

# Modeliranje biokatalitičke redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom

---

**Pohanić, Petra**

**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:149:522510>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-17**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Petra Pohanić

# ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Petra Pohanić

MODELIRANJE BOKATALITIČKE REDUKCIJE ACETONA KATALIZIRANE  
KETOREDUKTAZOM

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić

Zagreb, rujan 2018.

Najtoplije zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki, na velikoj pomoći prilikom izrade rada te na svom strpljenju, razumijevanju i podršci.

Također, hvala mag. ing. cheming. Aneri Švarc na velikoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada.

Zahvaljujem roditeljima, bratu, Filipu i svim prijateljima koji su bili uz mene, hrabрили me i podržavali tijekom cijelog mog školovanja.

Barbara, hvala za sve!

## SAŽETAK

### MODELIRANJE BIODOKATALITIČKE REDUKCIJE ACETONA KATALIZIRANE KETOREDUKTAZOM

Ketoreduktaze su enzimi koji sudjeluju u prijenosu elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma te time kataliziraju redoks reakcije. U ovom radu provedeno je ispitivanje kinetike ketoreduktaze (KRED) u reakciji redukcije acetona, kao i ispitivanje kinetike u povratnoj reakciji, oksidaciji izopropanola. KRED za redukciju acetona zahtijeva prisustvo koenzima nikotin-amid-adenin-dinukleotid-fostata (NADPH) koji dovodi vodik do acetona reducirajući ga u izopropanol, prilikom čega NADPH prelazi u oksidirani oblik,  $\text{NADP}^+$ . Eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu *Scientist*, a kinetički parametri procijenjeni su nelinearnom regresijom pomoću simpleks metode ili metode najmanjih kvadrata. Također, određena je stabilnost enzima u otopini acetona.

Na temelju sheme reakcije i procijenjenih kinetičkih parametara postavljen je matematički model. Upotrebom modela provedena je simulacija redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom u kotlastom reaktoru. Zaključeno je kako se reakcija redukcije acetona katalizirana ketoreduktazom može koristiti u procesu regeneracije koenzima  $\text{NADP}^+$  zbog postignute ravnotežne konverzije od 84,7 %.

Ključne riječi: modeliranje, ketoreduktaza, regeneracija koenzima, enzimski kinetika

## ABSTRACT

### MODELLING OF BIOCATALYTICAL ACETONE REDUCTION CATALYZED BY KETOREDUCTASE

Ketoreductase is an enzyme involved in the transfer of electrons, hydrogen or oxygen atoms, thus catalyzing the redox reaction. In this paper, ketoreductase kinetics (KRED) was investigated in the reaction of acetone reduction as well as the kinetic in the reverse reaction, the isopropanol oxidation. KRED for acetone reduction requires the presence of nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate (NADPH) coenzyme, which transfers the hydrogen to acetone by converting it into isopropanol, whereby NADPH passes into an oxidized form,  $\text{NADP}^+$ . Experimental data were processed in the *Scientist* program package, and kinetic parameters were estimated by nonlinear regression using the simplex method or the least squares method. Also, the stability of the enzyme in the acetone solution was determined.

Based on reaction scheme and estimated kinetic parameters, a mathematical model was set. Using the model, the simulation of acetone reduction catalyzed by ketoreductase was done in the batch reactor. It was concluded that reaction of acetone reduction catalyzed by examine ketoreductase can be used in the  $\text{NADP}^+$  coenzyme regeneration process due to achieved 84,7 % equilibrium conversion.

Key words: modelling, ketoreductase, coenzyme regeneration, enzyme kinetics

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.1. Enzimi .....	2
2.1.1. Stabilnost enzima .....	3
2.1.2. Podjela enzima .....	3
2.2. Oksidoreduktaze .....	3
2.3. Koenzim nikotin-amid-adenin-dinukleotid-fosfat, NADPH .....	4
2.4. Regeneracija koenzima .....	5
2.5. Modeliranje biotransformacija.....	6
2.5.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija .....	6
2.5.2. Reaktorski model .....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	11
3.1. Aparatura.....	11
3.1.1. Analitička vaga .....	11
3.1.2. Homogenizator.....	11
3.1.3. Spektrofotometar.....	11
3.1.4. Kotlasti reaktor.....	12
3.1.5. pH metar.....	13
3.2. Analitičke metode .....	13
3.2.1. Kinetička karakterizacija ketoreduktaze .....	13
3.2.2. Određivanje stabilnosti ketoreduktaze u otopini acetona .....	15
3.2.3. Obrada podataka .....	16
4. MATEMATIČKI MODEL PROCESA .....	17
4.1. Kinetički model.....	17

4.2. Rektorski model .....	17
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	19
5.1. Kinetička karakterizacija ketoreduktaze .....	19
5.1.1. Kinetička karakterizacija u reakciji redukcije acetona .....	19
5.1.2. Kinetička karakterizacija u reakciji oksidacije izopropanola .....	22
5.2. Utjecaj acetona na stabilnost ketoreduktaze .....	24
5.3. Simulacija redukcije acetona .....	27
5. ZAKLJUČAK .....	29
LITERATURA .....	30
POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA .....	32
PRILOZI .....	34
ŽIVOTOPIS .....	35



## 1. UVOD

Zanimanje za komercijalnu proizvodnju spojeva koji nastaju u biokatalitičkim procesima konverzijom biomase i u bioprocima iz obnovljivih sirovina svakodnevno raste. Potreba za takvom proizvodnjom posebno je naglašena pri sintezi kemikalija (akrilamid, akrilna kiselina), u prehrambenoj industriji (glukoza i fruktoza sirupi, pivo, šećer, ulja), kao i u farmaceutskoj industriji (6-aminopenicilinska kiselina). (Jukić et al., 2005)

Biokataliza postiže nove napretke u zaštiti okoliša, te se smatra jednim od važnih alata u postizanju ciljeva „Zelene kemije“ kao što je dizajn, razvoj i aplikacija kemijskih procesa u svrhu smanjenja i uklanjanja supstrata štetnih za ljude i okoliš. Ujedno predstavlja alternativu tradicionalnim kemijskim procesima (Alcalde et al., 2006), ali uzimajući u obzir enzimsku kinetiku i stabilnost enzima.

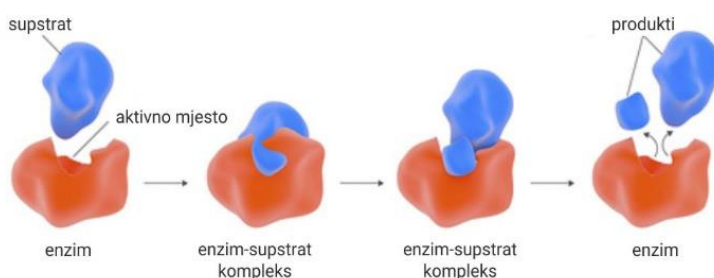
Danas modeliranje procesa ima sve veću ulogu u razvoju biokatalitičkih procesa. Izgradnja modela omogućava predviđanje brzina reakcije pri različitim početnim koncentracijama supstrata, proračun iskorištenja i vrijeme odvijanja reakcije. Koristan je u optimizaciji procesa kao i za dizajn reaktora. (Vasić-Rački et al., 2011)

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Enzimi

Enzimi ili biokatalizatori su kompleksni proteini sastavljeni od više lanaca aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama. (Findrik Blažević, 2012) Enzimi se sastoje od proteinskog (apoenzim) i neproteinskog dijela (prostetička skupina ili kosupstrat). Prostetička skupina može biti organska makromolekula, nukleinska kiselina ili metalni ioni (metaloenzim) te je čvrsto povezana s apoenzimom tijekom kataliziranja reakcije i specifična je samo za jedan supstrat dok je kosupstrat slabo vezan za apoenzimski dio enzima i lako disocira. (Illanes, 2008) Prvi, potpuno čist enzim, izolirao je Sumner još 1926. godine i dokazao da je on po kemijskom sastavu protein. (Findrik Blažević, 2017)

Upravo zbog svoje specifičnosti, enzimi kataliziraju samo određenu reakciju te je bitno naglasiti kako nakon kemijske reakcije ostaju nepromijenjeni. Mehanizam enzimskog djelovanja prikazan je na slici 2.1. U optimalnim uvjetima, sličnim onima u živoj stanici, kataliziraju reakcije do  $10^{10}$  puta brže od reakcija što se odvijaju bez enzima. Enzimi ubrzavaju kemijsku reakciju pravilno orijentirajući molekule koje se sudaraju, odnosno smanjuju energiju koju je potrebno dovesti molekulama u reakciji kako bi međusobno reagirale (energija aktivacije). (Duraković, 1996)



**Slika 2.1** Mehanizam enzimskog djelovanja

Za razliku od klasičnih katalizatora, enzimi su biorazgradivi i time ekološki prihvatljivi, provode kompleksne reakcije u jednom stupnju, djeluju pri niskim koncentracijama te ne zahtijevaju primjenu ekstremnih reakcijskih uvjeta poput pH, temperature i tlaka. Uz navedene

prednosti, posjeduju i nedostatke poput visoke cijene izolacije i pročišćavanja, vrlo lako podliježu inhibiciji supstratom i/ili produktom kao i deaktivaciji. (Vrsalović Presečki, 2003)

### 2.1.1. Stabilnost enzima

Stabilnost enzima definirana je kao ostatak enzimске aktivnosti nakon određenog vremena. Razlikujemo operacijsku stabilnost enzima i stabilnost u uvjetima skladištenja. Operacijska stabilnost je definirana kao stabilnost enzima tijekom kontinuirane upotrebe. Obično se izražava kao vrijeme poluživota enzima, tj. kao vrijeme potrebno da se njegova početna aktivnost snizi na polovicu početne vrijednosti. Stabilnost u uvjetima skladištenja ovisi o fizikalnom stanju enzima (suspenzija, otopina, liofilizat). (Findrik Blažević, 2012) Na stabilnost enzima također mogu utjecati inhibitori, kisik, neprikladna pH vrijednost, ali najčešće se misli na temperaturu iznad koje se gubi enzimska stabilnost. Većina enzima je aktivna i stabilna u vrlo limitirajućem području pH i temperature, najčešće između 15°C do 50°C, odnosno pH 5 do 10. (Bommarius & Riebel, 2004)

### 2.1.2. Podjela enzima

Enzime se dijele u šest osnovnih skupina: (1) transferaze (premještaju funkcionalne grupe između donora i odgovarajućeg akceptora), (2) hidrolaze (kataliziraju hidrolitičke reakcije), (3) liaze (kataliziraju nehidralitičko cijepanje kemijske veze), (4) izomeraze (kataliziraju izomerizaciju supstrata), (5) ligaze (kataliziraju reakciju tvoreći kovalentnu vezu između dviju molekula) i (6) oksidoreduktaze.

## **2.2. Oksidoreduktaze**

Oksidoreduktaze sudjeluju u prijenosu elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma te time kataliziraju redoks reakcije (oksidaciju i redukciju). Predstavljaju približno 25% svih enzima i čine jednu od najvećih enzimskih klasa. Za svoju aktivnost zahtijevaju prisustvo koenzima te ukoliko ga nemaju vezanog za samu strukturu, potrebno je dodati ga u stehiometrijskoj koncentraciji u odnosu na supstrat. Postoje 22 podskupine oksidoreduktaza među koje pripadaju dehidrogenaze. One oksidiraju supstrate prenoseći atom vodika na koenzim (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>,

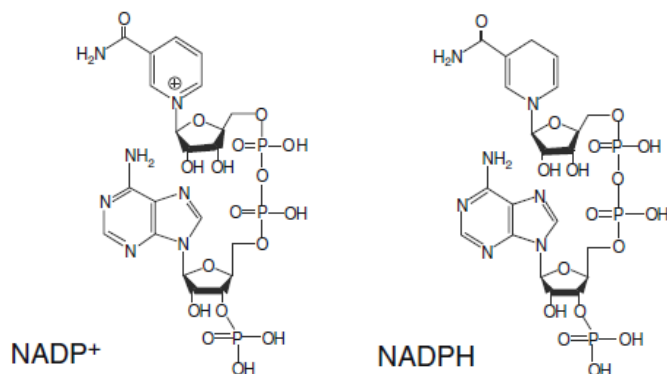
FAD<sup>+</sup>, FMN) i sudjeluju u metabolizmu stanica. NAD(P)H ovisne dehidrogenaze imaju veliku primjenu u sintezi kiralnih spojeva. (Illanes, 2017)

Ketoreduktaze (KRED) ili karbonil reduktaze također pripadaju podskupini oksidoreduktaza. Često se koriste kao katalizatori u redukciji ketona u optički čiste alkohole. Primjerice, nalaze se u stanicama pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*) te su prvobitno korištene dodatkom ketona živoj stanici kvasca kako bi reducirala kofaktor NAD(P)H. (Nguyen et al., 2004) Ketoreduktaze su također identificirane i izolirane iz *Picrophilus torridus*, *Thermus thermophilus*, *Pyrococcus furiosus*, odnosno iz termofilnih mikroorganizama te su tolerantne na temperature i do 70°C. Također su enantioselektivne i dobro topive u vodi. Njihova svojstva nastoje se poboljšati korištenjem procesnog inženjerstva. (Huisman et al., 2009)

### 2.3. Koenzim nikotin-amid-adenin-dinukleotid-fosfat, NADPH

Koenzimi su transportni metaboliti, organske molekule niskomolekulske mase, metalni ioni ili neke druge jednostavne molekule. Prema reakcijama u kojima sudjeluju, razlikujemo koenzime koji su prenosioci funkcijskih skupina (npr. vitamini B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>, biotin) te oksidoredukcijske koenzime koji su povezani s procesima oksidacije i redukcije (NAD<sup>+</sup>, NADP<sup>+</sup>). (Miloš, 2009)

Kemijske strukture koenzima NADP<sup>+</sup> (nikotin-amid-adenin-dinukleotid) i NADPH (nikotin-amid-adenin-dinukleotid-fosfat) prikazane su na slici 2.2. Od velike su važnosti obzirom da 80% poznatih oksidoreduktaza zahtjeva NADH kao koenzim, a 10% NADPH. (Wu et al., 2013)

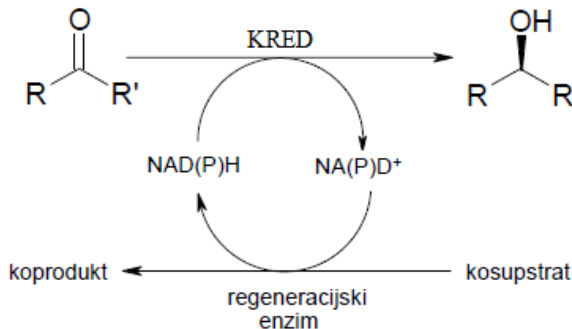


Slika 2.2 Kemijske strukture NAD<sup>+</sup> i NADPH

## 2.4. Regeneracija koenzima

Pojedini enzimi zahtijevaju prisutnost koenzima za svoju aktivnost, a ukoliko nisu vezani za samu strukturu enzima potrebno ih je dodati u stehiometrijskim koncentracijama u odnosu na supstrat. Obzirom da su preskupi da bi se koristili u stehiometrijskim količinama, poželjno je provoditi postupke regeneracije koenzima kako bi se omogućila njihova manja potrošnja. (Hummel, 1999)

U regeneracijskim sustavima se oksidirani ili reducirani oblik nastalog koenzima reakcijom pretvara u početni oblik te ujedno predstavlja jedan od supstrata početne reakcije. Tako se, primjerice, odvođenjem  $\text{NADP}^+$  iz sustava i prevodeći ga u  $\text{NADPH}$  narušava reakcijska ravnoteža i prema La Chatelierovom principu dolazi do pomicanja ravnoteže u željenom smjeru. Samim time, neželjeni oblik koenzima konvertira u oblik potreban za glavnu reakciju. (Findrik Blažević, 2012) Općenita shema redukcije ketona u optički aktivan oblik alkohola uz prisustvo ketoreduktaze i koenzima  $\text{NAD(P)H}$  kao i regeneraciju koenzima prikazana je slikom 2.3.



**Slika 2.3** Shematski prikaz redukcije ketona u optički aktivan oblik alkohola uz prisustvo ketoreduktaze i koenzima  $\text{NAD(P)H}$  te regeneracija koenzima

Postoji mnogo načina za regeneraciju koenzima kao što su elektrokemijska, kemijska, fotokemijska i enzimaska regeneracija. Enzimaska regeneracija je jedina primjenjiva u industrijskim mjerilima (Wang et al, 2017) jer pokazuje veliku selektivnost, najbolje je istražena metoda te je okolišno prihvatljiva. Pronalazak pravog načina regeneracije kako bi se postigla što veća selektivnost, posebice u pretvorbi dijelova reaktanata u željeni produkt, nije jednostavan zadatak. U obzir se mora istodobno uzeti nekoliko čimbenika: stabilnost enzima i koenzima, konverzija pretvorbe te usklađivanja brzina reakcija u višeenzimskom sustavu. (Wu et al., 2013)

## 2.5. Modeliranje biotransformacija

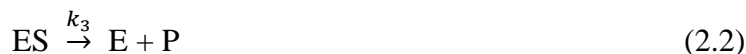
Biotransformacije su bioprocеси u kojima se reakcije odvijaju u jednom ili dva stupnja uz uvjet da postoji slična struktura između reaktanata i produkta te su katalizirane enzimima. Općenito, svrha modeliranja u procesnom inženjerstvu je analizirati procese primjenom znanstvenih metoda tijekom definiranja problema i razvitka postupaka njihovog rješavanja. Tijekom postupka modeliranja prvo je potrebno definirati svrhu provođenja procesa, zatim provesti niz eksperimentalnih podataka, postaviti matematički model procesa koji uključuje kinetički i reaktorski model, riješiti postavljene modele i ocijeniti valjanost modela usporedbom rezultata simulacije modela s dobivenim eksperimentalnim podacima. (Sin et al., 2009)

Modeliranje i simuliranje biotransformacijskih procesa ima veliku ulogu u potrazi za optimalnim procesnim uvjetima. Mogu se koristiti za razvoj dizajna, kao *scale up* te za usporedbu alternativnim procesima. U kombinaciji s računalnim programima, može se reći da vode do boljeg razumijevanja problema jer omogućavaju procjenu konverzije, volumena reaktora, procjenu procesnih varijabli i parametara, tijekom reakcije kao i predviđanje stabilnosti enzima. (Vrsalović Presečki et al., 2006)

### 2.5.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija

Kinetički model enzimske reakcije je matematički izraz koji opisuje vezu između brzine enzimske reakcije i koncentracija ovisno o reaktorskim uvjetima: temperaturi i/ili tlaku. Osnovni kinetički model ispitivanja brzina enzimski katalizirane reakcije se može opisati pomoću hipoteze koju su predložili Leonor Michealis i Maud Menten (1913). Predložili su da enzimska kinetika slijedi dva koraka. Prvi korak je formiranje kompleksa enzim-supstrat (ES) između supstrata (S) i enzima (E) te uključuje brzu reverzibilnu reakciju, a u drugom koraku nastali međukompleks se u slijednoj reakciji raspada na produkt (P) i nepromijenjeni enzim (E). Mehanizmi se mogu opisati jednadžbama 2.1 i 2.2 gdje se oznake  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  određuju eksperimentalno i predstavljaju konstantnu brzinu pojedinih reakcija u sustavu.





Osnovna jednađba Michealis-Mentenićine kinetike za jednosupstratnu reakciju dana je izrazom 2.3.:

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S} \quad (2.3)$$

U navedenom izrazu,  $r_S$  predstavlja brzinu potrošnje supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ],  $V_m$  je maksimalna reakcijska brzina koja je ostvarena kada se molekule enzima nalaze u obliku kompleksa ES [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ],  $c_S$  je koncentracija supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ], a  $K_m^S$  je Michealis - Mentenova konstanta koja govori o afinitetu enzima prema supstratu te je jednaka koncentraciji supstrata pri kojoj reakcijska brzina postiže polovicu svoje vrijednosti [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ].

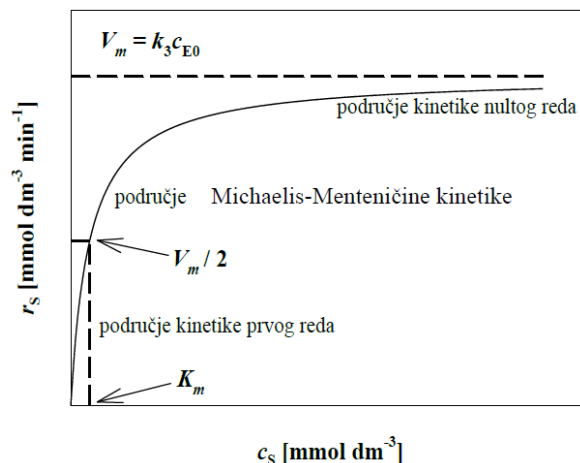
Ujedno,  $V_m$  i  $K_m^S$  su karakteristićni parametri procesa dani izrazima 2.4 i 2.5:

$$V_m = k_3 \cdot c_{E1} \quad (2.4)$$

$$K_m^S = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.5)$$

Iz izraza je vidljivo kako maksimalna brzina reakcije predstavlja umnožak koncentracije enzima i njegove konstante brzine reakcije. Vrijednost  $K_m^S$  je manja pri većim vrijednostima  $k_1$ , u odnosu na  $k_2 + k_3$ , iz čega slijedi da je reakcija nastajanja međukompleksa brža kao i da enzim ima dobar afinitet prema supstratu. (Findrik Blažević, 2017)

Fizićka slika Michealis – Mentenićine kinetike (jedn. 2.3) prikazana je na slici 2.4. Za navedenu kinetiku karakteristićna su tri različita područja ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata. Područje kinetike prvog reda, područje Michealis – Metenićine kinetike i područje nultog reda. U području niskih koncentracija supstrata,  $c_S \ll K_m^S$ , postoji linearna ovisnost reakcijske brzine,  $r_S$ , o koncentraciji supstrata,  $c_S$ , te se područje može aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda. Također, područje visokih koncentracija supstrata,  $c_S \gg K_m^S$ , se može aproksimirati kinetikom nultog reda, dok se područje Michealis – Mentenićine kinetike nalazi između područja kinetike nultog i prvog reda. (Baković, 2017)



**Slika 2.4** Grafički prikaz ovisnosti reakcijske brzine o koncentraciji supstrata za Michealis – Meneničinu kinetiku

Većina reakcija je dvosupstratna, gdje drugi supstrat, najčešće, predstavlja koenzim te je potrebno prethodno opisan model modificirati. Dvosupstratna reakcija (jedn. 2.6) opisuje se Michealis – Menteničinim izrazom prikazanog jednadžbom 2.7:



$$r_S = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) \cdot (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (2.7)$$

### 2.5.1.1. Inhibicija enzima

Ukoliko se supstrat, produkt ili neka treća tvar, koja kemijski nalikuje na supstrat, neželjeno veže za aktivno mjesto enzima, dolazi do smanjenja brzine enzimski katalizirane reakcije te dolazi do inhibicije i deaktivacije enzima. Time je reakcija djelomično ili potpuno onemogućena. Ukoliko inhibitor nalikuje supstratu i veže za isto aktivno mjesto kao supstrat, govorimo o kompetitivnoj inhibiciji. Nekompetitivnom inhibicijom nazivamo vezanje inhibitora na neko drugo, ne aktivno mjesto na enzimu, čime ometa daljnje povezivanje supstrata, dok antikompetitivna inhibicija predstavlja kombinaciju kompetitivne i nekompetitivne inhibicije zbog mogućnosti vezanja inhibitora na aktivno ili ne aktivno mjesto enzima. (Duraković, 1996) Postojanje navedenih inhibicija mora se uključiti u Michealis – Menteničinu jednadžbu. Ovisno o vrsti inhibicije za jednosupstratne reakcije dane su jednadžbe prikazane u tablici 2.1.



**Tablica 2.1.** Kinetika enzimske inhibicije

Inhibicija	Brzina potrošnje supstrata, $r_s$
kompetitivna	$\frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_S}$
nekompetitivna	$\frac{V_m \cdot c_S}{\left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) \cdot (K_m^S + c_S)}$
antikompetitivna	$\frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)}$

U navedenim izrazima  $K_i$  predstavlja konstantu inhibicije [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ], a  $c_i$  koncentraciju inhibitora [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]. (Dunn et al., 2000)

### 2.5.2. Reaktorski model

Enzimski reaktori su procesni uređaji u kojima bioprocese kataliziraju enzimi te u njima nema rasta biološkog materijala kao što je to slučaj kod fermentatora. Prema izvedbi, možemo ih podijeliti na: kotlaste, protočno kotlaste i cijevne. Zbog pojednostavljenja postavljanja modela, reaktore definiramo kao idealne.

Najjednostavniji je idealni kotlasti (šaržni ili *batch*) reaktor. Uvijek radi nestacionarno, odnosno sastav smjese i brzina reakcije ovise o vremenu. Model idealnog kotlastog reaktora sadrži pretpostavku rada pri konstantnoj temperaturi (izotermi rad) i konstantnom volumenu iz čega proizlazi pretpostavka o konstantnoj gustoći te pretpostavlja postojanje jednakog sastava reakcijske smjese u svakoj točki reaktora zbog idealnom miješanja. Reakcijska smjesa stavlja se na početku u reaktor, a završetkom reakcije, reaktor se otvara i reakcijska smjesa se izvadi iz reaktora. Pogodni su za reakcije u kapljevitoj fazi, za manje kapacitete te se koriste kao početni uređaji za *scale up*. (Gomzi, 1998)

Bilanca tvari, uz pretpostavku idealnog miješanja, za kotlasti tip reaktora može se opisati jednadžbom 2.8:

$$r_A \cdot V = \frac{d(V \cdot c_A)}{dt} \quad (2.8)$$

gdje  $r_A$  predstavlja brzinu potrošnje komponente A [ $\text{mol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ],  $V$  volumen reakcijske smjese u bioreaktoru [ $\text{dm}^{-3}$ ],  $t$  vrijeme [min] i  $c_A$  je množinska koncentracija komponente A [ $\text{mol dm}^{-3}$ ].

Uz pretpostavku konstantnog volumena reakcijske smjese jednadžba 2.8 glasi (jedn. 2.9):

$$r_A = - \frac{dc_A}{dt} \quad (2.9)$$

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Aparatura

##### 3.1.1. Analitička vaga

Sve potrebne odvage za provođenje eksperimenta vagane su na analitičkoj vagi *Shimadzu* (Slika 3.1).



**Slika 3.1** Analitička vaga *Schimadzu*

##### 3.1.2. Homogenizator

Uzroci su homogenizirani na homogenizatoru *MS2 Minishaker IKA* (slika 3.2).



**Slika 3.2** Homogenizator *MS2 Minishaker IKA*

##### 3.1.3. Spektrofotometar

Spektrofotometar je mjerni uređaj čiji je rad baziran na apsorpciji elektromagnetskog zračenja određenih valnih duljina prema Beer – Lambertovom zakonu (jedn. 3.1). Ukoliko je elektromagnetsko zračenje intenziteta  $I_0$  usmjereno u otopinu koja ga može apsorbirati,

propušteno zračenje,  $I$ , će biti smanjenog intenziteta, odnosno  $I_0/I$  predstavlja količina zračenja koja je prošla kroz uzorak. Apsorbancija,  $ABS$ , ovisi o molarnom apsorpcijskom koeficijentu,  $\varepsilon$ , koji je specifičan za svaku tvar i mijenja se s valnom duljinom ulaznog elektromagnetskog zračenja, o debljini uzorka,  $b$ , tj. o duljini svjetlosnog puta kroz uzorak te o koncentraciji tvari koja se nalazi u kiveti i apsorbira zračenje,  $c$ . (Novak, Bolanča, 2013)

$$ABS = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1)$$

U eksperimentalnom radu određivanja aktivnosti i stabilnosti ketoreduktaze, korišten je spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* (Slika 3.3) pri valnoj duljini  $\lambda = 340$  nm.



**Slika 3.3** Spektrofotometar *Shimadzu UV - 1800*

#### 3.1.4. Kotlasti reaktor

Tijekom rada korišten je kotlasti reaktor volumena  $V = 1.5$  cm<sup>3</sup> prilikom čega je reakcijski volumen bio  $V = 1$  cm<sup>3</sup>. Eksperimentalni dio određivanja stabilnosti ketoreduktaze, u otopini acetona, proveden je na sobnoj temperaturi uz konstanto miješanje ostvareno pomoću tresilice (Slika 3.4).



**Slika 3.4** Provođenje eksperimenta na tresilici

### 3.1.5. pH metar

Tijekom pripreve otopine fosfatnog pufera pH = 8, korišten je pH metar *Handylab Ph11* proizvođača *SCHOTT* (Slika 3.5).

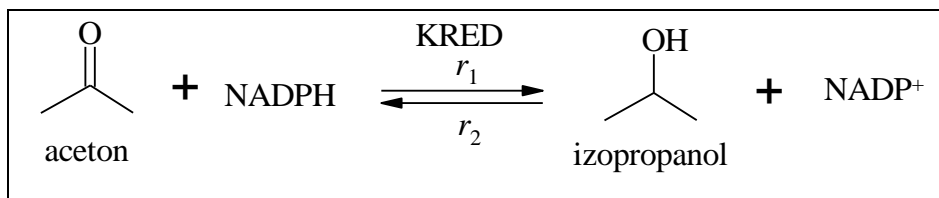


Slika 3.5 pH metar *Handylab Ph11*

## 3.2. Analitičke metode

### 3.2.1. Kinetička karakterizacija ketoreduktaze

Kinetika ketoreduktaze određivana je metodom početnih brzina u reakciji redukcije acetona u izopropanol uz koenzim NADPH kao i povratne reakcije uz koenzim NADP<sup>+</sup> kao kosupstrat. Shema reakcije prikazana je na slici 3.6.



Slika 3.6 Shematski prikaz ravnotežne reakcije redukcije acetona

U svim mjerenjima korišten je fosfatni pufer (pH = 8) koncentracije  $c_{\text{fosfati pufer}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Sva mjerenja provedena su na spektrofotometru pri valnoj duljini  $\lambda = 340 \text{ nm}$  prilikom čega je volumen ispitivanog uzorka u kvarcnoj kiveti bio konstantan i iznosio  $V = 1 \text{ cm}^3$ . Spektrofotometrijskom metodom dobivena je promjena apsorbancije u vremenu,  $\Delta ABS/\Delta t$ , koja ujedno predstavlja nagib pravca. Pomoću dobivenih rezultata izračunata je volumna aktivnost,  $A_V [\text{U cm}^{-3}]$ , (jedn. 3.2) kao i specifična aktivnost enzima,  $A_S [\text{U mg}^{-1}]$  (jedn. 3.3).

$$A_V = \frac{V_r}{\epsilon_{340} \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (3.2)$$

$$A_S = \frac{A_V}{\gamma_E} \quad (3.3)$$

U navedenim izrazima  $V_r$  predstavlja ukupni volumen uzorka u kiveti [ $\text{cm}^3$ ],  $\epsilon_{340}$  ekstincijski koeficijent pri valnoj duljini  $\lambda = 340 \text{ nm}$  [ $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ],  $d$  promjer kvarcne kivete [ $\text{cm}$ ],  $V_E$  volumen dodanog enzima [ $\text{mg cm}^{-3}$ ],  $\frac{\Delta ABS}{\Delta t}$  promjenu apsorbancije u vremenu [ $\text{min}^{-1}$ ], a  $\gamma_E$  predstavlja koncentraciju enzima [ $\text{mg cm}^{-3}$ ].

### 3.2.1.1. Mjerenje kinetike ketoreduktaze u reakciji redukcije acetona

Prilikom mjerenja kinetike ketoreduktaze u reakciji redukcije acetona koncentracija enzima je u svim ispitivanjima bila jednaka i iznosila je  $\gamma_{KRED} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ . Ispitan je utjecaj promjene koncentracije acetona na brzinu reakcije (Slika. 3.6) i to variranjem koncentracija acetona od  $7 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $1498 \text{ mmol dm}^{-3}$  uz konstantnu koncentraciju NADPH,  $c_{NADPH} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Nakon toga su provedena mjerenja pri variranju koncentracije NADPH u rasponu od  $0,024 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $0,156 \text{ mmol dm}^{-3}$  uz konstantnu koncentraciju acetona,  $c_{acetona} = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ , čime je ispitan utjecaj promjene koncentracije NADPH na kinetiku reakcije.

Također, bilo je potrebno ispitati inhibiciju produktom. Ispitivanje inhibicije redukcije acetona provodilo se pri konstantnim koncentracijama acetona,  $c_{acetona} = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ , i konstantnim koncentracijama NADPH,  $c_{NADPH} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Prvo se provodilo ispitivanje inhibicije izopropanolom gdje se varirala koncentracija izopropanola u rasponu od  $0 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $800 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a zatim se provodilo ispitivanje inhibicije produktom  $\text{NADP}^+$  pri koncentracijama od  $0 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $9,86 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

### 3.2.1.2. Mjerenje kinetike ketoreduktaze u reakciji oksidacije izopropanola

Kao i u prethodnom slučaju, provedeno je nekoliko sljedova ispitivanja, ali u ovom su se provodila kinetička ispitivanja za povratnu reakciju, odnosno oksidaciju izopropanola i redukciju  $\text{NADP}^+$ . U prvom slijedu ispitan je utjecaj promjene koncentracije izopropanola, prilikom čega je varirana njegova koncentracija u rasponu od  $13 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $325 \text{ mmol dm}^{-3}$  uz konstantnu koncentraciju  $\text{NADP}^+$ ,  $c_{NADP^+} = 4,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Nakon toga ispitan je utjecaj promjene koncentracije  $\text{NADP}^+$  u rasponu od  $0,0000148 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $2,464 \text{ mmol dm}^{-3}$  pri konstantnoj koncentraciji izopropanola,  $c_{izopropanol} = 1301 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

Variranjem koncentracije acetona i NADPH uz konstantne koncentracije izopropanola,  $c_{izopropanol} = 1301 \text{ mmol dm}^{-3}$ , i  $\text{NADP}^+$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 0,246 \text{ mmol dm}^{-3}$ , provedena su ispitivanje inhibicije produktom. U prvom slučaju koncentracija acetona je varirala u rasponu od  $0 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $1362 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a koncentracija NADPH u rasponu od  $0 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $0,240 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Korištena koncentracija enzima u prvom slijedu bila je  $\gamma_{KRED} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ , a u slijedeća tri je iznosila  $0,03 \text{ mg cm}^{-3}$ .

### 3.2.2. Određivanje stabilnosti ketoreduktaze u otopini acetona

Reakcije su provedene u šest kotlastih reaktora pri sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje na tresilici, a mjerenja su provedena na spektrofotometru pri valnoj duljini  $\lambda=340 \text{ nm}$ . U svakom pojedinom reaktoru prvo su pomiješani pufer,  $\text{pH} = 8$ , i enzim, od čega je uzet uzorak od  $10 \text{ }\mu\text{L}$  i dodan u prethodno priređenu otopinu u kiveti (Tablica 3.1.). Provedeno je spektrofotometrijsko mjerenje i određena je početna aktivnost enzima. Potom je u reaktor dodan određeni volumen acetona za zadanu koncentraciju (Tablici 3.2.) te je započelo vrijeme mjerenja stabilnosti. Za svaki reaktor, uzimani su uzorci u određenim vremenskim intervalima (5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120 i 180 minuta) kako bi se pratio pad aktivnosti enzima s vremenom.

Za svaki reaktor određene su konstante deaktivacije prvog reda prema jednadžbi 3.4, odnosno drugog reda prema jednadžbi 3.5.

$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A \quad (3.4)$$

$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A^2 \quad (3.5)$$

U izrazima  $k_d$  je konstanta deaktivacije enzima [ $\text{min}^{-1}$ ], a  $A$  relativna aktivnost enzima u reaktoru.

**Tablica 3.1.** Sastav testa korišten za mjerenja aktivnosti ketoreduktaze

Komponenta	Koncentracija	Volumen, $\mu\text{L}$	Komponenta	Jedinica
<b>pufer, pH=8</b>		935	100	$\text{mmol dm}^{-3}$
<b>NADPH</b>	$8 \text{ mg cm}^{-3}$	11	0,10	$\text{mmol dm}^{-3}$
<b>aceton</b>	680 mM	44	29,96	$\text{mmol dm}^{-3}$
<b>uzorak</b>		10	0,01	$\text{g dm}^{-3}$

**Tablica 3.2.** Sastav reaktorske smjese

<b>Broj reaktora</b>	<b>Aceton, mmol dm<sup>-3</sup></b>	<b>KRED, g cm<sup>-3</sup></b>
<b>0</b>	0	1
<b>1</b>	9,8	1
<b>2</b>	49,0	1
<b>3</b>	99,4	1
<b>4</b>	190,7	1
<b>5</b>	490,3	1

### 3.2.3. Obrada podataka

Eksperimentalni podaci, koji pokazuju utjecaj koncentracija pojedinih komponenata na početnu brzinu reakcije, obrađeni su u programskom paketu *Scientist*. Parametri modela procijenjeni su nelinearnom regresijom koristeći metodu najmanjih kvadrata ili simpleks metodu koja se koristi pri velikoj razlici početne vrijednosti parametara i njegove stvarne vrijednosti. Općenito, metode procjene parametara imaju za cilj pronaći minimalan zbroj kvadrata greške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela.

Predviđeni parametri (maksimalne reakcijske brzine, Michealis – Menteničine konstante, konstante inhibicije, konstanta deaktivacije) korišteni su u simulaciji reakcijskog procesa pomoću razvijenog modela, odnosno korišteni su za predviđanje promjene koncentracija reaktanata i produkata tijekom određenog vremena u kotlastom reaktoru. Simulacije su također provedene u programskom paketu *Scientist*.



## 4. MATEMATIČKI MODEL PROCESA

Matematički model procesa sastoji se od kinetičkog i reaktorskog modela. Postavljen je za biokatalitičku reakciju redukcije acetona na temelju sheme reakcije (Slika 3.6), kinetičkih ispitivanja, te na pretpostavci da je reaktorski volumen konstantan uz konstantnu temperaturu i idealno miješanje.

### 4.1. Kinetički model

Kinetički model sadrži jednadžbe za redukciju acetona (jedn. 4.1) i oksidaciju izopropanola (jedn. 4.2).

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot \gamma_{KRED} \cdot A \cdot c_{NADPH} \cdot c_{aceton}}{\left( K_{m_{aceton}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{izopropanol}}{K_{i_{izopropanol}}} \right) + c_{aceton} + \frac{c_{aceton}^2}{K_{i_s}} \right) \cdot \left( c_{NADPH} + K_{m_{NADPH}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{NADP^+}}{K_{i_{NADP^+}}} \right) \right)} \quad (4.1)$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot \gamma_{KRED} \cdot A \cdot c_{NADP^+} \cdot c_{izopropanol}}{\left( K_{m_{izopropanol}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{aceton}}{K_{i_{aceton}}} \right) + c_{izopropanol} \right) \cdot \left( c_{NADP^+} + K_{m_{NADP^+}} + \frac{c_{NADP^+}^2}{K_{i_s}} \right)} \quad (4.2)$$

Reakcija redukcije acetona je opisana dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom, acetonom, i kompetitivnim inhibicijama produktima, izopropanolom i  $NADP^+$ .

Povratna reakcija, reakcija oksidacije izopropanola opisana je dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom,  $NADP^+$ , i kompetitivnom inhibicijom produktom, acetonom.

U obje jednadžbe prisutan je član koji uzima u obzir relativnu aktivnost enzima,  $A$ .

### 4.2. Rektorski model

Rektorski model za kotlasti reaktor sastoji se od bilančnih jednadžbi za acetone (jedn. 4.3), izopropanol (jedn. 4.4),  $NADPH$  (jedn. 4.5) i  $NADP^+$  (jedn. 4.6).

$$\frac{dc_{aceton}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (4.3)$$

$$\frac{dc_{izopropanol}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (4.4)$$

$$\frac{dc_{NADPH}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (4.5)$$

$$\frac{dc_{NADP^+}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (4.6)$$

Deaktivacija ketoreduktaze je opisana modelom drugog reda (jedm. 4.7).

$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A^2 \quad (4.7)$$

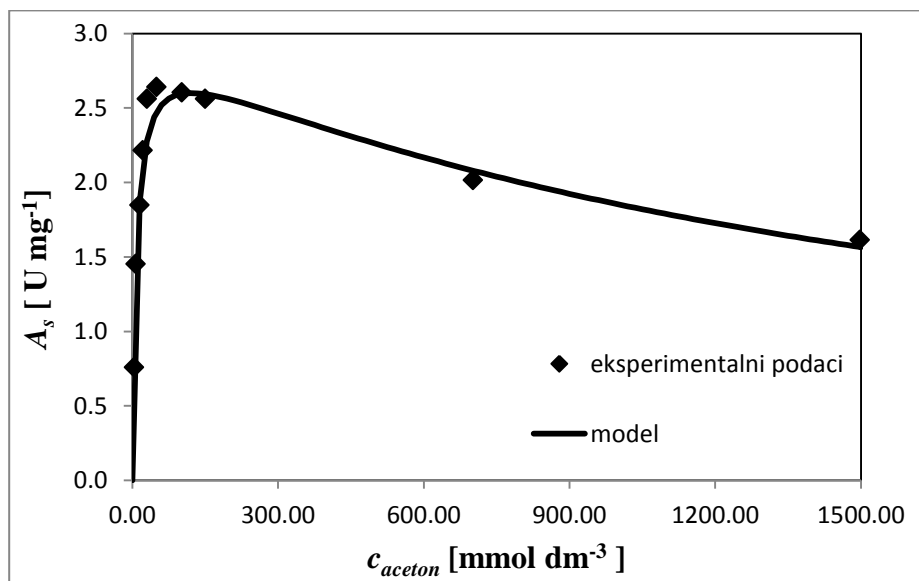
## 5. REZULTATI I RASPRAVA

Obzirom da ketoreduktaza zahtjeva prisutnost koenzima NADPH, cilj ovog rada bio je ispitati mogućnost potencijalnog korištenja reakcije redukcije acetona u procesu regeneracije koenzima. U ovom radu napravljena je kinetička karakterizacija ketoreduktaze, odnosno određeni su kinetički parametri procesa kao i kinetički model deaktivacije u kotlastom reaktoru te je simulacijom određena ravnotežna konverzija acetona.

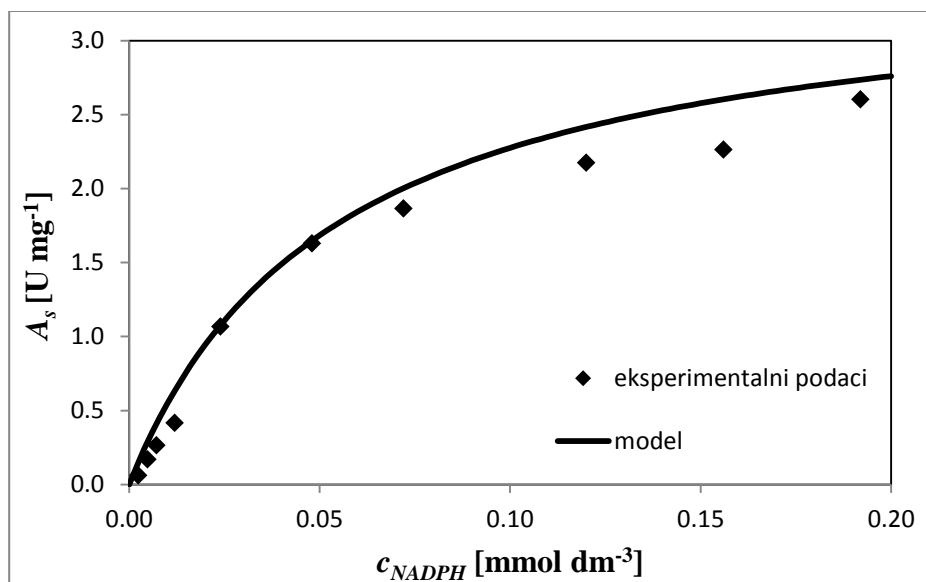
### 5.1. Kinetička karakterizacija ketoreduktaze

#### 5.1.1. Kinetička karakterizacija u reakciji redukcije acetona

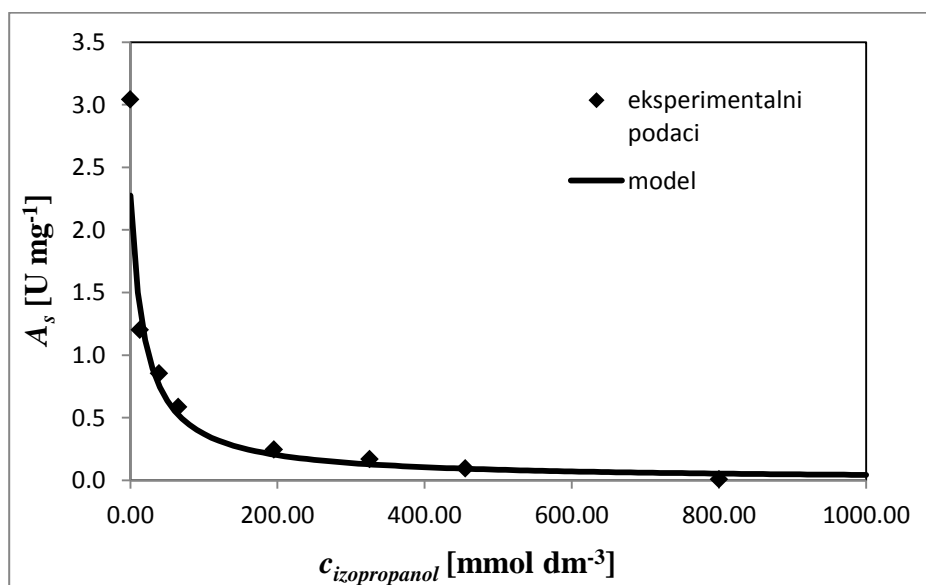
Kinetika ketoreduktaze određena je mjerenjem ovisnosti početnih brzina reakcije o različitim koncentracijama supstrata, acetona (Slika 5.1) i NADPH (Slika 5.2). Također, ispitana je inhibicija produktima, tj. utjecaj izopropanola (Slika 5.3) i  $\text{NADP}^+$  (Slika 5.4) na aktivnost enzima.



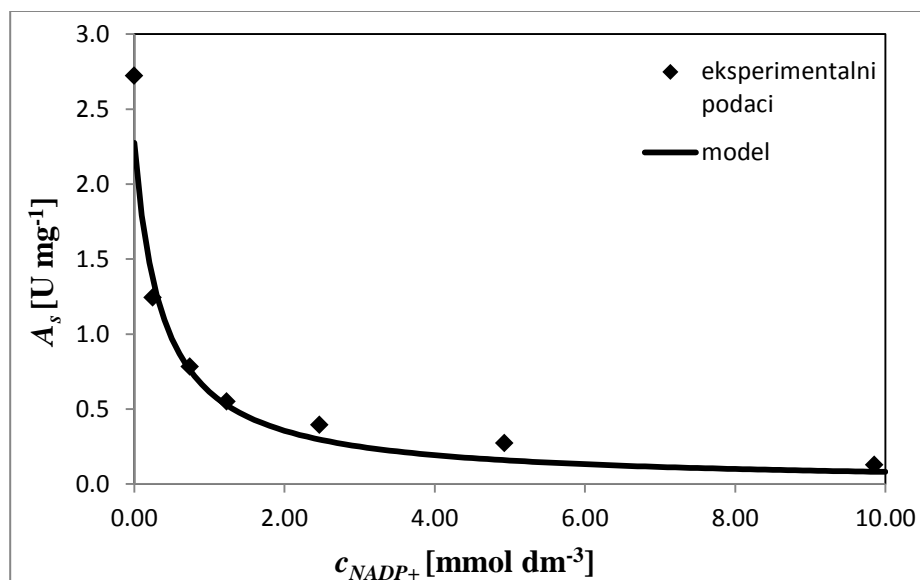
**Slika 5.1** Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji acetona ( $c_{\text{acetone}} = 7 - 1498 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{NADPH}} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $\gamma_{\text{KRED}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{fosfami pufer}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $\text{pH} = 8$ ;  $T = 25^\circ\text{C}$ )



**Slika 5.2** Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji NADPH ( $c_{NADPH} = 0,024 - 0,156$  mmol dm<sup>-3</sup>;  $c_{aceton} = 30$  mmol dm<sup>-3</sup>;  $\gamma_{KRED} = 0,01$  mg cm<sup>-3</sup>;  $c_{fosfati\ pufer} = 100$  mmol dm<sup>-3</sup>; pH = 8;  $T = 25^\circ\text{C}$ )



**Slika 5.3** Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji izopropanola ( $c_{izopropanol} = 0 - 800$  mmol dm<sup>-3</sup>;  $c_{NADPH} = 0,1$  mmol dm<sup>-3</sup>;  $c_{aceton} = 30$  mmol dm<sup>-3</sup>;  $\gamma_{KRED} = 0,01$  mg cm<sup>-3</sup>;  $c_{fosfati\ pufer} = 100$  mmol dm<sup>-3</sup>; pH = 8;  $T = 25^\circ\text{C}$ )



**Slika 5.4** Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji  $NADP^+$  ( $c_{NADP^+} = 0 - 9,86$  mmol  $dm^{-3}$ ;  $c_{NADPH} = 0,1$  mmol  $dm^{-3}$ ,  $c_{acetone} = 30$  mmol  $dm^{-3}$ ;  $\gamma_{KRED} = 0,01$  mg  $cm^{-3}$ ;  $c_{fosfatni\ puffer} = 100$  mmol  $dm^{-3}$ ; pH = 8;  $T = 25^\circ C$ )

Prema grafičkim prikazima ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentracijama supstrata i produkata reakcije, može se zaključiti postojanje inhibicije supstratom, acetonom, kao i postojanje kompetitivne inhibicije izopropanolom i  $NADP^+$ . Stoga je kinetika redukcije acetona opisana dvosupstratnom Michealis – Menteničinom jednadžbom (jedn. 4.1) s inhibicijom supstratom te s kompetitivnim inhibicijama, produktima, izopropanolom i  $NADP^+$ . Parametri procesa procijenjeni su nelinearnom regresijom u *Scientistu* i prikazani u Tablici 5.1.

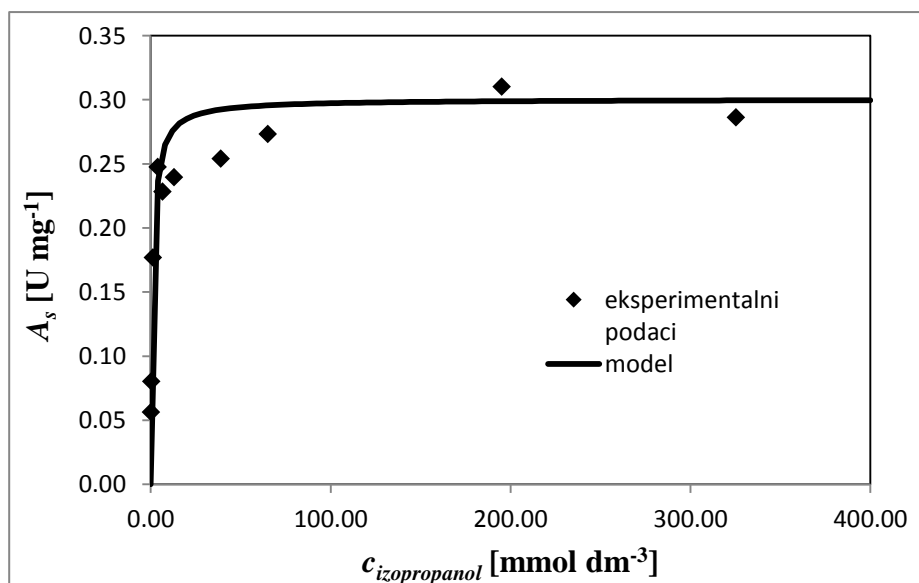
**Tablica 5.1** Procijenjeni kinetički parametri za reakciju redukcije acetona

Parametar	Jedinica	Vrijednost
$V_{m1}$	$U\ mg^{-1}$	$4,584 \pm 0,562$
$K_{m,acetone}$	$mmol\ dm^{-3}$	$8,687 \pm 2,385$
$K_{m,NADPH}$	$mmol\ dm^{-3}$	$0,054 \pm 0,016$
$K_{i,S}$	$mmol\ dm^{-3}$	$1677,84 \pm 546,76$
$K_{i,izopropanol}$	$mmol\ dm^{-3}$	$4,292 \pm 1,466$
$K_{i,NADP^+}$	$mmol\ dm^{-3}$	$0,241 \pm 0,053$

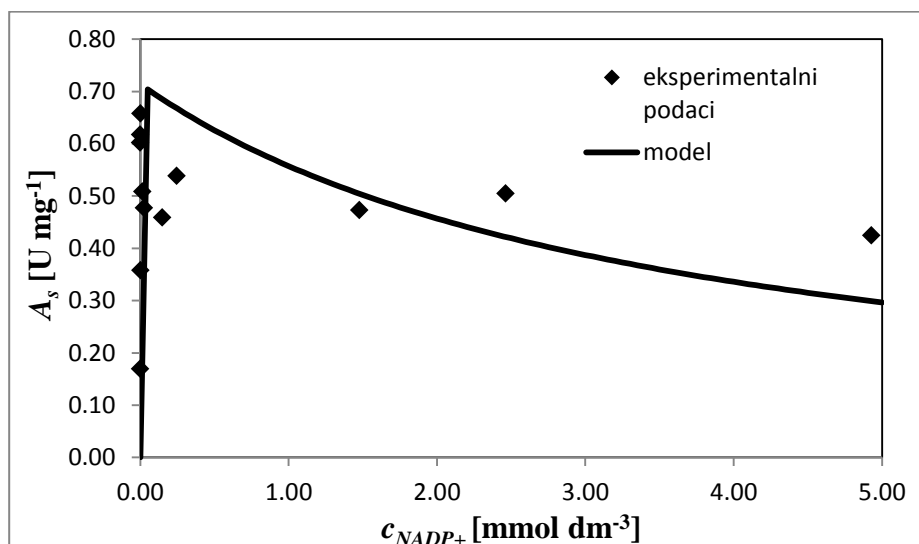
Vrijednost Michealis – Menteničine konstante,  $K_m^S$ , opisuje afinitet enzima prema supstratu te što je vrijednost manja, to enzim ima bolji afinitet. Prema procijenjenim vrijednostima  $K_m^S$ , može se zaključiti kako je NADPH specifičniji supstrat za korišteni enzim, KRED, u odnosu na aceton. Također, prema procijenjenim konstantama inhibicije može se zaključiti da produkti značajno inhibiraju reakciju redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom. Inhibicija supstratom nije značajan jer se očituje pri višim koncentracijama acetona ( $> 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ ).

### 5.1.2. Kinetička karakterizacija u reakciji oksidacije izopropanola

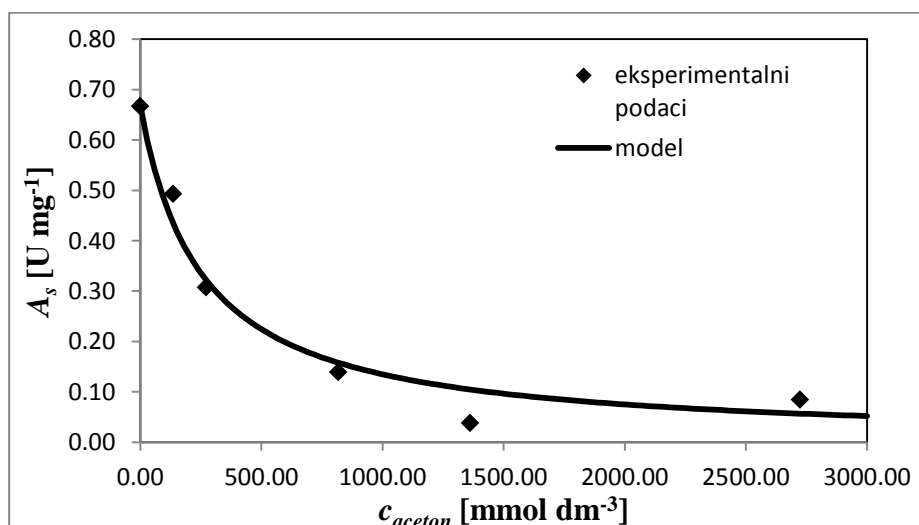
Metodom početnih brzina određena je kinetika ketoreduktaze u reakciji oksidacije izopropanolom, uz  $\text{NADP}^+$  kao kosupstrat, te je ispitana inhibicija produktima, acetonom i NADPH. Ispitivanjem je utvrđeno da NADPH nema utjecaj na reakciju oksidacije izopropanola, tj. da ne inhibira samu reakciju. Rezultati ispitivanja su grafički prikazani kao ovisnost početne reakcijske brzine o koncentracijama izopropanola (Slika 5.5),  $\text{NADP}^+$  (Slika 5.6) i acetona (Slika 5.7).



**Slika 5.4** Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji izopropanola ( $c_{\text{izopropanol}} = 13 - 325 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{NADP}^+} = 4,9 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $\gamma_{\text{KRED}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; pH = 8;  $T = 25^\circ\text{C}$ )



**Slika 5.5** Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji NADP<sup>+</sup> ( $c_{\text{NADP}^+} = 0,000148 - 2,464 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{izopropanol}} = 1301 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $\gamma_{\text{KRED}} = 0,03 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; pH = 8;  $T = 25^\circ\text{C}$ )



**Slika 5.6** Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji acetona ( $c_{\text{acetone}} = 0 - 1362 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{izopropanol}} = 1301 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{NADP}^+} = 0,246 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $\gamma_{\text{KRED}} = 0,03 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; pH = 8;  $T = 25^\circ\text{C}$ )

Kinetika je opisana dvosupstratnom Michealis – Menteničinom jednadžbom (jedn. 4.2) s s inhibicijom supstratom, NADP<sup>+</sup> i s kompetitivnom inhibicijom acetonom. Parametri procesa oksidacije izopropanola procijenjeni su nelinearnom regresijom u *Scientistu* i prikazani u Tablici 5.2.

**Tablica 5.2** Procijenjeni kinetički parametri za reakciju oksidacije izopropanola

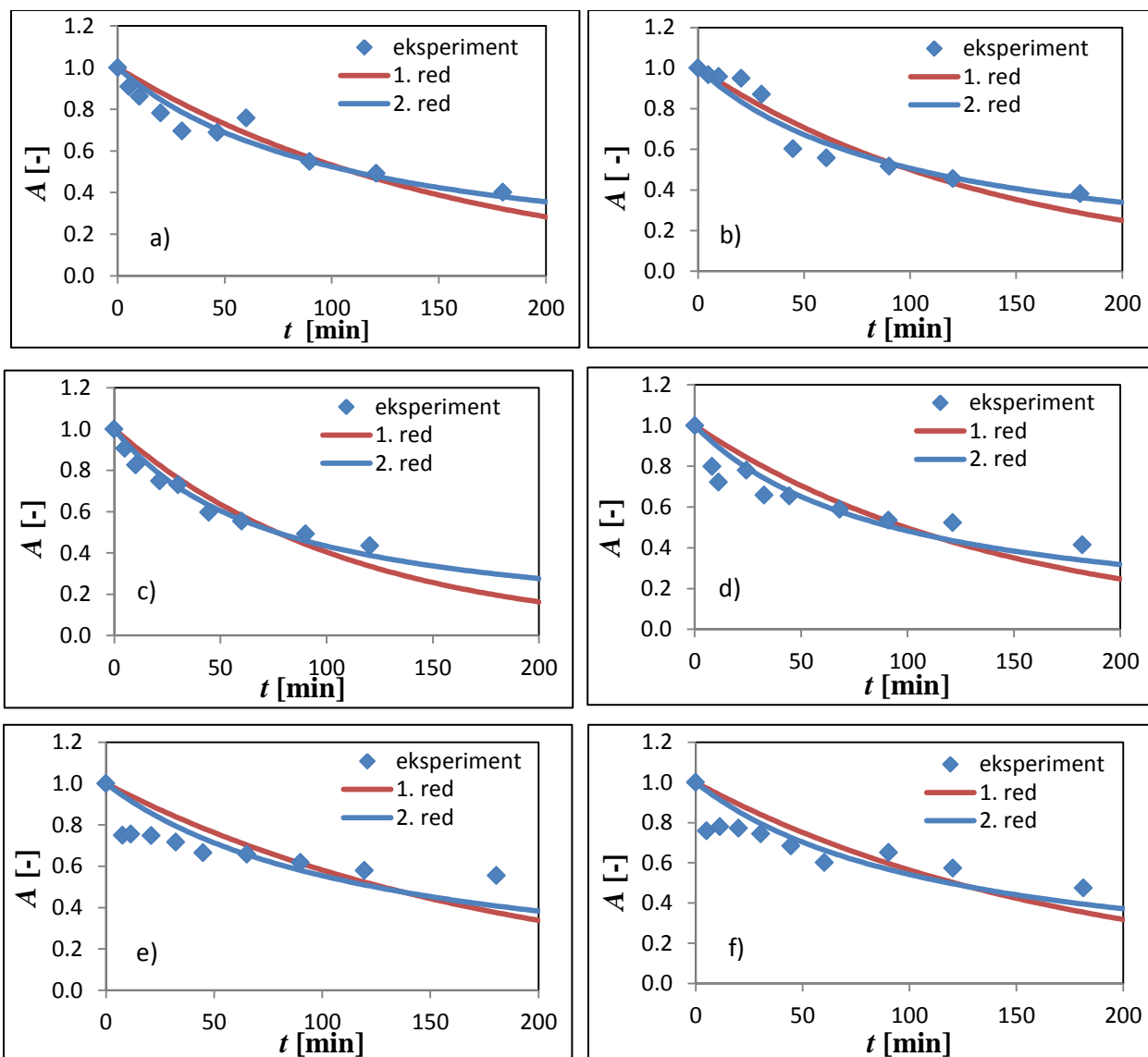
Parametar	Jedinica	Vrijednost
$V_{m2}$	U mg <sup>-1</sup>	0,715 ± 0,116
$K_{m,izopropanol}$	mmol dm <sup>-3</sup>	1,077 ± 3,455
$K_{m,NADP^+}$	mmol dm <sup>-3</sup>	6,17 · 10 <sup>-7</sup> ± 1,91 · 10 <sup>-6</sup>
$K_{i,S}$	mmol dm <sup>-3</sup>	3,554 ± 2,860
$K_{i,aceton}$	mmol dm <sup>-3</sup>	0,209 ± 0,033

Prema procijenjenim vrijednostima Michealis – Menteničine konstante može se zaključiti kako je NADP<sup>+</sup> specifičniji supstrat za korišteni enzim, KRED, u odnosu na izopropanol, te da aceton značajno inhibira reakciju oksidacije izopropanola katalizirane ketoreduktazom.

## 5.2. Utjecaj acetona na stabilnost ketoreduktaze

Ispitan je utjecaj različitih koncentracija acetona na stabilnost ketoreduktaze. Rezultati ispitivanja prikazani su kao ovisnost relativne aktivnosti, *A*, ketoreduktaze o vremenu trajanja inkubacije enzima uz različite koncentracije acetona u kotlastom reaktoru (Slika 5.7). Na slici 5.7 također je prikazano podudaranje eksperimentalnih podataka s obzirom na kinetički model deaktivacije procesa u kotlastom reaktoru. U tablici 5.3 su prikazani rezultati procjene konstante deaktivacija, prvog i drugog reda, pri različitim koncentracijama acetona.



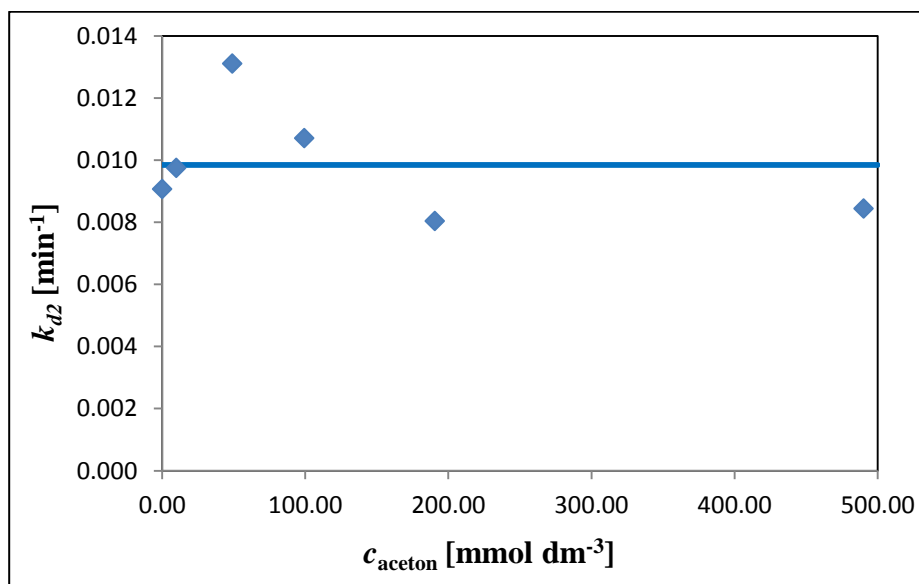


**Slika 5.7** Grafički prikaz ovisnosti relativne aktivnosti enzima u kotlastom reaktoru s vremenom pri: a)  $c_{\text{aceton}} = 0 \text{ mmol dm}^{-3}$ , b)  $c_{\text{aceton}} = 9,8 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; c)  $c_{\text{aceton}} = 49,0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; d)  $c_{\text{aceton}} = 99,4 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; e)  $c_{\text{aceton}} = 190,7 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; f)  $c_{\text{aceton}} = 490,3 \text{ mmol dm}^{-3}$

**Tablica 5.3** Konstante deaktivacije enzima u kotlastom reaktoru

$c_{\text{acetona}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$k_{d,1. \text{ reda}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$k_{d,2. \text{ reda}}$ [min <sup>-1</sup> ]	$R_1^2$	$R_2^2$
<b>0</b>	0,0063 ± 0,0006	0,0091 ± 0,0011	0,990 ± 0,081	0,994 ± 0,062
<b>9,8</b>	0,0069 ± 0,0006	0,0098 ± 0,0012	0,992 ± 0,077	0,994 ± 0,070
<b>49,0</b>	0,0091 ± 0,0007	0,0131 ± 0,0012	0,993 ± 0,070	0,998 ± 0,038
<b>99,4</b>	0,0070 ± 0,0009	0,0107 ± 0,0018	0,975 ± 0,122	0,986 ± 0,091
<b>190,7</b>	0,0054 ± 0,0010	0,0080 ± 0,0018	0,968 ± 0,144	0,978 ± 0,119
<b>490,3</b>	0,0057 ± 0,0009	0,0084 ± 0,0017	0,974 ± 0,130	0,982 ± 0,108

Prema dobivenim podacima zaključeno je da se enzim deaktivira modelom drugog reda (jedn. 3.5) zbog manjih odstupanja modela od eksperimentalnih podataka nego što je to u slučaju kod kinetike prvog reda. Ovisnost konstante deaktivacije drugog reda i koncentracije acetona dana je slikom 5.8 gdje je jasno vidljivo kako konstanta deaktivacije,  $k_{d2} = 0,099 \text{ min}^{-1}$ , ne ovisi o koncentraciji acetona.

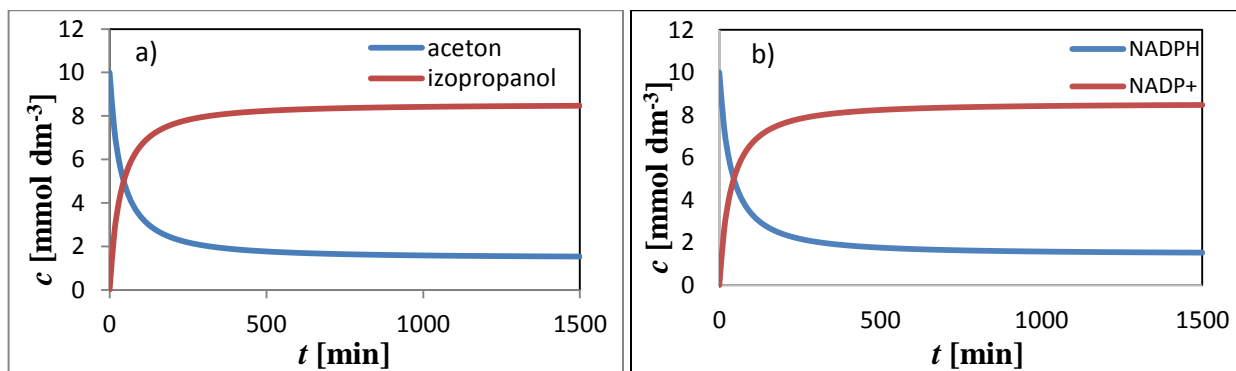


**Slika 5.8** Prikaz ovisnosti konstante deaktivacije o koncentraciji acetona

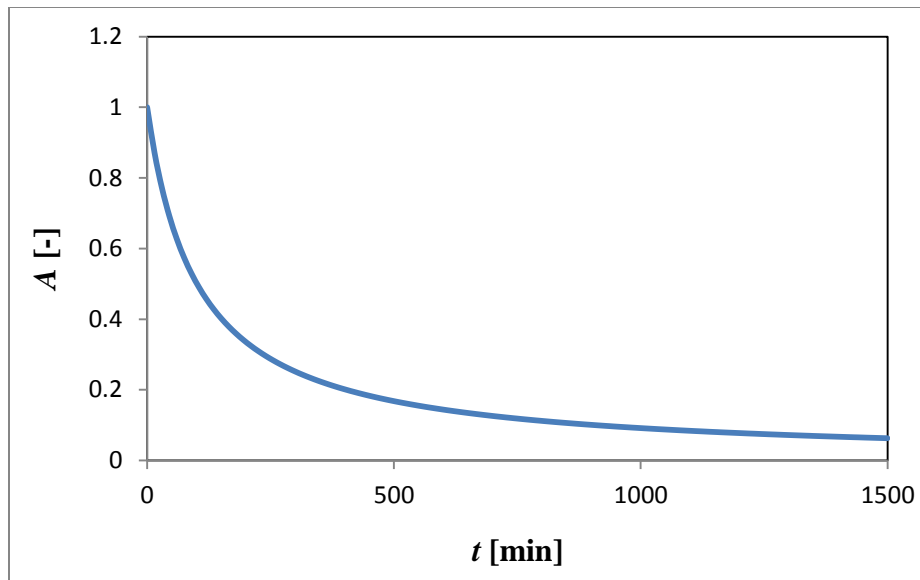
### 5.3. Simulacija redukcije acetona

Simulacija biokatalitičke reakcije redukcije acetona uz katalizator ketoreduktazu, u kotlastom reaktoru, provedena je u *Scientistu* korištenjem modela u Prilogu 1. Simulacija je provedena pri koncentracijama:  $c_{\text{acetona}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{izopropanol}} = 0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NADPH}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 0 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $\gamma_{\text{KRED}} = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$  uzimajući u obzir prethodno procijenjene kinetičke parametre procesa (konstante inhibicije, Michealis – Menteničine konstante, maksimalne reakcijske brzine, konstantu deaktivacije). Slikom 5.9 prikazana je simulacija promjene koncentracije acetona, odnosno izopropanola tijekom vremena u reakciji redukcije acetona katalizirane ketoreduktazom kao i simulacija promjene koncentracije NADPH, odnosno NADP<sup>+</sup> tijekom vremena. Ravnotežno stanje reakcije postiže se nakon 1500 min kada je postignuta konverzija acetona od 84,7 %.

Slika 5.10 pokazuje simulaciju promjene relativne aktivnosti enzima u reaktoru tijekom vremena. Relativna aktivnost označava deaktivaciju enzima te s vremenom pada te je u vremenu ravnotežne konverzije aktivnost iznosila 6,3 % početne aktivnosti. Obzirom da je enzim dosta nestabilan trebalo bi razmotriti mogućnost njegove stabilizacije, primjerice imobilizacijom.



**Slika 5.9** Simulacija biokatalitičke redukcije acetona u kotlastom reaktoru: a) promjena koncentracije acetona i izopropanola tijekom vremena; b) promjena koncentracije NADP i NADP<sup>+</sup> tijekom vremena ( $c_{\text{acetona}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{izopropanol}} = 0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{NADPH}} = 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{NADP}^+} = 0 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $\gamma_{\text{KRED}} = 0,1 \text{ g dm}^{-3}$ )



**Slika 5.10** Simulacija promjene relativne aktivnosti enzima u vremenu ( $k_{d2} = 0,099 \text{ min}^{-1}$ )

## 5. ZAKLJUČAK

Kinetika ketoreduktaze u reakciji redukcije acetona opisana je dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom, acetonom, i kompetitivnom inhibicijom produktima, izopropanolom i  $\text{NADP}^+$  dok je kinetika povratne reakcije, oksidacije izopropanola, opisana dvosupstratnom Michealis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom  $\text{NADP}^+$  i kompetitivnom inhibicijom acetonom.

Ispitivanjem utjecaja acetona na stabilnost ketoreduktaze utvrđeno je da deaktivaciju enzima bolje opisuje model drugog reda, te da konstanta deaktivacije iznosi  $k_d = 0,099 \text{ min}^{-1}$  i ne ovisi o koncentraciji acetona.

Postavljen je matematički model procesa redukcije acetona uz ketoreduktazu u kotlastom reaktoru, te je simulacijom određena ravnotežna konverzija acetona od 84,7 %. Obzirom na postignutu, relativno veliku, ravnotežnu konverziju, reakcija redukcije acetona ketoreduktazom može se potencijalno koristiti u procesu regeneracije koenzima  $\text{NADP}^+$ .

## LITERATURA

1. Alcade, M., Ferrer, M., Plou, F. J., Ballesteros, A., Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, Elsevier, Trends in Biotechnology 24 (2006) 281-287.
2. Baković T., Matematičko modeliranje proizvodnje optički aktivnog diola korištenjem višeenzimskog sustava, završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017) 15.
3. Bommarius A. S., Riebel B. R., Biocatalysis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2004) 30-36.
4. 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) 68-83.
5. Duraković S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb (1996) 301-337.
6. Findrik Blažević Z., Bioreakcijska tehnika 1, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2012).
7. Findrik Blažević, Z., Bioreaktori, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017).
8. Gomzi Z., Kemijski reaktori, Hinus, Zagreb (1998) 27-61.
9. Huisman G.W., Liang J., Krebber A., Practical chiral alcohol manufacture using ketoreductases, Elsevier, Current Opinion in Chemical Biology 14 (2009) 1-8.
10. Hummel W., Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments, Trends in Biotechnology 17 (1999) 487-491.
11. Ilanes, A., Enzyme Biocatalysis: principles and applications, Springer (2008) 4-18.
12. Jukić M., Đaković S., Filipović-Kovačević Ž., Kovač V., Vorkapić-Furač J., Dominantni trendovi „zelene“ kemije, Kemija u industriji 54 (2005) 255-272.
13. Miloš M., Osnove biokemije, interna skripta, Kemijsko – tehnološki fakultet, Sveučilište u Splitu, Split (2009).
14. Nguyen P. H., West M., Feske B. D., Padgett C. W., Enantioselectivity and Enzyme-Substrate Docking Studies of a Ketoreductase from *Sporobolomyces salmonicolor*

- (SSCR) and *Saccharomyces cerevisiae* (YOL151w), Hindawi Publishing Corporation 124289 (2014) 1-8.
15. Novak M., Bolanča T., Analitička kemija, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2013)
  16. Sin G., Woodley J. M., Gernaey K. V., Application of Modeling and Simulation Tools for the Evaluation of Biocatalytic Processes: A Future Perspective, *Biotechnology Progress* 25 (2008) 1529-1538.
  17. Vasić-Rački, Đ., Findrik, Z., Vrsalović Presečki, A., Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (2011) 845-856.
  18. Vrsalović Presečki A., Findrik Z., Zelić B., Modelling of the Biotransformation Processes, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 20 (2006) 227-241.
  19. Vrsalović Presečki A., Studij procesa dobivanja enzima u rastućim stanicama pekarskog kvasca, Magistarski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2003) 26-27.
  20. Wang X., Saba T., Yiu H.P. H., Howe F.R., Anderson James A., Shi J., Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways, *Chem* 2 (2017) 621-654.
  21. Wu H., Tian C., Song X., Liu C., Yang D., Jiang Z., Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes, *Green Chemistry* 15 (2013) 1773-1789.

## POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

### Grčki simboli

$\gamma$  - masena koncentracija enzima [ $\text{mg mL}^{-1}$ ]

$\Delta$  - promjena

$\varepsilon$  - molarni apsorpcijski (ekstinkcijski) koeficijent [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{mL}^{-1}$ ]

$\lambda$  - valna duljina [nm]

### Simboli

$A$  – relativna aktivnost enzima

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

$A_V$  - aktivnost biokatalizatora

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

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

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

$k_d$  – konstanta deaktivacije biokatalizatora [ $\text{min}^{-1}$ ]

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

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

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 [ $\text{cm}^3$ ]



$V_E$  – volumen dodanog enzima [ $\text{cm}^3$ ]

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

### **Skraćenice**

ABS – apsorbacija

$B_6$  - piridoksin

$B_{12}$  - kobalamin

E – enzim

ES – enzim-supstratski kompleks

$\text{FAD}^+$  - flavin – adenin – dinukleotid

FMN – flavin - mononukleotid

I – inhibitor

KRED – ketoreduktaza

$\text{NAD}^+$  - nikotin-amid –adenin-dinukleotid

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

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

P – produkt

S – supstrat

## PRILOZI

### Prilog 1

// Kotlasti reaktor, s deaktivacijom

IndVars:t

DepVars:Ac,Ip,NADPH,NADP,A

Params: Vm1,Kmac,KmNADPH,Kis1,KiIp,KiNADP,Vm2,Kmip,KmNADP,Kis2,Kiac,kd

$r1 = Vm1 * ckat * A * Ac * NADPH / ((Kmac * (1 + Ip / KiIp) + Ac + Ac * Ac / Kis1) * (NADPH + KmNADPH * (1 + NADP / KiNADP)))$

$r2 = Vm2 * ckat * A * Ip * NADP / ((Kmip * (1 + Ac / Kiac) + Ip) * (NADP + KmNADP + NADP * NADP / Kis2))$

Ac'=-r1+r2

Ip'=r1-r2

NADPH'=-r1+r2

NADP'=r1-r2

A'=-kd\*A\*A

Vm1=4.58428476

Kmac=8.68689306

KmNADPH=0.054118596

Kis1=1677.83917

KiIp=4.29241888

KiNADP=0.240602998

Vm2=0.714662218

Kmip=1.07741199

KmNADP=6.17E-07

Kis2=3.55472277

Kiac=0.209207281

kd=0.0099

t=0

ckat=0.1

Ac=10

Ip=0

NADPH=10

NADP=0

A=1

\*\*\*

## ŽIVOTOPIS

Petra Pohanić [REDACTED] Osnovno obrazovanje stječe u „Osnovna škola Sveta Nedelja“. 2008. godine upisuje Zdravstveno učilište, farmaceutski tehničar u Zagrebu. Nakon srednjoškolskog obrazovanja stažira u „Ljekarne Zagrebačke županije“, podružnica Samobor te 2014. polaže stručni ispit za farmaceutskog tehničara. Preddiplomski studij Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2014. godine.