

Modeliranje sinteze farmaceutika katalizirane imobiliziranim enzimom

Hamilton, Stella

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:149:347005>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-29**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Stella Hamilton

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2022.



Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije

FKITMCMXIX



SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Stella Hamilton

MODELIRANJE SINTEZE FARMACEUTIKA KATALIZIRANE IMOBILIZIRANIM ENZIMOM

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
2. prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić
3. izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar

Zagreb, veljača 2022.

Mojoj mentorici, prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki veliko hvala na stručnom vodstvu, pomoći i razumijevanju te na prenesenom znanju prilikom izrade i pisanja diplomskog rada.

Veliko hvala i asistentu, mag. ing. oecoing. Dini Skendroviću na nesebičnoj pomoći te brojnim savjetima tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada i prilikom pisanja ovog rada.

Hvala svim mojim prijateljima na velikoj podršci i ohrabrenjima tijekom studiranja, s vama su moji studentski dani bili ljepši.

Zahvaljujem se i mojoj Renati za sva ohrabrenja, svaku podršku i za svaki razgovor tijekom studiranja.

Također hvala mome dečku Dini na potpori i ohrabrenjima tijekom studija.

Od srca hvala baki Mili i baki Viki koje su u svakom trenutku bile tu za mene.

Najviše hvala mojim roditeljima na neizmjernej podršci, razumijevanju i ohrabrenjima. Hvala što ste vjerovali u mene kada možda ni sama nisam. Bez vas ništa ne bi bilo moguće!

SAŽETAK

Statini su farmaceutici koji se koriste pri snižavanju kolesterola te sprečavanju pojave kardiovaskularnih bolesti. Sve je veća potražnja za novim alternativnim načinima dobivanja kemikalija s kiralnim centrima čija je sinteza kompleksna zbog potrebe za visokom kemijskom i stereokemijskom čistoćom, a upravo jedan od njih je uporaba enzima 2-deoksiriboze-5-fosfat aldolaze (DERA). DERA katalizira reakciju sinteze (3R, 5R)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (laktola), prekursora u proizvodnji statina, dvostrukom aldolnom adicijom acetaldehida i kloroacetaldehida. U radu, imobiliziran je enzim DERA na magnetske nanočestice obložene silikom u svrhu povećanja stabilnosti enzima u prisustvu aldehida.

Ispitani su utjecaji različitih pH vrijednosti 0,1 M fosfatnog pufera na aktivnost i stabilnost enzima DERA gdje se kao optimalna pH vrijednost pokazao pH 6 u kojem je enzim pokazao najveću aktivnost i stabilnost. U reakciji acetaldehida i kloroacetaldehida te u reakciji acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala kinetika je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednadžbom te je postavljen matematički model procesa u kotlastom reaktoru. Ispitana je stabilnost enzima u prisutnosti različitih koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida.

Ključne riječi: statini, enzim, deoksiriboza-5-fosfat aldolaza, DERA, imobilizacija enzima, magnetske nanočestice, kinetika, deaktivacija enzima

ABSTRACT

Statins are pharmaceuticals used to lower cholesterol and prevent cardiovascular disease. There is a growing demand for new alternative ways to obtain chemicals with chiral centers, whose synthesis is complex due to the need for high chemical and stereochemical purity. One of the possibility is the use of the enzyme 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA). DERA catalyzes the synthesis reaction of (3R, 5R)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanal (lactol), a precursor in statin production, by double aldol addition of acetaldehyde and chloroacetaldehyde. The DERA enzyme was immobilized on magnetic nanoparticles coated with silica to enhance the stability of the enzyme in the presence of aldehydes.

The effects of different pH values of 0.1 M phosphate buffer on the activity and stability of DERA were investigated, and pH 6 was found to be the optimal pH with respect to the enzyme activity and stability. In the reaction of acetaldehyde and chloroacetaldehyde and in the reaction of acetaldehyde and 4-chloro-3-hydroxybutanal, the kinetics was described by the two-substrate Michaelis-Menten equation and a mathematical model of the process in the batch reactor was set. Enzyme stability was examined in the presence of different concentrations of acetaldehyde and chloroacetaldehyde.

Key words: statins, enzyme, deoxyribose-5-phosphate aldolase, DERA, enzyme immobilization, magnetic nanoparticles, kinetics, enzyme deactivation

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Enzimi	3
2.1.1. Struktura enzima.....	3
2.1.2. Mehanizam djelovanja enzima	4
2.1.3. Podjela enzima	5
2.1.4. Stabilnost enzima.....	6
2.1.5. Prednosti i nedostaci enzima	6
2.1.6. Aldolaza.....	7
2.2. Statini	9
2.3. Imobilizacija enzima	11
2.3.1. Kovalentna imobilizacija.....	13
2.4. Nosioči za imobilizaciju	14
2.4.1. Magnetske nanočestice	15
2.5. Matematičko modeliranje enzimatskih reakcija	16
2.5.1. Uvod u matematičko modeliranje	16
2.5.2. Modeliranje enzimatskih reakcija.....	17
2.5.3. Enzimski reakcijska kinetika	17
2.5.4. Rektorski modeli.....	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1. Aparatura	23
3.1.1. Spektrofotometar	23
3.1.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	23
3.1.3. Centrifuga.....	24
3.1.4. Liofilizator	25
3.1.5. Analitička vaga	26
3.1.6. Homogenizator	26
3.2. Analitičke metode.....	27
3.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom	27
3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima DERA spektrofotometrijskom metodom.....	28
3.2.3. Određivanje koncentracije supstrata, produkata i međuprodukata	29
3.2.4. Određivanje aktivnosti slobodnog enzima	30
3.3. Imobilizacija enzima DERA.....	30
3.3.1. Sinteza magnetskih nanočestica	30
3.3.2. Oblaganje magnetskih nanočestica silikom.....	30

3.3.3. Funkcionalizacija magnetskih nanočestica.....	31
3.3.4. Aktivacija magnetnih nanočestica.....	31
3.3.5. Imobilizacija enzima	31
3.3.6. Određivanje aktivnosti i stabilnosti imobiliziranog enzima	31
3.4. Karakterizacija enzima DERA	32
3.4.1. Određivanje aktivnosti imobiliziranog enzima DERA u ovisnosti o pH vrijednosti fosfatnog pufera.....	32
3.4.2. Određivanje kinetike enzima DERA	32
3.4.3. Stabilnost enzima DERA.....	33
3.5. Sinteza laktola u kotlastom reaktoru	34
3.6. Matematički model.....	35
3.6.1. Kinetički model	35
3.6.2. Reaktorski model.....	35
3.6.3. Obrada rezultata.....	36
4. REZULTATI I RASPRAVA	37
4.1. Karakterizacija enzima DERA	37
4.1.1. Utjecaj različitih pH vrijednosti fosfatnog pufera na aktivnost i stabilnost enzima DERA	37
4.1.2. Utjecaj acetaldehida i kloroacetaldehida na stabilnost enzima DERA.....	38
4.2. Kinetika enzima DERA.....	39
4.2.1. Kinetika enzima u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida	40
4.2.2. Kinetika enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala	41
4.3. Sinteza 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala aldolnom adicijom katalizirana enzimom DERA u kotlastom reaktoru	43
5. ZAKLJUČAK	45
6. LITERATURA.....	46
7. PRILOZI.....	50
8. POPIS SIMBOLA I KRATICA	52
9. ŽIVOTOPIS	54

1. UVOD

Sve veći broj odraslih danas obolijeva od srčanih i krvožilnih bolesti, a jedan od najčešćih problema današnjice je povišeni kolesterol koji je ujedno jedan od uzroka spomenutih bolesti. Vrijednost kolesterola izražava se preko koncentracije lipoproteina male gustoće, LDL. LDL je lipoprotein koji prenosi kolesterol kroz krv te je upravo njegova povećana koncentracija uzrok nakupljanja kolesterola na stjenkama krvnih žila. Štoviše, povećanju kolesterola doprinose pušenje, genetika, ishrana i drugo. Za početak, važna je pravilna ishrana, fizička aktivnost, reguliranje tjelesne težine i krvnog tlaka te nepušenje. S obzirom na to radi li se o oboljenju od već spomenutih bolesti ili o svrstavanju u skupinu visokog rizika, statini su farmaceutici koji doprinose reguliranju razina kolesterola u krvi te na taj način pomažu u liječenju.¹

Statini su skupina lijekova, odnosno farmaceutika za snižavanje kolesterola koji to čine blokiranjem enzima u jetri neophodnog za stvaranje kolesterola. Mogu se razlikovati prema strukturnim fizikalno-kemijskim svojstvima, prema načinu dobivanja te kliničkim učincima koji iz navedenih svojstava proizlaze.² Prema načinu dobivanja, statini se mogu podijeliti u tri grupe ovisno o tome nastaju li prirodnom, polu-umjetnom ili u potpunosti umjetnom sintezom. Prirodni statini, dobiveni izravnom fermentacijom gljiva, su lovastatin i pravastatin. Polu-umjetnom sintezom dobiva se simvastatin koji nastaje izravnom alkilacijom lovastatina. Dok u sintetske statine ubrajamo fluvastatin, rosuvastatin te atorvastatin. Uglavnom, svi statini sadrže 3,5-dihidroksi kiselinski bočni lanac s dva definirana kiralna centra.^{3,4} Porastom cijena sve je veća potražnja za novim alternativnim načinima dobivanja kiralnih centara, a upravo jedan od njih je uporaba enzima 2-deoksiriboze-5-fosfat aldolaze (DERA).

Enzimi ili biokatalizatori su globularni proteini koji ubrzavaju kemijske reakcije te su ekološki prihvatljivi zbog svoje selektivnosti, specifičnosti, stereospecifičnosti, netoksičnosti, obnovljivosti, mogućnosti razgradnje toksične tvari te mogućnosti kataliziranja pri blagim i za okoliš prihvatljivim uvjetima. Mana im je visoka cijena, nestabilnost izvan prirodnog okruženja te podložnost inhibiciji i deaktivaciji. Enzimi se najčešće koriste u farmaceutskoj, prehrambenoj, naftnoj i tekstilnoj industriji. Enzime je potrebno ispitati u realnim reaktorskim uvjetima, kinetički ih karakterizirati te pronaći metodu njihove stabilizacije kako bi bili pogodni za industrijsko mjerilo.

Imobilizacija enzima je sve češće korištena metoda kako bi se poboljšala aktivnost, stabilnost i specifičnost enzima radi njihovog uspješnijeg korištenja u industriji. Pomoću

imobilizacije enzimi se fiksiraju na nosioc ili unutar njih, stvarajući na taj način heterogeni reakcijski sustav.⁵

U ovom radu karakteriziran je imobilizirani biokatalizator DERA koji katalizira reakciju dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida, koja kao produkt daje (3R,5R)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal, važan prekursor u dobivanju statina. Metoda imobilizacije primijenjena u ovom radu je kovalentna imobilizacija, a kao nosioci korištene su magnetske nanočestice, zbog svoje velike površine, visokog omjera površine i volumena te lakoće razdvajanja pod utjecajem vanjskog magnetskog polja.

2. OPĆI DIO

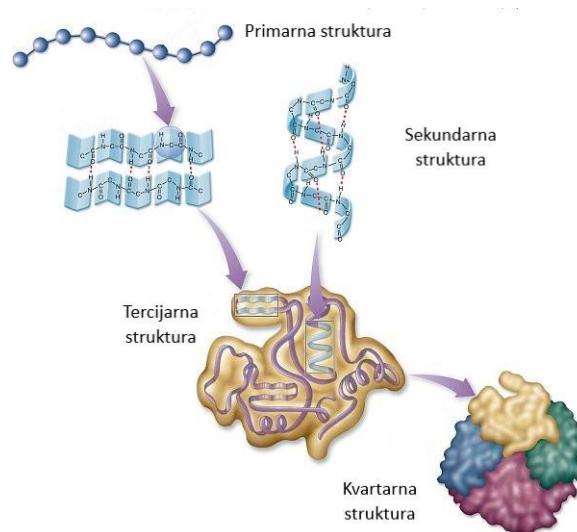
2.1. Enzimi

Enzimi su biokatalizatori, organske makromolekule koje nastaju u živoj stanici gdje djeluju kao katalizatori biokemijskih reakcija vezanih za osnovne životne procese. Po svom sastavu su globularni proteini organizirani u četiri strukturalna nivoa, te se sastoje od niza aminokiselina povezanih peptidnim vezama. U prirodi postoji 20 aminokiselina u kojima se nalazi samo 5 elemenata periodnog sustava (ugljik, dušik, vodik, kisik i sumpor). Teorija biokatalize pretpostavlja postojanje međuspoja enzim - supstrat. Postojanje ovog spoja je dokazano nizom eksperimentalnih istraživanja kao što su rendgenska analiza, spektroskopija i elektron spin rezonancija. Supstrat se veže na specifični dio proteinske molekule enzima koji se zove aktivno mjesto. Veći enzimi mogu imati i više od jednog aktivnog mjesta. Kako bi se supstrat mogao vezati na aktivno mjesto, prostorna struktura tog dijela proteinske molekule i molekule reaktanta moraju međusobno odgovarati kao brava i ključ. Nakon nastajanja međuspoja u biokatalizi dolazi do prijelaza protona s molekule reaktanta na molekulu enzima, pa je biokataliza u osnovi kiselo - bazna kataliza. Konfiguracija molekule enzima utječe na biokatalizu, pa tako efekt približavanja omogućava dovođenje u blizinu reaktivnih (veznih) grupa i katalitičkog centra, a efekt površine dovodi do pada polarnosti otapala u blizini površine enzima (desolvatacija molekula reaktanata). Molekule supstrata i enzima se pritom deformiraju kako bi lakše došlo do vezanja (biokatalize). Na aktivnom mjestu molekule enzima postoji vezni centar (aktivne grupe aminokiselina preko kojih dolazi do vezanja reaktanta na molekulu proteina) i katalitički dio (aktivne grupe aminokiselina koje prenose vodik). Na aktivnom centru se nalaze lanci aminokiselina na koje se vežu molekule reaktanta i molekule produkta. Na katalitičkom centru se nalaze grupe aminokiselina koje su uključene u mehanizam biokatalize.⁶

2.1.1. Struktura enzima

Strukture enzima prikazane su Slikom 1. Kako je svaki enzim zapravo protein, određuje ga specifičan slijed aminokiselina koje određuje DNK unutar stanica (primarna struktura). S obzirom na broj aminokiselina razlikujemo enzime molekulske mase od nekoliko tisuća do nekoliko milijuna. Peptidni lanci nastali povezivanjem aminokiselina u međusobnom su kontaktu gdje dolazi do njihovog svijanja u spirale pri čemu se vodikovim vezama povezuju karbonilne i amidne grupe što stabilizira čitav sustav (sekundarna struktura). Povezivanje uzvojnica kovalentnim vezama može ići i dalje pri čemu nastaju tercijarne struktura. I konačno,

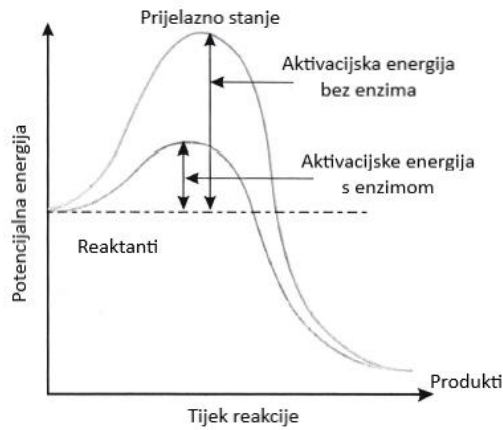
spajanjem peptidnih lanaca disulfidnim mostovima u još veće strukture nastaju globularni proteini (kvartarna struktura) koji predstavljaju najstabilniju strukturu biokatalizatora.^{7,8}



Slika 1. Strukture enzima⁹

2.1.2. Mehanizam djelovanja enzima

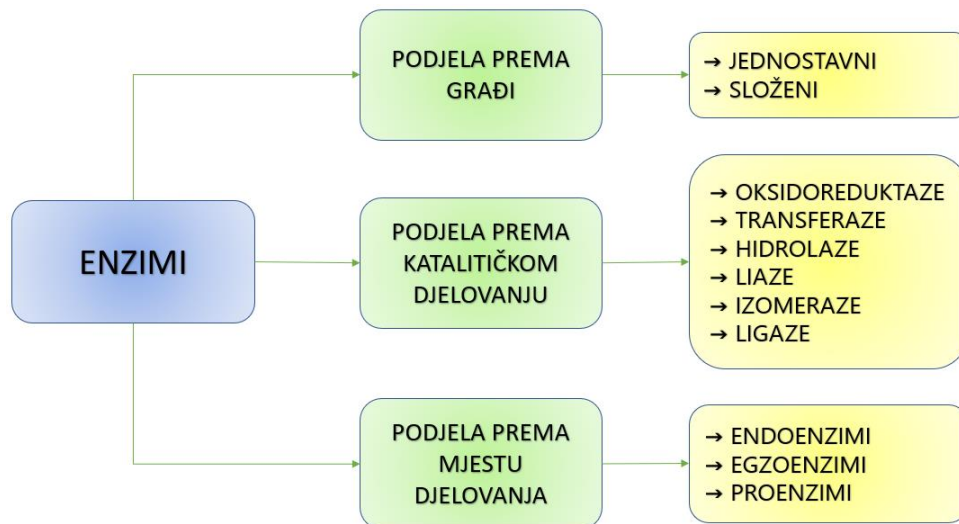
Enzimi kataliziraju reakcije poput oksidacije, redukcije, hidrolize i izomerizacije koje se odvijaju u uvjetima sličnim onima u živoj stanici, pri čemu dolazi do sniženja energetske barijere biokemijske reakcije zbog međudjelovanja između enzima i supstrata, pri čemu nema utjecaja na kemijsku ravnotežu reakcije. Potom dolazi do nastanka prijelaznog aktiviranog kompleksa iz kojeg nastaje konačni produkt, a katalizator ostaje nepromijenjen. Kako bi se produkt lakše mogao odvojiti od enzima na kraju reakcije i kako bi se enzim mogao koristiti u daljnjim reakcijama stvaranje kompleksa mora biti velike brzine i reverzibilno.⁷ Shematski prikaz mehanizma katalitičke reakcije vidljiv je na Slici 2.



Slika 2. Shematski prikaz energetske dijagrama tijekom reakcije katalizirane enzimom i reakcije koja nije katalizirana enzimom¹⁰

2.1.3. Podjela enzima

Enzime možemo podijeliti prema građi, području djelovanja i prema osnovi reakcije koje kataliziraju. U prirodi je prisutno gotovo 25 000 enzima, a do sada ih je izolirano oko 3 000.¹¹ Na Slici 3. shematski je prikazana podjela enzima. Prema građi se dijele na jednostavne (proteinski dio) i složene (i proteinski i neproteinski dio - koenzim), prema području djelovanja mogu biti: endoenzimi, egzoenzimi i proenzimi, a prema katalitičkom djelovanju se dijele na: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze.¹²



Slika 3. Podjela enzima

2.1.4. Stabilnost enzima

Stabilnost enzima predstavlja jedan od najvažnijih parametara koji omogućuje značajniju volumnu produktivnost sustava. Kod svih vrsta enzima može doći do njihove deaktivacije, a ona najviše ovisi o tipu enzima i uvjetima u reakcijskom sustavu. Osim kovalentne veze između molekula cisteina - disulfidni mostovi, sve ostale veze unutar enzima su vrlo slabe (vodikove veze između polarnih aminokiselina, vodikove veze između peptidnih veza, hidrofobne interakcije između nepolarnih aminokiselina, ionske veze između suprotno nabijenih pokrajnjih lanaca). Zbog toga enzimi pokazuju iznimnu osjetljivost na velike oscilacije u promjenama pH-vrijednosti, temperature, ionske jakosti i sl. Pa ipak, nerijetko se događa da enzime koristimo pri uvjetima različitim od optimalnih zbog njihove stabilnosti i aktivnosti. Pojavu deaktivacije enzima nije moguće izbjeći, može se samo odviti brže ili sporije. Zbog odvijanja procesa deaktivacije neke od potencijalnih primjena enzima ne mogu biti realizirane u praktičnoj primjeni. Radi toga važno je daljnja istraživanja usmjeriti prema mogućnostima stabilizacije enzima,¹³ jer su prednosti njihovog korištenja višestruke.

Primjeri metoda stabilizacije enzima su slijedeći: imobilizacija, međumolekulska povezivanje, kemijska modifikacija, dodatak metalnih iona, primjena visokih koncentracija neutralnih soli, dodatak liganda (supstrata ili inhibitora), dodatak polihidridnih alkohola, zamjena vodenog s organskim reakcijskim medijem i proteinsko inženjerstvo.

Pojam stabilnosti enzima možemo definirati kao ostatak enzimske aktivnosti nakon određenog vremenskog perioda. Razlikujem dvije vrste stabilnosti: operacijsku stabilnost enzima i stabilnost enzima u uvjetima skladištenja. Operacijska stabilnost je vrlo važan parametar u provedbi procesa. Predstavlja stabilnost enzima tijekom kontinuirane uporabe koja se često izražava kao vrijeme poluraspada enzima. To je vrijeme potrebno da se njegova početna aktivnost snizi na polovinu početne vrijednosti. Također, za definiranje operacijske stabilnosti postoji i procjenjivanje vrijednosti konstante deaktivacije, k_d . Deaktivacijska konstanta se može procijeniti na temelju eksperimentalnih podataka ovisnosti koncentracije reaktanata i produkata o vremenu ukoliko je poznat kinetički model reakcije.¹³

2.1.5. Prednosti i nedostaci enzima

Prednosti upotrebe biokatalizatora u usporedbi s klasičnim kemijskim katalizatorima su mnogostruke. Biokatalizatori mogu imati izraženiju aktivnost, ne djeluju na reakcijsku ravnotežu i vrlo su selektivni. Prihvatljivi su za okoliš jer se dobivaju iz obnovljivih izvora i biorazgradivi su. Procesi koje kataliziraju se provode u blagim reakcijskim uvjetima, a stvaraju malo otpada, troše manje sirovina, vode i obično imaju manji broj procesnih stupnjeva što

ubrzava samu reakciju. Produkti koji nastaju takvim reakcijama su čisti što smanjuje dodatne troškove procesa njihove izolacije.^{6,14} Važno svojstvo biokatalizatora je njihova enantioselektivnost, vrlo značajno u farmaceutskoj industriji u kojoj je jedan od najbitnijih uvjeta čistoća produkta.⁶

Biokatalizatori imaju i nedostatke u vidu potrebe za kofaktorom, nestabilni su izvan prirodnog okruženja, aktivnost/stabilnost im pada porastom temperature, a često dolazi do inhibicije reaktantima ili produktima reakcije. Uz sve navedeno enzimi su spojevi složene molekulske strukture što povećava njihovu cijenu i čini ih nedostupnima.^{6,14}

2.1.6. Aldolaza

Aldolaze ubrajamo u skupinu enzima liaza,¹⁵ koje kataliziraju reakciju adicije ili eliminacije skupina u svrhu stvaranja/uklanjanja dvostruke veze.¹⁴

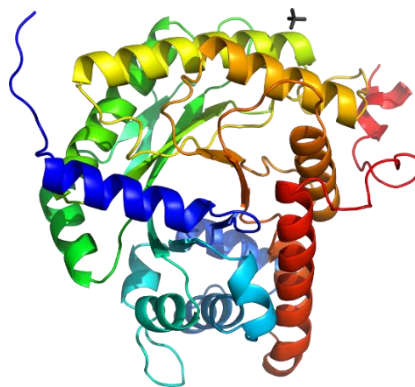
Fruktoza-difosfat aldolaza je glikolitički enzim prisutan u svim životinjskim i biljnim tkivima te kod većine mikroorganizama koji katalizira pretvorbu fruktoze 1-6-difosfata u gliceraldehid 3-fosfat i dihidroksi-aceton fosfat. Veoma je specifična prema supstratu: D-fruktozi. Unutar stanice enzim aldolaza se nalazi u citoplazmi i jezgri. Identificirana su tri izoenzima aldolaze (A, B i C), svaki sastavljen od 4 identične podjedinice, od kojih je svaka polipeptidni lanac od 360 aminokiselina. Aldolaza A (Slika 4.) prevladava u mišićima; aldolaza B, u jetri dok aldolaza C prevladava u mozgu.¹⁶ Tip A (aldolaza A) je vezan za filament citoskeleta koji sadrži aktin. Enzim regulira kontrakciju stanica putem reverzibilnog vezanja za te niti. Aldolaza je sveprisutna u svim stanicama, s većom prisutnošću u mišićnom, jetrenom i moždanom tkivu. Povećanje razine aldolaze otkriveno je kod miotonične bolesti mišića. Serumske razine aldolaze također se povećavaju nakon akutnih koronarnih sindroma. Povećanje izoenzima aldolaze A prvenstveno je povezano s pojedinim vrstama ozljeda mišića. Trenutno se aldolaza koristi učestalo kao biomarker ozljede skeletnih mišića.^{17,18} Neke od primjena aldolaza su: kemoenzimske sinteze, organske sinteze, kvantificiranje D-fruktoze-1,6-difosfata, određivanje metabolita u slijednim reakcijama, markeri za određivanje molekulske mase pomoću kolona i gelova.¹⁷

Aldolaze su jedni od najatraktivnijih enzima koji se mogu koristiti za biokatalizu, jer kataliziraju stereoselektivno stvaranje C-C veza. Aldolaze kataliziraju reverzibilno dodavanje donorskog spoja na akceptorski spoj.¹⁹ Poznati inhibitori enzima aldolaze su: teški metali (Cu^{2+} , Zn^{2+} i Ag^+), derivati hidroksinaftaldehid-fosfata, fosforilirani aromatski spojevi, D-eritruuloza 1-fosfat, fosfatidilserin liposomi, fosfat i adenin nukleotidi.¹⁷

Aldolaze možemo podijeliti prema mehanizmu djelovanja i prema donoru. Prema mehanizmu djelovanja dijele se na:

1. aldolaze koje formiraju intermedijer u obliku Schiffove baze sa supstratom na aktivnom mjestu enzima, one se većinom mogu pronaći u višim eukariotima te nekim prokariotima;
2. aldolaze koje koriste dvovalentni metalni kofaktor (Zn^{2+}) koji se na aktivnom mjestu ponaša kao Lewisova kiselina i tako aktivira karbonilni supstrat.

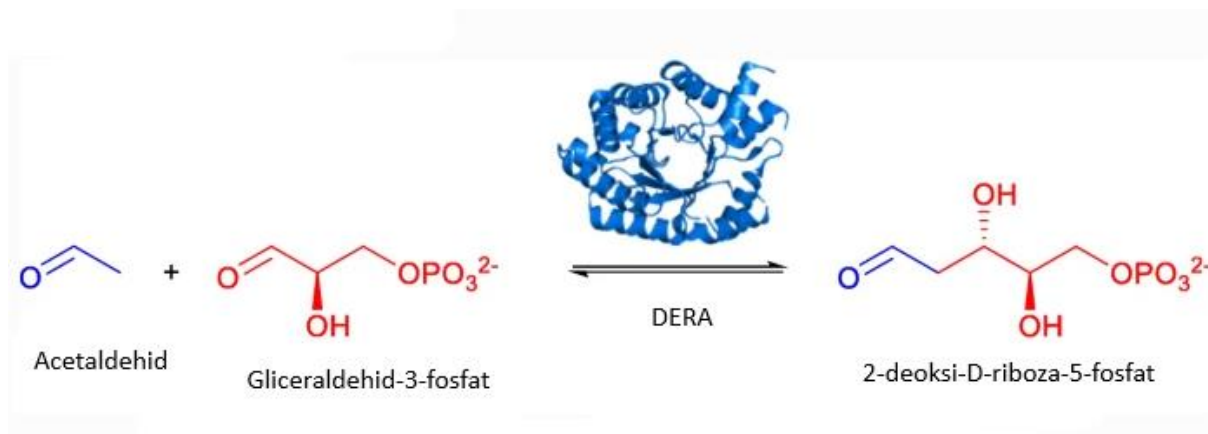
Prema donoru (nukleofilu) aldolaze dijelimo na piruvate/fosfoenolpiruvate, dihidroksiaceton fosfat (DHAP), dihidroksiaceton (DHA), glicin, acetaldehid.^{15,20}



Slika 4. Struktura enzima aldolaze A²¹

2.1.6.1. 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA)

2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA) je aldolaza I. klase, ona katalizira stereoselektivno stvaranje C-C veze između acetaldehida i brojnih drugih aldehida. DERA katalizira reverzibilnu aldolnu reakciju acetaldehida i gliceraldehid-3-fosfata kako bi se dobio 2-deoksiriboza-5-fosfat (Slika 5.). Posebnost enzima DERA je u tome da koristi aldehid kao prirodni elektrondonor, a ne keton. Također, vrlo korisno svojstvo je mogućnost kataliziranja sekvencijalne aldolne reakcije dajući 2,4,6-trideoksiheksoze, koje mogu biti vrijedni međuprodukti za proizvodnju lijekova za snižavanje kolesterola.²² Otkriveno je kako stanični ekstrakti *E. coli* kataliziraju reverzibilnu reakciju gliceraldehid-3-fosfata s acetaldehidom kako bi se dobio 2-deoksiriboza-5-fosfat. Osim u *E. coli* DERA je identificirana u širokom rasponu biljnih i životinjskih tkiva.²²



Slika 5. Dobivanje 2-deoksiriboza-5-fosfata in vivo uz pomoć biokatalizatora DERA²²

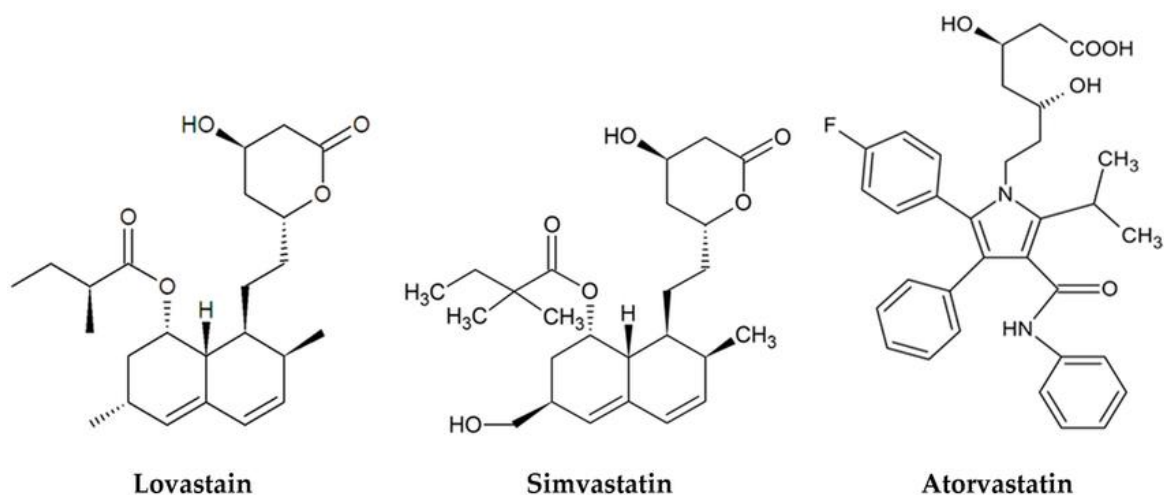
Praktična primjena DERA-e kao biokatalizatora ograničena je slabom tolerancijom prema industrijski relevantnim koncentracijama aldehida, posebno acetaldehida. Stoga je važno daljnja istraživanja usmjeriti prema razvoju odgovarajućih eksperimentalnih uvjeta, uključujući proteinski inženjering i/ili imobilizaciju na odgovarajućim nosačima.²²

2.2. Statini

Statini (Slika 6.) predstavljaju često korištenu klasa lijekova koji inhibiraju HMG-CoA (3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim) reduktazu kako bi smanjili sintezu kolesterola, snižavajući razinu lipoproteina u serumu. Jednostavnije rečeno, to su lijekovi za snižavanje kolesterola koji to čine blokiranjem enzima u jetri neophodnog za stvaranje kolesterola.^{23,24,25} Otkriveno je da izazivaju staničnu smrt u različitim tumorskim stanicama.²⁴ Snižavanje kolesterola nije jedina korist povezana sa statinima. Oni se također povezuju s smanjenjem rizika od srčanih bolesti i moždanog udara te smanjenjem rizika od stvaranja određenih krvnih ugrušaka.²⁶ Statini se preporučuju koristiti u slučajevima hipertenzije, osteoporotičnih prijeloma, ventrikularne aritmije i prevencije Alzheimerove bolesti i Parkinsonove bolesti.³

Statine je moguće podijeliti u tri različite grupe ovisno o tome nastaju li prirodnom, polu-umjetnom ili u potpunosti umjetnom sintezom. Prirodni statini nastaju izravnom fermentacijom gljiva, a uključuju lovastatin i pravastatin. Polu-umjetna sinteza podrazumjeva simvastatin koji nastaje izravnom alkilacijom lovastatina. Umjetno stvoreni statini se po strukturi razlikuju od prirodnih statina, ali postoji sličnost s prirodnim statinima u inhibitornoj skupini sličnoj HMG CoA.³ Svi statini sadrže 3,5-dihidroksi kiselinu s dva definirana kiralna centra. To je učinilo enzimsku sintezu privlačnom zbog svoje jedinstvene prednosti u stereokemijskoj kontroli.⁴ Sintaza bočnog lanca statina koji sadrži dvije kiralne hidroksilne skupine može biti izazovna. Prirodno i polu-umjetno sintetizirani statini posjeduju bočni lanac

u obliku laktona hidrolizirani u odgovarajuću i biološki aktivnu hidroksilnu kiselinu. Umjetno sintetizirani statini dostupni su u aktivnom obliku dihidroksi heptanske kiseline s dvije kiralne alkoholne skupine vezane na heterocikličku jezgru. Samo je jedan od enantiomera kiralnog bočnog lanca aktivan i potrebno ga osigurati njegovu visoku čistoću za odgovarajuću aktivnost što predstavlja veliki izazov za proizvođače.²⁷



Slika 6. Struktura prirodnog, polu-sintetiziranog i umjetno sintetiziranog statina³

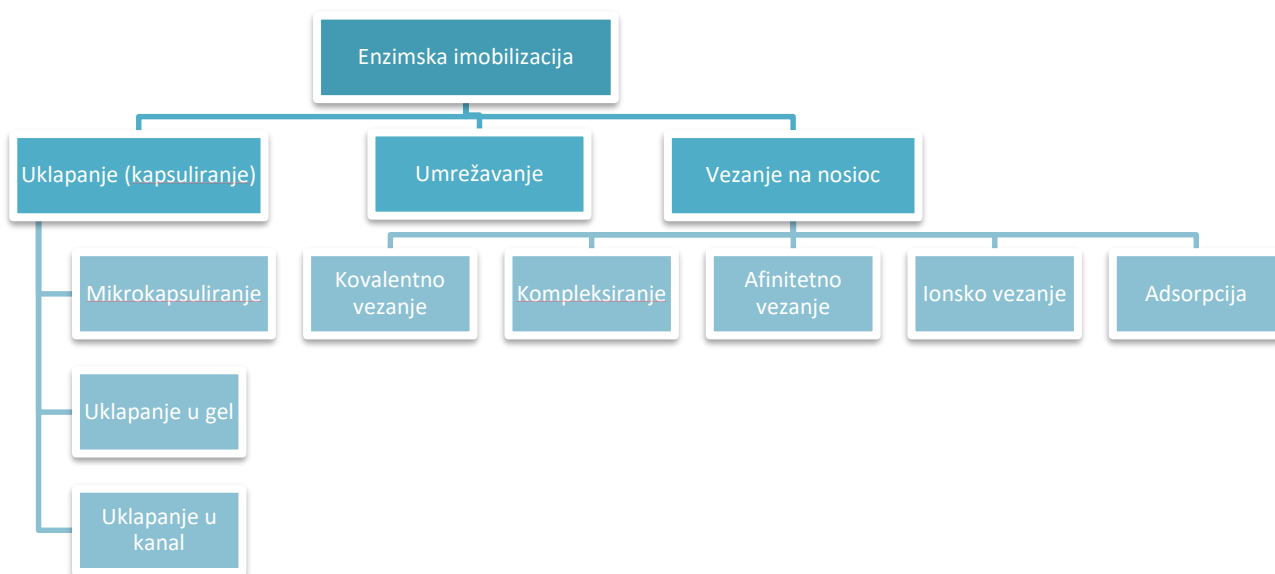
Jedan od perspektivnijih pristupa ovoj problematici je uzastopno dodavanje dvostrukog aldola acetaldehida u derivate aldehida katalizirano 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolazom (DERA) jer omogućava uvođenje dva potrebna stereocentara u jednom koraku te se dobiveni laktolni međuprodukt može pretvoriti u bočni lanac atorvastatina ili rosuvastatina. Novootkriveni DERA enzimi pokazuju veću aktivnost i stabilnost, čime pokazuju održiv smjer sinteze statina kataliziran enzimima. Za pripremu statinskog bočnog lanca rosuvastatina u industrijskim razmjerima koristi se asimetrični dodatak kloroacetaldehida i acetaldehida kataliziran DERA-om. Za bočni lanac atorvastatina, DERA iz *E. coli* konstruirana je da katalizira sekvencijalno dodavanje 3-azidopropinaldehida s acetaldehidom. Nedostatak takvog pristupa je uporaba opasnog azido spoja. Pokušaji prevladavanja tog nedostatka uključuju amino aldehid kao akceptor. Na tom putu DERA katalizira sekvencijalno dodavanje aldola od 2 ekvivalenta acetaldehida do amino aldehida za dobivanje amino laktola. Nastali laktol se zatim oksidacijom, aciliranjem i uklanjanjem zaštite pretvara u bočni lanac statina. Ovaj pristup još uvijek nije dovoljno dobro istražen i postoje mnoga pitanja za razmatranje njegove izvedivosti. Osim toga, jedini dostupni podaci za ovaj proces objavljeni su u obliku patenata.⁴

2.3. Imobilizacija enzima

Imobilizacija enzima je tehnologija kojom možemo povećati stabilnost enzima te ga višekratno koristiti,²⁸ a također je i korisna tehnika za poboljšanje učinkovitosti katalize u proizvodnim uvjetima.²⁹

Postupkom imobilizacije enzima stvaramo heterogene biokatalizatore, tj. biokatalizatore prevodimo iz otopljenog (enzimi) ili suspendiranog (cijele stanice mikroorganizama) u netopljiv oblik. S obzirom da takav biokatalizator s reakcijskom otopinom čini heterogeni sustav, ovakvi se biokatalizatori nazivaju heterogeni biokatalizatori. Heterogene biokatalizatore prve generacije čine imobilizirani enzimi. Kasnije je započela imobilizacija cijelih stanica mikroorganizama, takve biokatalizatore nazivamo heterogeni biokatalizatori druge generacije.⁶ Osim u biokatalizi, imobilizirani enzimi se koriste i kao aktivni dijelovi uređaja za medicinske i analitičke svrhe (biosenzori), kao selektivni adsorbensi za pročišćavanje proteina i enzima, učinkoviti mikrouređaji za kontrolirano otpuštanje lijekova i sl.³⁰

Imobilizacijske tehnike mogu se podijeliti na: fizikalne metode imobilizacije i kemijske metode, ovisno o tome dolazi li do stvaranja kemijskih veza tijekom imobilizacije.⁶ Pri odabiru metode imobilizacije enzima, treba uzeti u obzir nekoliko čimbenika kao što su veličina enzima, vrsta površinskih funkcionalnih skupina na proteinu, naboj proteina i izoelektična točka, potrebe prijenosa supstrata/produkta i drugi. Neke od metoda imobilizacije (Slika 7.) su vezanje za nosioc, umrežavanje i uklapanje (kapsuliranje).



Slika 7. Shematski prikaz metoda imobilizacije

Što se tiče vezanja na nosioc, fizikalne metode su adsorpcija, ionsko vezanje i afinitetno vezanje. Samo vezanje na nosioc uglavnom se postiže međumolekularnim silama kao što su vodikove veze, van der Waalsove sile, hidrofobne, hidrofilne i elektrostatske interakcije. Fizikalno vezanje je uglavnom preslabo kako bi enzim ostao fiksiran na nosiocu u industrijskim uvjetima visoke koncentracije reaktanata i produkata visoke ionske jakosti.^{31,32}

Umrežavanje biokatalizatora uključuje udruživanje stanica mikroorganizama ili enzima bliže jedno drugome kako bi naposljetku formirali trodimenzionalnu strukturu te je to način imobilizacije bez nosioca. Postiže se fizikalnom ili kemijskom metodom. Kemijske metode uključuju stvaranje kovalentne veze između stanica pomoću bifunkcionalnih ili multifunkcionalnih reagensa kao što su glutaraldehid ili toluen diizocijanat.³⁰ Također, kombiniranjem nekih drugih metoda s umrežavanjem može se postići bolja mehanička stabilnost i jednostavnost rukovanja no upotrebom nosioca dovodi do manje učinkovite imobilizacije.⁵

Uklapanjem, odnosno kapsuliranjem dolazi do skupljanja enzima unutar polimerne mreže uglavnom organskih ili anorganskih polimernih matrica, najčešće su to poliakrilamid i silika sol-gel. Kako nekad fizikalna metoda nije dovoljna tada je potrebno koristiti u kombinaciji s kovalentnim vezanjem kako bi se spriječilo „curenje“ enzima. Također, ova metoda omogućuje ograničeni prijenos mase supstrata i produkata uz zadržavanje enzima.⁵

Općenite prednosti imobiliziranih biokatalizatora u odnosu na enzime u otopljenom obliku ili na biokatalizatore u obliku cijelih stanica mikroorganizma su slijedeće:

- lako izdvajanje reakcijske smjese i ponovno korištenje,
- veća stabilnost u usporedbi s slobodnim biokatalizatorima u širem području temperature i pH,
- u procesima s imobiliziranim biokatalizatorima nema enzima u otpadnim tokovima,
- mogućnost provođenja kontinuiranih procesa,
- smanjenje troškova industrijske proizvodnje,
- bolja kontrola aktivnosti enzima,
- lakša upotreba u industriji i medicinskim svrhama i
- mogućnost uporabe enzima porijeklom iz organizama koji se inače ne smatraju sigurnima za uporabu zbog patogenosti.³⁰

Prednost imobilizacije jednog enzima u odnosu na imobilizaciju cijelih stanica je u čistoći dobivenog produkta.³⁰ Također, u usporedbi s imobiliziranim enzimima, slobodni

enzimi imaju otežanu separaciju i ponovno korištenje, na aktivnost utječu temperatura, pH i ostali radni uvjeti te cijena enzima uglavnom je visoka.³³

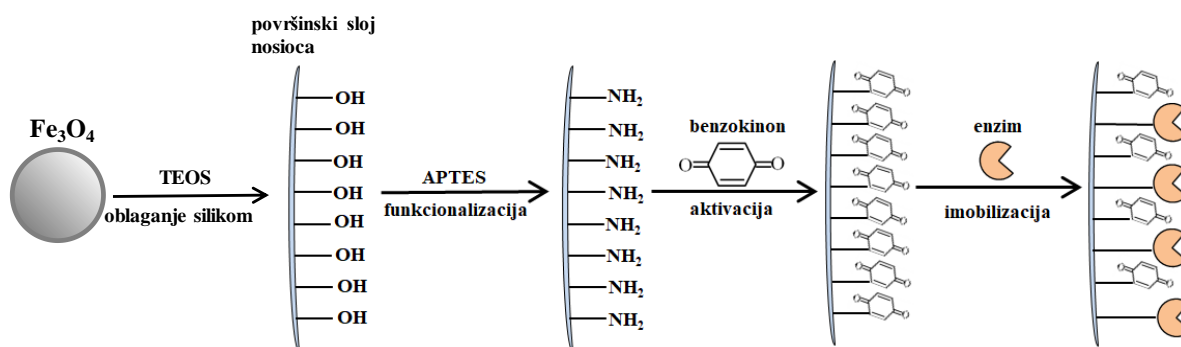
2.3.1. Kovalentna imobilizacija

50-ih godina prošlog stoljeća započeo je značajan razvoj imobilizacijskih tehnika. Kovalentnu imobilizaciju klasificiramo kao specifičnu kemijsku metodu imobilizacije. Prvobitni nosioci koji su se koristili kod kovalentne imobilizacije, npr. poliaminostiren, nisu bili pogodni za ovaj tip imobilizacije radi gubitka aktivnosti enzima nakon same imobilizacije.⁶ Kovalentne veze uglavnom osiguravaju najčvršće veze između enzima i nosioca, a nastaju kemijskim reakcijama između aktivnih funkcionalnih grupa pričvršćenih na nosioc i aktivnih funkcionalnih grupa aminokiselina bočnog lanca enzima.³²

Ova tehniku imobilizacije uključuje funkcionalizaciju i aktivaciju površinu nosioca s određenim kemijskih skupina sposobnih za stvaranje kovalentnih veza s enzimima kao što su -NH₂, -OH, -COOH, -SH. Najčešće funkcionalne grupe enzima koje reagiraju su: amino-skupina lizina ili arginina, karboksilna skupina aspartatne kiseline ili glutamične kiseline, hidroksilna skupina serina ili treonina i sulfhidrilna grupa cisteina. Preko navedenih aktivnih grupa i funkcionalnih grupa na površini nosioca, moguće je stvoriti jaku vezu s čvrstom površinom pri čemu kasnije ne dolazi do odvajanja enzima od podloge.³⁰ Kako bi čvrsta podloga imala funkcionalne grupe potrebne da dođe do veze, potrebno ju je predaktivirati s kemijskim reagensima za predaktivaciju (glutaraldehyd, cijanogen bromid, trionil klorid i sl.) koji su jako elektrofilni, pa reagiraju s jakim nukleofilom poput amino-skupine. Najvažniji tipovi veze koji nastaju između enzima i nosioca su: izourea veza, diazo veza, peptidna veza i veza nastala reakcijom alkilacije.³⁰

U ovom radu provedena je imobilizacija kovalentnim vezanjem koja se provodila pripremom nosioca kako je prikazano na Slici 8. i provodi se na sljedeći način :

Hidrotermalnom sintezom nastaju magnetske nanočestice Fe₃O₄, koje se oblažu slojem silike pomoću tetraetilortosilikata (TEOS), nakon čega je površina čestice prekrivena OH skupinama. Za funkcionalizaciju se koristio aminopropiltrietsilan (APTES), nakon čega je uslijedila aktivacija molekulama benzokinona koje su se vezale na amino skupine APTES-a. Na molekule benzokinona se vezao enzim.



Slika 8. Postupak imobilizacije enzima na čvrsti nosioc

2.4. Nosioci za imobilizaciju

Svojstva enzima i materijala nosioca reguliraju svojstva imobiliziranih enzima. Upravo interakcije između enzima i nosioca uvjetuju specifična kemijska, biokemijska, mehanička i kinetička svojstva imobiliziranog enzima. Iz tog razloga, bitan je odabir odgovarajućeg nosioca. Postoji popriličan broj raznih nosioca koji omogućuju odabir različitih značajki ovisno o enzimu i danoj primjeni (npr. veličina čestica, kemijska funkcionalnost, poroznost i drugo).^{34,35} Materijali također trebaju zadovoljiti određene standarde kao što su netopivost u vodi, dobra mehanička čvrstoća i kemijska otpornost u različitim radnim uvjetima, u kombinaciji s velikom površinom, sposobnošću formiranja čestica koje se mogu kontrolirati, kao i izvrsnom reaktivnošću prema bilo kojim funkcionalizirajućim agensima.³⁶

Posebno je važno da nosioc ima mogućnost imobilizirati značajnu količinu enzima po jedinici mase.³⁷ Također, kao što je već spomenuto, korisna karakteristika može biti i poroznost ukoliko promjer pora ostane unutar odgovarajućeg raspona. Kako bi došlo do ulaska proteina u poru, promjer pora mora biti širi od prosječnog promjera proteina dok prevelike pore uzrokuju značajan pad aktivne površine.^{37,38}

Nosioci za imobilizaciju mogu se podijeliti u dvije glavne skupine: organski i anorganski. U organske nosioce ubrajamo nosioce prirodnog podrijetla, odnosno biopolimere i sintetske nosioce. Nosioci prirodnog podrijetla su polisaharidi u koje ubrajamo celulozu koja je najzastupljeniji prirodni polimer koji se koristi za imobilizaciju penicilina i slično, zatim škrob, hitozan, alginat te proteini poput pektina, želatine, albumina i kolagena.^{34,35} Sintetički organski polimeri uključuju vinilne i akrilne polimere kao što su poliakrilamid, polimetakrilat i polivinil alkohol te polipropilen. Isto tako, primjenjuju se i poliamidi kao što je najlon. Relativno popularna upotreba ekološki prihvatljivih nosioca biološkog podrijetla za imobilizaciju enzima može se povezati s mogućim smanjenjem troškova proizvodnje i s ograničenom biokompatibilnosti kod anorganskih nosioca, odnosno njihovog slabog afiniteta prema

biomolekulama. Neki od anorganskih nosioca su zeoliti, keramika, aktivni ugljen, silika i mezoporozna silika, metalni oksidi poput Al_2O_3 , TiO_2 i ZrO_2 te magnetski nosioci. Anorganski nosioci su popularni za imobilizaciju enzima radi širokog izbora poroznosti, kao i izvrsne toplinske, mehaničke i mikrobne otpornosti.^{36,37,38}

S brzim napretkom nanotehnologije, došlo je do šireg interesa za novi oblik celuloze, tj. "nanocelulozu" kao napredni materijal za razne industrijske primjene. U suštini, svojstva nanoceluloze kao što su izrazita morfologija i geometrijske dimenzije, visoka specifična površina i mehanička robustnost su vrlo korisna kao potpora za imobilizaciju enzima.³⁶

Nosioci na bazi silike jedni su od najpopularnijih izbora za imobilizaciju enzima. Razlog tome je velika površina silike koja se lako može modificirati u različite funkcionalne skupine kao potpora imobilizaciji enzima, zajedno s osiguravanjem visokog stupnja fizikalne, kemijske i biološke otpornosti.³⁶

2.4.1. Magnetske nanočestice

Magnetske nanočestice kao anorganski nosioci se ističu kao posebno korisni nosioci korišteni za imobilizaciju enzima. Najčešće korištene magnetske čestice su magnetit (Fe_3O_4) i maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Magnetske nanočestice Fe_3O_4 izazivaju veliki interes radi jednostavnih tehnika njihove pripreme, lakog dobivanja željenih fizičkih svojstava veličine i oblika, niske toksičnosti, dobrog kapaciteta za prijenos naboja, dobrog kapaciteta zadržavanja enzima, sposobnosti površinske modifikacije, manji otpor prijenosu mase i jaka magnetska svojstva koja olakšavaju njihov oporavak iz reakcijske smjese.^{5,39}

Postoje razne metode za sintezu navedenih magnetskih nanočestica. Neke od njih su „zelena sinteza“ (upotreba inaktiviranih biljnih tkiva, biljnih ekstrakata te drugih dijelova biljaka, mikroorganizama itd.), ko-precipitacija, mikroemulzija, termalna razgradnja, laserska piroliza, kemijsko taloženje pare, elektrokemijska sinteza i druge.⁴⁰

Prednost imobilizacije enzima na magnetskim nanočesticama je povoljna komercijalna primjena radi praktičnosti u rukovanju, jednostavnosti odvajanja enzima iz reakcijske smjese i ponovne upotrebe, čime se omogućuje isplativa upotreba, na primjer, kontinuiranom radu. Drugi ključni čimbenik kako bi se potpuno iskoristile prednosti spomenutih nanočestica, je idealno reguliranje orijentacije enzima na nosiocu. U usporedbi s poroznim nosačima, neporozne nanočestice nemaju problema s vanjskom difuzijom, što ih čini konkurentnijima posebno za industrijsku upotrebu velikih razmjera u sustavima čvrsto-tekuće (npr. istaloženi protein). Štoviše, imobilizirani enzim ne može lako prodrijeti u kožu i stoga pokazuje nisku ili nikakvu alergenost. Sljedeća prednost je općenito poboljšana stabilnost i u uvjetima

skladištenja i u radu, npr. prema denaturaciji toplinom ili autolizom. Unatoč povezanim prednostima imobiliziranog enzima na magnetskim nanočesticama, on također ima neke nedostatke uključujući smanjenu aktivnost, konformacijske promjene enzima, mogućnost denaturacije enzima, promjene svojstava, ograničenja prijenosa mase i smanjena učinkovitost protiv netopivih supstrata. Štoviše, dugotrajna industrijska upotreba imobiliziranih enzima zahtijeva pripremu vrlo stabilnih derivata koji imaju prikladna funkcionalna svojstva za danu reakciju (npr. aktivnost i selektivnost).⁵

Kao što je već navedeno, magnetske nanočestice imaju širok raspon primjene jer posjeduju jedinstvena svojstva, a neka od njih su niska toksičnost, biokompatibilnost te superparamagnetizam. Ova svojstva mogu biti korisna u raznim potencijalnim primjenama kao što su imobilizacija stanica i enzima, u sustavima bioseparacije, imunološka testiranja, isporuka lijekova i biosenzori. Također, koriste se za ekstrakciju selektiranih stanica iz bioloških uzoraka i kultura. U tijeku je i razvoj tehnika kao što je popravljavanje tkiva, liječenje magnetskom hipertermijom, ciljana implikacija lijeka i označavanje stanica.^{5,41}

Površina nanočestica trebala bi biti modificirana kako bi se zaštitile od oksidacije pri izlaganju zraku, te im se poboljšala stabilnost u kiselim uvjetima i spriječila aglomeracija zbog magnetskih dipolnih momenata. Jedna od mogućih modifikacija je oblaganje magnetskih nanočestica silikom radi njezine inertnosti i jedinstvenih kemijskih svojstava.³⁶

2.5. Matematičko modeliranje enzimatskih reakcija

2.5.1. Uvod u matematičko modeliranje

Općenito, matematičko modeliranje je osnovno načelo reakcijskog inženjerstva. Definiira se kao postupak opisivanja realnog sustava matematičkim jednadžbama s ciljem razvoja i uporabe matematičkog modela za kasnije analize, projektiranja i optimiranja sustava za koji je model izrađen. Modeliranjem odnosno odabirom odgovarajućeg matematičkog modela, te procjenom kinetičkih parametara istog, predviđa se ponašanje sustava, na temelju kojeg se određuje najpovoljniji tip reaktora te početni reakcijski uvjeti. S obzirom na predviđanje ponašanja sustava, sustav je definiran matematičkim relacijama između ulaznih i izlaznih veličina te se smatra apstraktnom cjelinom koja je izolirana i egzistira kao nezavisna.

Tijekom provedbe modeliranja, velika pažnja obraća se na broj prisutnih parametara, odnosno na varijable u modelu kao što su temperatura, koncentracija, tlak, volumen, fizikalna i kemijska svojstva itd. Što je više varijabli u modelu, to je model složeniji.

Matematički modeli pokazuju veliku učinkovitost određivanja optimalnih radnih uvjeta s ciljem optimiranja produktivnosti i konverzije supstrata. Prilikom optimiranja procesa, simulacijama, pomoću modela, može se odrediti tijek reakcije u određenim uvjetima, te tako uštediti vrijeme i novac potreban za provođenje eksperimenta. Matematički model procesa uključuje kinetički i reaktorski model, tj. bilance tvari komponenata koje ovise o tipu reaktora.^{42,11,43}

2.5.2. Modeliranje enzimatskih reakcija

U današnje vrijeme modeliranje ima iznimnu ulogu kod enzimatskih reakcija, te konstantno raste. Modeliranje enzimskih reakcija zahtjevan je zadatak zbog složenosti sustava te kemijskih i konformacijskih prijelaza povezanih s reakcijom.

Kako su biokatalitički procesi vrlo slični kemijskim, ipak bitna razlika je u tome što biokatalitički procesi moraju uzeti u obzir enzimatsku kinetiku i stabilnost enzima.

Tijekom modeliranja enzimatskih reakcija, potrebno je obratiti pažnju na parametre kao što su karakteristike biokatalizatora, koncentracije supstrata, produkata i katalizatora, reakcijska ravnoteža te kemijska i fizikalna svojstva supstrata i produkata. Spomenuti parametri mogu imati veliki utjecaj na tijek reakcije. Također, pomoću modela procesa u reaktoru, postoji mogućnost predviđanja tijeka reakcije, najpovoljniji tip reaktora, potrebnu koncentraciju biokatalizatora itd., uz saznanja o enzimatskoj kinetici i procijenjene kinetičke parametre.

Potrebno je odrediti kinetiku enzimski katalizirane reakcije koja se uobičajeno određuje prateći promjenu početne brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata kako bi se razvio model. Enzimski kinetički parametri se procjenjuju iz izraza za brzinu reakcije koji se temelje na matematičkoj obradi podataka dobivenih provođenjem enzimski katalizirane reakcije.^{44,45}

2.5.3. Enzimaska reakcijska kinetika

Enzimaska reakcijska kinetika bavi se proučavanjem brzine enzimskih reakcija te je samim time i dio bioreakcijskog inženjerstva. Razlikuje se od kemijske reakcijske kinetike jer proizlazi iz mehanizma biokatalitičke reakcije.

Kako bi se uspostavio učinkovit i izvediv biokatalitički proces, važno je ispitati kinetička svojstva enzima. Procjena kinetičkog modela u ranom razvoju procesa može biti vrijedna za daljnju implementaciju procesa. Omogućuje donošenje odluka utemeljenih na dokazima, identifikaciju uskih grla i kvantificiranje problema procesa. Za procjenu učinkovitost procesa koriste se matematički modeli, oni omogućuju brzu i jeftinu optimizaciju reakcije te su

korisni u pronalaženju najisplativijeg načina za biosintezu proizvoda na industrijskoj razini. Također mogu predvidjeti, ocijeniti i istražiti različite scenarije ili pretpostavke modeliranog sustava i okoline, npr. izmjene početnih reakcijskih uvjeta i koncentracije reagensa i/ili katalizatora.⁴

Kinetičko modeliranje enzima nudi bitne informacije o enzimskim reakcijama kroz reaktivnost vrsta koje sudjeluju, a koje su ključne u dizajniranju poboljšanih reakcijskih uređaja i procjeni njihove učinkovitosti. Što se tiče uspostavljanja reakcijskih sustava i razvoja prikladnih kinetičkih jednadžbi bitno je osiguravanje zahtjeva za očuvanjem mase, inhibicija, učinaka prijenosa mase i drugo. Vezano za to, ključni čimbenici koji imaju utjecaj na kinetičko modeliranje enzima mogu biti temperatura i vrijednosti pH, upotreba imobiliziranih enzima, sastav reakcijskog medija i slično.

Dok se u kemijskom reakcijskom inženjerstvu govori o reakcijama prvog i drugog reda, u ovom slučaju govori se o Michaelis-Menteničinom tipu kinetike.^{30,4,46}

2.5.3.1. Michaelis-Menteničina kinetika

Ovisnost brzine reakcije o reakcijskim veličinama i parametrima opisana je kinetičkim modelima. Brzina enzimskih reakcija opisuje se Michaelis - Menteničinom kinetičkom jednadžbom.⁴⁷ Michaelis - Menteničina kinetika predstavlja ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata i enzima na temelju mehanizma prikazanih jednadžbama 1. i 2.



Kod jednosupstratnih reakcija u prvom koraku dolazi do brze reverzibilne reakcije enzima (E) i supstrata (S) pri čemu nastaje kompleks enzim-supstrat (ES) (Jedn. 1.). Kompleks zatim kemijski reagira i dolazi do stvaranja produkta (P) odvojenog od enzima (E) (Jedn. 2.).

Jednosupstratne enzimatske reakcije, koje slijede Michaelis-Menteničinu kinetiku karakterizira hiperbolička ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata (Slika 9.) (Jedn. 2.3). Pretpostavka na kojoj se temelji sljedeći izraz glasi kako je koncentracija supstrata dovoljno visoka da ne dolazi do bitne promjene u njezinoj početnoj vrijednosti tijekom perioda u kojem se eksperimentalno određuje početna brzina reakcije.

$$r = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s} \quad (3)$$

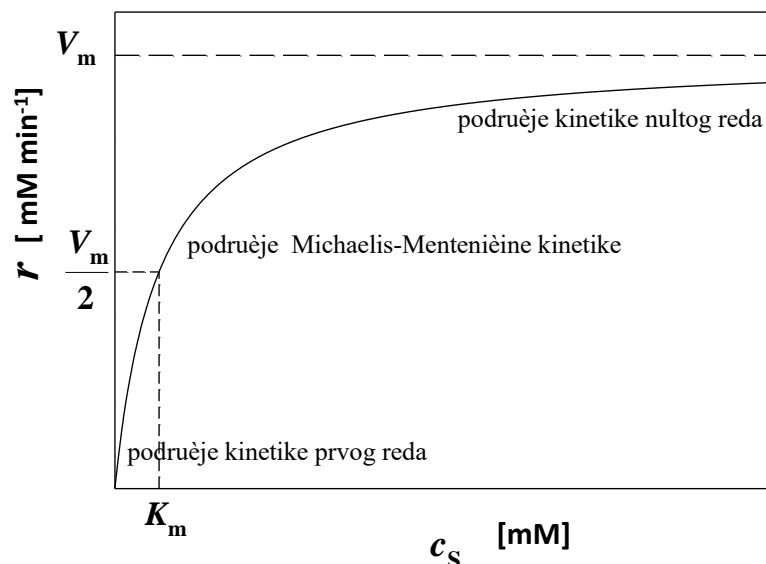
U navedenoj jednadžbi c_s označava koncentraciju supstrata [mM], V_m je maksimalna brzina reakcije [mM min⁻¹], K_m^S je Michaelis-Menteničina konstanta [mM], dok je r_s brzina potrošnje supstrata [mM min⁻¹]. Ključni parametri Michaelis-Menteničine kinetike su maksimalna brzina reakcije (V_m) koja ovisi o koncentraciji enzima (Jedn. 4) i Michaelis - Menteničina konstanta (K_m^S) (Jedn. 5.) koja ovisi o konstantama brzina reakcija k_1 , k_2 i k_3 , prikazanih u jednadžbama mehanizma reakcije (Jedn 1. i 2.) te o uvjetima okoline kao što su pH i temperatura i o supstratu.

$$V_m = k_2 \cdot E_0 \quad (4)$$

$$K_m^S = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (5)$$

Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata karakteristična za jednosupstratne reakcije koje slijede Michaelis – Menteničinu kinetiku prikazana je na Slici 9. Upravo iz tog grafa mogu se uočiti tri karakteristična područja koja slijede:

1. područje kinetike prvog reda
2. područje Michaelis - Menteničine kinetike
3. područje kinetike nultog reda



Slika 9. Grafički prikaz ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis - Menteničinu kinetiku

U području niske koncentracije supstrata, $c_s \ll K_m^S$, pri konstantnoj koncentraciji enzima, E , brzina reakcije je linearno proporcionalna koncentraciji supstrata, te se to područje aproksimira kinetikom reakcije 1. reda. U području visoke koncentracije supstrata, $c_s \gg K_m^S$,

brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata, te se to područje aproksimira kinetikom reakcije 0. reda. Područje između dva navedena, je Michaelis-Menteničino područje.

Dvosupstratna enzimatska kinetika opisuje enzimatske reakcije u kojima dolazi do reakcije dva supstrata. Drugi supstrat je najčešće koenzim.⁴⁸ Navedena dvosupstratna reakcija (Jedn. 6.) opisuje se Michaelis - Menteničnim kinetičkim modelom (Jedn. 7.), koja se ovisno o broju supstrata mijenja.



$$r = \frac{V_m \cdot c_{S_1} \cdot c_{S_2}}{(K_m^{S_1} + c_{S_1}) \cdot (K_m^{S_2} + c_{S_2})} \quad (7)$$

2.5.3.2. Inhibicija enzima

U biokatalitičkim reakcijama vrlo često dolazi do smanjenja aktivnosti enzima, koja se očituje smanjenjem brzine enzimatske reakcije zbog inhibicije reakcije. Michaelis-Menteničin model ne uključuje postojanje inhibicije supstratom i produktom. Brzina reakcije se usporava na način da se inhibitor veže za aktivno mjesto na enzimu. Inhibitor može biti supstrat ili produkt neke kemijske reakcije. Razlikujemo tri tipa inhibicije enzima⁴⁹:

1. Kompetitivna inhibicija (Jedn. 8) – inhibitor se veže na aktivno mjesto na enzimu, smanjujući na njemu koncentraciju supstrata, što rezultira smanjenjem brzine reakcije i povećanjem Michaelis - Menteničine konstante.
2. Nekompetitivna inhibicija (Jedn. 9) – inhibitor se ireverzibilno veže na mjesto različito od aktivnog, čime se mijenja oblik enzima te je na taj način ometano vezanje supstrata na aktivno mjesto enzima, što dovodi do smanjenja brzine enzimatske reakcije.
3. Antikompetitivna inhibicija (Jedn. 10) – inhibitor se veže isključivo za enzim-supstrat kompleks.

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

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

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (10)$$

U navedenim izrazima c_i [mM] predstavlja koncentraciju inhibitora, a K_i [mM] konstantu inhibicije.

2.5.3.3. Deaktivacija enzima

Osim promjenom aktivnosti enzima, smanjenje brzine enzimatske reakcije moguće je i zbog deaktivacije enzima. Uzroci deaktivacije mogu biti: povišenja temperature, promjene pH vrijednosti, tlak u sustavu, denaturacija proteina, prevelika brzina miješanja ili prisustva nekih komponenata u sustavu koje na enzim djeluje deaktivirajuće i dr. Brzina deaktivacije enzima opisuje se kinetikom prvog (Jedn. 11) i drugog reda (Jedn. 12).⁴⁹

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \rightarrow V_m = V_{m0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (11)$$

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m^2 \rightarrow V_m = \frac{V_{m0}}{1 + V_{m0} \cdot k_d \cdot t} \quad (12)$$

U navedenim izrazima k_d je deaktivacijska konstanta prvog reda [min^{-1}] koja može biti procijenjena iz reaktorskih eksperimenata, odnosno praćenjem aktivnosti enzima tijekom provođenja eksperimenata nezavisnim mjerenjima.¹⁴

2.5.4. Reaktorski modeli

Kemijski reaktori u kojima se odvijaju bioprocesi nazivaju se bioreaktori. Koriste se za proizvodnju biomase i bioprodukata pomoću mikroorganizama ili životinjskih stanica, te za biotransformacije pomoću enzima. Bioreaktori se mogu podijeliti na fermentatore i enzimatske reaktore. Kod fermentatora se reakcije odvijaju uz žive mikroorganizme ili njihove stanice, dok se kod enzimatskih reaktora odvijaju procesi katalizirani enzimima. Postoje razni tipovi bioreaktora, no osnovna tri su: kotlasti (šaržni) reaktor, protočno kotlasti i cijevni reaktor.

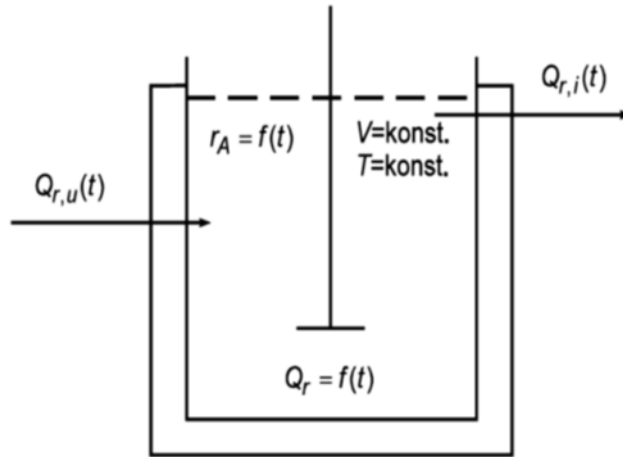
Kriteriji za odabir bioreaktora su: tip reakcijskog medija, tip kinetike i oblik biokatalizatora. Također, važno je da bioreaktor bude optimiran kako bi se postigla što bolja produktivnost, odnosno da se proizvede što više produkata po jedinici vremena, jedinici enzimatske aktivnosti biokatalizatora i jedinici vremena.⁵⁰

2.5.4.1. Kotlasti bioreaktor

Kotlasti (šaržni / *batch*) reaktor predstavlja zatvoreni sustav u kojem tijekom reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom. U takvom sustavu ostvaruje se približno idealno miješanje te je sastav reakcijske smjese u svakoj točki isti. U kotlastom reaktoru sve veličine stanja (sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije, količina oslobođene i utrošene topline) ovise o vremenu, odnosno on radi u nestacionarnom stanju. Ukoliko je reaktor termostatiran, pretpostavlja se izotermni rad, te se pretpostavlja da je volumen reakcijske smjese stalan i nezavisan o vremenu tj. da ne dolazi do promijene gustoće.⁵¹

Kotlasti reaktor se koristi za reakcije u kapljevitj fazi te za proizvodnju manjih količina produkata na umjerenim tlakovima i temperaturama, što je najčešće u industriji. Pogodan je za reakcijske sustave koji nisu inhibirani niti supstratom niti produktom.⁵²

Na Slici 10. prikazan je idealni kotlasti reaktor s naznačenim najvažnijim značajkama.



Slika 10. Shematski prikaz kotlastog reaktora⁵⁰

Bilanca tvari za kotlasti reaktor, uz pretpostavku idealnog miješanja, opisana je Jedn. 13.

$$r_A \cdot V = - \frac{d(V \cdot c_A)}{dt} \quad (13)$$

r_A predstavlja brzinu potrošnje komponente A [mM min^{-1}], V volumen reakcijske smjese u bioreaktoru [dm^3], c_A koncentraciju komponente A [mM] i t vrijeme [min].

S pretpostavkom da je i volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu, odnosno nema promjene gustoće, Jedn. 14. glasi:

$$r_A = - \frac{dc_A}{dt} \quad (14)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Aparatura

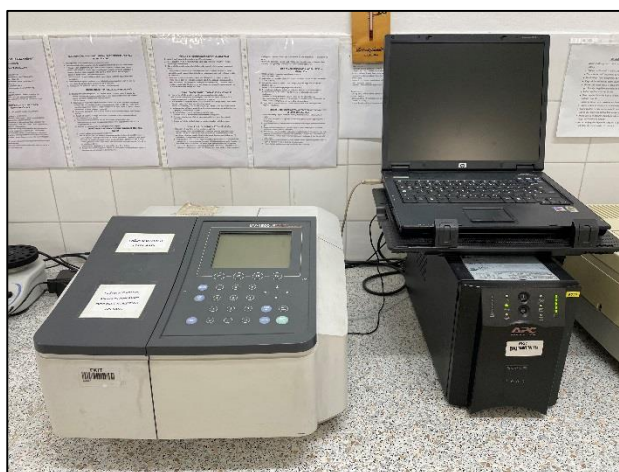
3.1.1. Spektrofotometar

Spektrofotometar je mjerni instrument za analizu spektra elektromagnetskog zračenja, koji mjeri količinu svjetla koju apsorbira određena vrsta molekula u otopini u vidljivom i UV području, odnosno apsorbanciju kao funkciju valne duljine svjetlosti. Zraka svjetlosti propušta se kroz uzorak te se mjeri intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak (I) i uspoređuje s intenzitetom ulaznog svjetla (I_0). Intenzitet apsorbiranog zračenja u uzorku je proporcionalan koncentraciji tvari koja se određuje.

Apsorpcija svjetlosti kroz otopinu opisuje se Lambert-Beer-ovim zakonom (*Jedn. 15*) pri čemu je ABS apsorbancija pri određenoj valnoj duljini svjetlosti, c koncentracija tvari u otopini [mol dm^{-3}], b duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm] i ε molarni apsorpcijski koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$] karakterističan za svaku molekulsku vrstu i ovisan o valnoj duljini svjetlosti.

$$ABS = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (15)$$

U ovom radu korišten je spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* (*Slika 11.*) za mjerenje aktivnosti enzima DERA početnim brzinama u reakcijskoj otopini te mjerenje stabilnosti.



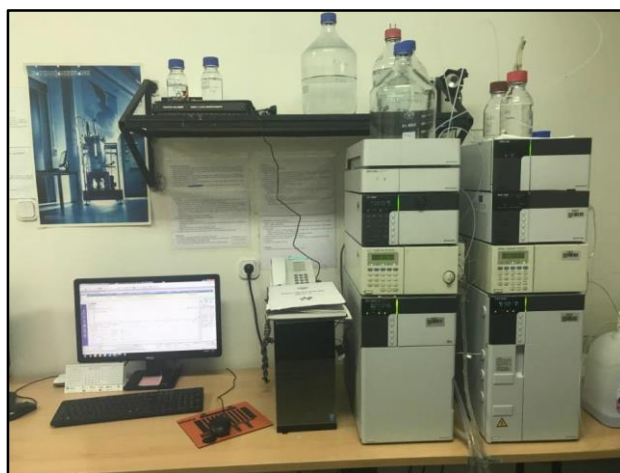
Slika 11. Spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

3.1.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC - engl. *High performance liquid chromatography*) je kao analitička metoda vrsta kromatografije u koloni koja se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovu kemijskih interakcija između tvari koje se analiziraju i stacionarne faze koja se nalazi u koloni. Princip rada je taj da se određeni volumen

uzorka injektira u mobilnu fazu, koja pod visokim tlakom putuje kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom koja se sastoji od materijala koji ima veliku adsorpcijsku površinu. Na temelju specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme koje je potrebno da analizirana tvar dođe do kraja stupca, odnosno da se eluira naziva se retencijsko vrijeme, a ono ovisi o prirodi tvari, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Što je retencijsko vrijeme manje, kromatogram je bolji, a to se postiže korištenjem visokog tlaka. Nakon kolone uzorak ulazi u UV-detektor koji mjeri apsorpciju svjetla kod određene valne duljine ili u RI-detektor koji mjeri razliku indeksa loma otopine s analitom i reference, što u oba slučaja rezultira karakterističnim signalom u kromatogramu. Učinkovitost separacije spojeva ovisi o primjeni odgovarajuće stacionarne i mobilne faze, te o brzini eluiranja.

Za određivanje koncentracija supstrata, acetaldehida i kloroacetaldehida te dobivenih produkata, u ovom radu, korišten je HPLC proizvođača *Shimadzu* prikazan na Slici 12.



Slika 12. HPLC uređaj *Shimadzu*

3.1.3. Centrifuga

Centrifuga *Hettich Universal 320R* (Slika 13.) je korištena za odvajanje enzima ili radi uklanjanja zaostalog nosioca, odnosno magnetskih nanočestica od reakcijske otopine. Uzorci su centrifugirani na 14 000 o/min u trajanju od 5 min pri 4°C.



Slika 13. Centrifuga *Hettich Universal 320R*

3.1.4. Liofilizator

Liofilizator *LABCONCO Free Zone* (Slika 14.) je uređaj za sušenje uzoraka. Princip rada je prolazak uzorka kroz dvije faze sušenja, primarnu i sekundarnu fazu. U primarnoj fazi uzorak je u smrznutom stanju (od $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$), te smanjenjem tlaka ispod trojne točke vode isparava slobodna voda. U sekundarnoj fazi sušenja je sušenje iz tekućeg stanja, u sustav se dovodi toplina, te dolazi do uklanjanja vezane vode. Kemijski sastav, biološko – fiziološka i senzorna svojstva uzoraka ostaju nepromijenjena. Liofilizator se primjenjuje u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji (ekstrakti kave, voćnih sokova, začina, antibiotici i drugo) te za čuvanje proteina, enzima, mikroorganizama. U ovom radu, liofilizator je korišten za sušenje nosioca, odnosno magnetnih nanočestica.



Slika 14. Liofilizator *LABCONCO Free Zone*

3.1.5. Analitička vaga

Sve mase tvari u čvrstom agregatnom stanju potrebne za provođenje eksperimenata vagane su na analitičkoj vagi *Shimadzu* s preciznošću na četiri decimale (Slika 15.).



Slika 15. Analitička vaga *Shimadzu*

3.1.6. Homogenizator

Uzorci su homogenizirani na homogenizatoru *MS2 Minishaker IKA* (Slika 16.)



Slika 16. Homogenizator *MS2 Minishaker IKA*

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom

Postoje razne metode određivanja proteina u uzorku. U ovom radu odabrana je metoda po Bradford-u. Bilo je potrebno odrediti sadržaj proteina u otopini enzima kako bi se izračunala učinkovitost imobilizacije kao i u otopini nakon imobilizacije enzima. Korišteni enzim u eksperimentalnom radu je DERA proizvođača Prozomix.

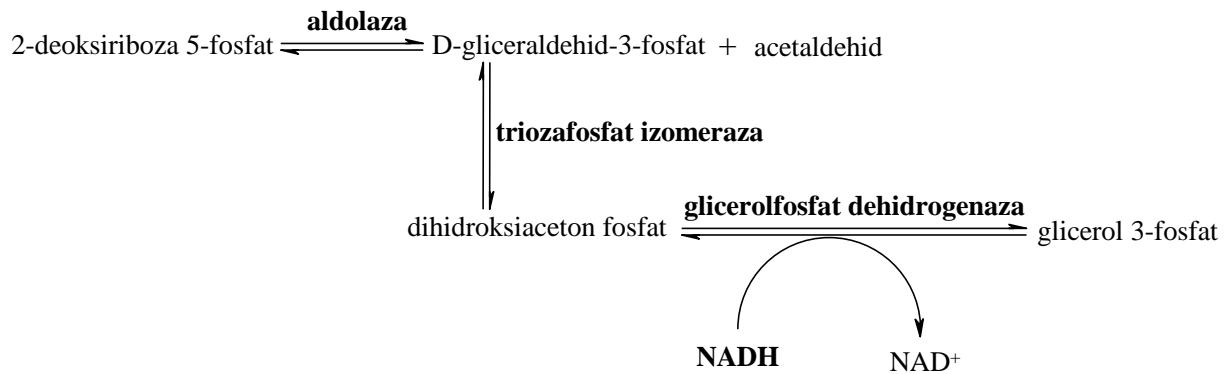
Metoda se bazira na miješanju razrijeđenog enzima ili otopine proteina s Bradfordovim reagensom što uzrokuje reakciju između proteina i reagensa odnosno boje Coomassie Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. Navedena boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Što je koncentracija proteina u uzorku viša, to će se više boje vezati na protein, odnosno boja će postati tamnija. Anionska boja se veže za NH_3 skupine proteina. Pri ovom procesu apsorpcijski maksimum boje se pomiče sa 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski. Bradfordov reagens je unaprijed pripremljen od 100 mg CBB, 50 mL 95% EtOH, 100 mL 85% fosfatne kiseline i vode do 1000 mL.

Prije početka određivanja proteina bilo je potrebno napraviti baždarni pravac koju ukazuje na odnos proteina poznatih koncentracija i apsorbancije te se pomoću dobivene jednadžbe pravca računa nepoznata koncentracija proteina u uzorku. Baždarni pravac napravljen je mjerenjem apsorbancije otopina albumina (engl. *Bovine serum albumin*, BSA) poznate koncentracije na valnim duljinama $\lambda = 450$ i 595 nm. Pripravljene su standardne otopine BSA koncentracija 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L i 20 mg/L. U plastične kivete stavljeno je 500 μL standardne otopine određene koncentracije i 500 μL Bradfordovog reagensa. Sadržaj u kiveti inkubiran je 10 minuta na sobnoj temperaturi pri čemu je nastalo plavo obojenje različitog intenziteta, ovisno o koncentraciji BSA. Nakon inkubacije, očitane su apsorbancije na spektrofotometru *Shimadzu UV-1800* i nacrtan je baždarni pravac (Prilog 1.).

Na isti način očitane su apsorbancije realnih uzoraka s činjenicom da su uzorci razrijeđeni onoliko puta koliko je bilo potrebno da mjerena koncentracija bude u području granica detekcije i kvantifikacije.

3.2.2. Određivanje aktivnosti enzima DERA spektrofotometrijskom metodom

Mjerenje aktivnosti enzima DERA temelji se na tri reakcije. Prva reakcija je cijepanje 2-deoksiriboza 5-fosfat (DRP) u D-gliceraldehid-3-fosfat i acetaldehid. Navedena reakcija je katalizirana enzimom DERA. Nastali D-gliceraldehid-3-fosfat transformira se u dihidroksiaceton fosfat pomoću enzima triozafosfat izomeraze (TPI). Dihidroksiaceton fosfat potom reducira uz enzim glicerolfosfat dehidrogenazom (GDH) pri čemu dolazi od oksidacije koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (NADH). S obzirom da su enzimi TPI i GDH u suvišku, reakcije koje su katalizirane njima su veoma brze. Stoga reakcija koju katalizira DERA predstavlja usko grlo procesa tj. najsporiju reakciju u testu te je ovim postupkom možemo pratiti spektrofotometrijski. Opisani proces shematski je prikazan na Slici 17.



Slika 17. Shematski prikaz reakcija na kojima se temelji test za određivanje aktivnosti enzima DERA

Test prema kojem se određuje aktivnost enzima DERA se sastoji od 1 mM NADH, 1 mM DRP, 312 U/mL TPI, 253,44 U/mL GDH u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6, pri čemu je koncentracija enzima DERA 1,25 mg/mL. Nakon što su sve komponente dodane u kvarcnu kivetu spektrofotometrijski se prati pad koncentracije NADH pri valnoj duljini $\lambda = 340$ nm u vremenskom periodu od 100 s. Dobivena promjena apsorbancije ($\Delta ABS/\Delta t$) predstavlja nagib apsorpcijske krivulje iz koje se računaju volumna aktivnost (A_v) prema jednadžbi 16. i specifična aktivnost enzima (A_s) prema jednadžbi 17.

$$A_v = \frac{V_r}{\varepsilon_{340} \cdot d \cdot V_{DERA}} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (16)$$

$$A_s = \frac{A_v}{c_{DERA}} \quad (17)$$

U gore navedenim izrazima V_r predstavlja ukupni volumen u kiveti [mL], V_{DERA} je volumen dodanog enzima [mL], ϵ_{340} je ekstinkcijski koeficijent [$\text{cm}^2/\mu\text{mol}$] pri valnoj duljini $\lambda = 340$ nm, d predstavlja promjer kivete ($d = 1$ cm), $\Delta ABS/\Delta t$ kao što je već rečeno predstavlja promjenu apsorbancije u vremenu [min^{-1}]. Volumna aktivnost je A_v [U mL^{-1}], specifična aktivnost A_s [U mg^{-1}], dok je c_{DERA} koncentracija enzima [mg/mL].

3.2.3. Određivanje koncentracije supstrata, produkata i međuprodukata

Koncentracije supstrata acetaldehida i kloroacetaldehida te produkata i međuprodukata 4-kloro-3-hidroksibutanala, 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala, 3-hidroksibutanala i 3,5-dihidroksiheksanala određuju se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Kako bi se navedeni aldehidi mogli pratiti s UV detektorom uzorci su prije mjerenja derivatizirani. Uzorak ($V = 5 \mu\text{L}$) je promiješan s derivatizacijskom otopinom ($V = 50 \mu\text{L}$). Derivatizacijska otopina se sastoji od 0,02 mg/L o-benzilhidroksilamin hidroklorida otopljenog u smjesi piridina, metanola i vode u omjeru 33:15:2. Derivatizacija se provodila tijekom 20 min na sobnoj temperaturi na tresilici nakon čega je dodan metanol ($V = 350 \mu\text{L}$). Uzorci su centrifugirani radi uklanjanja enzima i radi uklanjanja ostatka magnetnih čestica tj. viška nosioca te su zatim analizirani HPLC analitičkom metodom kako bi se utvrdila točna koncentracija supstrata i nastalih produkata u vremenu uzimanja uzoraka. Za određivanje koncentracija supstrata i produkata HPLC metodom korištena je kolona *Phenomenex Kinetex RP* (C18, 5 μm , 250 x 4.6 mm, 100 Å) koja je bila termostatorirana na 30°C. Kao mobilna faza korištena je trifluoroctena kiselina (TFA) u vodi (eluent A) i TFA u acetonitrilu (eluent B). Protok mobilne faze bio je 1,5 mL/min, a UV detekcija pri valnoj duljini $\lambda = 215$ nm. Metoda na HPLC-u trajala je 18 minuta. U prilogu 2. nalazi se primjer jednog kromatograma gdje se mogu uočiti retencijska vremena supstrata, međuprodukta i produkta. Vrijeme zadržavanja acetaldehida je 10,6 min, kloroacetaldehida 12 min, međuprodukta 9,9 min, a produkta je 8,9 min. Iz dobivenog kromatograma očitaju se površine te se pomoću baždarnog pravca i nagiba računaju točne koncentracije. Baždarni pravac je ovisnost odzivnih površina o koncentraciji promatrane komponente, a dobiven je na način da su na HPLC-u određene odzivne površine uzoraka otopina promatrane komponente poznatih koncentracija (Prilog 3.).

3.2.4. Određivanje aktivnosti slobodnog enzima

Za izračunavanje uspješnosti imobilizacije potrebno je izmjeriti aktivnosti slobodnog i imobiliziranog enzima. Aktivnost se mjeri u aldolnoj reakciji u kotlastom reaktoru, a 1 U aktivnosti DERA definira se kao količina enzima potrebna za stvaranje 1 μmol produkta u minuti. Za mjerenje aktivnosti slobodnog enzima, reakcijska otopina je sadržavala 100 μL otopine aldehida i 100 μL otopine enzima (koncentracije kotlastog reaktora - 12,5 mg/mL enzima, 100 mM acetaldehida, 50 mM kloroacetaldehida). Uzorci su uzimani u pravilnim vremenskim intervalima tijekom prvih 150 sekundi reakcije te su derivatizirani i analizirani na HPLC kako bi se kvantificirala koncentracija produkta. Aktivnost čistog enzima (A) [U/mL] se računala prema sljedećoj jednadžbi 18.

$$A = \frac{d(c_{\text{međuprodukt}} + c_{\text{produkt}})}{dt} \quad (18)$$

3.3. Imobilizacija enzima DERA

3.3.1. Sinteza magnetskih nanočestica

Kako bi se sintetizirale magnetske nanočestice, otopljeno je 3,2 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ u 50 mL etilen glikola u kojem je prethodno otopljeno 7,7 g natrijevog acetata kako bi se spriječila aglomeracija, nakon čega je sve zajedno miješano 30 minuta. Zatim je smjesa prenesena u autoklav na žarenje tijekom 3 h do 200°C. Nakon dosegnutih 200°C, smjesa je zagrijavana 8 h pri konstantnoj temperaturi. Precipitat se odvojio etanolom i magnetom nakon zagrijavanja te se par puta isprao etanolom. Zatim je uslijedilo sušenje u liofilizatoru *LABCONCO Free Zone*. Ovakvim načinom sinteze je dobiveno 930 mg suhih magnetnih nanočestica.

3.3.2. Oblaganje magnetskih nanočestica silikom

U svrhu funkcionalizacije magnetskih nanočestica iste su obložene silikom na način da je u 930 mg suhih čestica dodano 50 mL ultračiste vode. Zatim je u smjesu dodano 150 mL etanola i 1 mL TEOS-a te se sve zajedno miješalo u ultrazvučnoj kupelji 10 minuta na sobnoj temperaturi. Tijekom miješanja u smjesu je dokapano 4,5 mL amonijaka (NH_3), nakon čega je sve zajedno miješano 12 h. Nakon ispiranja etanolom, uslijedilo je sušenje u liofilizatoru kojim je dobiveno 1100 mg magnetskih nanočestica obloženih silikom.

3.3.3. Funkcionalizacija magnetskih nanočestica

Magnetske nanočestice funkcionalizirane su dodatkom 50 mL etanola i 3 mL APTES-a. Tako pripremljena suspenzija se zatim miješala u inertoj atmosferi dušika pri 30°C i 160 okr/min tijekom 24 sata.

3.3.4. Aktivacija magnetnih nanočestica

Prethodno pripremljene i funkcionalizirane magnetske nanočestice bilo je potrebno aktivirati. U tu svrhu pomiješano je 1 mL 1,5 mM *p*-benzokinona s 25 mg funkcionaliziranih magnetnih nanočestica, te je miješano 1 h pri 900 o/min i 25°C. Nakon 1 h, aktivirane magnetne nanočestice su ispirane 2-3 puta s 0,1 M fosfatnim puferom pH 6.

3.3.5. Imobilizacija enzima

Imobilizacija se provodila miješanjem 100 µL otopine enzima s 900 µL fosfatnog pufera s aktiviranim nosiocem, pri 900 o/min i 25°C kroz 1,5 h. Kako bi se utvrdila količina imobiliziranog enzima, Bradfordovom metodom mjeri se koncentracija proteina u supernatantu kako je opisano u poglavlju 3.2.1. Imobilizirani enzim je potom ispran 3 puta s 0,1 M fosfatnim puferom pH 6 te je korišten za naknadna mjerenja aktivnosti i stabilnosti. Učinkovitost imobilizacije računala se prema jednadžbi 19.

$$\text{Učinkovitost imobilizacije} = \frac{\text{ukupna konc.enzima} - \text{konc.enzima u supernatantu}}{\text{ukupna konc.enzima}} \quad (19)$$

3.3.6. Određivanje aktivnosti i stabilnosti imobiliziranog enzima

Za mjerenje aktivnosti imobiliziranog enzima, 25 mg magnetskih nanočestica s imobiliziranim enzimom pomiješa se sa 100 µL pufera i 100 µL otopine aldehida (100 mM AA, 50 mM CAA). Proces uzorkovanja je isti kao kod slobodnog enzima, ali su se uzorci uzimali tijekom prvih 30 minuta (poglavlje 3.4.4). Zadržana aktivnost računala se prema jednadžbi 20.

$$\text{Zadržana aktivnost} = \frac{\text{aktivnost imobiliziranog enzima}}{\text{aktivnost čistog enzima}} \quad (20)$$

Nakon 30 minuta, nosioc se 3 puta isprao 0,1 M fosfatnim puferom pH 6, te se u svrhu ispitivanja stabilnosti enzima odredila aktivnost imobiliziranog enzima ponovnim pokretanjem reakcije. U tu svrhu imobilizirani enzim se pomiješao sa 100 µL pufera i 100 µL otopine aldehida, a uzorkovanje se vršilo tijekom prvih 5 minuta reakcije. Stabilnost imobiliziranog enzima se računala prema jednadžbi 21.

$$\text{Stabilnost} = \frac{\text{aktivnost imobiliziranog enzima u 2.ciklusu}}{\text{aktivnost imobiliziranog enzima u 1.ciklusu}} \quad (21)$$

3.4. Karakterizacija enzima DERA

3.4.1. Određivanje aktivnosti imobiliziranog enzima DERA u ovisnosti o pH vrijednosti fosfatnog pufera

Aktivnost enzima DERA u reakciji sinteze 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala određivala u 0,1 M fosfatnom puferu različitih pH vrijednosti (pH 6-8) pri sobnoj temperaturi od 25°C uz homogenizaciju reakcijske smjese. Koncentracija acetaldehida bila je 100 mM, kloroacetaldehida 50 mM, dok je masa nosioca iznosila 20 mg, a koncentracija vezanog enzima na nosioc iznosila je 0,2 mg/mL. Uzorci su se uzimali u pravilnim vremenskim intervalima unutar 5 minuta tijekom 30 minuta eksperimenta. Nakon toga, nosioc je ispran 3 puta te se tijekom 5 minuta izmjerila stabilnost. Uzorci su potom analizirani na HPLC-u. Iz grafa koji prikazuje ovisnost promjene koncentracije promjene međuprodukta (4C-Cl) s vremenom nastalog produkta u vremenu provučen je regresijski pravac te je nagib pravca proporcionalan aktivnosti enzima. Specifična aktivnost enzima DERA izračunata je prema *jednadžbi 22*.

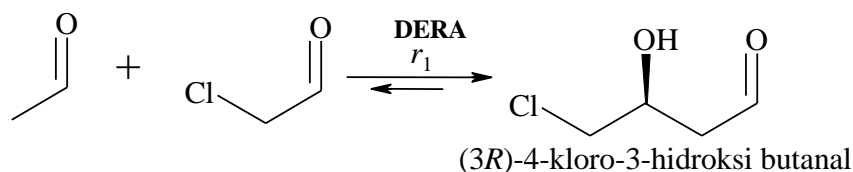
$$A_s = \frac{\frac{dc}{dt}}{c_{protein}} \quad (22)$$

3.4.2. Određivanje kinetike enzima DERA

Kinetika enzima DERA određivana je metodom početnih brzina. Sva mjerenja su provedena u kotlastom reaktoru pri sobnoj temperaturi u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6. Kinetika se određivala u prvom i drugom stupnju promatrane reakcije.

3.4.2.1. Određivanje kinetike enzima DERA u reakciji acetaldehida i kloroacetaldehida

Ispitana je kinetika enzima DERA u prvom stupnju sinteze prikazanoj na sljedećoj Slici 18.



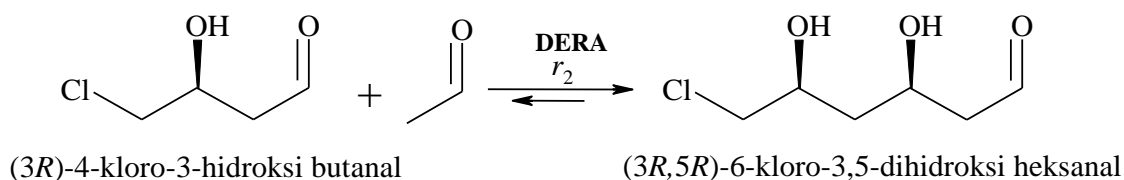
Slika 18. Shematski prikaz prvog stupnja sinteze bočnog lanca statina

Mjeren je utjecaj različitih koncentracija acetaldehida u rasponu 10 - 200 mM pri konstantnoj koncentraciji kloroacetaldehida (CAA, $c_{CAA} = 200$ mM). Nakon toga izmjeren je

utjecaj različitih koncentracija kloroacetaldehida u rasponu 10 - 200 mM na početnu reakcijsku brzinu uz konstantnu koncentraciju acetaldehida (AA, $c_{AA} = 200$ mM). Reakcijski volumen je iznosio 200 μ L, a koncentracija enzima DERA u reaktoru 1,25 mg/mL. Uzorci su se uzimali tijekom 10 minuta u pravilnim vremenskim intervalima, te se koncentracija produkta određivala na HPLC-u. Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka promjene koncentracije međuprodukta (4C-Cl) s vremenom, određena je specifična aktivnost enzima DERA prema jednadžbi 22.

3.4.2.2. Određivanje kinetike enzima DERA u reakciji acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl međuprodukt)

Drugi stupanj u sintezi se temelji na reakciji acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl), prilikom čega se dobiva 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal (6C-Cl). Ovaj dio reakcije shematski je prikazan na Slici 19.



Slika 19. Shematski prikaz drugog stupnja sinteze bočnog lanca statina

Eksperimentalno je ispitana kinetika enzima DERA i u ovom koraku sinteze. Prvo se mjerio utjecaj različitih koncentracija 4C-Cl u rasponu 20 - 120 mM pri konstantnoj koncentraciji acetaldehida $c_{AA} = 50$ mM. Nakon toga se pratila kinetika enzima DERA pri konstantnoj koncentraciji 4C-Cl od $c_{4C-Cl} = 50$ mM. Mjerio se utjecaj različitih koncentracija acetaldehida u rasponu 25 - 250 mM. Reakcijski volumen je iznosio 200 μ L, a koncentracija enzima DERA u reaktoru 1,25 mg/mL. Iz promjene koncentracije laktola (6C-Cl) u vremenu računala se specifična aktivnost enzima prema jednadžbi 22.

3.4.3. Stabilnost enzima DERA

3.4.3.1. Utjecaj kloroacetaldehida i acetaldehida na stabilnost enzima DERA

Utjecaj supstrata (kloroacetaldehida i acetaldehida) na stabilnost enzima DERA određivao se u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6 s 1,25 mg/mL enzima pri sobnoj temperaturi s različitom početnom koncentracijom kloroacetaldehida ($c_{CAA} = 50 - 800$ mM), odnosno acetaldehida ($c_{AA} = 50 - 800$ mM). Aktivnost enzima se pratila tijekom 24 sata na način da su se uzorci uzimali u pravilnim vremenskim intervalima direktno iz reaktora u kivetu. Test za

mjerenje aktivnosti je opisan u poglavlju 3.2.2. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka, korištenjem kinetičkog modela drugog reda procijenjena je konstanta deaktivacije jedn. 23.

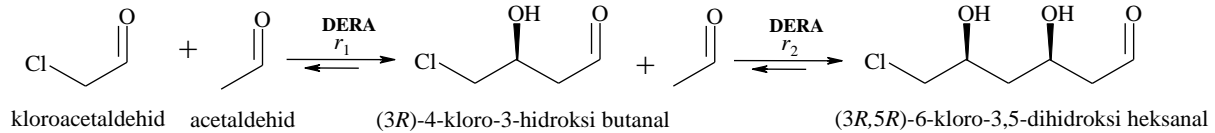
$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A^2 \quad (23)$$

3.5. Sinteza laktola u kotlastom reaktoru

Laktol je sintetiziran u kotlastom reaktoru volumena 100 mL. Reakcija je provedena u 0,1 M fosfatnom puferu pH 6 pri sobnoj temperaturi. Koncentracija acetaldehida iznosila je 100 mM, dok je koncentracija kloroacetaldehida iznosila 50 mM. Koncentracija enzima DERA bila je 3 mg/mL. Pretpostavljeno je kako je sustav stacionaran i izoterman te da je miješanje idealno. Uzorci su uzimani u pravilnim vremenskim intervalima. Aktivnost enzima praćena je standardno opisanim testom aktivnosti, a promjene koncentracija supstrata i produkata praćeno je već spomenutom HPLC metodom.

3.6. Matematički model

Matematički model sinteze laktola katalizirane enzimom DERA (Slika 20.) sastoji se od kinetičkih i bilančnih jednadžbi u reaktoru.



Slika 20. Shema sinteze bočnog lanca statina katalizirane enzimom DERA

3.6.1. Kinetički model

Kinetički model je razvijen na temelju sheme prikazane na Slici 20., eksperimentalnih rezultata i procijenjenih kinetičkih parametara. Kinetika prvog stupnja opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju supstratom kloroacetaldehidom (CAA) (Jedn. 24.).

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_{AA} \cdot c_{CAA}}{(K_{m1}^{AA} + c_{AA}) \cdot (K_m^{CAA} + c_{CAA} + \frac{c_{CAA}^n}{K_i^{CAA}})} \quad (24)$$

Kinetika drugog stupnja također je opisana dvosupstratnom Michaelis- Menteničinom kinetikom uz inhibiciju supstrata acetaldehida (AA) i međuprodukta 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl) (Jedn. 25.).

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot c_{AA} \cdot c_{4C-Cl}}{(K_{m2}^{AA} + c_{AA} + \frac{c_{AA}^2}{K_i^{AA}}) \cdot (K_m^{4C-Cl} + c_{4C-Cl} + \frac{c_{4C-Cl}^2}{K_i^{4C-Cl}})} \quad (25)$$

3.6.2. Reaktorski model

Reaktorski model za kotlasti reaktor sastoji se od bilančnih jednadžbi za acetaldehid (Jedn. 26.), kloroacetaldehid (Jedn. 27.), 4-kloro-3-hidroksibutanal (Jedn. 28.) i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal (Jedn. 29.).

$$\frac{dc_{AA}}{dt} = -r_1 - r_2 \quad (26)$$

$$\frac{dc_{CAA}}{dt} = -r_1 \quad (27)$$

$$\frac{dc_{4C-Cl}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (28)$$

$$\frac{dc_{6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal}}{dt} = r_2 \quad (29)$$

Deaktivacija enzima koja se može primijetiti tijekom provedbe eksperimenata opisana je kinetikom drugog reda (Jedn. 30.), dok je konstanta deaktivacije (k_d) opisana polinomom drugog reda (Jedn. 31.).

$$\frac{dc_{DERA}}{dt} = -k_d \cdot c_{DERA}^2 \quad (30)$$

$$k_d = \sum_{i=1-3(\text{aldehidi})} (a_i \cdot c_i^2 + b_i \cdot c_i) \quad (31)$$

3.6.3. Obrada rezultata

Obrada eksperimentalnih podataka napravljena je u programskom paketu *Scientist*. Napravljena je simulacija na temelju eksperimentalnih podataka i pretpostavljenog modela. Potrebni parametri su se procijenili nelinearnom regresijom simpleks metodom ili metodom najmanjih kvadrata. Metode procjene parametara pronalaze minimalni zbroj kvadrata greške između eksperimentalnih podataka i izračunatih pomoću modela.

Simpleks metoda se koristi u slučaju kada je velika razlika između početne vrijednosti parametra i njegove prave vrijednosti. Navedena metoda je jako dobra prilikom određivanja približne vrijednosti parametara, dok se metoda najmanjih kvadrata koristi za određivanje vrijednosti parametara sa većom točnošću. Nakon procijenjenih parametara i napisanog modela provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi određenog modela. Za rješavanje diferencijalnih jednadžbi *Scientist* se koristi slijedećim metodama: Eulerova metoda, metoda Runge Kutta IV, Bulirsch - Stoer metoda i Episode algoritam.

Na temelju eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri tj. maksimalna brzina reakcija V_m , Michaelis-Menteničine konstante K_m , konstante inhibicije K_i i konstante deaktivacije k_d . Navedeni parametri su korišteni za simulacije pomoću modela, odnosno za predviđanje promjena koncentracija supstrata i produkata s vremenom u kotlastom reaktoru.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je enzim DERA je imobiliziran na nosioc, odnosno na magnetne nanočestice obložene silikom. Karakterizacija imobiliziranog enzima napravljena je u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida pri čemu nastaje laktol. Dobiveni produkt je bitan prekursor u proizvodnji statina, lijekova koji se koriste za snižavanje kolesterola. Prilikom primjene enzima DERA najveći nedostatak je u navedenoj reakciji sklonost deaktivaciji u prisustvu visokih koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida s obzirom da to nisu njegovi prirodni supstrati. Svrha imobilizacije enzima DERA na magnetne nanočestice je povećanje stabilnosti enzima u prisustvu aldehida i kloroacetaldehida. Deaktivacija ovisi i o pH i temperaturi. Prijašnjim istraživanjima utvrđeno je kako je najbolja temperatura za odvijanje eksperimenata sobna temperatura (25°C).

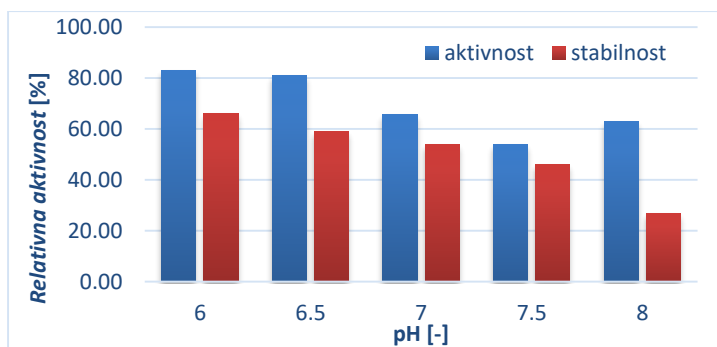
U ovom radu ispitani su utjecaji različitih pH vrijednosti te utjecaj acetaldehida i kloroacetaldehida na stabilnost i aktivnost imobiliziranog enzima DERA. Pri optimalnim uvjetima imobilizirani enzim DERA je kinetički okarakteriziran.

4.1. Karakterizacija enzima DERA

Aktivnost i stabilnost enzima DERA ispitane su pri različitim pH vrijednostima te je također ispitan utjecaj supstrata na stabilnost enzima DERA.

4.1.1. Utjecaj različitih pH vrijednosti fosfatnog pufera na aktivnost i stabilnost enzima DERA

Utjecaj različitih pH vrijednosti na aktivnost i stabilnost enzima prikazana je na Slici 21. Vidljivo je kako najveću aktivnost i stabilnost enzim DERA ima u 0,1M fosfatnom puferu pri pH 6 koji je odabran kao najbolji medij za sve provedbu daljnjih eksperimenata.



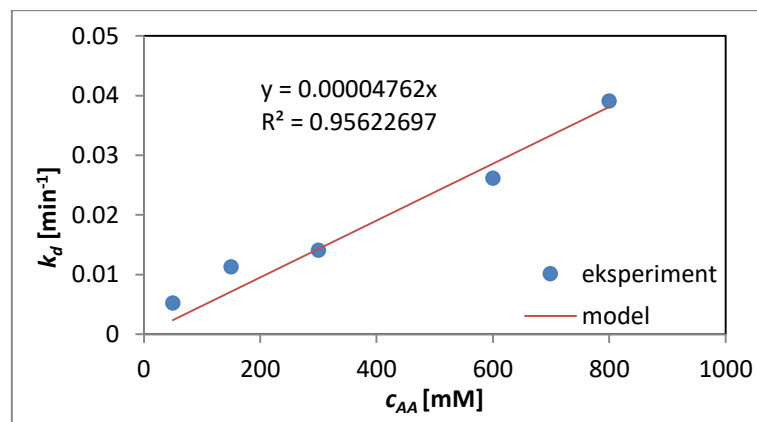
Slika 21. Aktivnost i stabilnost enzima DERA u 0,1 M fosfatnom puferu pri različitim pH vrijednostima

4.1.2. Utjecaj acetaldehida i kloroacetaldehida na stabilnost enzima DERA

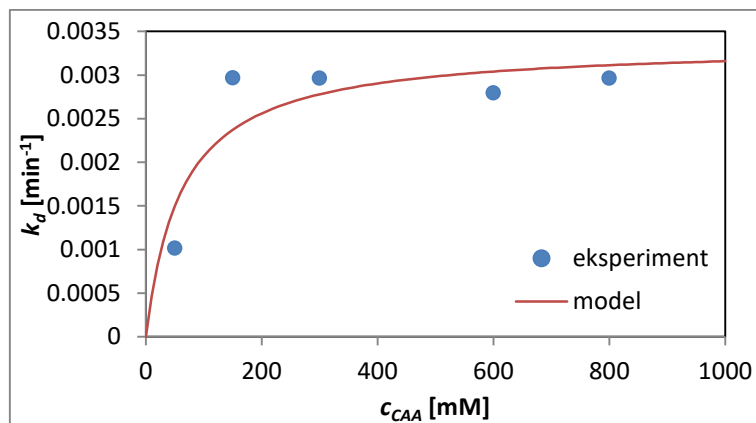
Utjecaj različitih koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida na stabilnost enzima DERA prikazan je kao ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji navedenih tvari. Konstanta deaktivacije je procijenjena na temelju jedn. 30. i 31.

Na Slici 22. prikazana je ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji acetaldehida. Vidljiva je linearna ovisnost konstante deaktivacije u odnosu na koncentraciju aldehida dok je u prijašnjim istraživanjima za slobodan enzim ta ovisnost bila eksponencijalna⁵³. Prema slici 22. može se zaključiti što je veća koncentracija acetaldehida to je konstanta deaktivacije veća. Najniža brzina deaktivacije enzima bila bi pri nižim vrijednostima koncentracije acetaldehida, u ovom slučaju pri koncentraciji od 50 mM. Također, vidljivo je kako se pretpostavljeni matematički model vrlo dobro slaže s eksperimentalnim podacima uz mala odstupanja.

Na Slici 23. prikazana je ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji kloroacetaldehida. Vidljivo je kako konstanta deaktivacije pokazuje hiperboličnu ovisnost, te pri nižim koncentracijama kloroacetaldehida raste, a nakon koncentracije od 200 mM prelazi u kinetiku 0. reda. Također, pretpostavljeni se matematički model slaže s eksperimentalnim podacima uz mala odstupanja.



Slika 22. Ovisnost konstante deaktivacije enzima DERA o koncentraciji acetaldehida (0,1 M fosfatni pufer pH 6)



Slika 23. Ovisnost konstante deaktivacije enzima DERA o koncentraciji kloroacetaldehida (0,1 M fosfatni pufer pH 6)

Ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji acetaldehida opisana je jednadžbom oblika $k_d = a \cdot c + b$, dok je ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji kloroacetaldehida opisana jednadžbom oblika $k_d = \frac{a \cdot c}{b + c}$, a njihovi parametri prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Parametri u jednadžbi ovisnosti konstante deaktivacije o koncentraciji aldehida i kloroacetaldehida

Parametar	a [$\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$]	b [min^{-1}]
acetaldehid	$4,76 \cdot 10^{-5}$	0
Parametar	a [min^{-1}]	b [mM]
kloroacetaldehid	$3,35 \cdot 10^{-3}$	62,15

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako kloroacetaldehid ima manji utjecaj na stabilnost imobiliziranog enzima DERA.

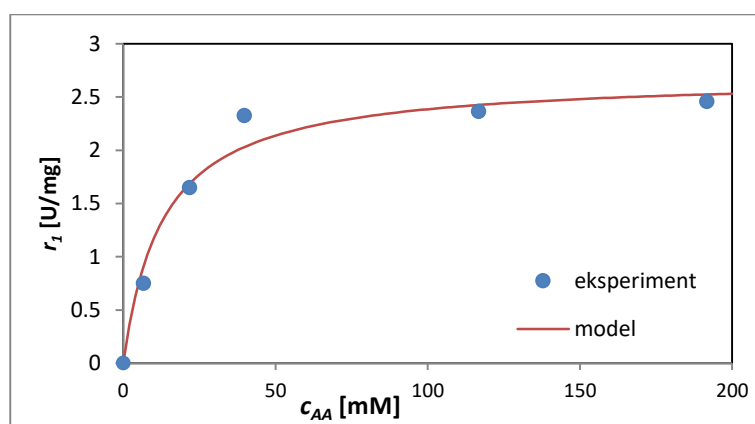
4.2. Kinetika enzima DERA

Kinetika enzima DERA u reakciji sinteze laktola iz acetaldehida i kloroacetaldehida određena je metodom početnih brzina te je prikazana kao ovisnost početne reakcijske brzine o koncentracijama supstrata i međuprodukta. Kinetika je određena u prvom i drugom stupnju sinteze laktola. Kinetika enzima u reakciji acetaldehida i kloroacetaldehida te u reakciji acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednadžbom (Jedn 24. i 25.). Vrijednosti Michaelis-Menteničinih konstanti za acetaldehid, kloroacetaldehid i 4-kloro-3-hidroksibutanal (K_m), maksimalna brzina reakcije (maksimalna

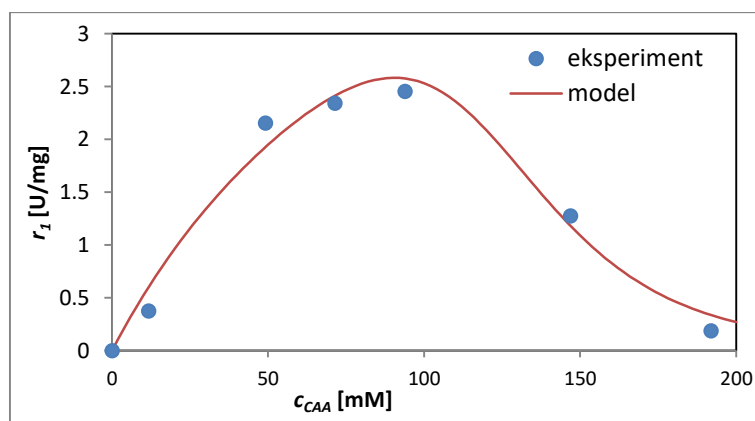
aktivnost enzima, V_m) te konstante inhibicije supstrata i međuprodukta (K_i) procijenjeni su nelinearnom regresijom u programskom paketu *SCIENTIST*.

4.2.1. Kinetika enzima u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida

Na Slici 24. prikazana je ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji acetaldehida. Koncentracija acetaldehida se varirala od 0 do 200 mM, a koncentracija kloroacetaldehida se držala konstantnom na 100 mM. Na Slici 25. je prikazana ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji kloroacetaldehida. Koncentracija kloroacetaldehida se varirala od 0 do 200 mM, dok se koncentracija acetaldehida držala konstantnom na 200 mM.



Slika 24. Kinetika DERA-e u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida (0,1 M fosfatni pufer pH 6 , $\gamma_{DERA} = 1,25 \text{ mg cm}^{-3}$). Ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji acetaldehida ($c_{CAA} = 100 \text{ mM}$).



Slika 25. Kinetika DERA-e u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida (0,1 M fosfatni pufer pH 6 , $\gamma_{DERA} = 1,25 \text{ mg cm}^{-3}$). Ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji kloroacetaldehida ($c_{AA} = 200 \text{ mM}$).

Iz grafičkih prikaza je vidljivo kako se eksperimentalni podaci vrlo dobro slažu sa modelom, a kod variranja koncentracije kloroacetaldehida može se uočiti pad aktivnosti pri 100 mM što ukazuje na pojavu antikompetitivne inhibicije supstratom. Antikompetitivnu inhibiciju karakterizira vezanje inhibitora za enzim-supstrat kompleks pri čemu dolazi do zaustavljanja reakcije. U slučaju inhibicije kloroacetaldehidom došlo je do vezanja inhibitora na više mjesta što je rezultiralo naglim smanjenjem brzine reakcije pri višim koncentracijama. Zbog navedenog prilikom opisivanja ovakve inhibicije uveden je parametar n (jedn.24).⁵⁴

Dobiveni eksperimentalni podatci su opisani dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom (jedn. 24). U Tablici 2. prikazane su vrijednosti kinetičkih parametara enzima za prvi stupanj sinteze.

Tablica 2. Kinetički parametri enzima DERA-e u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida.

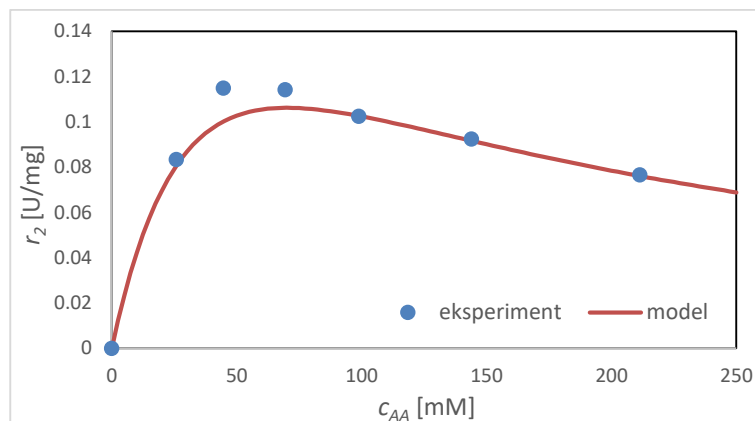
Parametar	V_m	K_m^{AA}	K_m^{CAA}	K_i^{CAA}	n
	[U mg ⁻¹]	[mM]	[mM]	[mM]	
Vrijednost	6,69	13,05	110,92	$1,39 \cdot 10^{12}$	6,86
Devijacija	+/- 0,82	+/- 2,79	+/- 25,19	+/- $5,15 \cdot 10^{12}$	+/- 0,76

Iz procijenjenih parametara vidljivo je kako je zbog niže vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante acetaldehid specifičniji supstrat u ovoj reakciji.

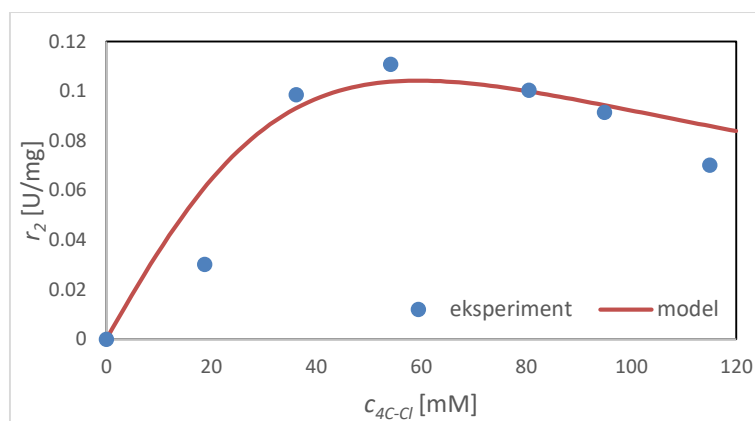
4.2.2. Kinetika enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala

Na slici 26. prikazana je ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji acetaldehida. Koncentracija međuprodukta (4C-Cl) se držala konstantnom na 50 mM dok se koncentracija acetaldehida varirala.

Na slici 27. je prikazana ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji 4-kloro-3-hidroksibutanala. Koncentracija acetaldehida držala se konstantnom na 50 mM dok se koncentracija međuprodukta varirala.



Slika 26. Kinetika DERA-e u reakciji aldolne adicije acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksi butanala (0,1 M fosfatni pufer pH 6 , $\gamma_{DERA} = 1,25 \text{ mg cm}^{-3}$). Ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji acetaldehida ($c_{4C-Cl} = 50 \text{ mM}$).



Slika 27. Kinetika DERA-e u reakciji aldolne adicije acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksi butanala (0,1 M fosfatni pufer pH 6 , $\gamma_{DERA} = 1,25 \text{ mg cm}^{-3}$). Ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji 4-kloro-3-hidroksi butanala ($c_{AA} = 50 \text{ mM}$).

Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako se eksperimentalni podaci dobro slažu sa modelom, te da oba supstrata inhibiraju reakciju. Eksperimentalni podaci su opisani dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s inhibicijom oba supstrata (jedn. 22).

U Tablici 3. su prikazane vrijednosti kinetičkih parametara enzima za drugi stupanj sinteze.

Tablica 3. Kinetički parametri enzima DERA-e u reakciji aldolne adicije acetaldehida i i 4-kloro-3-hidroksi butanala.

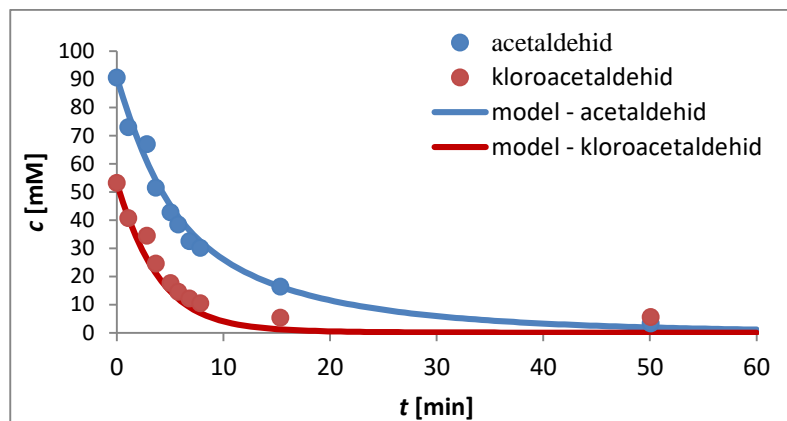
Parametar	V_m [U mg ⁻¹]	K_m^{AA} [mM]	K_m^{4C-Cl} [mM]	K_i^{4C-Cl} [mM]	K_i^{AA} [mM]
Vrijednost	4,86	49,98	521,07	98,58	6,79
Devijacija	+/- 0,16	+/- 4,52	+/- 32,88	+/- 10,64	+/- 0,48

Kao i u prvom stupnju aldolne adicije iz procijenjenih parametara može se zaključiti da je acetaldehid specifičniji supstrat od 4-kloro-3-hidroksibutanala.

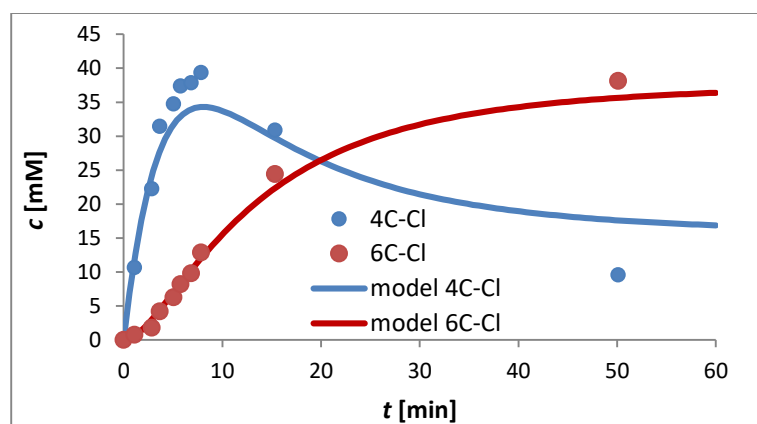
Iz procijenjenih parametara za prvi i drugi stupanj reakcije može se vidjeti da je reakcija aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida brža (viša maksimalna brzina reakcije) od reakcije sinteze u drugom stupnju. Stoga se može pretpostaviti da će tijekom provedbe reakcije sinteze u drugoj reakciji u reaktoru uz enzim DERA doći do nakupljanja određene količine međuprodukta.

4.3. Sinteza 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala aldolnom adicijom katalizirana enzimom DERA u kotlastom reaktoru

Sinteza laktola provedena je u kotlastom tipu reaktora. Na Slikama 28. i 29. prikazane su ovisnosti koncentracija supstrata i produkata u vremenu. Na Slici 28. vidljiv je pad koncentracije acetaldehida i kloroacetaldehida koji se troše tijekom reakcije. U reaktoru je postignuta konverzija acetaldehida 96,3 % nakon 50 min dok je konverzija kloroacetaldehida 89,35 %. Uzrok navedenom je da se acetaldehid troši i za nastajanje sporednog produkta. Obzirom da su acetaldehid i kloroacetaldehid uvedeni u omjeru 1,7 : 1, može se zaključiti da je kloroacetaldehid bio u suvišku. Na Slici 29. prikazan je trend nastajanja produkta 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala i međuprodukta 4-kloro-3-hidroksibutanala. Vidljivo je kako se koncentracija 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala povećava tijekom vremena, dok koncentracija međuprodukta 4-kloro-3-hidroksibutanala nakon određenog vremena opada jer se odvija drugi stupanj sinteze (Slika 19.). Postavljeni matematički model (Jedn. 24.-31.) je dobro opisao eksperimentalne rezultate prikazane na Slikama 28. i 29.



Slika 28. Sinteza 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala aldolnom adicijom katalizirana enzimom DERA u kotlastom reaktoru ($0,1 \text{ M}$ fosfatni pufer pH 6 , $\gamma_{\text{DERA}} = 3 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{AA}} = 90,76 \text{ mM}$, $c_{\text{CAA}} = 53,27 \text{ mM}$). Vremenska promjena koncentracije supstrata.



Slika 29. Sinteza 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala aldolnom adicijom katalizirana enzimom DERA u kotlastom reaktoru ($0,1 \text{ M}$ fosfatni pufer pH 6 , $\gamma_{\text{DERA}} = 3 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{AA}} = 90,76 \text{ mM}$, $c_{\text{CAA}} = 53,27 \text{ mM}$). Vremenska promjena koncentracije produkta.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu, ispitana je reakcija sinteze bočnog lanca statina pomoću imobiliziranog enzima DERA na magnetnim nanočesticama obloženim silikom. Također, spomenuti biokatalizator kojim se ubrzala reakcija je karakteriziran.

Ispitivanjem utjecaja različitih pH vrijednosti 0,1 M fosfatnog pufera na stabilnost i aktivnost enzima DERA kao optimalna pH vrijednost pokazala se vrijednost pH 6, koja je shodno tome je odabrana kao medij za provedbu daljnjih eksperimenata.

Kinetika enzima DERA određena je u prvom i drugom stupnju sinteze. U reakciji acetaldehida i kloroacetaldehida te u reakciji acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala kinetika je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednadžbom. U prvoj reakciji dolazi do antikompetitivne inhibicije kloroacetaldehidom, dok kod kinetike druge reakcije dolazi do antikompetitivne inhibicije oba supstrata.

Također iz kinetičkih parametara može se zaključiti da je prva reakcija brža u odnosu na drugu u kojoj dolazi do nakupljanja međuprodukta tijekom procesa.

Supstrati, acetaldehid i kloroacetaldehid deaktiviraju enzim, te se deaktivacija enzima opisala kinetikom drugog reda. Prilikom ispitivanja utjecaja supstrata na stabilnost enzima utvrđeno je da acetaldehid ima veći deaktivacijski utjecaj na enzim od kloroacetaldehida.

Korištenjem procijenjenih kinetičkih parametra postavljen je matematički model procesa koji je dobro opisao rezultate sinteze laktola u kotlastom reaktoru.

6. LITERATURA

1. www.plivazdravlje.hr (pristup 5.1.2022)
2. Jiao, X. C., Pan, J., Xu, G. C., Kong, X. D., Chen, Q., Zhang, Z. J., & Xu, J. H.: *Efficient synthesis of a statin precursor in high space-time yield by a new aldehyde-tolerant aldolase identified from Lactobacillus brevis*, Catal Sci Technol, (2015), 5, 4048-4054.
3. Subhan, M., Faryal, R., Macreadie, I. G., *Exploitation of Aspergillus terreus for the Production of Natural Statins*, Journal of Fungi, (2016.), 2, 1 – 13.
4. Švarc, A., Fekete, M., Hernandez, K., Clapés, P., Findrik, Blažević, Z., Szekrenyi, A., Skendrović, D., Vasić-Rački, Đ., Charnock, S., J., Vrsalović, Presečki, A., *An innovative route for the production of atorvastatin side-chain precursor by DERA-catalysed double aldol addition*, Chem Eng Sci, (2021.), 231, 1 – 10.
5. Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., Nasiri, S., *Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization*, Biotechnol. Lett., (2016), 38, 223–233.
6. izv. prof. dr, sc. Findrik Blažević, Z., Bioreaktori, Interna skripta za dio kolegija Reaktori i Bioreaktori, Zagreb, 2017.
7. Copeland, R. A., *Enzymes: Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, John Wiley and Sons, New York, (2000).
8. Blanch, H.W., Clark, D.C.: *Biochemical Engineering*; Taylor & Francis (1997)
9. <https://eleventeengreen.wordpress.com/2012/11/19/proteins-four-levels/> (pristup 25.8.2021)
10. <https://bichep.com/enzyme-action-mechanism-and-properties/> (pristup 25.8.2021)
11. Vrsalović-Presečki A.; (2006); Studij fumaraze i alkohol dehidrogenaze u biotransformacijama; disertacija; Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije; Sveučilište u Zagrebu; Zagreb
12. http://www.bionet-skola.com/w/Enzimi_ (pristup 25.8.2021)
13. Kragl, U., Vasić-Rački, Đ., Wandrey, C.: *Continuous processes with soluble enzymes*, Indian Journal of Chemistry, (1993), 103-117.
14. Illanes, A.: *Enzyme biocatalysis: principles and applications*, Springer Science & Business Media, (2008).
15. Samland, A. K., Sprenger, A. G.: *Microbial aldolases as C–C bonding enzymes—unknown treasures and new developments*, Appl microbiol biot, (2006), 71, 253.

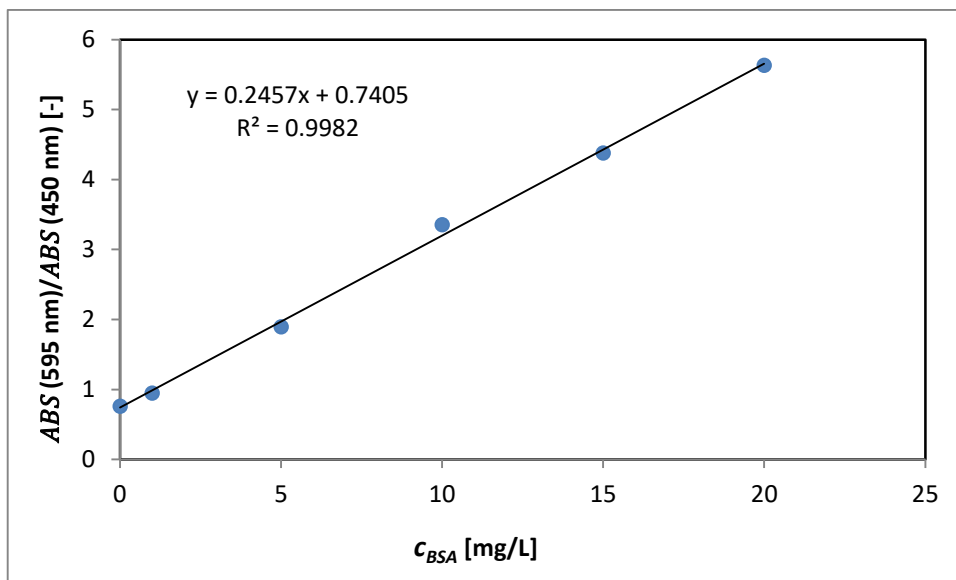
16. Rider, L., G., Lindsley, C., B., Miller, F., W. Juvenile, *Dermatomyositis*, Textbook of Pediatric Rheumatology, (2016.) 351 – 383.
17. www.worthington-biochem.com/ALD/ (pristup 30.8.2021)
18. Berridge, B., R., Van Vleet, J., F., Herman, E., *Cardiac, Vascular, and Skeletal Muscle Systems*, Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, (2013.) 1567 – 1665.
19. Robins, K., Osorio-Lozada, A., Avi, M., Richter, M., 7.23 *New Emerging Reactions. Comprehensive Chirality*, (2012.), 7, 481 – 515.
20. Schürmann, M., Sprenger, G. A.: *Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from Escherichia coli and is related to a novel group of bacterial transaldolases*, Journal of Biological Chemistry, (2001), 276, 11055-11061.
21. www.pngwing.com/en/search?q=aldolase+A (pristup 26.01.2022)
22. Haridas, M., Abdelraheem, E.M.M., Hanefeld, U., *2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA): applications and modifications*, Appl Microbiol Biotechnol, (2018), 102, 9959–9971.
23. Chakraborty, S., Skolnick, B., E., Alves, W., M., Marshall, L., F., Narayan, R., K., *Chapter 5 - Traumatic Brain Injury*, Handbook of Neuroemergency Clinical Trials (Second Edition), Academic Press, (2018.) 85 – 109.
24. Kontny, U., Lissat, A., *Apoptosis and drug resistance in malignant bone tumors*, Bone Cancer, (2015.), 425 – 436.
25. www.medicalnewstoday.com/articles/8274 (pristup 15.9.2021)
26. www.mayoclinic.org/diseases-conditions/high-blood-cholesterol/in-depth/statins/art-20045772 (pristup 15.9.2021)
27. Grabner, B., Pokhilchuk, Y., Gruber-Woelfler, H., *DERA in Flow: Synthesis of a Statin Side Chain Precursor in Continuous Flow Employing Deoxyribose-5-Phosphate Aldolase Immobilized in Alginate-Luffa Matrix*, Catalysts, (2020.), 10, 1 – 15.
28. Sastre D., E., Reis, E., A., Marques Netto, C., G., C., *Chapter Four - Strategies to rationalize enzyme immobilization procedures*, Methods Enzymol, Academic Press (2020.), 630, 81 – 110.
29. Ozalp, V., C., Bayramoglu, G., Arica, M., Y., *Chapter Five - Fibrous polymer functionalized magnetic biocatalysts for improved performance*, Methods in Enzymology, Academic Press, (2020.), 630, 111 – 132.
30. izv. prof. dr. sc. Z. Findrik Blažević, Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta, Zagreb, 2013.

31. Minteer, S.D., *Enzyme stabilization and immobilization – Methods and protocols*, Humana Press (2017) 4.
32. Liu, D.-M., Chen, J., Shi, Y.-P., *Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization*, *Trac -Trends Anal Chem*, (2018), 102, 332–342.
33. Y.J. Yoo, Y. Feng, Y.-H. Kim, C.F.J. Yagonia, *Fundamentals of Enzyme Engineering*, Springer Netherlands (2017) 8-62.
34. Sheldon, R., A., Van Pelt, S., *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*, *Chem. Soc. Rev.*, 42, (2013), 6223-6235.
35. Torres-Salas, P., del Monte-Martinez, A., Cutiño-Avila, B., Rodriguez-Colinas, B., Alcalde, M., Ballesteros, A. O., Plou, F. J., *Immobilized Biocatalysts: Novel Approaches and Tools for Binding Enzymes to Supports*, *Adv Mater*, 23, (2011), 5275–5282.
36. Wahab, R. A., Elias, N., Abdullah, F., & Ghoshal, S. K., *On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview*, *Reactive and Functional Polymers*, 152, (2020), 104613.
37. Zucca, P., Sanjust, E., *Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms*, *Molecules*, 19, (2014), 14139-14194.
38. Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U. T., *Biocatalysts and Enzyme Technology 2nd Edition*, Wiley-Blackwell (2012) 320.
39. Muley, A. B., Mulchandani, K. H., Singhal, R. S., *Immobilization of enzymes on iron oxide magnetic nanoparticles: Synthesis, characterization, kinetics and thermodynamics*, *Methods Enzymol*, 630, (2019), 39-79.
40. Majidi, S., Zeinali Sehrig, F., Farkhani, S. M., Soleymani Goloujeh, M., Akbarzadeh, A., *Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles*, *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 44, (2014), 722–734.
41. Gonzalez-Fernandez, M. A., Torres, T. E., Andres-Verges, M., Costo, R., de la Presa, P., Serna, C. J., Morales, M. P., Marquina, C., Ibarra, M. R., Goya, G. F., *Magnetic nanoparticles for power absorption: Optimizing size, shape and magnetic properties*, *J. Solid State Chem*, 182, (2009), 2779–2784.
42. Magdić, D.: *Uvod u matematičko modeliranje*, Osijek (2011).
43. Imhof, P., *A Networks Approach to Modeling Enzymatic Reactions*, *Computational Approaches for Studying Enzyme Mechanism Part B*, (2016), 249–271.
44. Vasić-Rački, Đ., Findrik, Z., Presečki, A. V.: *Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development*, *Appl microbiol biotechnol*, (2011), 91, 845.

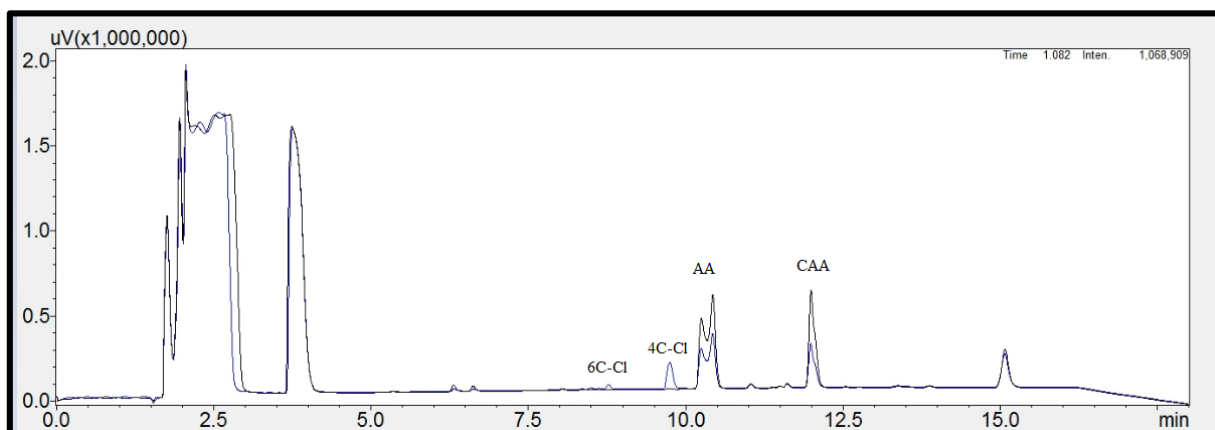
45. Straathof, A. J. J.: *Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting*, J Mol Catal B-Enzym, (2001), 11, 991-998.
46. E. M.Papamichael, H. Stamatis, P.-Y. Stergiou, A. Foukis, O.A. Gkini: *Enzyme Kinetics and Modeling of Enzymatic Systems*, Advances in Enzyme Technology, 71–104 (2019).
47. Dunn I. J., Heinzle E., Ingham J., Prenosil J. E., *Biological Reaction Engineering: Principles, Applications and Modelling with PC simulation* , Wiley-VCH; Weinheim; (1992); 25-31.
48. Blanch H. W., Clark D. S., *Biochemical Engineering*, Marcel Dekker, New York, (1993), 151-157.
49. Laidler K. J., Bunting P. S., *The Chemical Kinetics of Enzyme Reaction*; Claredon Press; Oxford University Press; (1973), 93-97, 430-435.
50. Vasić-Rački Đ., *Biokemijsko inženjerstvo*; Kemija u industriji; 39(10), (1990), 459-467.
51. Kosar V., *Reaktori i bioreaktori*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, (2017), Zagreb.
52. Gomzi Z., *Kemijski reaktori*, HINUS, Zagreb, (1998), 36-55.
53. Švarc, A., Findrik Blažević, Z., Vasić-Rački, Đ., Szekrenyi, A., Fessner, W., Charnock, S. J., Vrsalović Presečki, A, *2-Deoxyribose-5-phosphate aldolase from Thermotoga maritima in the synthesis of a statin-side chain precursor: characterization, modelling and optimization*, J Chem Technol Biot, 94 (2019), 1832-1842.
54. Avinash V.S., Ramasamy, S., Suresh, C.G., Pundle, A., *Penicillin V acylase from Pectobacterium atrosepticum exhibits high specific activity and unique kinetics*, Int J Biol Macromol, 79, (2015), 1-7.

7. PRILOZI

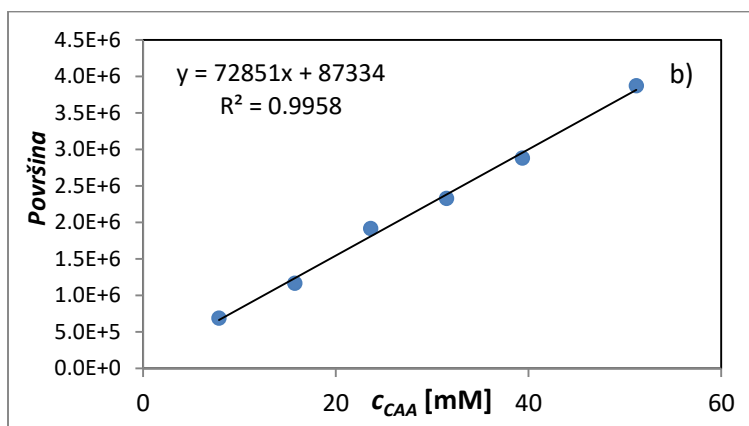
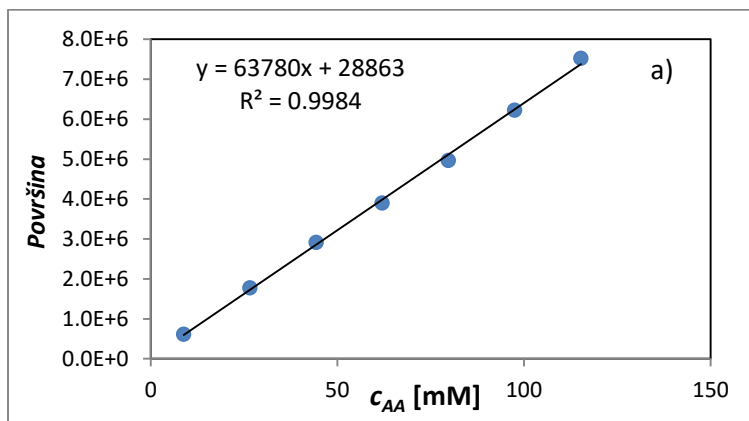
Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina



Prilog 2. Primjer kromatograma u reakciji sinteze



Prilog 3. Baždarni pravci za određivanje koncentracije a) acetaldehida i b) kloroacetaldehida



8. POPIS SIMBOLA I KRATICA

SIMBOLI

A	površina pika kromatograma
A_s	specifična aktivnost enzima [U/mg]
A_v	volumna aktivnost [U/mL]
b	duljina puta svjetlosti [cm]
c	koncentracija [mM]
d	promjer kivete [$d = 1$ cm]
ϵ	molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [$\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{mL}^{-1}$]
I	intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak [-]
I_0	intenzitet ulaznog svjetla [-]
λ	valna duljina zračenja [nm]
k	konstanta brzine reakcije [min^{-1}]
k_d	konstanta deaktivacije enzima [min^{-1}]
K_i	konstanta inhibicije [mmol dm^{-3}]
K_m	Michaelis - Menteničina konstanta [mmol dm^{-3}]
pH	vrijednost određena koncentracijom vodikovih iona u otopini
r	reakcijska brzina [$\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$]
t	vrijeme [min]
T	temperatura [$^{\circ}\text{C}$]
V	volumen [dm^3]
V_m	maksimalna brzina reakcije [$\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$, U/mg]

KRATICE

AA	acetaldehid
ABS	apsorbancija
APTES	aminopropiltrietsilan
BSA	apsorbancija otopina albumina, (engl. <i>Bovine serum albumin</i>)
CAA	kloroacetaldehid
CBB	boja Coomassie Blue G-250
DERA	deoksiriboza-5-fosfat aldolaza

DHAP	dihidroksiaceton fosfat
DHA	dihidroksiaceton
DRP	2-deoksiriboza-5-fosfat
E	enzim
ES	kompleks enzim – supstrat
GDH	glicerol fosfat dehidrogenaza
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (<i>engl. High performance liquid chromatography</i>)
LDL	lipoprotein niske gustoće (<i>engl. Low density lipoprotein</i>)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid
S	supstrat
P	produkt
TEOS	tetraetilortosilikat
TFA	trifluoroctena kiselina
TPI	triozafosfat izomeraza
4C-Cl	4-kloro-3-hidroksibutanal
6C-Cl	6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal

9. ŽIVOTOPIS

Stella Hamilton [REDACTED] Osnovnu školu Jurja Habelića završava 2011. godine te iste godine upisuje Gimnaziju Velika Gorica. Maturirala je 2015. godine te upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, gdje 2019. završava preddiplomski studij, smjer Ekoinženjerstvo. Potom obrazovanje nastavlja na diplomskom studiju Ekoinženjerstvo. Stručnu praksu odrađuje 2019. godine u Pliva d.o.o. u Kontroli kvalitete. Sudjelovala je na XIII. Susretu mladih kemijskih inženjera s posterskim izlaganjima na temu: „Ispitivanje uvjeta sinteze nanočestica zlata uz glukozu“ i „Uklanjanje mikroplastike naprednim oksidacijskim procesima“. Također, koautorica je objavljenog rada „Environmentally acceptable synthesis of nanoparticles for their potential use as textile coatings“ na 13. Međunarodnom znanstveno-stručnom simpoziju „TEXTILE SCIENCE AND ECONOMY 2020“. Trenutno radi administrativne poslove u Rp Global Projekti d.o.o.