih smjesa u Eppendorf epruvetama prikazan je u tablici 3.7.

Tablica 3.7. Sastav reakcijske smjese u Eppendorf epruveti pri ispitivanju utjecaja različitih koncentracija metanola na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII.

Otopina	V [μ L]	c [mM]
formaldehid	51,88	100
propanal	50,02	100
pufer	8,19-373,10	50
FSA VarII ili VarIII	25	0,5 mg mL ⁻¹
metanol	0-364,92	0-300

3.7. Praćenje deaktivacije enzima FSA VarII i VarIII tijekom inkubacije s formaldehidom

Deaktivacija enzima ispitana je s 4 različite koncentracije formaldehida. Formaldehid se miješa s TEA HCl pH 8,0 puferom i enzimom FSA, čime dobijemo reakcijske otopine sastava prikazanog u tablici 3.8.

Tablica 3.8. Sastav reakcijske otopine u Eppendorf epruveti tijekom inkubacije enzima FSA VarII/VarIII s formaldehidom.

Otopina	V [μ L]	c [mM]
formaldehid	16,68-60,01	50-500
pufer	0,01-43,32	50
FSA VarII ili VarIII	60	25

Reakcijske otopine sastava prikazanog u tablici 3.8. su stavljene na tresilicu, te su kroz 24 sata u određenim vremenskim intervalima uzimani uzorci za analizu na HPLC-u. Uzorci su pripremljeni tako da se iz Eppendorf epruvete uzelo 10 μL otopine u Amicon® Ultra 15 filter koji se potom stavlja na centrifugu pri 14.000 okr min^{-1} i 5 minuta, te se ispire dva puta sa 150 μL TEA HCl pH 8,0 puferom, te se tih 300 μL prebacuje u Eppendorf epruvete s TEA HCl puferom pH 8,0, formaldehidom i propanalom, čime dobijemo reakcijske otopine prikazane u tablici 3.9. Iz tih reakcijskih otopina su tijekom 30 minuta u određenim vremenskim intervalima uzimani uzorci za analizu na HPLC-u. Na temelju eksperimentalnih podataka ovisnosti koncentracije produkta o vremenu određivana je aktivnost enzima, a iz ovisnosti aktivnosti enzima o vremenu procijenjene su konstante deaktivacije enzima.

Tablica 3.9. Sastav reakcijske otopine u Eppendorf epruveti nakon inkubacije enzima FSA VarII/VarIII s formaldehidom.

Otopina	V [μL]	c [mM]
formaldehid	50,01	100
propanal	50,02	100
pufer	389,97	50
FSA VarII ili VarIII	10	0,5 mg mL^{-1}

3.8. Ispitivanje utjecaja enzima FSA VarII na reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru s dotokom

Reakcija aldolne adicije katalizirana enzimom FSA VarII ispitana je u kotlastom reaktoru s dotokom na osnovu dobrih rezultata pokazanih u prethodnim ispitivanjima iste reakcije s enzimom FSA VarI (Findrik et al., 2017). Mjerenje je provedeno na način da se u Eppendorf epruveti nalazila početna reakcijska smjesa prikazana u tablici 3.10., u koju se vršio kontinuirani dotok koncentriranih otopina formaldehida i propanala koncentracije 150 mM tijekom prvih 6 sati reakcije. Protok formaldehida i propanala iznosio je 1,05 $\mu\text{L min}^{-1}$. Korišteni pufer je 50 mM TEA HCl pH 8,0. Reakcija se pratila 29 sati, tijekom kojih su u određenim vremenskim intervalima uzimani uzorci za analizu na HPLC-u.

Tablica 3.10. Sastav početne reakcijske smjese u Eppendorf epruveti pri ispitivanju reakcije aldolne adicije u kotlastom reaktoru s dotokom

Otopina	V [μL]	c [mM]
formaldehid	57,93	150
propanal	55,44	150
pufer	4886,63	50
FSA VarII	5	60 mg mL ⁻¹

3.9. Ispitivanje povratne reakcije raspada aldola uz enzim FSA VarII i VarIII

Povratna reakcija raspada aldola na formaldehid i propanal ispitana je s 2 različite koncentracije enzima FSA VarII i VarIII. Aldol je sintetiziran pomoću enzima FSA VarI standardnom reakcijom aldolne adicije, sastava reakcijske smjese prikazanog u tablici 3.11. Tako sintetizirani aldol se prebacio u Eppendorf epruvete s puferom TEA HCl pH 8,0 i enzimima FSA VarII i VarIII, čime dobijemo reakcijske otopine prikazane u tablici 3.12. Reakcija se pratila 24 sata, tijekom kojih su u određenim vremenskim razmacima uzimani uzorci za analizu na HPLC-u.

Tablica 3.11. Sastav reakcijske smjese u Eppendorf epruveti prilikom sinteze aldola

Otopina	V [μL]	c [mM]
formaldehid	100,04	100
propanal	100,04	100
pufer	599,94	50
FSA VarI	200	5 mg mL ⁻¹

Tablica 3.12. Sastav reakcijske smjese u Eppendorf epruveti pri ispitivanju povratne reakcije raspada aldola

Otopina	V [μL]	c [mM]
aldol	936,97	42
pufer	3,03-53,03	50
FSA VarII ili VarIII	10-60	0,5-3 mg mL ⁻¹

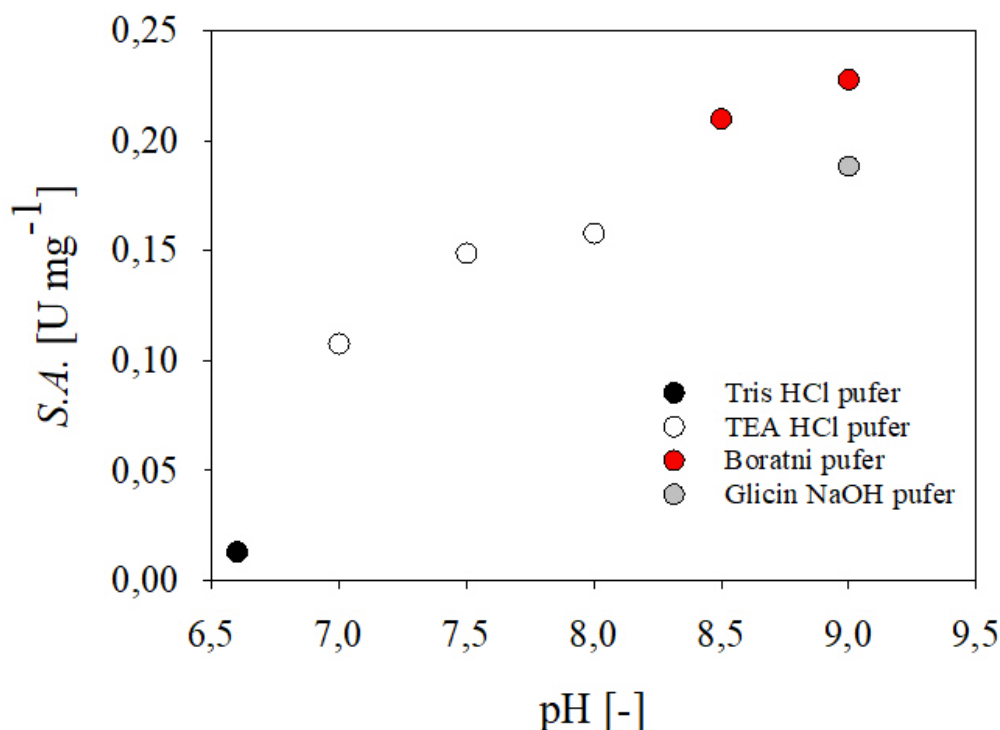
4. Rezultati i rasprava

4.1. Ekspresija FSA VarI iz transformiranih stanica M15

Ekspresijom enzima FSA VarI iz transformiranih stanica M15 uspješno je dobiveno 0,8075 g liofiziranog enzima FSA VarI. Mjerenjem koncentracije proteina metodom po Bradfordu (Bradford, 1976.) izračunata je koncentracija proteina u dobivenom enzimu, te je zaključeno da je dobiveni enzim 100 %-tnog proteinskog sastava.

4.2. Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost FSA Var I

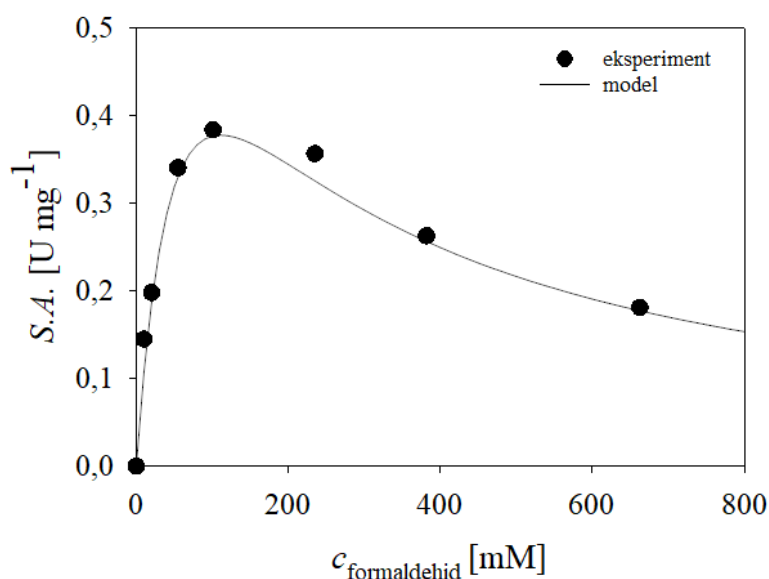
Određena je specifična aktivnost enzima FSA VarI u puferima različitih pH vrijednosti. Rezultati su prikazani na slici 4.1. Iako enzim naizgled pokazuje najveću specifičnu aktivnost pri pH vrijednosti od 9, iz prethodnih ispitivanja poznato je da produkt aldolne adicije ispitivane u ovom radu pokazuje sklonost raspadanju i naknadnim reakcijama pri pH vrijednostima većim od 8, te je stoga optimalan izbor TEA HCl pufer pH 8,0. Ta pH vrijednost i pufer su korišteni u daljnjim ispitivanjima.



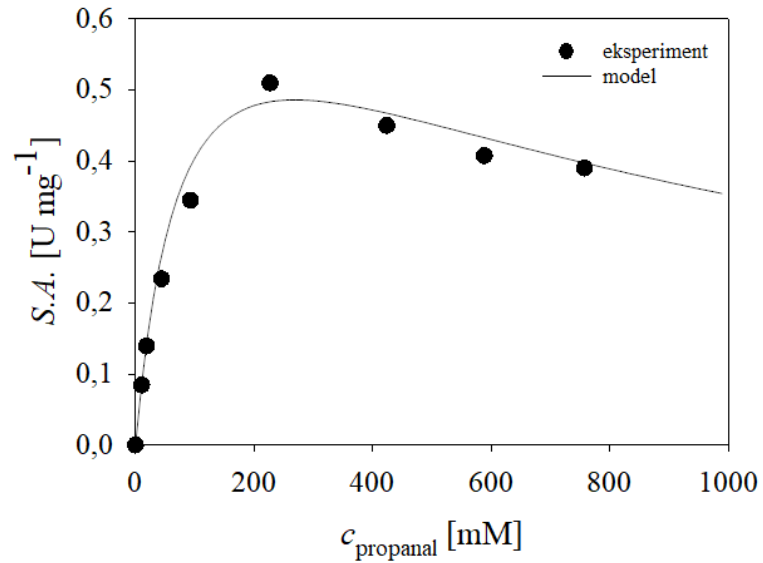
Slika 4.1. Ovisnost specifične aktivnosti FSA VarI o pH vrijednosti (25 °C, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{formaldehid}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{propanal}} = 100 \text{ mM}$)

4.3. Utjecaj koncentracije formaldehida i propanala na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII u reakciji aldolne adicije

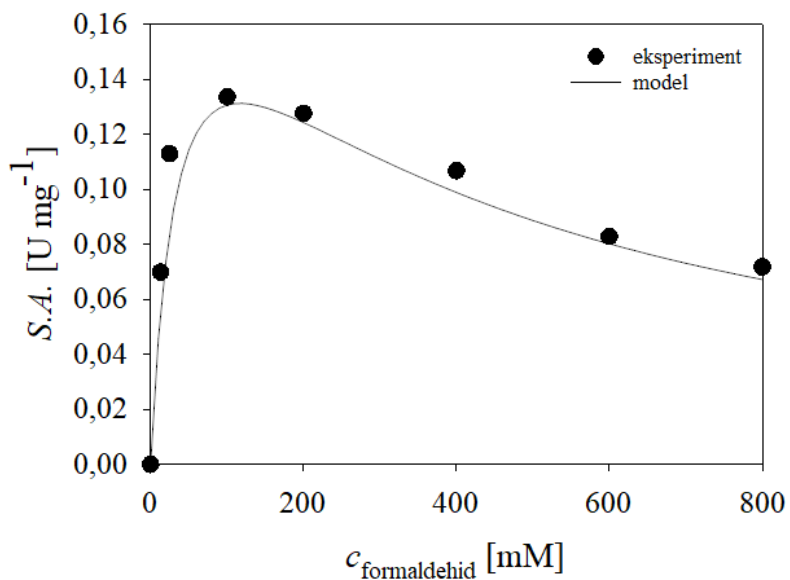
Ispitan je utjecaj koncentracije formaldehida i propanala na specifičnu aktivnost enzima VarII i VarIII. Rezultati su prikazani na slikama 4.2. – 4.6. Rezultati pokazuju da kod svih varijanti enzima FSA povećanjem koncentracije supstrata dolazi prvo do rasta, a zatim do pada specifične aktivnosti, iz čega se može zaključiti da oba supstrata inhibiraju enzim FSA u reakciji aldolne adicije. Na osnovu toga za opis kinetike odabran je Michaelis-Menteničin kinetički model s inhibicijom supstratom, te je vidljivo da odabrani model dobro opisuje eksperimentalne podatke. Tablica 4.1. prikazuje procijenjene kinetičke parametre modela. Kinetički parametri za enzim FSA VarI preuzeti su iz prethodnih ispitivanja pri istim uvjetima reakcije (Česnik et al., 2018). Kinetički parametri pokazuju da su VarI i VarII usporedivi po aktivnosti, dok VarIII pokazuje osjetno manju aktivnost. Pri usporedbi enzima VarI s VarII, VarII ima prednost u nižim vrijednostima K_m za testirane supstrate, dok VarI pokazuje slabiju inhibiciju supstratom (viši K_i).



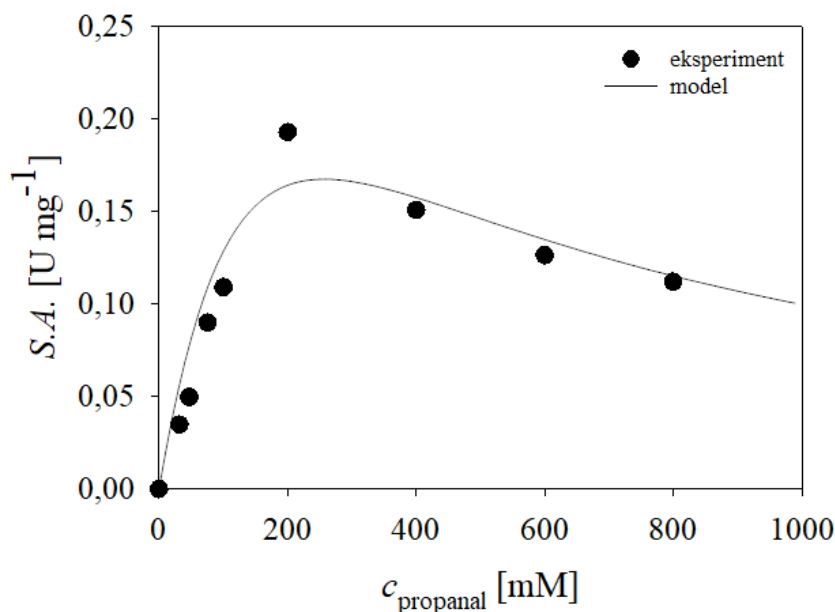
Slika 4.2. Utjecaj koncentracije formaldehida na specifičnu aktivnost FSA VarII u reakciji aldolne adicije (25 °C, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{propanal}} = 100 \text{ mM}$)



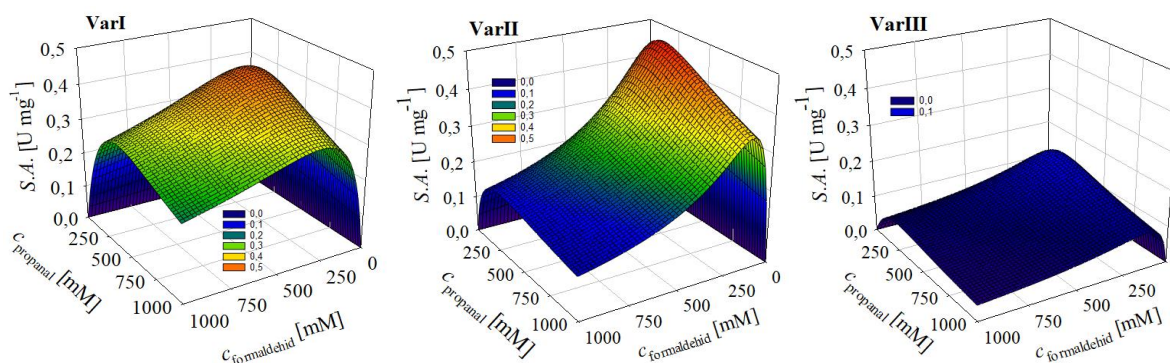
Slika 4.3. Utjecaj koncentracije propanala na specifičnu aktivnost FSA VarII u reakciji aldolne adicije (25 °C, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{formaldehid}} = 100 \text{ mM}$)



Slika 4.4. Utjecaj koncentracije formaldehida na specifičnu aktivnost FSA VarIII u reakciji aldolne adicije (25 °C, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{propanal}} = 100 \text{ mM}$)



Slika 4.5. Utjecaj koncentracije propanala na specifičnu aktivnost FSA VarIII u reakciji aldolne adicije ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5\text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{formaldehid}} = 100\text{ mM}$)



Slika 4.6. Utjecaj koncentracije formaldehida i propanala na specifičnu aktivnost enzima FSA VarI/VarII/VarIII u reakciji aldolne adicije ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5\text{ mg mL}^{-1}$)

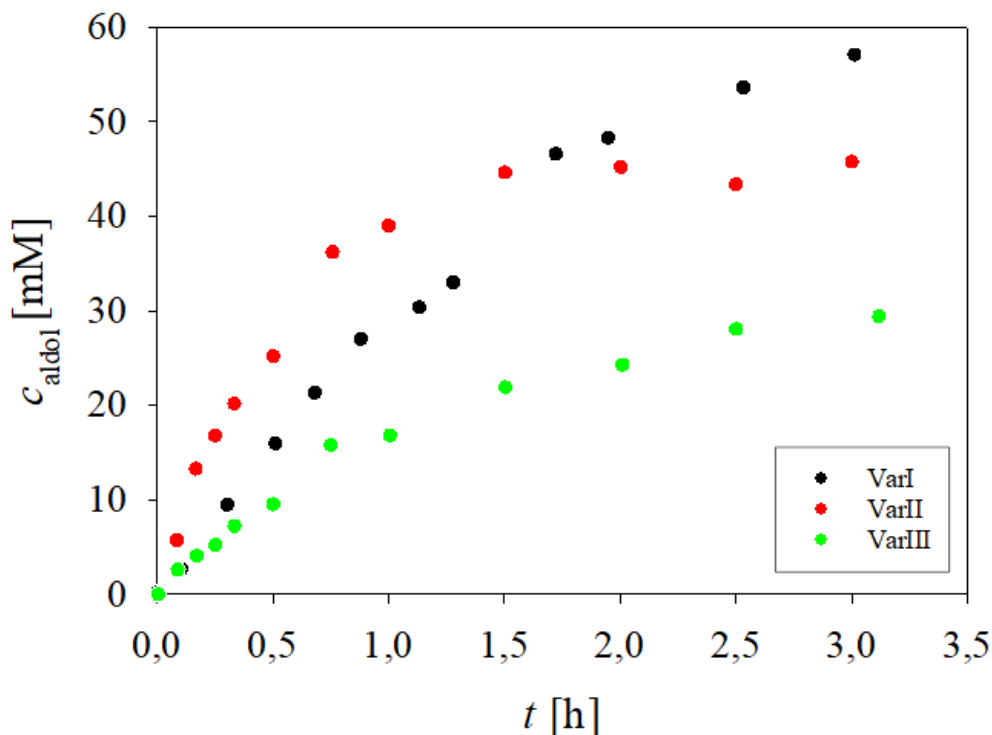
Tablica 4.1. Kinetički parametri enzima FSA VarI, VarII i VarIII procijenjeni iz eksperimentalnih rezultata prikazanih na slikama 4.2. – 4.6.

Parametar	Jedinica	FSA VarI	FSA VarII	FSA VarIII
V_m	U mg^{-1}	$3,42 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,11$	$0,74 \pm 0,03$
$K_m^{\text{formaldehid}}$	mM	$102,24 \pm 4,01$	$67,52 \pm 7,22$	$36,33 \pm 8,82$
K_m^{propanal}	mM	$668,96 \pm 14,17$	$82,85 \pm 7,74$	$220,71 \pm 25,89$
$K_i^{\text{formaldehid}}$	mM	$679,94 \pm 38,81$	$183,19 \pm 29,25$	$377,28 \pm 68,70$
K_i^{propanal}	mM	$230,56 \pm 10,86$	$873,39 \pm 138,18$	$298,99 \pm 41,57$

Iz slike 4.6. se može zaključiti da je radi postizanja visoke specifičnosti enzima potrebno održavati koncentracije aldehida u određenom povoljnom području. Dok je za FSA VarI to područje dosta široko radi manje inhibicije aldehydima, za VarII i VarIII enzime to nije slučaj, jer se kod njih vrijednosti specifičnih aktivnosti enzima blizu maksimalne mogu postići u izrazito uskom koncentracijskom području.

4.4. Utjecaj koncentracije enzima FSA VarI, VarII i VarIII na nastajanje aldola u kotlastom reaktoru

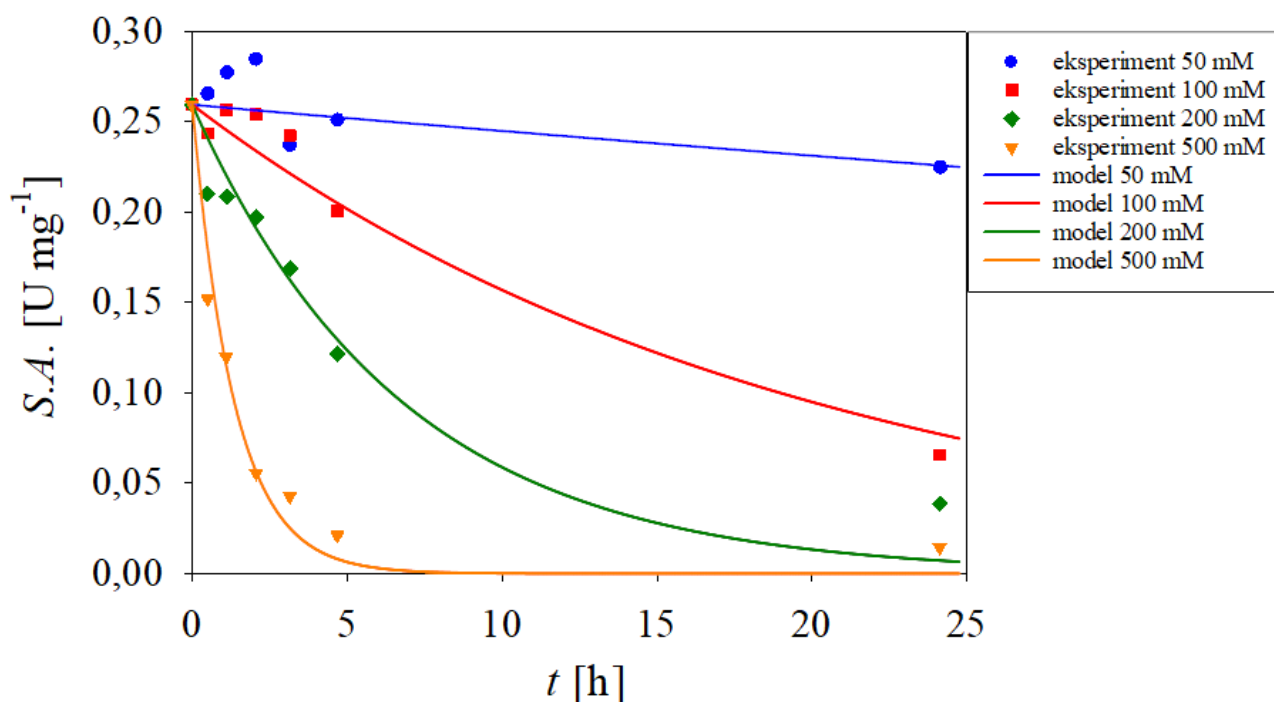
Provedena je usporedba prinosa aldola tijekom pojedinačnih reakcija aldolne adicije katalizirane s enzimima FSA VarI, VarII i VarIII u kotlastom reaktoru. Rezultati su prikazani na slici 4.8. Iz rezultata je vidljivo da FSA VarI daje najveće prinose produkta u ispitivanom vremenskom rasponu reakcije, dok FSA VarII pokazuje najveću početnu brzinu prinosa produkta. Shodno rezultatima mjerenja kinetike reakcije u prethodnom poglavlju 4.3., enzim FSA VarIII pokazuje najslabiji prinos aldola.



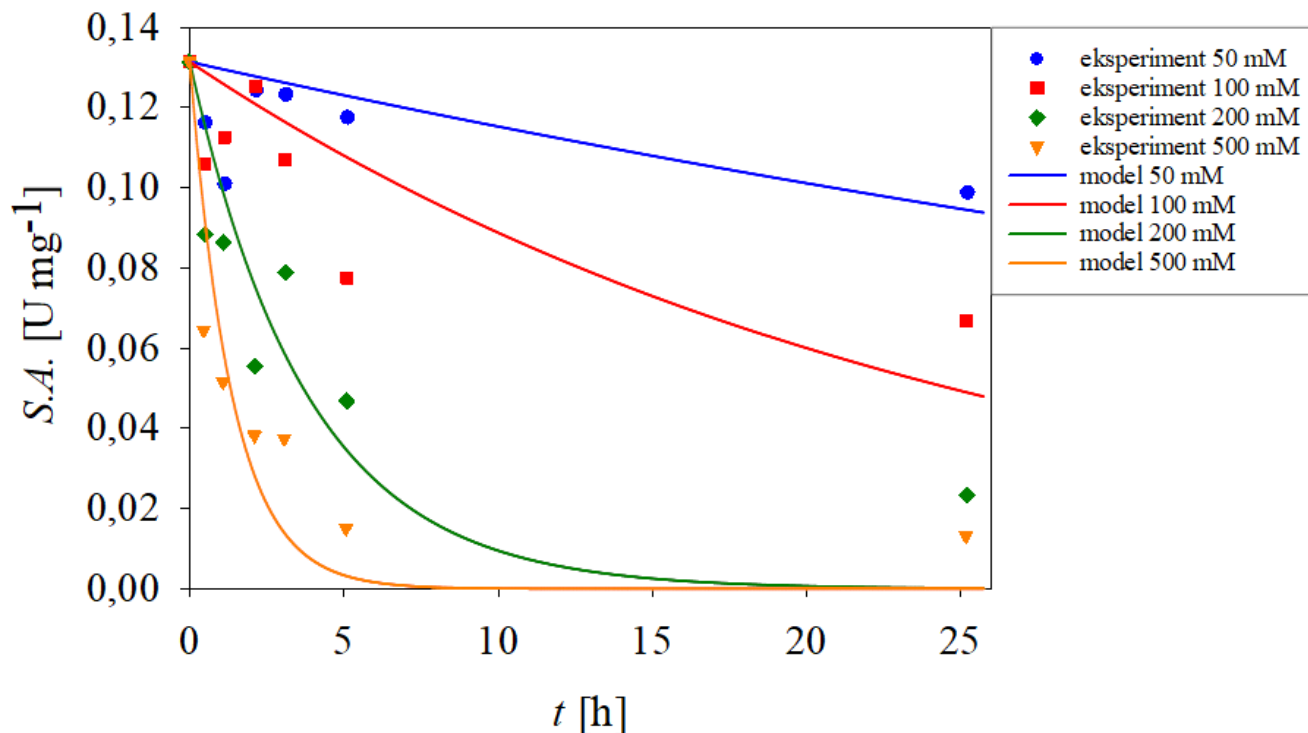
Slika 4.8. Utjecaj koncentracije enzima FSA VarI, VarII i VarIII na nastajanje aldola u kotlastom reaktoru (25 °C, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 5 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{propanal}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{formaldehid}} = 100 \text{ mM}$).

4.5. Deaktivacija enzima FSA VarII i VarIII tijekom inkubacije s formaldehidom

Ispitan je utjecaj različitih koncentracija formaldehida na deaktivaciju enzima FSA VarII i VarIII tijekom inkubacije s formaldehidom. Rezultati su prikazani na slikama 4.9. i 4.10. U tablicama 4.2. i 4.3. prikazani su procijenjeni kinetički parametri konstante deaktivacije prvog reda za enzime FSA Var II i VarIII. Rezultati pokazuju da kod oba enzima, čije su stabilnosti vrlo sličnih vrijednosti, povećanjem koncentracije formaldehida dolazi do rasta konstante deaktivacije k_d , te posljedično do naglog pada specifične aktivnosti enzima. Iz prikazanih rezultata se vidi i da kotlasti reaktor nije idealan kod viših koncentracija supstrata, te je za daljnja ispitivanja ove reakcije odabran kotlasti reaktor s dotokom kod kojeg se regulacijom dotoka supstrata može kontrolirati njegova koncentracija u reaktoru.



Slika 4.9. Utjecaj koncentracije formaldehida na deaktivaciju enzima FSA VarII tijekom inkubacije s formaldehidom (25 °C, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{propanal}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{formaldehid}} = 100 \text{ mM}$)



Slika 4.10. Utjecaj koncentracije formaldehida na deaktivaciju enzima FSA VarIII tijekom inkubacije s formaldehidom (25 °C, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{propanal}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{formaldehid}} = 100 \text{ mM}$)

Tablica 4.2. Kinetički parametar deaktivacije enzima FSA VarII procijenjen iz eksperimentalnih rezultata prikazanih na slici 4.9.

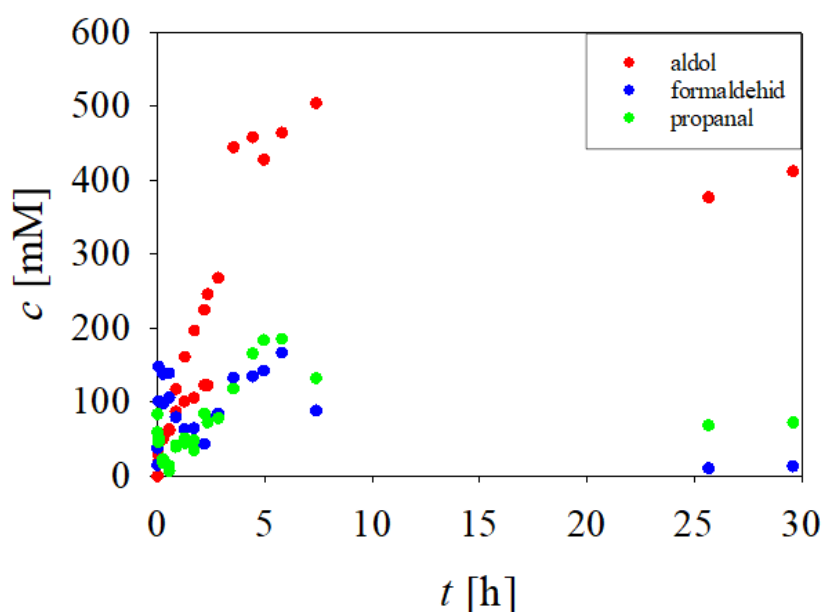
Parametar	Jedinica	$c_{\text{formaldehid}}$			
		50 mM	100 mM	200 mM	500 mM
$k_d^{\text{formaldehid}}$	h^{-1}	$0,01 \pm 0,003$	$0,05 \pm 0,006$	$0,14 \pm 0,020$	$0,74 \pm 0,073$

Tablica 4.3. Kinetički parametar deaktivacije enzima FSA VarIII procijenjen iz eksperimentalnih rezultata prikazanih na slici 4.10.

Parametar	Jedinica	$c_{\text{formaldehid}}$			
		50 mM	100 mM	200 mM	500 mM
$k_d^{\text{formaldehid}}$	h^{-1}	$0,01 \pm 0,005$	$0,04 \pm 0,013$	$0,26 \pm 0,062$	$0,73 \pm 0,167$

4.6. Utjecaj enzima FSA VarII na reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru s dotokom

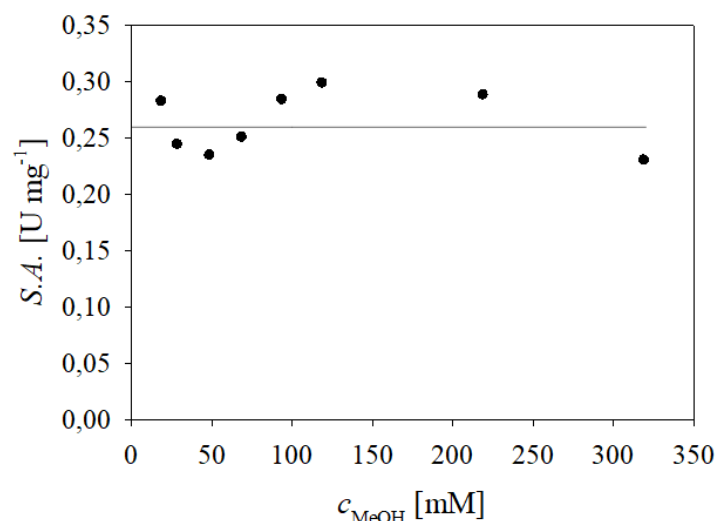
FSA VarII je korišten prilikom aldolne adicije propanala i formaldehida u kotlastom reaktoru s dotokom. Rezultati su prikazani na slici 4.11. Do obustave dotoka nakon 6 sati reakcije dobiveno je 464 mM aldolnog produkta. Nakon 29 sati reakcije, dobiveno je 412 mM aldolnog produkta što ukazuje na raspad produkta tijekom vremena. Ovi rezultati pokazuju da je usprkos jakoj inhibiciji supstratima moguće postići relativno visoke koncentracije produkta za FSA Var II. Treba napomenuti da uvjeti procesa u ovom slučaju nisu optimirani. Ukoliko se ovi rezultati usporede s rezultatima dobivenim s FSA VarI (Findrik et al., 2017) može se zaključiti da su nešto lošiji jer je tamo postignuta koncentracija produkta od 806 mM nakon 6 sati reakcije, ali ti rezultati su postignuti nakon optimiranja pomoću matematičkog modela procesa. Kako u eksperimentu prikazanom na slici 4.11. koncentracija aldehida prelazi 100 mM, za očekivati je da će koncentracija produkta biti niža, zbog niže aktivnosti enzima uzrokovane inhibicijom supstratom.



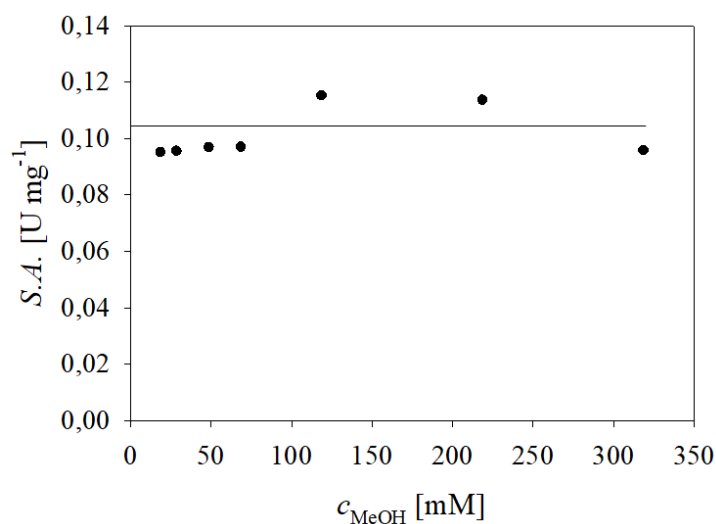
Slika 4.11. Utjecaj enzima FSA VarII na reakciju aldolne adicije u kotlastom reaktoru s dotokom ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 50 mM pufer, $\gamma_{\text{FSA}} = 60\text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{propanal}} = 55,43\text{ mM}$, $c_{\text{formaldehid}} = 57,93\text{ mM}$, $q_{v, \text{propanal}} (13,53\text{ M}) = 1,05\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$, $q_{v, \text{formaldehid}} (12,95\text{ M}) = 1,05\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$)

4.7. Utjecaj metanola na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII

Utjecaj različitih koncentracija metanola na specifičnu aktivnost enzima FSA VarII i VarIII prikazan je na slikama 4.12. i 4.13. Kod oba enzima vidljivo je da se bez obzira na veličinu ispitivane koncentracije metanola vrijednost specifične aktivnosti enzima značajno ne mijenja, iz čega se može zaključiti da metanol korišten kao stabilizator u boci formaldehida ne utječe na ispitivanu reakciju aldolne adicije.



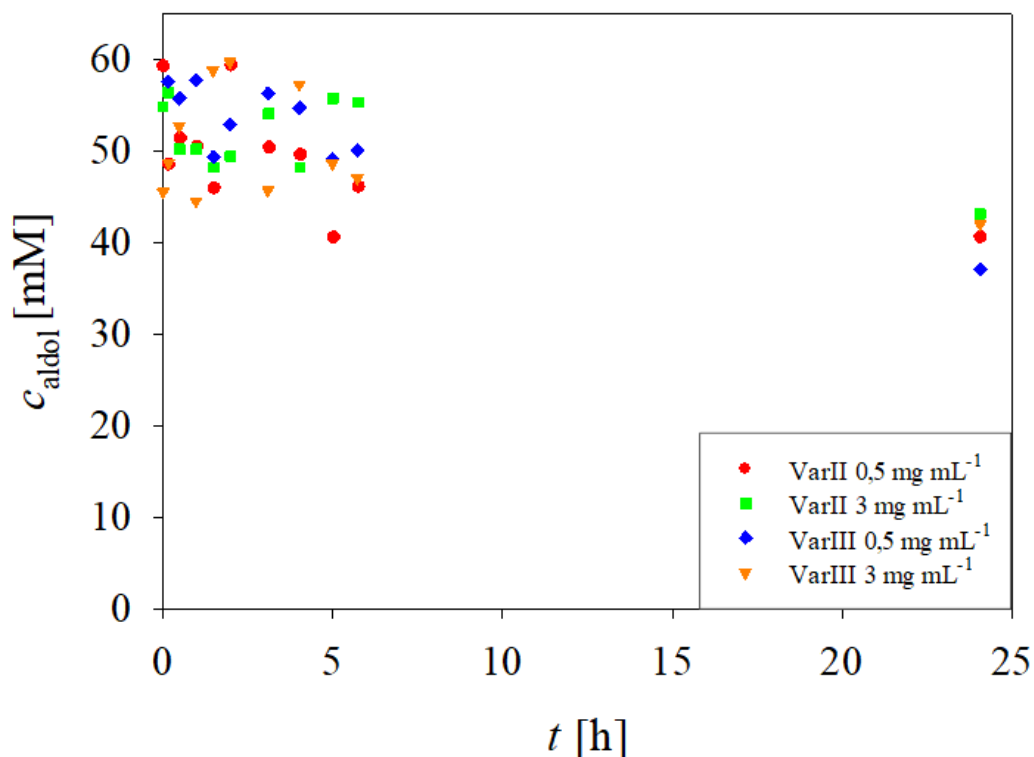
Slika 4.12. Ovisnost specifične aktivnosti FSA VarII o koncentraciji MeOH (25 °C, 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0, $\gamma_{\text{FSA VarII}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{formaldehyd}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{propanal}} = 100 \text{ mM}$)



Slika 4.13. Ovisnost specifične aktivnosti FSA VarIII o koncentraciji MeOH (25 °C, 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0, $\gamma_{\text{FSA VarIII}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{formaldehyd}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{propanal}} = 100 \text{ mM}$)

4.8. Utjecaj enzima FSA VarII i VarIII na povratnu reakciju raspada aldola

Ispitan je utjecaj dvije različite koncentracije enzima FSA VarII i VarIII na povratnu reakciju raspada aldola na formaldehid i propanal. Rezultati su prikazani na slici 4.14. U sva 4 slučaja vidljivo je da nema velikih promjena u koncentraciji aldola, tj. da ne dolazi do njegova raspada. Male promjene koncentracija koje su prisutne mogu se pripisati raspadu aldola, a tijekom ispitivanja nije došlo do porasta koncentracija formaldehida i propanala, što nam pokazuje da povratna reakcija nije izražena. Na osnovu prikazanog može se zaključiti da povratne reakcije raspada aldola nema, odnosno da ju možemo zanemariti.



Slika 4.14. Utjecaj različitih koncentracija enzima FSA VarII i VarIII na povratnu reakciju raspada aldola (25 °C, 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0, $\gamma_{\text{FSA VarII/VarIII}} = 0,5\text{-}3 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{aldol}} = 42 \text{ mM}$)

5. Zaključak

Uspješno je provedena ekspresija enzima FSA VarI iz transformiranih stanica M15, čime je dobiven enzim 100 %-tnog proteinskog sastava koji je korišten u naknadnim ispitivanjima reakcije aldolne adicije.

Određena je kinetika reakcije aldolne adicije uz različite varijante enzima FSA, koju je bilo moguće opisati s Michaelis-Menteničinim modelom uz inhibiciju supstratom. Iz procijenjenih kinetičkih parametara vidljivo je da VarI i VarII pokazuju sličnu aktivnost, dok VarIII pokazuje znatno manju aktivnost. Vidljiv je i značajan inhibicijski učinak oba supstrata na aktivnost svih varijanti enzima FSA, koji je najmanje izražen kod enzima FSA VarI. U usporedbi VarI i VarII, VarII ima prednost u nižoj vrijednosti parametra K_m za testirane supstrate, dok je kod VarI prisutna slabija inhibicija supstratom.

Provođenjem reakcije aldolne adicije u kotlastom reaktoru pronađeno je da FSA VarI daje najveće prinose aldolnog produkta, dok FSA VarIII daje najmanje. Dobiveni rezultati u skladu su s procijenjenim kinetičkim parametrima varijanti enzima FSA.

Ispitan je utjecaj različitih koncentracija formaldehida na deaktivaciju enzima FSA VarII i VarIII tijekom inkubacije s formaldehidom, te se na osnovu dobivenih rezultata može zaključiti da je za promatranu reakciju aldolne adicije kotlasti reaktor s dotokom prikladniji od običnog kotlastog reaktora, radi mogućnosti kontrole koncentracija inhibirajućih supstrata.

Ispitivanjem povratne reakcije raspada aldola i utjecaja metanola na specifičnu aktivnost enzima FSA, utvrđeno je da u oba slučaja ne dolazi do značajnog utjecaja na promatranu reakciju aldolne adicije.

6. Prilozi

PRILOG 1. Slika 6.1. Kromatogram formaldehida

PRILOG 2. Slika 6.2. Kromatogram propanala

PRILOG 3. Slika 6.3. Kromatogram 3-hidroksi-2-metilpropanala

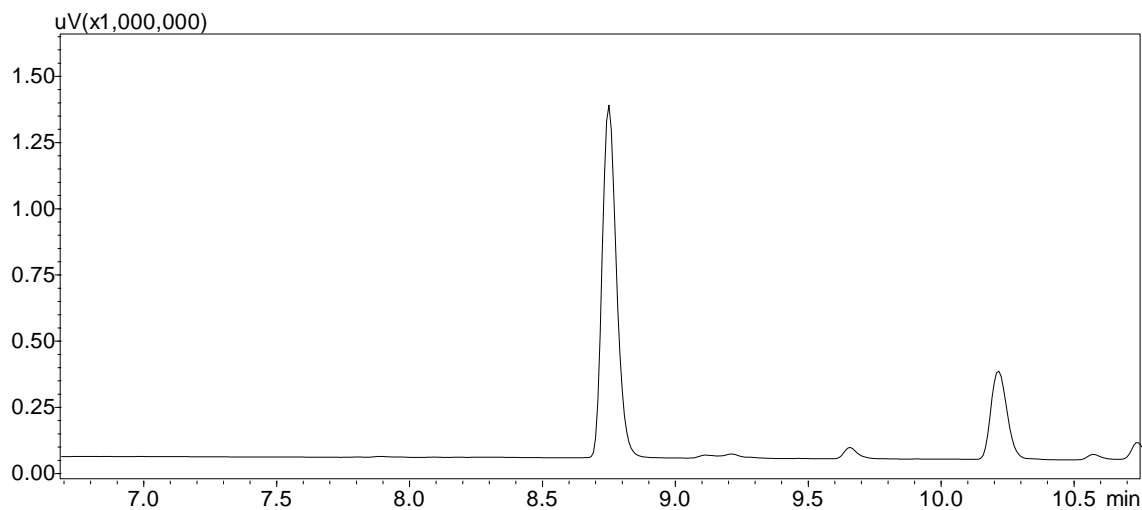
PRILOG 4. Slika 6.4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije formaldehida

PRILOG 5. Slika 6.5. Baždarni pravac za određivanje koncentracije propanala

PRILOG 6. Slika 6.6. Baždarni pravac za određivanje koncentracije 3-hidroksi-2-metilpropanala

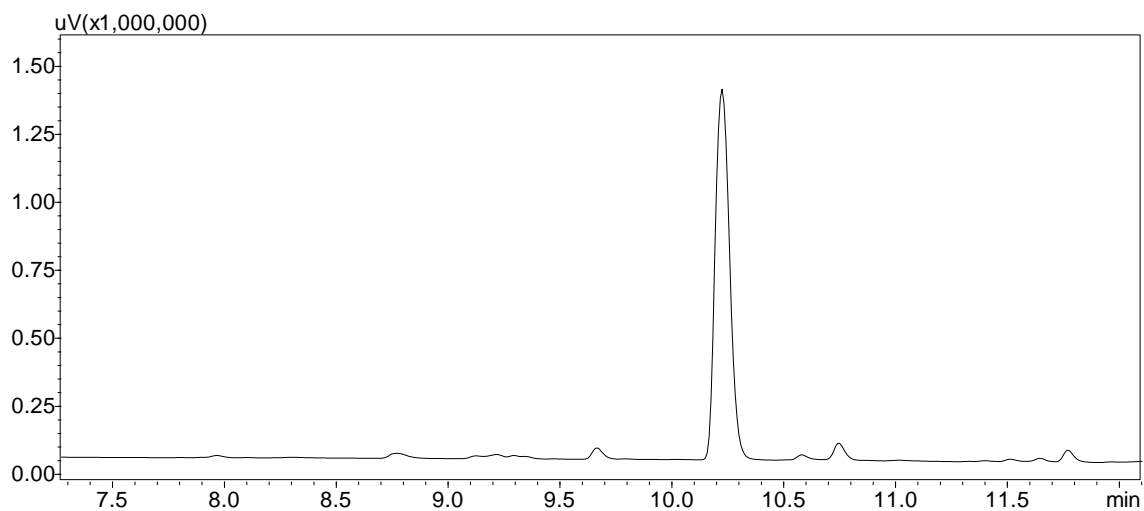
PRILOG 7. Slika 6.7. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina

PRILOG 1.



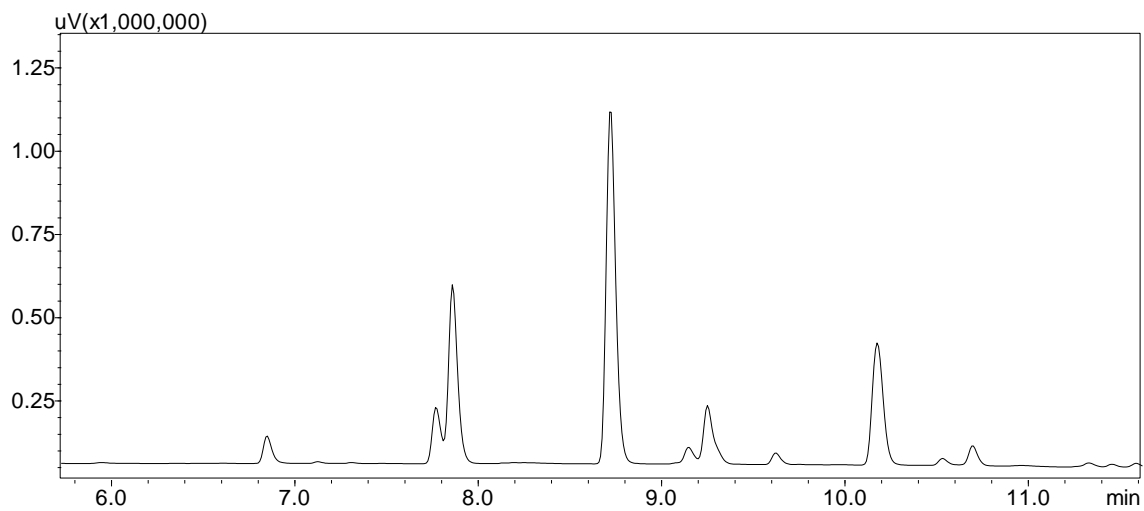
Slika 6.1. Kromatogram analiziranog uzorka formaldehida na Phenomenex Kinetex® C18 koloni (retencijsko vrijeme 8,7 min)

PRILOG 2.



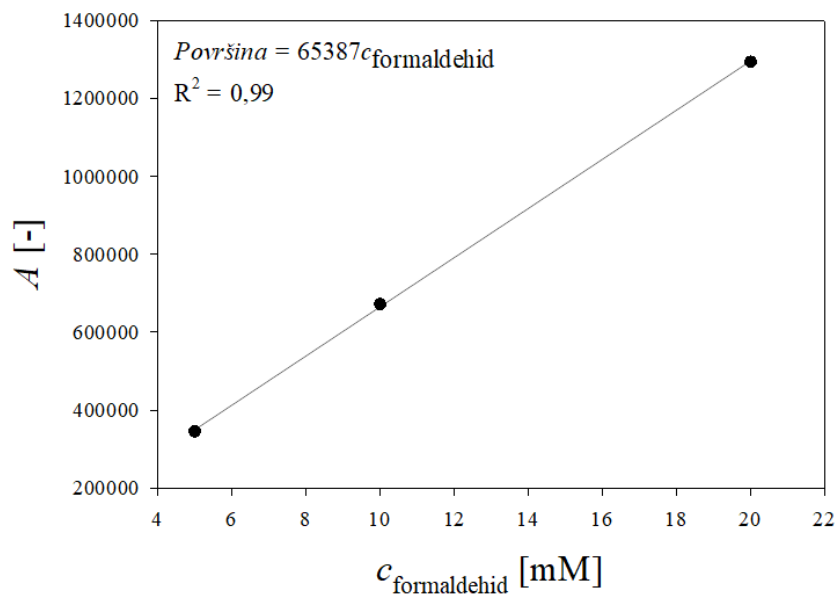
Slika 6.2. Kromatogram analiziranog uzorka propanala na Phenomenex Kinetex® C18 koloni (retencijsko vrijeme 10,1 min)

PRILOG 3.



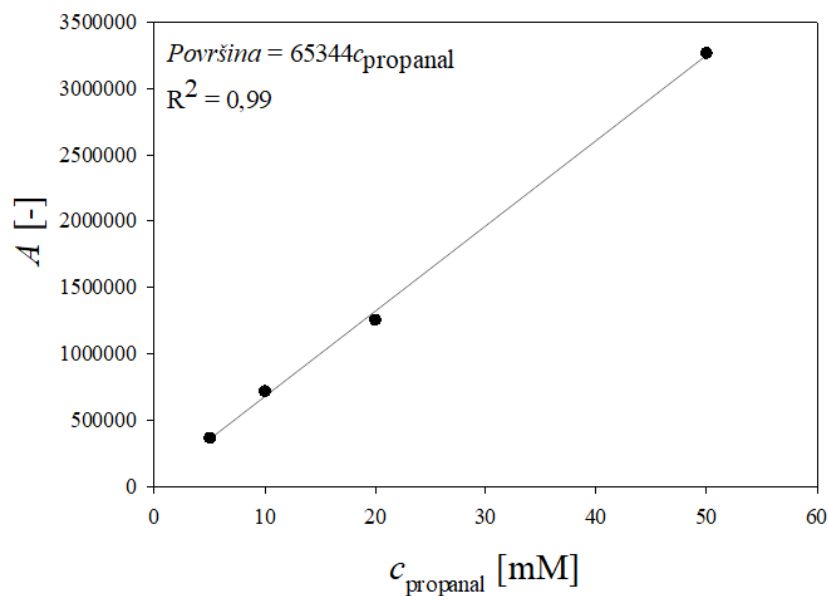
Slika 6.3. Kromatogram analiziranog uzorka 3-hidroksi-2-metilpropanala na Phenomenex Kinetex® C18 koloni (retencijsko vrijeme 7,8 min)

PRILOG 4.



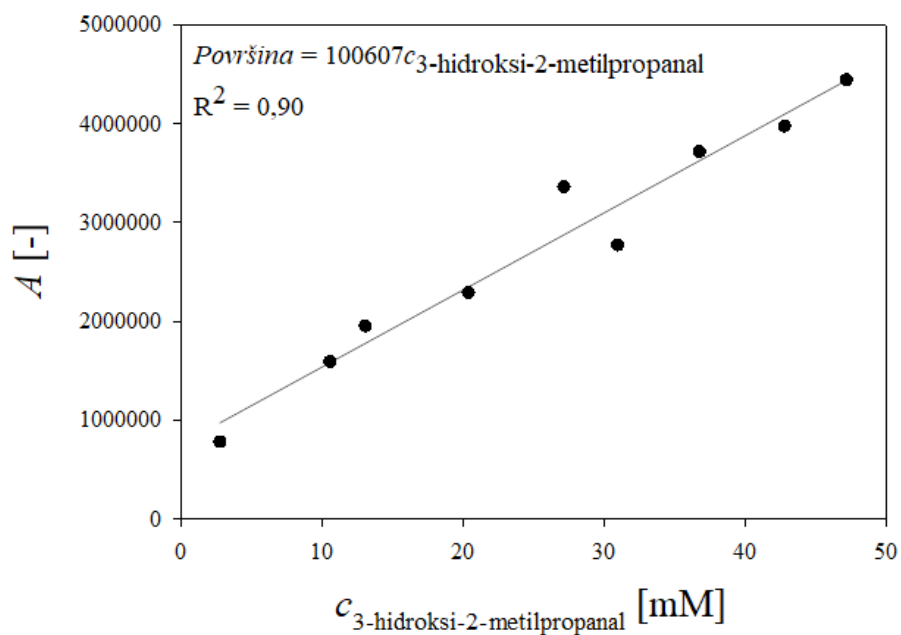
Slika 6.4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije formaldehida

PRILOG 5.

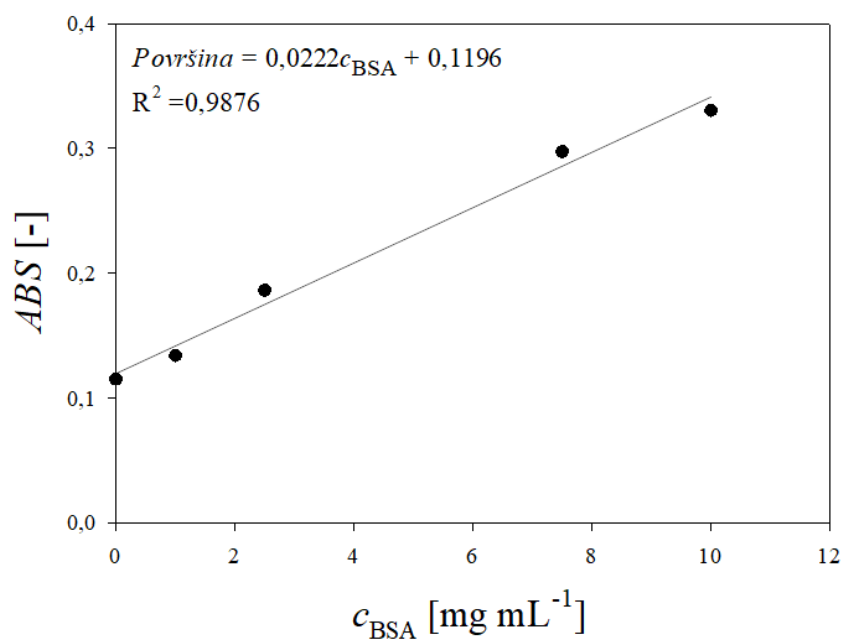


Slika 6.5. Baždarni pravac za određivanje koncentracije propanala

PRILOG 6.

**Slika 6.6.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije 3-hidroksi-2-metilpropanala

PRILOG 7.

**Slika 6.7.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina

7. Popis simbola

A	površina ispod odziva	[-]
ABS	apsorbancija	[-]
$BnONH_2 \cdot HCl$	O-benzilhidroksilamin hidroklorid	
c	molarna koncentracija	[mM]
d	udaljenosti kroz koju prolazi svjetlost u kiveti	[cm]
FSA	D-fruktoza-6-fosfat aldolaza	
γ	masena koncentracija	[mg mL ⁻¹]
H_3PO_4	fosforna kiselina	
$HPLC$	kapljevinska kromatografija visokog učinka	
$IPTG$	izopropil- β -D-tiogalaktopiranozid	
k_d	konstanta deaktivacije	[h ⁻¹]
K_i	konstanta inhibicije	[mmol / dm ³]
K_m	Michaelisova konstanta	[mmol / dm ³]
m	masa	[g ili mg]
$MeOH$	metanol	
$S.A.$	specifična aktivnost enzima	[U / mg]
T	temperatura	[°C]
t	vrijeme	[min ili h]
TEA	trietanolamin	
TFA	trifluoroctena kiselina	
$TRIS$	tris(hidroksimetil)aminometan	
UV	ultraljubičasto svjetlo	
V	volumen	
V_m	maksimalna brzina reakcije	[U mg ⁻¹]

8. Literatura

D. Bas, F.C. Dudak, I.H. Boyaci; Modelling and optimization IV: Investigation of reaction kinetics and kinetic constants using a program in which artificial neural network (ANN) was integrated, *Journal of Food Engineering*, 79, 1152-1154 (2007)

J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer; *Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman, 97-99 (2002)

M.M. Bradford; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254 (1976)

J.M. Brass, F.W.J.M.M. Hoeks, M. Rohner; Application of modelling techniques for the improvement of industrial bioprocess, *Journal of Biotechnology*, 59, 63-72 (1997)

T.D.H. Bugg; *Introduction to enzyme and coenzyme chemistry*, Blackwell Publishing, 19-21 (2004)

I. Chorkendorff, J.W. Niemanstverdiert; *Concepts of modern catalysis and kinetics*, Wiley-VCH, 2-3 (2003)

P. Clapés, W. Fessner, G.A. Sprenger, A.K. Samland; Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases, *Current Opinion in Chemical Biology*, 14, 1 (2009)

M. Česnik, D. Skendrović, M. Sudar, Đ. Vasić-Rački, R. Roldan, K. Hernández, P. Clapés, A. Szekrenyi, W.D. Fessner, Z. Findrik Blažević; Aldolase comparison in enzymatic aldol addition, *CarbaZymes* (2018)

D.C. DeLuca, J. Lyndal York; *Encyclopedia of Genetics*, Academic Press, 625 (2001)

K. Faber; *Biotransformations in organic chemistry*, Springer, 3-6 (2011)

Z. Findrik Blažević, M. Česnik, Đ. Vasić-Rački, R. Roldan, K. Hernández, P. Clapés; Optimization of enzyme catalyzed aldol addition of propanal and formaldehyde, *CarbaZymes* (2017)

X. Garrabou, J.A. Castillo, C. Guerard-Helaine, T. Parella, J. Joglar, M. Lemaire, P. Clapés; Asymmetric self- and cross-aldol reactions of glycolaldehyde catalyzed by D-Fructose-6-phosphate aldolase, *Angewandte Chemie International Edition*, 48, 5521-5525 (2009)

A. Illanes; *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*, Springer, 16-17 (2008)

A. Illanes, L. Wilson, C. Vera; *Problem solving in enzyme biocatalysis*, Wiley, 6-7 (2014)

- K.R. Jegannathan, P.H. Nielsen; Environmental assessment of enzyme use in industrial production, *Journal of Cleaner Production*, 42, 228-240 (2013)
- A.M. Klivanov; Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents, *Accounts of Chemical Research*, 23, 114-120 (1990)
- A. Liese, M.V. Filho; Production of fine chemicals using biocatalysis, *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 595 (1999)
- J. J. Marsh, H.G. Leberer; Fructose-biphosphate aldolases: An evolutionary history, *Trends in Biochemical Sciences*, 17, 110-113 (1992)
- P.F. Mugford, U.G. Wagner, Y. Jiang, K. Faber, R.J. Kazlauskas; Enantiocomplementary enzymes: classification, molecular basis for their enantioselectivity, and prospects for mirror-image biotransformations, *Angewandte Chemie International Edition*, 47 (46), 8782-93 (2008)
- S. Mukherjee, J.W. Yang, S. Hoffmann, B. List; Asymmetric enamine catalysis, *Chemical Reviews*, 107, 5471-5569 (2007)
- M.T. Reetz; Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: Past, present and future, *Journal of the American Chemical Society*, 135 (34), 12480 (2013)
- G. Sin, J.M. Woodley, K.V. Gernaey; Application of modeling and simulation tools for the evaluation of biocatalytic processes: A future perspective, *Biotechnol. Prog.*, 25, 1530 (2009)
- D.J. Pollard, J.M. Woodley; Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *Trends in Biotechnology*, 25 (2), 65 (2006)
- S.B. Rubin-Pitel, C.M.H. Cho, W. Chen, H. Zhao; Directed evolution tools in bioproduct and bioprocess development, *Elsevier*, 64 (2003)
- W. Saibi, S. Abdeljalil, K. Masmoudi, A. Gargouri; Biocatalysts: Beautiful creatures, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier, 1-5 (2012)
- M. Schürmann, G.A. Sprenger; Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to novel group of bacterial transaldolases, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 11055-61 (2001)
- M. Sugiyama, Z. Hong, P. Liang, S.M. Dean, L.J. Whalen, W. A. Greenberg, C. Wong; D-fructose-6-phosphate aldolase-catalyzed one-pot synthesis of iminocyclitols, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 14811 (2007)

S. Takayama, G.J. McGarvey, C. Wong; Microbial aldolases and transketolases: New biocatalytic approaches to simple and complex sugars, *Annual Review of Microbiology*, 51, 287-288 (2004)

B.M. Trost, C.S. Brindle; The direct catalytic asymmetric aldol addition, *Chemical Society Reviews*, 39, 1601 (2010)

Đ. Vasić-Rački, Z. Findrik, A.V. Presečki; Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Applied Microbiology and Technology*, 91, 845-856 (2011)

Đ. Vasić-Rački, U. Kragl, A. Liese; Benefits of enzyme kinetics modelling, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 17, 7 (2003)

R. Wolfenden, M.J. Snider; The depth of chemical time and the power of enzymes as catalysts, *Accounts of Chemical Research*, 34, 938-945 (2001)

