

# Razvoj matematičkog modela sinteze ATP-a u kaskadnoj reakciji

---

**Plačko, Wanda**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2021**

*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:149:787891>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

**Wanda Plačko**

**RAZVOJ MATEMATIČKOG MODELA SINTEZE ATP-a U  
KASKADNOJ REAKCIJI**

**DIPLOMSKI RAD**

**Voditelj rada: doc. dr. sc. Martina Sudar**

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

doc. dr. sc. Martina Sudar

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

**Zagreb, siječanj, 2021.**

*Velika hvala docentici Martini Sudar na dragocjenim savjetima, velikom strpljenju, podršci i pomoći pri izradi ovog rada.*

*Hvala doktoru Slawomiru Poradi na pomoći u izradi grafičkog prikaza na kraju rada.*

*Hvala mojim roditeljima, Marleni i Krunoslavu te bratu Marku na neprekidnoj potpori i na svemu što su učinili za mene u životu.*

*Hvala mom prijatelju Marku na podršci tijekom mog studija i stručne prakse.*

## SAŽETAK

Enzimske kaskadne reakcije predstavljaju obećavajući način sinteze tvari zbog većih iskorištenja procesa i smanjenja potrebe za dodavanjem drugih komponenti u proces te za pročišćavanjem produkata reakcije. Matematički modeli mogu dati dobar i brzi uvid u ovakve procese bez potrebe za provođenjem prevelikog broja eksperimenata. U ovom radu je razvijen matematički model sinteze ATP-a u kaskadnoj reakciji te su provedene simulacije pri različitim koncentracijama adenzina i magnezija. Time su dobiveni uvjeti pri kojima je moguće postići najveću koncentraciju ATP-a. Također je korištenjem razvijenog modela procijenjena osjetljivost kinetičkih parametara svake pojedinačne reakcije u ovom kaskadnom procesu. Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da parametri napredne reakcije katalizirane enzimom PPK2-I najviše utječu na ishod kaskadne reakcije.

Ključne riječi: enzimski kinetika, kaskadna reakcija, ATP, matematički model

## SUMMARY

Enzymatic cascade reactions are a promising way to synthesize substances due to the higher yield and the reduction of the need to add other components to the process and to purify the reaction products. Mathematical models can give a good and quick insight into such processes without the need to conduct too many experiments. A mathematical model of ATP synthesis in a cascade reaction was developed according to the obtained experimental data and simulations of the cascade reaction at different concentrations of adenosine and magnesium were performed. In that way conditions under which it is possible to achieve the highest concentration of ATP were estimated. Parameter sensitivity of each reaction in the cascade was estimated by simulations using the mathematical model. According to the obtained results it can be concluded that parameters in the forward reaction catalyzed by the enzyme PPK2-I have the highest effect on the outcome of the cascade reaction.

Keywords: enzyme kinetics, cascade reaction, ATP, mathematical model

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO .....	2
2.2. ENZIMI.....	5
2.2.1. Kaskadne reakcije.....	7
2.2.2. Regeneracija ATP-a.....	8
2.3. ENZIMSKA KINETIKA .....	11
2.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE.....	13
2.4.1. Metoda početnih brzina .....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	16
3.1. MATERIJALI .....	16
3.1.1. Enzimi.....	16
3.1.2. Kemikalije .....	16
3.1.3. Mjerni instrumenti i oprema .....	16
3.2. METODE .....	20
3.2.1. Priprava pufera .....	20
3.2.2. Određivanje kinetike.....	20
3.2.3. HPLC metoda .....	21
4. MATEMATIČKO MODELIRANJE.....	23
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	25
5.1. ENZIMSKA KINETIKA .....	26
5.1.1. Reakcije katalizirane enzimom ADK.....	26
5.1.2. Reakcija katalizirana enzimom PPK2-I.....	30
5.1.3. Reakcije katalizirane enzimom PPK2-II .....	35
5.1.4. Optimalno područje početnih koncentracija supstrata u kaskadi za sintezu ATP-a .....	41
5.2. ANALIZA OSJETLJIVOSTI KINETIČKIH PARAMETARA.....	42
5.2.1. Analiza osjetljivosti parametara u reakcijama kataliziranih enzimom ADK .....	42
5.2.2. Analiza osjetljivosti parametara reakcije katalizirane enzimom PPK2-I.....	46
5.2.3. Analiza osjetljivosti parametara reakcija kataliziranih enzimom PPK2-II .....	48
5.2.4. Utjecaj promjene koncentracije svakog enzima na koncentraciju ATP-a.....	52
6. ZAKLJUČAK .....	53

7. LITERATURA .....	54
8. PRILOZI .....	57
8.1. BAŽDARNI DIJAGRAMI .....	57
8.2. RAČUNALNI KOD ZA SIMULACIJU KASKADNE REAKCIJE.....	59

## 1. UVOD

Svakim danom sve više raste svijest o potrebi održivosti industrije te raste potreba za razvojem tehnologija koje bi unaprijedile proizvodnju i smanjile negativan utjecaj na okoliš. Zelena kemija se temelji na principu održivosti te predstavlja jedan od načina da se smanji upotreba opasnih kemikalija, eliminira ili smanji nastajanje otpada.<sup>1</sup>

Razvojem biotehnologije, koja je vodeća grana Zelene kemije, mogu se zadovoljiti svi postavljeni uvjeti. Napretkom u molekularnoj biologiji, biotehnologiji te proteinskim inženjerstvom mogu se sintetizirati enzimi koji će najbolje odgovarati određenom industrijskom procesu kako bi se postigla maksimalna produktivnost uz minimalno nastajanje otpada što je od velike važnosti u farmaceutskoj industriji.<sup>2,3,4</sup>

Jedan od primjera zašto su enzimski procesi važni za farmaceutsku industriju je taj što na tržištu postoji širok spektar lijekova sintetiziranih reakcijama metilacije. Prirodni metilni ciklusi su dio složene mreže različitih puteva regeneracije i transformacija te su povezani s metabolizmom adenzin-5'-trifosfata (ATP). Takvi procesi su ciklički ili kaskadni i učinkovitiji od linearnih procesa u pogledu upotrebe resursa i izbjegavanja nakupljanja nusprodukata.<sup>5</sup>

Da bi se postigla biotehnoška primjena nekog procesa, nužno je provesti kinetičku karakterizaciju enzima koji sudjeluju u procesu. Modeliranjem enzimskih reakcija dolazi se do boljeg razumijevanja utjecaja različitih varijabli na ishod reakcije, što znači da se mogu predvidjeti utjecaji promjena varijabli na proces bez potrebe da se rade eksperimenti.<sup>2,6</sup>



## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BIOTEHNOLOGIJA I ZELENA KEMIJA

Velik spektar kemikalija koje su se proizvodile u prošlosti i koje se i danas proizvode, primjerice u kemijskoj i farmaceutskoj industriji, su poboljšale kvalitetu ljudskog života. Ipak, u pojedinim granama kemijske industrije se za ubrzavanje kemijskih reakcija koriste kemijski katalizatori poput metala, metalnih oksida i metalnih hidrida. Nerijetko se kao reagensi koriste i jake kiseline. Ovakvi postupci stvaraju veliku količinu otpada koji je nerijetko i toksičan te ima potencijalno negativan utjecaj na okoliš.<sup>2,7</sup>

Jedan od načina kako unaprijediti te procese je implementacija principa Zelene kemije u razvoj tehnologije, industriju, politiku i obrazovanje. Principe zelene kemije su osmislili Paul Anastas i John Warner koji su pokušali definirati “environmentally friendly” kemijski postupak ili produkt prema konceptu sprječavanja onečišćenja i smanjenja upotrebe opasnih kemikalija. To znači upotrebu sigurnijih kemikalija, prevenciju nastajanja otpada i upotrebu katalizatora umjesto stehiometrijskih količina reagensa uz povećanje energetske učinkovitosti i smanjenje korištenja prirodnih resursa.<sup>7,8</sup>

Ujedinjeni narodi su se 2015. godine obvezali poboljšati svjetsku dobrobit provođenjem socijalne, ekološke i ekonomske održivosti uvođenjem Ciljeva održivog razvoja (tablica 2.1.). Među njima su bili osiguravanje pitke vode na globalnoj razini, odgovorna potrošnja i proizvodnja resursa te akcije protiv klimatskih promjena. Ciljevi Zelene kemije slažu se s Ciljevima održivog razvoja.<sup>9,10</sup>

Tablica 2.1. Ciljevi Zelene kemije<sup>10</sup>

1	osmisлити tehnologije koje eliminiraju otpad
2	maksimizirati ekonomiju atoma
3	sinteze bez ili s manje upotrebe opasnih kemikalija
4	sinteza produkata manje toksičnih za okoliš
5	upotreba sigurnih otapala (voda)
6	povećanje energetske učinkovitost (blagi uvjeti rada)
7	upotreba obnovljivih resursa
8	izbjegavanje upotrebe kemijskih derivata
9	upotreba katalizatora
10	dizajn kemikalija i proizvoda koji se razgrađuju nakon upotrebe
11	korištenje real-time monitoringa u svrhu sprječavanja onečišćenja
12	smanjiti vjerojatnost nezgode

Za postizanje postavljenih ciljeva (tablica 2.1.) predloženo je uvođenje međuresorne suradnje u svrhu čistije proizvodnje, sustava upravljanja kemikalijama, obrazovnih programa koji se uklapaju u principe Zelene kemije, poslovnih modela i pametne tehnologije. Također, u svrhu postizanja ovih ciljeva, potiču se razna akademska istraživanja.<sup>7,9</sup>

Pojam biotehnologije je prvi osmislio inženjer agrikulturne i ekonomije Karl Erkey iz Mađarske. Erkey je definirao biotehnologiju kao „sve procese kojima se od početnih sirovina uz pomoć živih organizama proizvodi traženi produkt.”<sup>11</sup> Predloženo je da biotehnologija bude podijeljena na četiri sektora označena bojama. Bijeli, crveni, zeleni i plavi sektor predstavljaju redom industrijski sektor, farmaceutski/medicinski sektor, agrikulturu i zaštitu okoliša. Neki od industrijskih biotehnoških procesa se koriste svakodnevno, primjerice dobivanje limunske kiseline fermentacijom pomoću gljive *Aspergillus niger* ili proizvodnja ulja pomoću *Yarrowia lipolytica* te zaslađivača iz biljaka *Stevia rebaudiana* i *Siraitia grosvenorii*.<sup>11</sup> Isto tako, većina industrija poput kožne, prehrambene, tekstilne, farmaceutske, dijelom ovisi o enzimskim procesima u kojima se koriste proteaze. U zaštiti okoliša, jedan od razloga korištenja biotehnologije je uklanjanje onečišćenja uljem, uklanjanje teških metala i pesticida.<sup>3,12</sup>

Biotehnologija je danas jedna od najznačajnijih grana industrije. Razvoj tehnologije rekombinantne DNA, potreba za obnovljivim izvorima i pojam održivosti za buduće kemijske procese bili su glavni pokretači u primjeni industrijske biotehnologije. Tehnologijom rekombinantne DNA omogućeno je mapiranje, umetanje ili izbacivanje pojedinih gena, manipulacija proteinima u cilju dobivanja proteina s potpuno drugačijim svojstvima te njihova masovna proizvodnja. Takvi su proizvodi postali jeftiniji i dostupniji. Isto tako, omogućen je i razvoj genetski modificiranih organizama u proizvodne ili prehrambene svrhe.<sup>14,15</sup> Rade se i

istraživanja koja imaju cilj u skoroj budućnosti zamijeniti kemijske procese biotehnoškima. Jedan od primjera je sinteza arome L-mentola fermentacijom pomoću genetski modificirane *Escherichia coli*. No, količina arome dobivene na taj način nije ekonomski opravdana, stoga je potrebno još vremena za pronalaženje procesa koji bi zamijenio postojeći kemijski.<sup>14</sup>

Prednosti biotehnoških u odnosu na kemijske procese su blagi operacijski uvjeti pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi, što dovodi do nižih operativnih troškova. Reakcije se najčešće odvijaju u vodi kao otapalu, tako da nema potrebe za agresivnim otapalima. Selektivnost je jedna od velikih prednosti enzimskih reakcija jer nastaju produkti određene strukture, a ne racemične smjese, te je moguće biotehnoške procesi integrirati s drugim bioprocima. To sve dovodi do smanjenja energetske potrošnje u procesu i generiranja manje otpada, a enzimi su sami po sebi biorazgrađivi. Enzime treba prilagoditi industrijskim zahtjevima, što se postiže usmjerenom (*in vitro*) evolucijom ili proteinskim inženjerstvom.<sup>18,15</sup> Kako bi se odredila ekonomska isplativost ovakvih procesa, potrebno je poznavati iskorištenje na produktu, produktivnost, konačnu koncentraciju produkta te uloženu energiju u proces.<sup>14</sup>

Izolacija produkta nakon reakcije, bila ona fermentacija ili enzimska reakcija, je često komplicirana i skupa. Za komercijalne potrebe od 100 g dm<sup>-3</sup> koncentracije produkta, potrebno je oko 300 do 400 g dm<sup>-3</sup> kemikalija za izolaciju. Iako neke optimizacije biokatalizatora mogu pomoći, poput imobilizacije enzima, niska koncentracija produkta na kraju procesa je često rezultat inhibicijskih ili toksičnih učinaka supstrata, produkta ili nusprodukta.<sup>14,16,17</sup>

Cikličkim procesima s više enzima, takozvanim bioprocima nove generacije, se ostvaruje regeneracija kofaktora te mogućnost lakše izolacije produkta što dovodi do nižih operativnih troškova. Još uvijek su takvi procesi u začecima jer se dobivaju niže koncentracije produkta u usporedbi s konvencionalnim kemijskim procesima. Kako bi se ciklički procesi razumjeli i na kraju upotrijebili, potrebno ih je prvo objasniti matematičkim modelima.<sup>14</sup>

## 2.2. ENZIMI

Prema načelima zelene kemije i održivog razvoja u proizvodnju su uvedeni biokatalizatori ili enzimi. Enzimi su biološki katalizatori koji ubrzavaju kemijske reakcije u živim organizmima. Riječ "enzim" je prvi upotrijebio njemački fiziolog Wilhelm Kühne 1878. godine kada je opisivao sposobnost kvasca da proizvede alkohol metabolizmom šećera. Riječ "enzim" potječe iz grčke riječi "en" (unutar) i "zume" (kvasac).<sup>18</sup>

Enzimi su većinom kompleksni proteini od 100 do više od 2000 povezanih aminokiselina, kompleksne trodimenzionalne strukture. Djeluju prema principu brava-ključ, što znači da o strukturi aktivnog mjesta na enzimu ovisi koji će se supstrat vezati tj. koja će se reakcija katalizirati. Ostali dio enzima služi za stabilizaciju aktivnog mjesta i osigurava okolinu za interakciju supstrata i aktivnog mjesta. Otkriveno je da i neke RNA molekule mogu katalizirati određene reakcije i takvi enzimi se nazivaju ribozimi. U enzimskim reakcija osim enzima često sudjeluju i kofaktori i koenzimi. Kofaktori su metalni ioni koji čine neproteinski dijelovi enzima dok su koenzimi organske molekule. Uloga kofaktora i koenzima je stabilizacija enzima u cilju provođenja kemijske reakcije, a u njihovom odsutstvu postoji mogućnost da do reakcije ne dođe.<sup>18</sup>

Enzimi su potrebni u vrlo malim koncentracijama te oni ubrzavaju reakcije, izlaze iz reakcije nepromijenjeni i djeluju na način da snižavaju energiju aktivacije i ubrzavaju postizanje kemijske ravnoteže. Enzimске reakcije u živim stanicama su dio metaboličkog puta i nikad ne postižu ravnotežu jer bi to značilo prestanak reakcije, a time i prestanak protoka tvari kroz metabolički put.<sup>18</sup>

Enzimi su prisutni u svim živim stanicama, uključujući životinjske i biljne te se mogu iz njih izolirati, ali se ipak najčešće izoliraju iz stanica mikroorganizama. Razlog tome je puno brži rast stanica mikroorganizama u odnosu na životinjske ili biljne te je postupak izolacije jednostavniji. Mikrobni enzimi su stabilniji, a mikroorganizmi se mogu jednostavnije genetski modificirati u donosu na životinjske ili biljne stanice.<sup>18,19</sup>

Enzimi mogu biti unutarstanični i izvanstanični. Izvanstanične enzime izlučuje sama stanica te se takvi enzimi najčešće koriste u procesima fermentacije. Unutarstanične enzime je potrebno izolirati iz stanice kako bi se oni upotrijebili u procesu.<sup>18</sup> Izolirani enzimi se mogu koristiti pročišćeni ili nepročišćeni. Prednost izoliranih enzima pred cijelim stanicama je veća koncentracija produkta nakon reakcije i jednostavniji proces pročišćavanja produkata. Nepročišćeni enzimi dobivaju se razbijanjem stanice ili sekrecijom istog iz stanice i ne prolaze kroz postupak pročišćavanja, čime se smanjuju troškovi proizvodnje. No, ako se u takvim

smjesama nalaze proteaze koje deaktiviraju enzim, takav enzim se mora pročistiti. Neke industrije, primjerice prehrambena industrija za proizvodnja sira tradicionalno koriste nepročišćene enzime, dok farmaceutska koristi pročišćene enzime upravo zbog dobivanja produkta točno određene strukture.<sup>18,20</sup>

Danas se enzimi koriste u četiri različita industrijska područja: kao biokatalizatori, terapijska sredstva, analitički reagensi i sredstva za manipulaciju (primjerice u genetici).<sup>19</sup> Globalnim tržištem enzima trenutno dominiraju hidrolaze, posebno proteaze, te amilaze, celulaze i lipaze.<sup>18,21</sup> Globalnom proizvodnjom dominiraju dvije tvrtke koje zauzimaju više od dvije trećine globalnog tržišta enzima, a to su danska tvrtka Novozymes, s tržišnim udjelom od 47 % i američka tvrtka DuPont s 21 % tržišnog udjela.<sup>18</sup>

Enzimi se proizvode u količinama od  $\mu\text{g}$  do tona godišnje, ovisno o primjeni, a pripremaju se u obliku koncentriranih otopina, prahova ili granula.<sup>18</sup>

Enzimi su podložni deaktivaciji ako temperatura ili pH prekorače granice optimuma, a isto tako su podložni inhibiciji supstratom i/ili produktom. Također najčešće rade pri optimalnom pH 7, dok izrazito kiseli ili lužnati uvjeti mogu uzrokovati ireverzibilne promjene na strukturi enzima i inaktivirati enzim. Što se tiče temperature, granica optimuma ovisi o samom enzimu. Viša temperatura ubrzava postizanje ravnoteže, ali prekoračenje granice optimuma također može dovesti do inaktivacije.<sup>18</sup> Zbog svih ovih razloga važno je eksperimentalno ispitati stabilnost enzima.

Danas cijena proizvodnje enzima opada što otvara nove mogućnosti njihovog korištenja u industriji. No, postoje i drugi izazovi kao što su hlapljivost reaktanata i produkata, njihova niska topljivost u vodi i nepovoljna termodinamika procesa. Za rješavanje svih izazova modificirani enzimi sami po sebi nisu dovoljni te se stoga rješenja za ovakve izazove mora pronaći i u procesnom inženjerstvu.<sup>22</sup>

### 2.2.1. Kaskadne reakcije

Enzimske kaskadne reakcije čini nekoliko reakcija povezanih u jedan biokatalitički put, pritom koristeći nekoliko enzima. U prirodi su kaskadne reakcije dio metaboličkih puteva u živim stanicama. U svrhu industrijske proizvodnje, kaskadne reakcije se mogu odvijati *in vivo* i *in vitro*. Reakcije *in vivo* se odvijaju unutar živih stanica, te se na taj način izbjegava dodavanje skupih kofaktora. No, neki nusprodukti reakcije mogu biti toksični za samu stanicu ili je u takvim procesima izolacija produkta zahtjevna, stoga se često mora pristupiti inženjerstvu metaboličkih puteva. *In vitro* kaskadne reakcije se odvijaju pomoću enzima izoliranih iz stanica i suspendiranih u reakcijskoj smjesi ili imobiliziranih na nosač. Na ovaj način se mogu optimirati koncentracije enzima i izbjeći inhibicija produktom. *In vitro* kaskadne reakcije se mogu konfigurirati tako da se cijeli proces odvija u jednom reaktoru (tzv. one-pot više enzimske reakcije), kako bi se smanjio broj postupaka obrade i pročišćavanja. *In vitro* kaskade se mogu podijeliti na 5 tipova: linearne, cikličke, ortogonalne, paralelne i kombinirane kaskade (tablica 2.2.).<sup>23</sup>

Tablica 2.2. Tipovi *in vitro* kaskada<sup>23</sup>

Tip kaskade	Opis
<b>linearne kaskade</b>	Najjednostavnije, produkt nastaje iz jednog ili više intermedijera koji nastaju iz supstrata.
<b>cikličke kaskade</b>	Više supstrata je transformirano u intermedijer koji se konvertira u produkt, a djelomično natrag u supstrat. Ravnoteža se pomiče prema jednom od početnih susptrata.
<b>ortogonalne kaskade</b>	Nastajanje produkta je povezano s koracima regeneracije kofaktora ili kosupstrata, te se oni uklanjaju iz reakcije, a ravnoteža se pomiče prema produktu.
<b>paralelne kaskade</b>	Dvije različite enzimske reakcije povezane su putem regeneracije kofaktora ili kosupstrata.
<b>kombinirane kaskade</b>	Dva različita tipa kaskada se mogu kombinirati tako da tvore potpunu novu kaskadu, primjerice kombinacija linearne i ortogonalne kaskade.

Prednost kaskada prema linearnim procesima su veća iskorištenja procesa. Također, izbjegava se nastajanje i kasnije izdvajanje nusprodukata iz reakcijske smjese čime se smanjuje cijena pročišćavanja i zbrinjavanja otpada nakon procesa. U takvim procesima se ravnoteža pomiče u smjeru nastajanja produkata što je važno kod procesa s nestabilnim međuproduktima. Kod ovakvih kompleksnih procesa vrlo je važno poznavati njihovu kinetiku kako bi ih bilo moguće optimirati.<sup>29</sup>

### 2.2.2. Regeneracija ATP-a

Reakcije metilacije su od velike važnosti za farmaceutsku industriju zbog mogućnosti sinteze velikog broja lijekova. Standardna sredstva za metilaciju, poput metil jodida, su toksična i kancerogena, te stoga postoji potreba za razvojem ekološki prihvatljivim metodama provođenja takvih reakcija.<sup>5</sup>

S-Adenosilmetionin (SAM) je jedan od najrasprostranjenijih kofaktora u prirodi koji igra ulogu u mnogim sintezama poput biosinteza prirodnih složenih kofaktora, modifikacijama nukleotida. U farmaciji se koristi u sintezi lijekova za liječenje karcinoma i u epigenetici. Brojne metilacije koriste SAM kao kofaktor koji služi kao donor radikala. S obzirom da postoji potražnja za selektivno metiliranim farmaceutskim proizvodima, jasno je da su reakcije ovisne o SAM kofaktoru selektivne alkilacije vrlo obećavajući alati za ekološki prihvatljivu sintezu bioaktivnih spojeva. Međutim, nestabilnost SAM-a te inhibicijsko djelovanje nusprodukta S-adenozilhomocisteina (SAH) onemogućavali su razvoj tih procesa na industrijskoj razini. Stoga je potrebno osmisliti sustav regeneracije kofaktora za enzime koji ovise o SAM-u. Mehanizam sinteze SAM kofaktora je kaskadne prirode i ovisi o ciklusu adenzin trifosfata (ATP-a).<sup>5</sup> ATP je mala organska molekula sastavljena od riboze i adenina i tri fosfatne grupe. Prekidanjem veza između fosfatnih grupa oslobađa se energija koja je temelj metabolizma same stanice i služi kao izvor energije za daljne procese u stanici među kojima su sinteza nukleinskih kiselina i proteina i samo održavanje stanice. Kao posljedica prekidanja veza između fosfatnih grupa, nastaju redom derivati adenzin difosfat (ADP), adenzin monofosfat (AMP) i adenzin.<sup>24</sup> ATP je stabilan u vodenim otapalima, tako da ne gubi fosfatnu skupinu ukoliko ne sudjeluje u enzimskim reakcijama, što ga čini dobrim izvorom energije u staničnom metabolizmu.<sup>24</sup>

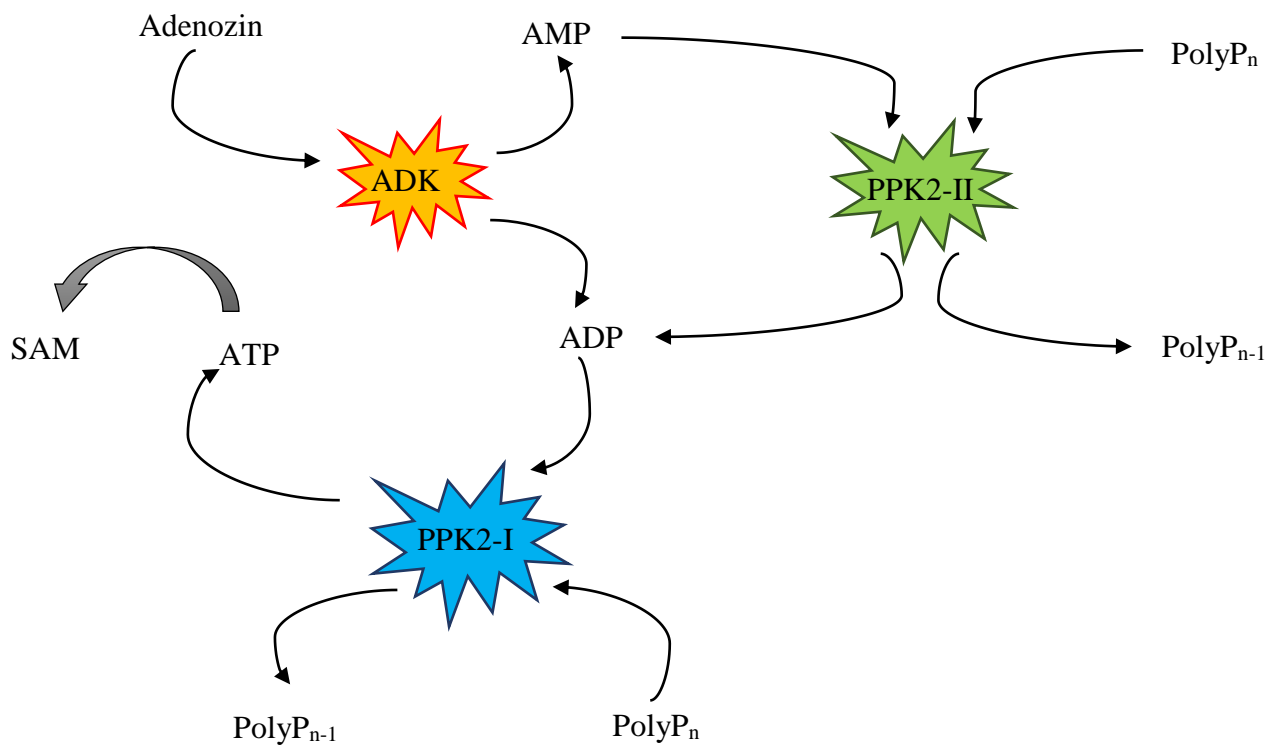
Ciklus ATP-a može biti kataliziran brojnim enzimima među kojima su i kinaze, koje imaju posebno mjesto u svojoj strukturi za vezanje ovakvih molekula. Među njih spadaju

polifosfatne kinaze (PPK grupa) koje sudjeluju u metabolizmu polifosfata u ATP ciklusu kao osnovnog izvora energije. Dije se u dvije skupine; PPK1 skupinu koji kataliziraju reverzibilne polimerizacije krajnje fosfatne skupine ATP-a u polifosfatni lanac, te PPK2 koja ima ulogu u sintezi ATP-a pomoću polifosfata. Mnogo sustava za regeneraciju ATP-a koristi kinaze za transport fosfatne grupe, a jedan od razloga je niska cijena polifosfata. U ovim enzimskim reakcijama je prisutan magnezij kao kofaktor.<sup>25,26</sup>

Fosforilacija adenzina za dobivanje ATP se provodi primarnim metabolizmom stanice i katalizirana je velikim brojem enzima. No, većinu tih enzima nije moguće koristiti u *in vitro* sintezama jer su vezani za staničnu stijenku ili zahtijevaju kompleksne i skupe kofaktore. Dosad je opisano mnogo regeneracijskih sustava ATP-a koji polaze od ADP-a, a samo nekoliko sustava koji počinju od AMP-a ili adenzina. Enzimi iz skupine kinaza PPK2 su prikladni za takve reakcije jer ih mogu katalizirati *in vitro* pomoću polifosfata koji je kao kemikalija prisutan u velikim količinama i stabilan u vodenoj otopini. Neki PPK2 enzimi mogu fosforilirati AMP i ADP, no inicijalnu fosforilaciju adenzina započinje isključivo enzim ADK koji koristi ATP kao donor fosfata. U daljnim reakcijama ATP se regenerira pomoću skupine PPK2 enzima.<sup>5</sup>

U ovom radu je opisan kaskadni sustav regeneracije ATP-a koji je dio kaskade SAM ciklusa za proizvodnju S-ribosil-L-homocisteina.<sup>5,29</sup>





Slika 2.1. Shematski prikaz regeneracije ATP-a.<sup>5</sup>

### 2.3. ENZIMSKA KINETIKA

Enzimski kinetika je proučavanje faktora koji utječu na reakciju kako bi se utvrdila brzina kemijske reakcije. U tu svrhu koriste se matematički modeli. Matematičko modeliranje vrlo je korisno za razvijanje procesa. Korištenjem razvijenog modela moguća je optimizacija procesa u laboratorijskom mjerilu. Modelima se pronalazi najekonomičniji proces, izbjegava se nastajanje nepoželjnih nusprodukata i inhibitora što dovodi do snižavanja troškova eksperimenata. Cilj enzimskog reakcijskog modeliranja je dobivanje kinetičkog modela koji opisuje vezu između brzine enzimske reakcije i veličine stanja reakcijskog sustava kao što su koncentracija, pH i temperatura. Za opisivanje enzimskih reakcija najčešće se koristi Michaelis-Menteničina kinetika (jednadžba 1).<sup>18,27</sup>

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s} \quad (1)$$

U prethodnoj jednadžbi  $V_m$  je maksimalna brzina enzimske reakcije nakon što se enzim zasiti supstratom, tj. maksimalna moguća brzina reakcije.  $K_m$  je Michaelisova konstanta koja predstavlja onu koncentraciju supstrata pri kojoj se postiže brzina reakcije koja iznosi polovicu maksimalne vrijednosti  $V_m$ .  $K_m$  predstavlja afinitet enzima prema supstratu. Mala vrijednost  $K_m$  znači veliki afinitet enzima prema supstratu, dok mala vrijednost  $K_m$  predstavlja mali afinitet enzima prema supstratu. Varijabla  $c_s$  predstavlja koncentraciju supstrata.<sup>19</sup> Za opisivanje aktivnosti enzima koristi se jedinica enzimske aktivnosti (*engl.* unit of catalytic activity) koja se označava s U. Ta vrijednost označava količinu enzima potrebnu za konverziju 1  $\mu$ mol supstrata u produkt u 1 minuti pri standardnim uvjetima.<sup>27</sup>

Često se u enzimskim reakcijama nalaze komponente koje se ponašaju kao inhibitori, tvari koje usporavaju ili sprječavaju reakciju.<sup>28</sup> Postoji pet vrsta inhibicija. Inhibicija produktom se događa kada se produkt veže na aktivno mjesto enzima. Kompetitivna inhibicija je prisutna kada se substrat i inhibitor natječu za isto mjesto na enzimu. Nekompetitivna inhibicija se događa kada inhibitor ima utjecaj na enzim, ali ne utječe na vezanje supstrata. Takvu inhibiciju najčešće uzrokuju metalni ioni, anioni i protoni. Ukoliko dolazi do vezanja inhibitora na kompleks enzim-supstrat, a ne za enzim, takva inhibicija se naziva antikompetitivna inhibicija. Inhibicija supstratom nastaje kada se druga molekula supstrata veže na kompleks enzim-supstrat i na taj način inhibira reakciju.<sup>28</sup>

Zbog mogućnosti prisustva inhibicija u sustavu, važno dobro ispitati reakciju što se postiže eksperimentalnim istraživanjima i ukomponirati ih u model. Tako se dobiju Michaelis-Menteničini modeli koji opisuju enzimsku reakciju, a u sebi mogu uključivati i inhibicije u enzimskoj reakciji. U tablici 2.3. su dani Michaelis-Menteničini modeli bez inhibicija i s različitim tipovima inhibicija.<sup>27,28</sup>

Tablica 2.3. Primjeri Michaelis-Menteničinih modela bez inhibicija i s inhibicijama<sup>28</sup>

Naziv modela	Model	Parametri modela
<b>Michaelis-Menteničina kinetika</b>	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_{m,S} + c_S}$	$V_m$ $K_{m,S}$
<b>Michaelis-Menteničina dvosupstratna kinetika</b>	$r_S = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_{m,S1} + c_{S1}) \cdot (K_{m,S2} + c_{S2})}$	$V_m$ $K_{m,S1}$ $K_{m,S2}$
<b>Kompetitivna inhibicija</b>	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_{m,S} \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right) + c_S}$	$V_m$ $K_{m,S}$ $K_{i,P}$
<b>Antikompetitivna inhibicija</b>	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_{m,S} + c_S \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right)}$	$V_m$ $K_{m,S}$ $K_{i,P}$
<b>Nekompetitivna inhibicija</b>	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{(K_{m,S} + c_S) \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right)}$	$V_m$ $K_{m,S}$ $K_{i,P}$
<b>Inhibicija supstratom</b>	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{\left(K_{m,S} + c_S + \frac{c_S^2}{K_{i,S}}\right)}$	$V_m$ $K_{m,S}$ $K_{i,S}$

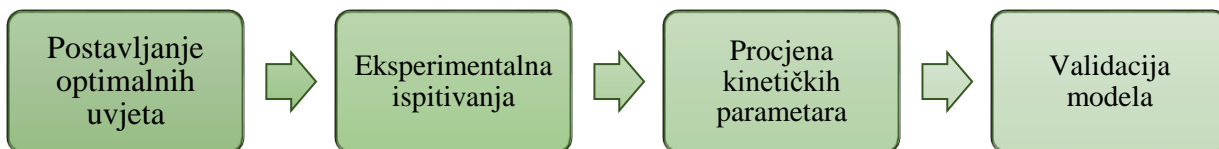
$V_m$  – maksimalna reakcijska brzina,  $K_m$  – Michaelisova konstanta,  $K_i$  – konstanta inhibicije, S – supstrat, P – inhibitor  $c$  – koncentracija,  $r_s$  – reakcijska brzina

## 2.4. MATEMATIČKO MODELIRANJE

Matematičko modeliranje omogućuje brži scale up i brži razvoj nekog procesa. Time se štedi na vremenu i novcu, što je pogotovo važno za farmaceutsku industriju. Postoje četiri polja modeliranja: biokatalitičko modeliranje koje opisuje katalizator na molekularnoj razini, kinetičko modeliranje koje se bazira na ispitivanju reakcijske kinetike i rezultata dobivenih eksperimentima i simulacijama, reaktorsko modeliranje koje povezuje kinetičke modele s reaktorskim masenim bilancama te hidrodinamikom, i na kraju procesno modeliranje čiji modeli opisuju odnos između dviju različitih jedinica u nekom procesu.<sup>29,30</sup>

Postupak modeliranja je proces koji zahtjeva određeni broj koraka. Shematski prikaz izrade modela za enzimsku reakciju je prikazan na slici 2.2. Prvo je potrebno eksperimentalno odrediti optimalan pH i temperaturu. Zatim se kreće u eksperimentalna ispitivanja gdje je cilj dobiti što više podataka kako bi se opisala kinetika. Takva se ispitivanja najčešće rade metodom početnih brzina koja je opisana u sljedećem poglavlju. Postoje i druge metode mjerenja poput diskontinuirane metode gdje se pomiješaju supstrat i enzim te se mjeri koncentracija produkta nakon određenog vremena. Isto tako postoje i kontinuirane metode mjerenja kada se pomiješa enzim i supstrat te se mjeri nastajanje produkta ili nestajanje supstrata kontinuirano kroz vrijeme. Na temelju eksperimentalnih podataka može se odabrati kinetički model (tablica 2.3.) za koji se smatra da najbolje opisuje eksperimentalne podatke te nakon toga slijedi procjena kinetičkih parametara. Parametri se procjenjuju nelinearnom regresijom, a za tu svrhu se koriste različiti računalni programi. Nakon što su parametri procesa procijenjeni, nužno je ispitati njihovu osjetljivost, odnosno njihov utjecaj na proces. To se radi na način da se mijenja vrijednost pojedinog parametra te se prati kolika su odstupanja modela. Ukoliko su odstupanja modela velika, može se zaključiti da parametar značajno utječe na proces.<sup>30</sup>

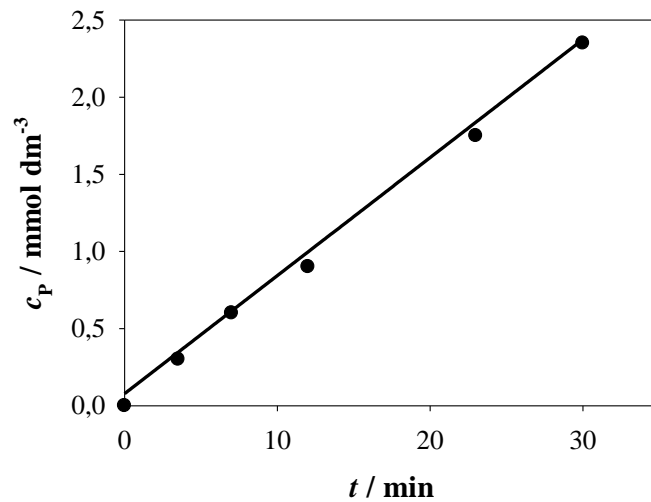
Nakon što je model reakcije razvijen, potrebno ga je validirati.<sup>30</sup> U svrhu validacije modela, eksperimentalni podaci se uspoređuju s računalnim simulacijama pri identičnim uvjetima. Simulacije i eksperimentalne vrijednosti se moraju slagati s određenom točnošću. Nakon što je model validiran, može se dalje koristiti za optimiranje reakcije, za izbor najboljeg tipa reaktora, procjenu produktivnosti, potrošnju enzima i koenzima, i tako dalje.<sup>30</sup>



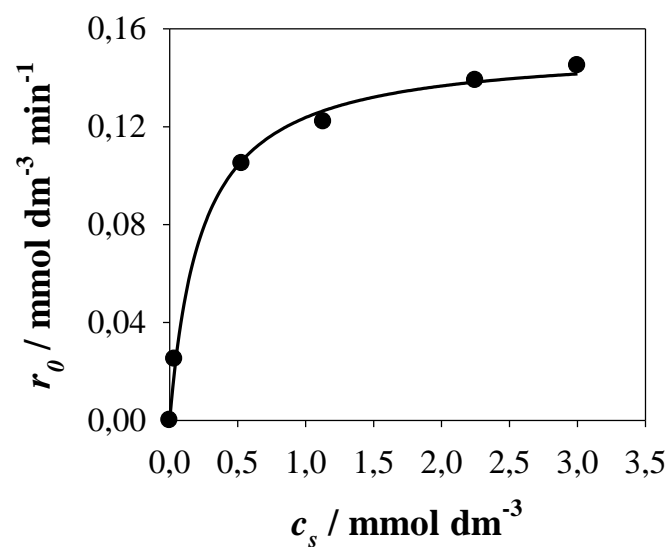
Slika 2.2. Pojednostavljeni prikaz razvoja kinetičkog modela<sup>30</sup>

#### 2.4.1. Metoda početnih brzina

Metoda početnih brzina je eksperimentalna metoda pomoću koje se mjeri brzina kemijske reakcije pri malim promjenama koncentracije, tj. kada je konverzija supstrata manja od 10%. Tada se može zanemariti utjecaj nastalog produkta i eventualne povratne reakcije.<sup>31,32</sup> Također, zanemaruje se i utjecaj ionskih interakcija na reakciju i promjene pH u reakciji, a te utjecaje nije jednostavno opisati pomoću reakcijske stehiometrije.<sup>32</sup> Drugim riječima, ono što se mjeri je samo brzina napredne reakcije. Postupak se svodi na provođenje niza eksperimenata pri različitim početnim koncentracijama supstrata, dok se koncentracije ostalih komponenata reakcijskog sustava i uvjeti u kojima se provodi eksperiment, drže konstantnima. Primjer rezultata jednog eksperimenta prikazan je na slici 2.4. Bez obzira mjeri li se promjena koncentracije supstrata ili nastalog produkta potrebno je povući pravac kroz dobivene podatke, a iz nagiba tog pravca računa se početna brzina reakcije pri ispitivanoj koncentraciji. Provođenjem eksperimenata pri drugim koncentracijama dobije se početna reakcijska brzina pri ispitivanim koncentracijama te se omogućuje konstruiranje grafa koji pokazuje ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji ispitivane komponente (slika 2.5.). Dobiveni eksperimentalni podaci se opisuju odgovarajućim kinetičkim modelom koji služi za procjenu kinetičkih parametara.<sup>31,32</sup>



Slika 2.4. Primjer eksperimentalnih podataka promjene koncentracije produkta vremenu dobivenih metodom početnih brzina.



Slika 2.5. Primjer ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentraciji supstrata.

Metoda početnih brzina je pogodna metoda za određivanje brzine složenih katalitičkih i biokatalitičkih reakcija, a nedostatak joj je što zahtijeva veliku točnost mjerenja koncentracije reaktanta ili produkta.<sup>31</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Enzimi

U reakcijama su korišteni sljedeći enzimi: PPK2-I izoliran iz bakterije *Sinorhizobium meliloti*, PPK2-II izoliran iz bakterije *Acinetobacter johnsonii* i adenzin kinaza (ADK) izolirana iz kvasca *Saccharomyces cerevisiae*. Svi enzimi su izolirani u Institutu farmaceutskih znanosti na Albert-Ludwigs sveučilištu u Freiburgu, Njemačka.

##### 3.1.2. Kemikalije

Za izradu pufera za eluent i reakciju korišteni su  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  proizvođača Lach–Ner d.o.o., Češka i  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  proizvođača Merck, Njemačka. U reakciji je korišten  $\text{MgCl}_2$  kao kofaktor i polifosfat proizvođača Acros Organics, SAD. Korišteni su adenzin, adenzin monofosfat, adenzin difosfat i adenzin trifosfat proizvođača Sigma Aldrich, Kina. Ultračista voda je korištena kao sredstvo za pripremu uzoraka za baždarne dijagrame i razrjeđivanje uzoraka iz reakcija.

##### 3.1.3. Mjerni instrumenti i oprema

U radu je za homogeniziranje uzoraka korišten homogenizator Vibromix 10 tvrtke Domel d.o.o., Slovenija (slika 3.1.). Reakcije su provedene na električnoj tresilici ThermoMixer C tvrtke Eppendorf, Njemačka (slika 3.2.). Za centrifugiranje uzoraka je korištena centrifuga Universal 320 R tvrtke Hettich, Njemačka (slika 3.3.). Za vaganje komponenata reakcija i enzima je korištena analitička vaga na četiri decimale AU W120 Shimadzu, Japan (slika 3.4.) i vaga na dvije decimale EW 1500–2M Kern & Sohn GmbH, Njemačka. Za mjerenje pH vrijednosti korištena je elektroda BlueLine 16 pH SI Analytics, Njemačka, a za miješanje pufera je korištena magnetska mješalica Rotamix S–10 Domel d.o.o., Slovenija (slika 3.5.). Za pripremu ultračiste vode korišten je uređaj NIRO–VV–UV–UF

Nirosta d.o.o., (slika 3.6.). U svrhu određivanja konponenta reakcija korišten je Shimadzu HPLC uređaj, Japan (slika 3.7.).



Slika 3.1. Homogenizator Vibromix 10.

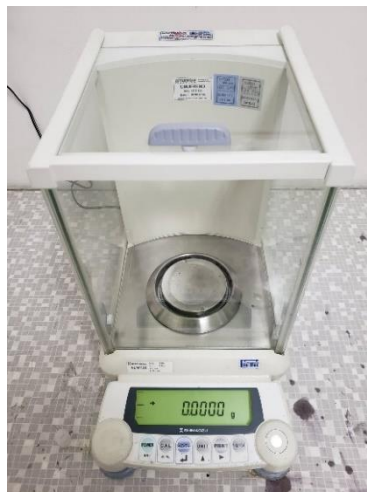


Slika 3.2. Električna tresilica ThermoMixer C.





Slika 3.3. Centrifuga Universal 320 R.



Slika 3.4. Analitička vaga na četiri decimale AU W120 Shimadzu.



Slika 3.5. pH elektroda BlueLine 16 SI Analytics i magnetska mješalica Rotamix S-10  
Domel d.o.o.



Slika 3.6. Uređaj NIRO-VV-UV-UF Nirosta d.o.o.



Slika 3.7. HPLC uređaj.

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Priprava pufera

#### 3.2.1.1. Pufer za eluent

Pripremljena je  $60 \text{ mmol dm}^{-3}$  otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i  $40 \text{ mmol dm}^{-3}$  otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  u ultračistoj vodi. Zatim su te dvije otopine pomiješane do postizanja pH 7,0. Pripremljeni pufer je korišten kao eluent za HPLC.

#### 3.2.1.2. Pufer za reakciju

Pripremljena je  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  otopina  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  otopina  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  u ultračistoj vodi. Zatim su te dvije otopine pomiješane do postizanja pH 7,5. Tako pripremljeni pufer je korišten za provedbu reakcija u svrhu kinetičke karakterizacije enzima.

### 3.2.2. Određivanje kinetike

Svrha eksperimenata je bila odrediti utjecaj određene komponente na početnu brzinu reakcije, varirajući koncentraciju jedne komponente dok su koncentracije ostalih komponenata

držane konstantnima. Napravljene su temeljne otopine pojedinih komponenti u puferu koje su korištene za pripremu odgovarajućih koncentracija komponenata u reaktoru. Prije pokretanja reakcije, odnosno prije dodatka enzima u reaktoru, uzet je nulti uzorak iz reakcijske smjese. Eksperimenti određivanja kinetike su provedeni u kotlastom reaktoru, tj. plastičnim kivetama od 2 mL. Reaktori su miješani na električnoj tresilici pri 1000 okretaja u minuti i pri temperaturi od 37 °C. Reakcije su provedene u 50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu pH 7,5. U određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci od 10 µL koji su razrijeđeni u 190 µL ultračiste vode, promiješani na homogenizatoru i prebačeni u Amicon kivete s filtrom Merck Milipore, SAD zbog uklanjanja enzima iz uzoraka prije analize na HPLC-u. Nakon toga su uzorci centrifugirani 5 minuta na 14000 okretaja u minuti pri temperaturi od 4 °C te su prebačeni u viala za analizu na HPLC.

### 3.2.3. HPLC metoda

U ovom radu je za analizu uzoraka primjenjivana tekućinska kromatografija visokog učinka. Proces separacije započinje injektiranjem uzorka u mobilnu fazu koja se pritom pod visokim tlakom kreće kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom. Na učinkovitost separacije prvenstveno utječe brzina protoka mobilne faze kroz kolonu, te primjena odgovarajuće stacionarne i mobilne faze. Korišteni su eluent A (organski) i eluent B (vodeni). Eluent A čini čisti acetonitril, a eluent B otopina 60 mmol dm<sup>-3</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> i 40 mmol dm<sup>-3</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> u ultračistoj vodi pH 7,0. Primijenjena je gradijentna metoda analize u trajanju od 9 minuta pri čemu se udio eluenta B smanjuje od 100 do 65% prvih 7 minuta, nakon čega slijedi vraćanje udjela eluenta B na početnu vrijednost od 100%. Analize su provedene pri temperaturi od 25 °C i protoku mobilne faze od 1,2 mL/min, na UV detektoru pri valnoj duljini 254 nm. Svi su uzorci analizirani na koloni Lichrospher 100 RP-18 kolona, proizvođača Dr. Maisch, veličine čestica 5 µm te dimenzija 250 x 4 mm. Retencijsko vrijeme za adenzin iznosilo je 6,6 min, za AMP 4,92 min, za ADP 4,24 min, a za ATP 3,5 min. Baždarni pravci za adenzin, AMP, ADP i ATP nalaze se redom u priložima 8.1.1., 8.1.2., 8.1.3., 8.1.4.

### 3.2.3.1. Izrada baždarnih dijagrama

Baždarni dijagrami su bili potrebni kako bi se mogla odrediti nepoznata koncentracija supstrata i produkta, poznavajući linearnu ovisnost između njihove koncentracije i analitičkog odgovora. Odvagane su određene mase adenzina, AMP-a, ADP-a i ATP na analitičkoj vagi (4 decimalne) te su pripremljene 6 mmol dm<sup>-3</sup> otopine u ultračistoj vodi. Otopine su profiltrirane na Amicon filterima i centrifugirane 5 minuta na 14000 okretaja u minuti pri temperaturi od 4 °C te su za svaku otopinu napravljena razrijeđenja od 5, 8, 10, 20, 50 i 100 puta. Svaki od tih uzoraka je analiziran na HPLC-u.

#### 4. MATEMATIČKO MODELIRANJE

Prema trendu kretanja eksperimentalnih podataka dobivenih mjerenjem ovisnosti specifične aktivnosti enzima u reakciji o koncentraciji komponenata reakcije, predloženi su sljedeći modeli za reakciju kataliziranu enzimom ADK (jednadžbe 2 i 3), reakciju kataliziranu enzimom PPK2-I (jednadžba 4) i reakciju kataliziranu enzimom PPK2-II (jednadžbe 5 i 6). Napredna reakcija katalizirana enzimom ADK opisana je jednadžbom 2. U reakciji su prisutne kompetitivna inhibicija s produktima AMP-om i ADP-om te antikompetitivna inhibicija s polifosfatom. Jednadžba 3 prikazuje trosupstratnu kinetiku bez inhibicija koja opisuje povratnu reakciju kataliziranu enzimom ADK. Jednadžbom 4 je opisana napredna reakcija katalizirana enzimom PPK2-I. U ovoj su reakciji prisutne inhibicija supstratom polifosfatom te kompetitivna inhibicija AMP-om i adenozinom. Napredna reakcija katalizirana enzimom PPK2-II je opisana jednadžbom 5 u kojoj su prisutne inhibicija supstratom polifosfatom, te kompetitivne inhibicije ATP-om i adenozinom. Na kraju, jednadžbom 6 je opisana povratna reakcija katalizirana enzimom PPK2-II koja predstavlja dvosupstratnu kinetiku bez inhibicija.

$$r_1 = \frac{V_m \cdot \gamma_{ADK} \cdot c_{ATP} \cdot c_{adenozin} \cdot c_{Mg^{2+}}}{\left( K_m^{ATP} \cdot \left( 1 + \frac{c_{AMP}}{K_i^{AMP}} + \frac{c_{ADP}}{K_i^{ADP}} \right) + c_{ATP} \cdot \left( 1 + \frac{c_{PolyP}}{K_i^{PolyP}} \right) \right) \cdot \left( K_m^{adenozin} + c_{adenozin} \right) \cdot \left( K_m^{Mg^{2+}} + c_{Mg^{2+}} \right)} \quad (2)$$

$$r_2 = \frac{V_m \cdot \gamma_{ADK} \cdot c_{AMP} \cdot c_{ADP} \cdot c_{Mg^{2+}}}{\left( K_m^{AMP} + c_{AMP} \right) \cdot \left( K_m^{ADP} + c_{ADP} \right) \cdot \left( K_m^{Mg^{2+}} + c_{Mg^{2+}} \right)} \quad (3)$$

$$r_3 = \frac{V_m \cdot \gamma_{PPK2-I} \cdot c_{ADP} \cdot c_{polyP} \cdot c_{Mg^{2+}}}{\left( K_m^{polyP} + c_{polyP} + \frac{c_{polyP}^2}{K_i^{polyP}} \right) \cdot \left( K_m^{ADP} \cdot \left( 1 + \frac{c_{AMP}}{K_i^{AMP}} + \frac{c_{adenozin}}{K_i^{adenozin}} \right) + c_{ADP} \right) \cdot \left( K_m^{Mg^{2+}} + c_{Mg^{2+}} \right)} \quad (4)$$

$$r_4 = \frac{V_m \cdot \gamma_{PPK2-II} \cdot c_{AMP} \cdot c_{polyP} \cdot c_{Mg^{2+}}^n}{\left( K_m^{Mg^{2+}} + c_{Mg^{2+}}^n \right) \cdot \left( K_m^{polyP} + c_{polyP} + \frac{c_{polyP}^2}{K_i^{polyP}} \right) \cdot \left( K_m^{AMP} \cdot \left( 1 + \frac{c_{ATP}}{K_i^{ATP}} + \frac{c_{adenozin}}{K_i^{adenozin}} \right) + c_{AMP} \right)} \quad (5)$$

$$r_5 = \frac{V_m \cdot \gamma_{\text{PPK 2-II}} \cdot c_{\text{ADP}} \cdot c_{\text{Mg}^{2+}}}{\left(K_m^{\text{Mg}^{2+}} + c_{\text{Mg}^{2+}}\right) \cdot \left(K_m^{\text{ADP}} + c_{\text{ADP}}\right)} \quad (6)$$

Osim kinetičkih jednadžbi, za matematički model kaskade proučavane u ovom radu definirane su bilancne jednadžbe za svaku komponentu u reakciji za kotlasti reaktor. Promjena koncentracije adenozina u vremenu je opisana jednadžbom 7, promjena koncentracije u vremenu AMP-a jednadžbom 8, promjena koncentracije ADP-a u vremenu jednadžbom 9, a promjena koncentracije ATP-a u vremenu je opisana jednadžbom 10.

$$\frac{dc_{\text{adenozin}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (7)$$

$$\frac{dc_{\text{AMP}}}{dt} = r_1 - r_2 - r_4 + r_5 \quad (8)$$

$$\frac{dc_{\text{ADP}}}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 + r_4 - r_5 \quad (9)$$

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

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

Jedan od većih izazova uvođenja biokatalitičkih procesa u industrijska postrojenja je odrediti optimalne koncentracije svakog reaktanta koji se koristi. Razvoj reakcijskog modela u ranoj fazi dizajniranja procesa može pokazati praktičnu i ekonomsku izvedivost predloženog postupka. Isto tako, modeli mogu pomoći u kritičkoj procjeni reakcijskih puteva, te mogu istaknuti potencijalne probleme poput uskih grla procesa, nastajanja i djelovanja inhibitora. Međutim, razvoj modela enzimske reakcije je često složen, pogotovo za kaskadne reakcije.<sup>33</sup>

Nakon što se razvije model enzimske reakcije i odrede vrijednosti parametara reakcije, potrebno je napraviti procjenu njihovog utjecaja na proces. Za industrijsku proizvodnju je važno iskorištenje reakcije, stoga je ovisnost sustava o kinetičkim parametrima važan aspekt za razvoj procesa. Procjena osjetljivosti parametara se radi na način da se jedan parametar poveća ili smanji za određeni faktor, dok se ostali parametri drže konstantnima. Zatim se provode simulacije s novim vrijednostima tog parametra te se dobivene vrijednosti uspoređuju s originalnim vrijednostima brzine reakcije, koncentracije produkta ili nekog drugog pokazatelja te se izračunava njegovo odstupanje. Parametri kod kojih je dobiveno najveće odstupanje najviše utječu na proces.<sup>23,33</sup>

U ovom radu je ispitana kinetika reakcija kataliziranih enzimima ADK, PPK2-I i PPK2-II u svrhu dobivanja ATP-a te su procijenjeni kinetički parametri reakcija. Zatim je razvijen model kaskadne reakcije koji u sebi sadržava bilancne jednadžbe za svaku komponentu te je simuliranjem u programskom paketu Scientist 3 pronađeno optimalno područje koncentracija supstrata za dobivanje najveće koncentracije produkta. Računalne simulacije su provedene pomoću modela danog u prilogu 8.2.

Osjetljivost parametara svake reakcije u ispitivanoj kaskadnoj reakcije je procijenjena simulacijama variranjem vrijednosti jednog parametra za  $\pm 10, 20, 30, 40$  i  $50\%$  dok su ostali parametri reakcije držani konstantnima. Zatim je izračunat postotak odstupanja koncentracije ATP-a. Na sličan način je procijenjen utjecaj koncentracije pojedinih enzima na koncentraciju produkta za koncentraciju svakog enzima od  $1,01, 2,01, 3,01, 4,01$  i  $5,01 \text{ mg cm}^{-3}$  pritom držeći parametre svake reakcije konstantnima. Sve su simulacije napravljene za vrijeme od  $24 \text{ h}$ .



## 5.1. ENZIMSKA KINETIKA

### 5.1.1. Reakcije katalizirane enzimom ADK

#### 5.1.1.1. Napredna reakcija katalizirana enzimom ADK

U ovoj reakciji sudjeluju adenozin i ATP kao supstrati te magnezij kao kofaktor. Reakcija je katalizirana enzimom ADK te kao produkti nastaju AMP i ADP. U tablici 5.1. su prikazane vrijednosti kinetičkih parametara ove reakcije koje su preuzete iz literature.<sup>34</sup>

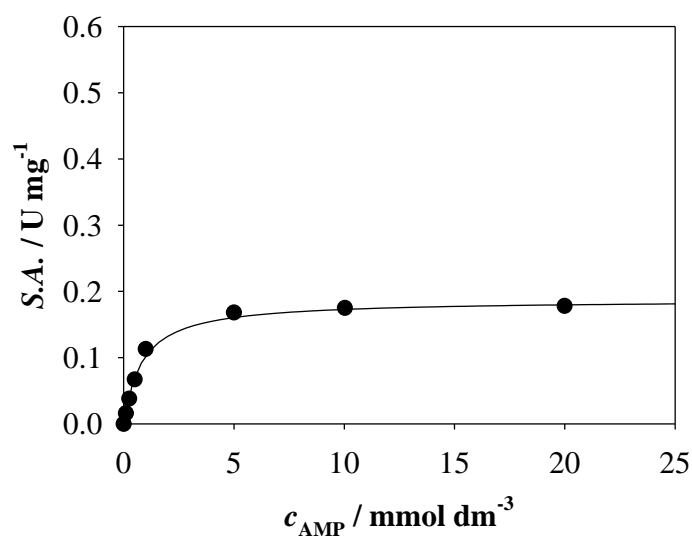
Tablica 5.1. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za naprednu reakciju kataliziranu enzimom ADK.<sup>34</sup>

Parametar	Jedinica	Vrijednost
$V_{m1}$	$\text{U mg}^{-1}$	$20,067 \pm 0,873$
$K_{m1}^{\text{adenozin}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$0,174 \pm 0,032$
$K_{m1}^{\text{ATP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$1,202 \pm 0,216$
$K_{m1}^{\text{Mg}^{2+}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$1,766 \pm 0,311$
$K_{i1}^{\text{AMP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$1,469 \pm 0,079$
$K_{i1}^{\text{ADP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$2,234 \pm 0,056$
$K_{i1}^{\text{PolyP}}$	$\text{mg mL}^{-1}$	$10,081 \pm 1,484$

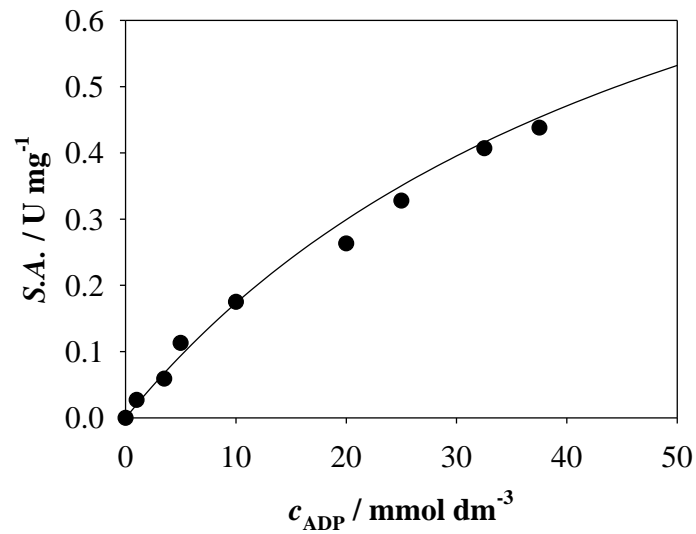
Prema vrijednostima parametara reakcije danim u tablici 5.1., moguće je vidjeti da enzim ADK ima najveći afinitet prema adenzinu zbog najmanje vrijednosti Michaelisove konstante. Suprotno tome, enzim ADK ima najmanji afinitet prema magneziju zbog najveće vrijednosti Michaelisove konstante. U ovoj reakciji su prisutne kompetitivne inhibicije s produktima AMP-om i ADP-om definirane konstantama inhibicije  $K_{i1}^{\text{AMP}}$  i  $K_{i1}^{\text{ADP}}$  te antikompetitivna inhibicija s polifosfatom definirana konstantom inhibicije  $K_{i1}^{\text{PolyP}}$ . Od kompetitivnih inhibicija najveći utjecaj ima AMP zbog najmanje vrijednosti konstante inhibicije. Polifosfat ima najmanji inhibitorski učinak na reakciju zbog najveće vrijednosti konstante inhibicije. Kako bi se smanjio utjecaj inhibicije produkata, poželjno je da koncentracije produkata budu što manje. Napredna reakcija katalizirana enzimom ADK je opisana jednačinom 2.

### 5.1.1.2. Povratna reakcija katalizirana enzimom ADK

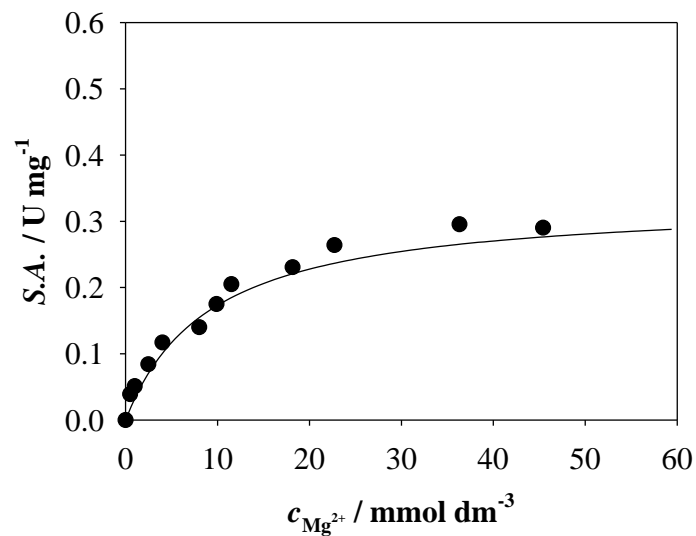
U ovoj reakciji su AMP i ADP supstrati, a magnezij je kofaktor. Reakcija je katalizirana enzimom ADK, a produkti su adenozin i ATP. Slike 5.1. i 5.2. prikazuju utjecaj koncentracija AMP-a i ADP-a, dok slika 5.3. prikazuje utjecaj koncentracije magnezija na specifičnu aktivnost enzima. Procijenjeni parametri reakcije su dani u tablici 5.2. Ova reakcija opisana je jednadžbom 3.



Slika 5.1. Utjecaj koncentracije AMP-a na specifičnu aktivnost enzima ADK u  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{ADK}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ADP}} = 10,00 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 9,99 \text{ mmol dm}^{-3}$



Slika 5.2. Utjecaj koncentracije ADP-a na specifičnu aktivnost enzima ADK u  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{ADK}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 10,00 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 9,99 \text{ mmol dm}^{-3}$



Slika 5.3. Utjecaj koncentracije magnezija na specifičnu aktivnost enzima ADK u  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{ADK}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 10,00 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{ADP}} = 10,01 \text{ mmol dm}^{-3}$

Tablica 5.2. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za povratnu reakciju kataliziranu enzimom ADK.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
$V_{m2}$	$\text{U mg}^{-1}$	$2,299 \pm 0,034$
$K_{m2}^{\text{AMP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$0,831 \pm 0,080$
$K_{m2}^{\text{ADP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$53,811 \pm 13,107$
$K_{m2}^{\text{Mg}^{2+}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$9,214 \pm 1,331$

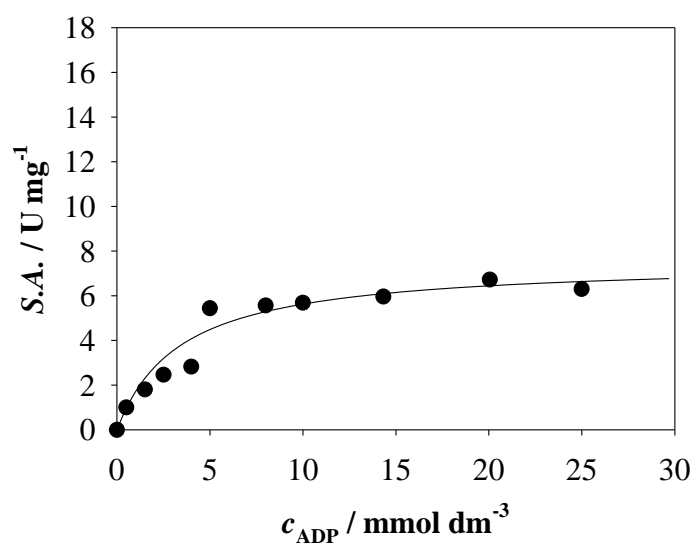
U povratnoj reakciji, enzim ADK pokazuje najveći afinitet prema AMP-u na što ukazuje mala vrijednost Michaelisove konstante  $K_{m2}^{\text{AMP}}$ , a to potvrđuje i slika 5.1. Enzim ADK ima najmanji afinitet prema ADP-u, na što ukazuje najveća vrijednost Michaelisove konstante  $K_{m2}^{\text{ADP}}$  u odnosu na ostale vrijednosti Michaelisovih konstanti. Iako je magnezij kofator, vrijednost njegove Michaelisove konstante je relativno visoka što znači da enzim nema veliki afinitet prema magneziju. U ispitivanom rasponu koncentracija ADP-a (slika 5.2.) nije postignuto zasićenje. Iz dobivenih rezultata vidi se da povećanjem koncentracije ADP-a u ispitivanom rasponu, specifična aktivnost enzima raste te je ovisnost specifične aktivnosti ADK o koncentraciji ADP-a gotovo linearna.

#### 5.1.1.3. Usporedba povratne i napredne reakcije katalizirane enzimom ADK

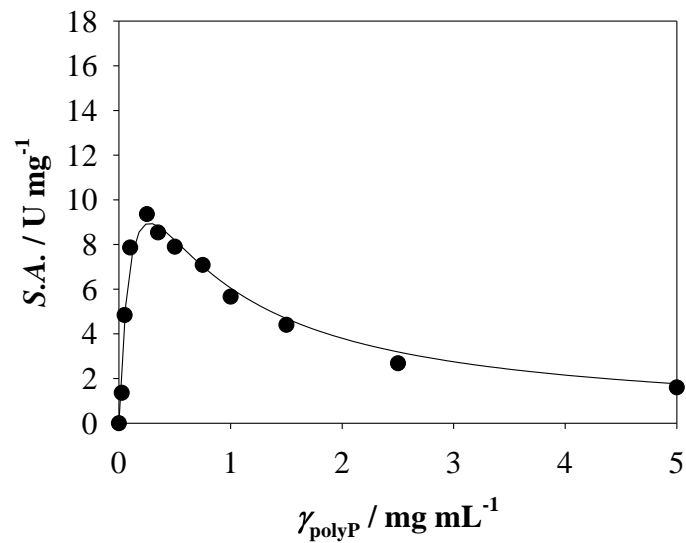
Uspoređujući vrijednosti maksimalne brzine napredne i povratne reakcije katalizirane enzimom ADK, može se uočiti da je napredna reakcija brža odnosno da je vrijednost maksimalne brzine napredne reakcije veća. Također, vrijednosti Michaelisovih konstanti supstrata u naprednoj reakciji su niske što ukazuje na velik afinitet enzima prema supstratima. Vrijednosti Michaelisovih konstanti u povratnoj reakciji su su relativno visoke, a to znači da enzim pokazuje niži afinitet prema supstratima AMP-u i ADP-u što je i poželjno jer to znači da će prevladati napredna reakcija.

### 5.1.2. Reakcija katalizirana enzimom PPK2-I

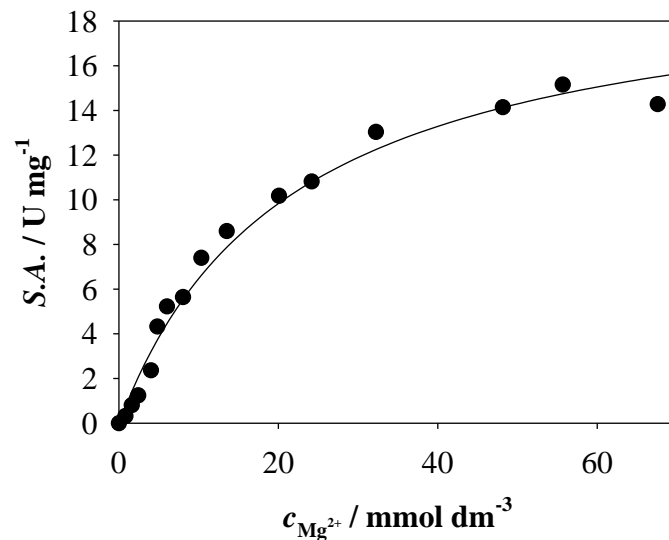
U ovoj reakciji su ADP i polifosfat supstrati, a magnezij je kofaktor. Enzimskom reakcijom nastaje produkt ATP. Utjecaji koncentracije supstrata na specifičnu aktivnost enzima su prikazani na slikama 5.4. i 5.5., dok je utjecaj koncentracije kofaktora prikazan na slici 5.6. Utjecaj koncentracije produkta na specifičnu aktivnost enzima je prikazan na slici 5.7. Utjecaji koncentracija inhibitora AMP-a i adozina na specifičnu aktivnost enzima su prikazani na slikama 5.8. i 5.9. Ova reakcija je opisana jednadžbom 4 te su parametri reakcije procijenjeni i dani u tablici 5.3.



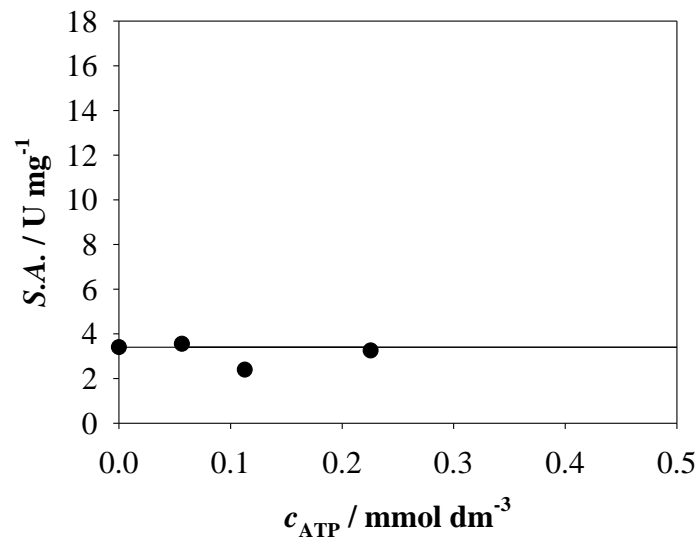
Slika 5.4. Utjecaj koncentracije ADP-a na specifičnu aktivnost PPK2-I u  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1000 \text{ rpm}$ ,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,005 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{PolyP}} = 2,50 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 4,00 \text{ mmol dm}^{-3}$



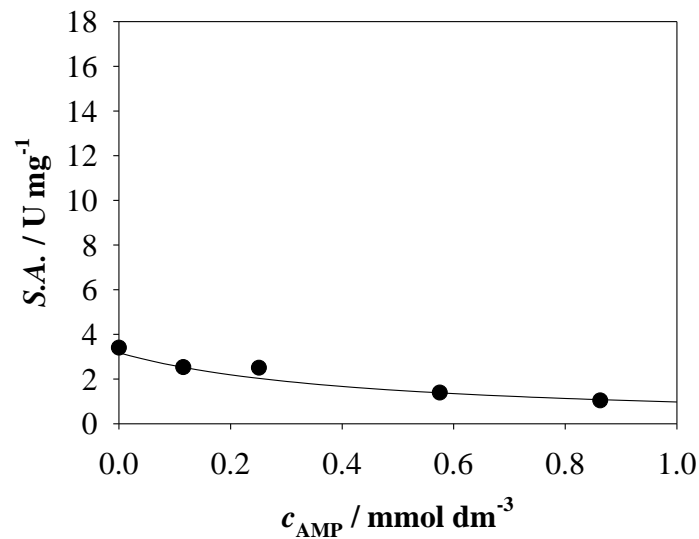
Slika 5.5. Utjecaj koncentracije polifosfata na specifičnu aktivnost enzima PPK2-I u 50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,005 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ADP}} = 2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 4,00 \text{ mmol dm}^{-3}$



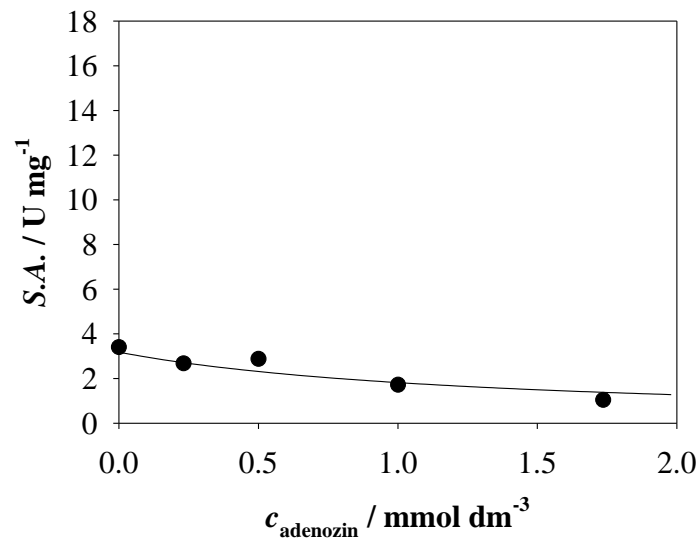
Slika 5.6. Utjecaj koncentracije magnezija na specifičnu aktivnost enzima PPK2-I u 50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,005 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ADP}} = 2,50 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{PolyP}} = 2,50 \text{ mg mL}^{-1}$



Slika 5.7. Utjecaj koncentracije ATP-a na specifičnu aktivnost enzima PPK2-I u 50 mmol  $\text{dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,005 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ADP}} = 2,49 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 3,99 \text{ mmol dm}^{-3}$



Slika 5.8. Utjecaj koncentracije AMP-a na specifičnu aktivnost enzima PPK2-I u 50 mmol  $\text{dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,005 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ADP}} = 2,49 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 3,99 \text{ mmol dm}^{-3}$



Slika 5.9. Utjecaj koncentracije adenoizina na specifičnu aktivnost enzima PPK2-I u 50 mol  $\text{dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,005 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ADP}} = 2,49 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 2,5 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 3,99 \text{ mmol dm}^{-3}$

Tablica 5.3. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za reakciju kataliziranu enzimom PPK2-I.

Parametar	Jednica	Vrijednost
$V_{m3}$	$\text{U mg}^{-1}$	$270,800 \pm 66,887$
$K_{m3}^{\text{ADP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$3,401 \pm 0,546$
$K_{m3}^{\text{Mg}^{2+}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$21,651 \pm 1,982$
$K_{m3}^{\text{polyP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$0,137 \pm 0,038$
$K_{i3}^{\text{polyP}}$	$\text{mg mL}^{-1}$	$0,550 \pm 0,111$
$K_{i3}^{\text{AMP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$0,255 \pm 0,053$
$K_{i3}^{\text{adenozin}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$0,769 \pm 0,204$

Slika 5.4. prikazuje tipičnu Michaelis-Menteničinu kinetiku. Moguće je procijeniti koncentraciju pri kojoj se postiže zasićenje supstratom na vrijednost između 25 i 30  $\text{mmol dm}^{-3}$ . Vrijednost Michaelisove konstante  $K_{m3}^{\text{ADP}}$  pokazuje relativno niski afinitet enzima prema ADP-u. Mala vrijednost Michaelisove konstante  $K_{m3}^{\text{polyP}}$  u reakciji ukazuje na visok afinitet enzima prema polifosfatu. Ipak, prema slici 5.5. se vidi da već pri koncentracijama polifosfata manjim od  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  dolazi do pada specifične aktivnosti enzima, te se iz toga može

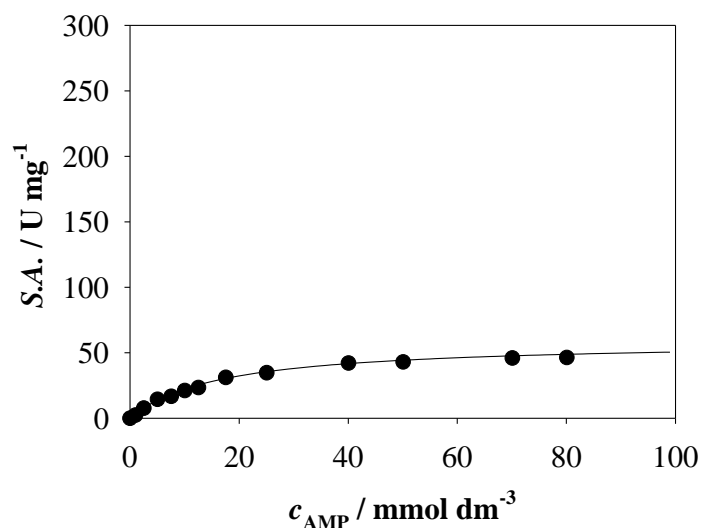


zaključiti da je to koncentracija koju treba dodati u reaktor kako bi se postigla maksimalna specifična aktivnost enzima. Relativno nizak afinitet enzima prema magneziju pokazuje velika vrijednost Michaelisove konstante  $K_{m3}^{Mg^{2+}}$ , te u ispitivanom rasponu koncentracija magnezija (slika 5.6.) nije postignuto zasićenje. Slika 5.7. ukazuje na to da povećanje koncentracije ATP-a nema nikakav utjecaj na specifičnu aktivnost enzima. Na slikama 5.8. i 5.9. je prikazan inhibitorni učinak AMP-a i adenzina te se vidi pad specifične aktivnosti enzima u oba slučaja. Konstanta inhibicije AMP-a  $K_{i3}^{AMP}$  ima najmanju vrijednost što znači da ova komponenta već pri malim koncentracijama počinje djelovati inhibitorno na enzim, dok adenzin od svih komponenata u reakciji djeluje najmanje inhibitorno. Ova reakcija je brza na što ukazuje velika vrijednost maksimalne brzine reakcije  $V_{m3}$ .

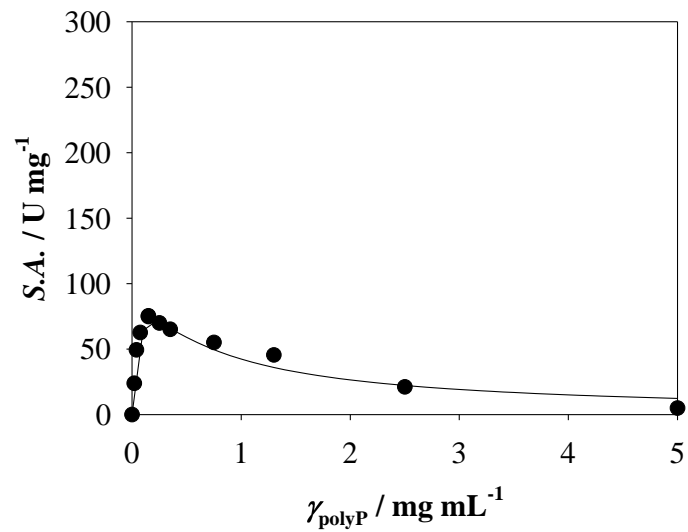
### 5.1.3.. Reakcije katalizirane enzimom PPK2-II

#### 5.1.3.1. Napredna reakcija katalizirana enzimom PPK2-II

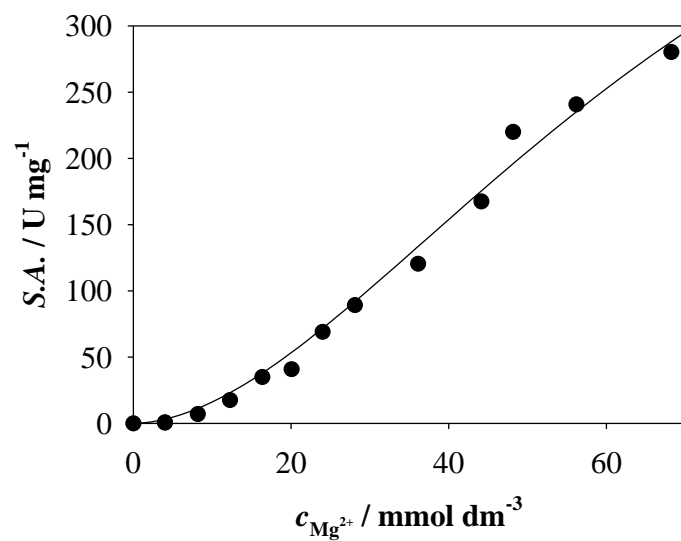
U naprednoj reakciji kataliziranoj enzimom PPK2-II AMP i polifosfat su supstrati, a magnezij je kofaktor. Produkt ove reakcije je ADP. Utjecaji koncentracija supstrata AMP-a i polifosfata na specifičnu aktivnost enzima su prikazani na slikama 5.10. i 5.11., dok je utjecaj koncentracije magnezija prikazan na slici 5.12. Na slikama 5.13. i 5.14. su prikazani utjecaji koncentracija inhibitora ATP-a i adenzina na specifičnu aktivnost enzima. Ova reakcija je opisana jednadžbom 5, a parametri su procijenjeni i dani u tablici 5.4.



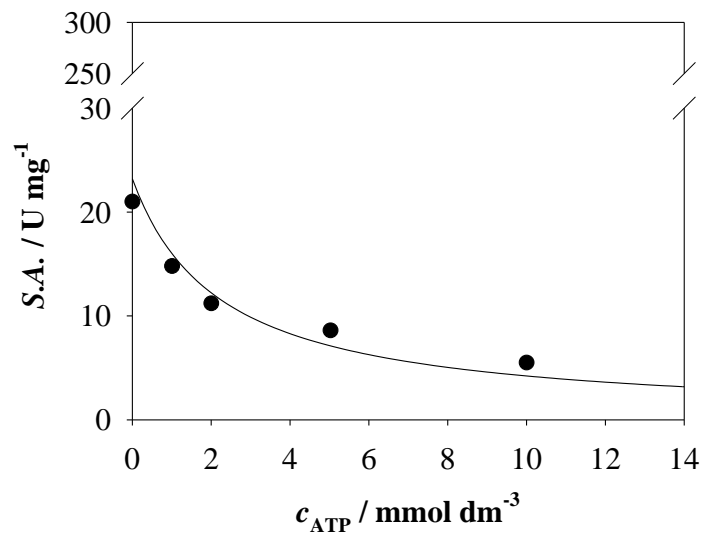
Slika 5.10. Utjecaj koncentracije AMP-a na specifičnu aktivnost enzima PPK2-II u 50 mmol  $\text{dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{PPK2-II} = 0,001 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 12,40 \text{ mmol dm}^{-3}$



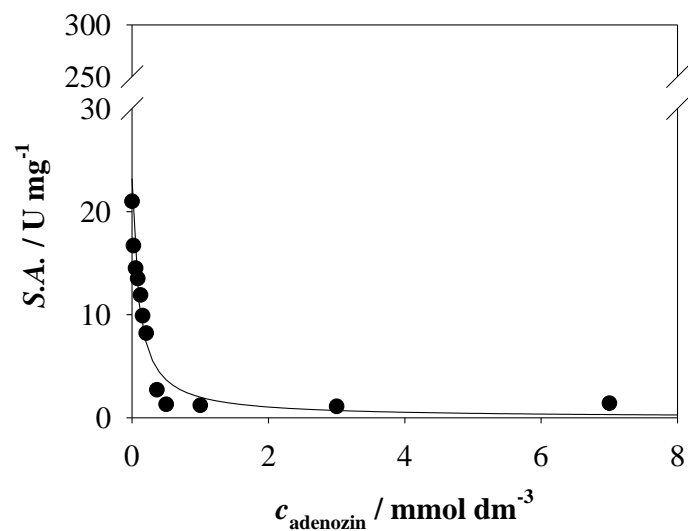
Slika 5.11. Utjecaj koncentracije polifosfata na specifičnu aktivnost enzima PPK2-II u 50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,001 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 10,01 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 13,04 \text{ mmol dm}^{-3}$



Slika 5.12. Utjecaj koncentracije magnezija na specifičnu aktivnost enzima PPK2-II u 50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,001 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 10,05 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{polyP}} = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$



Slika 5.13. Utjecaj koncentracije ATP-a na specifičnu aktivnost enzima PPK2-II u 50  $\text{mmol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,001 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 9,99 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 11,96 \text{ mmol dm}^{-3}$



Slika 5.14. Utjecaj koncentracije adenozina na specifičnu aktivnost enzima PPK2-II u 50  $\text{mmol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,001 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 9,99 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 12,29 \text{ mmol dm}^{-3}$

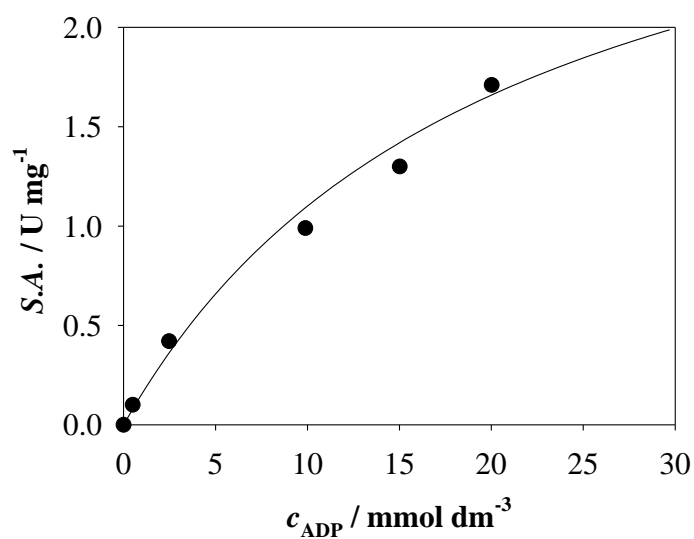
Tablica 5.4. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za naprednu reakciju kataliziranu enzimom PPK2-II.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
$V_{m4}$	$\text{U mg}^{-1}$	$8514,785 \pm 1284,787$
$K_{m4}^{\text{AMP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$16,456 \pm 0,986$
$K_{m4}^{\text{polyP}}$	$\text{mg mL}^{-1}$	$0,064 \pm 0,017$
$K_{i4}^{\text{polyP}}$	$\text{mg mL}^{-1}$	$0,596 \pm 0,148$
$K_{m4}^{\text{Mg}^{2+}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$2428,601 \pm 217,840$
$n$	-	$1,815 \pm 0,067$
$K_{i4}^{\text{ATP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$1,383 \pm 0,227$
$K_{i4}^{\text{adenozin}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$0,059 \pm 0,007$

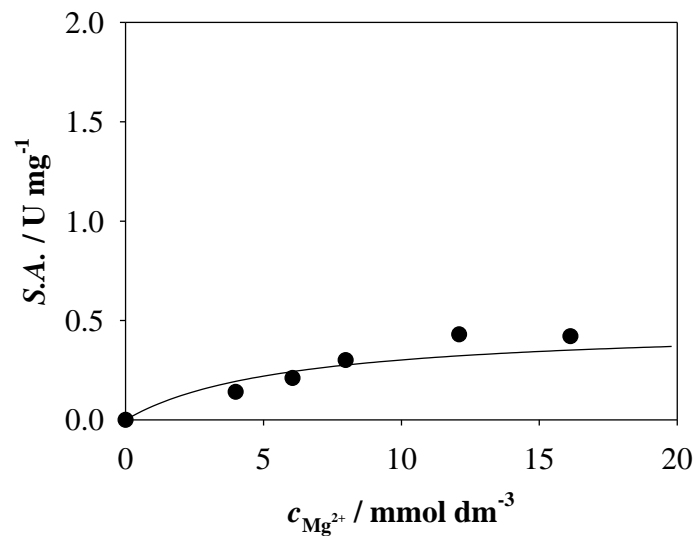
Na slici 5.10. je prikazana tipična Michaelis-Menteničina kinetika koja opisuje utjecaj koncentracije AMP-a na specifičnu aktivnost enzima. Do zasićenja AMP-om dolazi tek u području koncentracija iznad  $30 \text{ mmol dm}^{-3}$  što ukazuje na relativno mali afinitet enzima prema AMP-u. To potvrđuje i visoka vrijednost Michaelisove konstante  $K_{m4}^{\text{AMP}}$ . Slika 5.11. prikazuje Michaelis-Menteničinu kinetiku s inhibicijom supstratom polifosfatom te je iz slike vidljivo da se najveća specifična aktivnost enzima (iznad  $60 \text{ U mg}^{-1}$ ) postiže pri masenim koncentracijama polifosfata manjim od  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Iz toga se može zaključiti da je to koncentracija polifosfata koju treba dodati u reaktor kako bi se postigla maksimalna specifična aktivnost enzima. Strmi nagib linearnog dijela krivulje na slici 5.11. ukazuje na visok afinitet enzima prema polifosfatu, što potvrđuje i Michaelisova konstanta  $K_{m4}^{\text{polyP}}$ . Na slici 5.12. je prikazan utjecaj magnezija na specifičnu aktivnost enzima. Ovaj utjecaj je opisan Hillovom jednadžbom koja sadrži dodatni parametar  $n$  koji je također procijenjen iz prikupljenih eksperimentalnih podataka. Slike 5.13. i 5.14. prikazuju inhibiciju ATP-om i adenozinom. Vidljivo je da adenzin jače inhibira enzim već pri malim koncentracijama. U oba slučaja, porastom koncentracije inhibitora opada specifična aktivnost enzima te bi njihova koncentracija trebala biti što manja kako bi se smanjio negativan utjecaj na specifičnu aktivnost enzima. Maksimalna brzina reakcije je velika što upućuje na vrlo brzu reakciju.

### 5.1.3.2. Povratna reakcija katalizirana enzimom PPK2-II

U povratnoj reakciji kataliziranoj enzimom PPK2-II, ADP je supstrat, magnezij kofaktor, a kao produkt nastaje AMP. Slike 5.15. i 5.16. prikazuju utjecaj koncentracija ADP-a i magnezija na specifičnu aktivnost enzima. Parametri reakcije su procijenjeni i dani u tablici 5.5., a sama reakcija je opisana jednadžbom 6.



Slika 5.15. Utjecaj koncentracije ADP-a na specifičnu aktivnost enzima PPK2-II u 50 mmol  $\text{dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 18,14 \text{ mmol dm}^{-3}$



Slika 5.16. Utjecaj koncentracije magnezija na specifičnu aktivnost enzima PPK2-II u 50  $\text{mmol dm}^{-3}$  fosfatnom puferu pri pH 7,5, 37 °C, 1000 rpm,  $V_r = 1 \text{ cm}^3$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $c_{\text{ADP}} = 2,47 \text{ mmol dm}^{-3}$

Tablica 5.5. Procijenjene vrijednosti kinetičkih parametara za povratnu reakciju kataliziranu enzimom PPK2-II.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
$V_{m5}$	$\text{U mg}^{-1}$	$4,465 \pm 1,016$
$K_{m5}^{\text{ADP}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$20,547 \pm 6,028$
$K_{m5}^{\text{Mg}^{2+}}$	$\text{mmol dm}^{-3}$	$5,895 \pm 4,796$

Slika 5.15. prikazuje da u ispitivanom rasponu koncentracija ADP-a nije postignuto zasićenje. Iz dobivenih rezultata se vidi da povećanjem koncentracije ADP-a u ispitivanom rasponu, raste specifična aktivnost enzima, te je ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji ADP-a gotovo linearna. Isto se tako prema vrijednosti Michaelisove konstante  $K_{m5}^{\text{ADP}}$  može zaključiti da enzim ima manji afinitet prema ADP-u nego prema magneziju. Mala vrijednost maksimalne brzine reakcije  $V_{m5}$  upućuje na nisku brzinu reakcije.

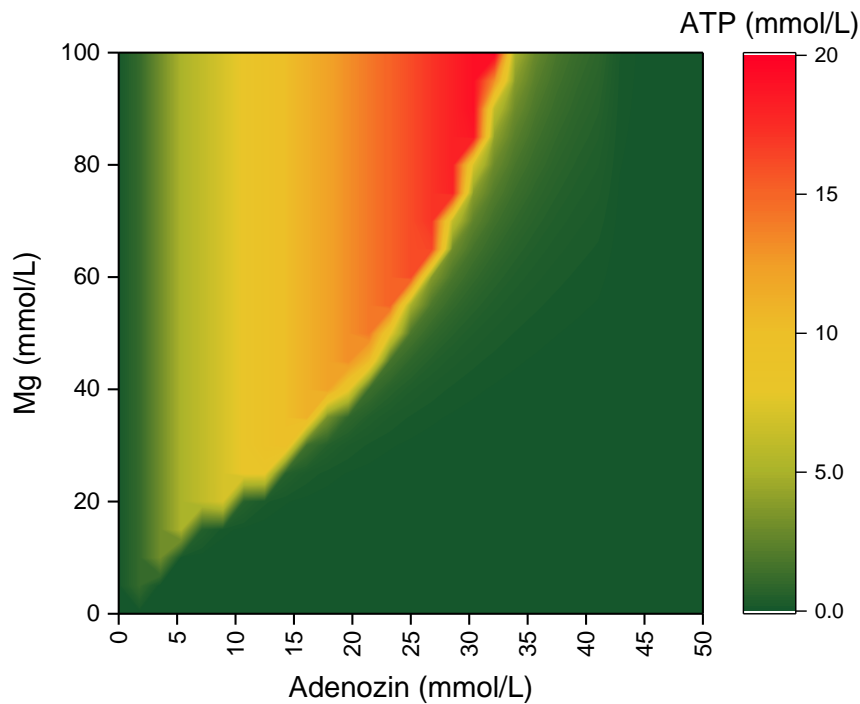
### 5.1.3.3. Usporedba napredne i povratne reakcije katalizirane enzimom PPK2-II

Usporedbom vrijednosti maksimalnih brzina napredne i povratne reakcije katalizirane enzimom PPK2-II može se zaključiti da je napredna reakcija brža od povratne što je vrlo poželjno. Enzim PPK2-II ima veći afinitet prema supstratima AMP-u i polifosfatu u naprednoj reakciji nego prema supstratu ADP-u u povratnoj reakciji. Prema tome i unatoč inhibicijama u naprednoj reakciji, povratna reakcija bi trebala biti zanemariva u odnosu na naprednu.

### 5.1.4. Optimalno područje početnih koncentracija supstrata u kaskadi za sintezu ATP-a

Nakon kinetičke karakterizacije i postavljanja bilanci za adenzin, AMP, ADP i ATP u kotlastom reaktoru, razvijen je matematički model dan u prilogu 8.2. Provedene su simulacije u kojima su varirane koncentracije magnezija i adenozina kako bi se pronašlo optimalno područje koncentracija pri kojim nastaje najveća koncentracija ATP-a. Simulacije su provedene na način da je za svaku ispitivanu koncentraciju adenozina varirana koncentracija magnezija od 0 do 100 mmol dm<sup>-3</sup> te je praćena koncentracija ATP-a nakon 24 h. S obzirom na iznose konstanti inhibicija u reakcijama, izabrane su početne koncentracije polifosfata od 0,5 mg mL<sup>-1</sup> i AMP-a od 0,1 mmol dm<sup>-3</sup>. Te su koncentracije držane konstantnima kroz sve simulacije. Pri koncentracijama adenozina većim od 30 mmol dm<sup>-3</sup>, inhibicija adenozinom je vrlo značajna tako da je na slici 5.24. prikazano samo područje koncentracija od 0 do 50 mmol dm<sup>-3</sup> za adenzin. Simulacijama je utvrđeno da je optimalno područje koncentracija supstrata (područje gdje se dobiva najveća koncentracija produkta ATP-a) između 20 i 25 mmol dm<sup>-3</sup> za adenzin i 80 i 100 mmol dm<sup>-3</sup> za magnezij. Najveća koncentracija ATP-a (19,99 mmol dm<sup>-3</sup>) dobivena je pri koncentracijama adenozina od 20 mmol dm<sup>-3</sup> i magnezija od 100 mmol dm<sup>-3</sup>.





Slika 5.24. Utjecaj koncentracija magnezija i adenozina na koncentraciju nastalog produkta ATP-a ( $\gamma_{ADK} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{PPK2-I} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{PPK2-II} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{polyP} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{AMP} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $t = 24 \text{ h}$ )

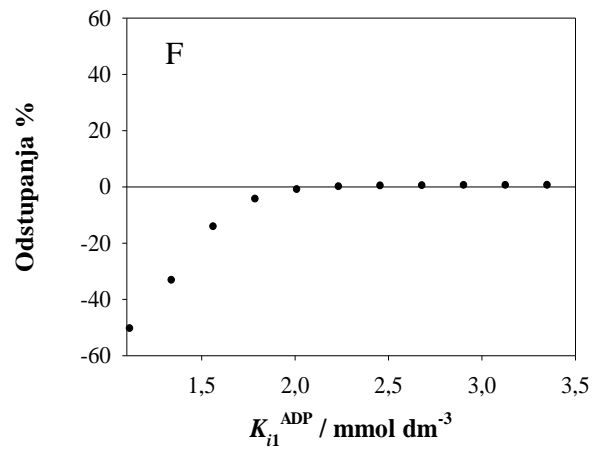
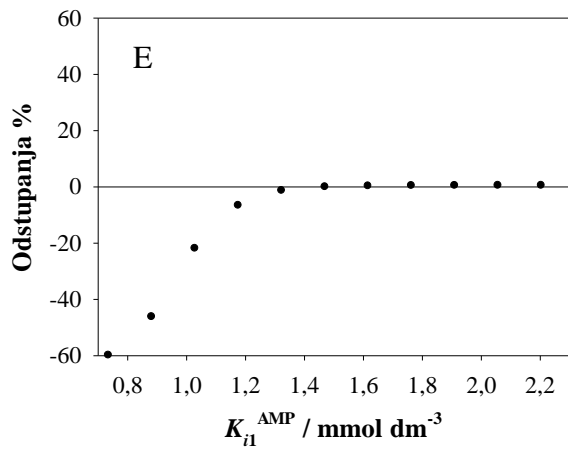
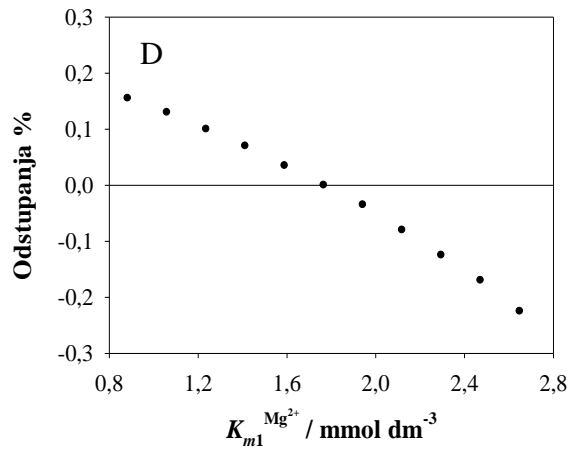
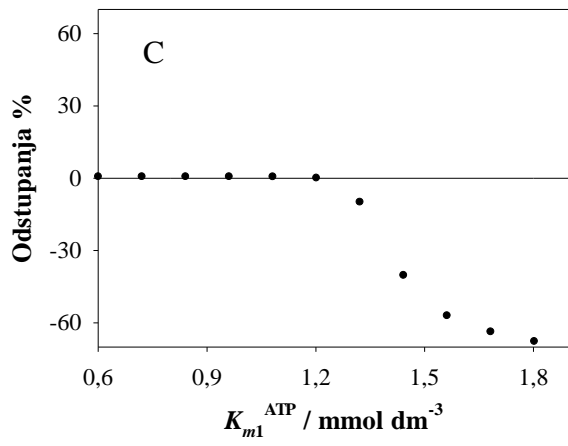
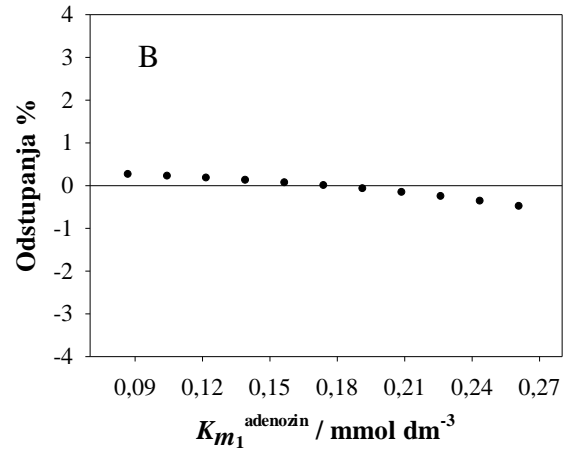
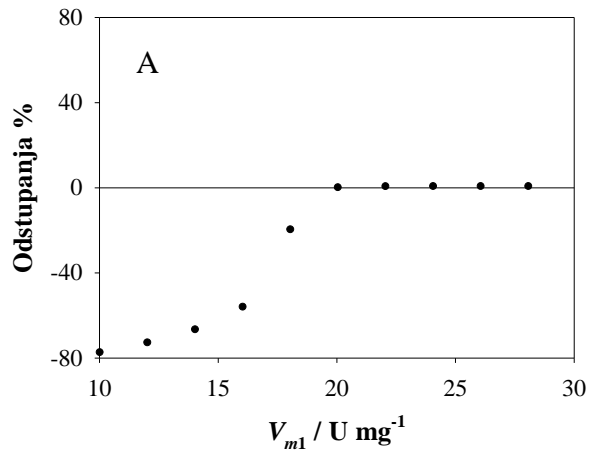
## 5.2. ANALIZA OSJETLJIVOSTI KINETIČKIH PARAMETARA

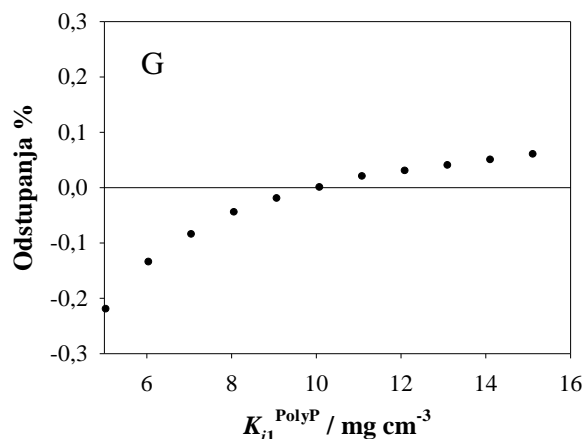
Analiza osjetljivosti kinetičkih parametara je napravljena za kinetičke parametre svake reakcije u kaskadi. Svrha analize osjetljivosti svakog kinetičkog parametra je utvrđivanje njegovog utjecaja na reakciju odnosno na koncentraciju ATP-a. Parametar s velikim odstupanjima koncentracije ATP-a od početne vrijednosti ima značajan utjecaj na reakciju.

### 5.2.1. Analiza osjetljivosti parametara u reakcijama kataliziranih enzimom ADK

#### 5.2.1.1. Analiza osjetljivosti parametara napredne reakcije katalizirane enzimom ADK

Slikom 5.18. su prikazani utjecaji kinetičkih parametara napredne reakcije katalizirane enzimom ADK na koncentraciju ATP-a.



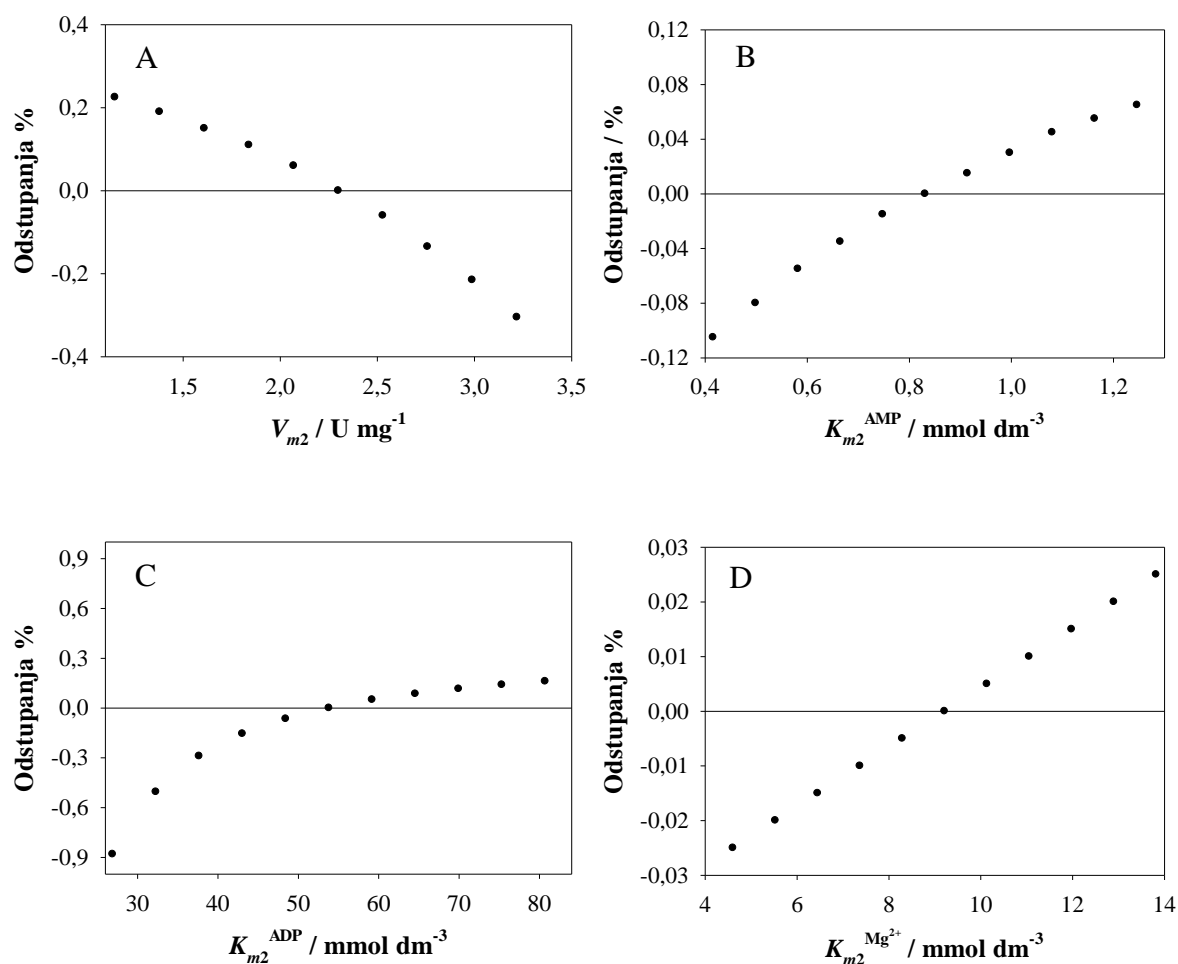


Slika 5.18. Utjecaj parametra A.  $V_{m1}$ , B.  $K_{m1}^{\text{adenozin}}$ , C.  $K_{m1}^{\text{ATP}}$ , D.  $K_{m1}^{\text{Mg}^{2+}}$ , E.  $K_{i1}^{\text{AMP}}$ , F.  $K_{i1}^{\text{ADP}}$  i G.  $K_{i1}^{\text{PolyP}}$  na koncentraciju ATP-a ( $\gamma_{\text{ADK}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{adenozin}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $t = 24 \text{ h}$ )

Prema slici 5.18.A vidljivo je da smanjenjem vrijednosti maksimalne brzine  $V_{m1}$  dolazi do izrazitog pada koncentracije ATP-a, no povećanjem maksimalne brzine ne dolazi do povećanja koncentracije ATP-a u sustavu. Variranje vrijednosti Michaelisove konstante  $K_{m1}^{\text{adenozin}}$  nema velikog utjecaja na sustav, kako je prikazano slikom 5.18.B, jer je promjena koncentracije ATP-a u oba slučaja manja od 1%. Slikom 5.18.C je pokazano da smanjenje vrijednosti Michaelisove konstante  $K_{m1}^{\text{ATP}}$  nema utjecaja na sustav, ali povećanje iste ima jer dolazi do pada koncentracije ATP-a za više od 30% povećanjem vrijednosti Michaelisove konstante  $K_{m1}^{\text{ATP}}$  za 20%. Daljnim povećanjem vrijednosti Michaelisove konstante  $K_{m1}^{\text{ATP}}$  za 50% dolazi do pada koncentracije ATP-a za više od 60%. Povećanjem vrijednosti  $K_{m1}^{\text{ATP}}$ , smanjuje se afinitet enzima ADK prema ATP-u. Prema slici 5.18.D, variranje Michaelisove konstante  $K_{m1}^{\text{Mg}^{2+}}$  nema značajnog utjecaja na sustav jer su odstupanja manja od 1%. Slike 5.18.E i 5.18.F pokazuju da smanjenjem vrijednosti konstanti inhibicija  $K_{i1}^{\text{AMP}}$  i  $K_{i1}^{\text{ADP}}$  za 50%, dolazi do pada koncentracije ATP-a za više od 50% u oba slučaja, tako da te konstante inhibicije imaju izražen utjecaj na sustav. Pri manjim vrijednostima konstanti inhibicija  $K_{i1}^{\text{AMP}}$  i  $K_{i1}^{\text{ADP}}$  dolazi do smanjenja one koncentracije pri kojoj AMP i ADP počinju djelovati inhibitorno, dakle povećava se njihova inhibicija. Prema slici 5.18.G variranje konstante inhibicije  $K_{i1}^{\text{PolyP}}$  nema značajnog utjecaja na proces.

### 5.2.1.2. Analiza osjetljivosti parametara povratne reakcije katalizirane enzimom ADK

Na slici 5.19. su prikazani utjecaji kinetičkih parametara povratne reakcije katalizirane enzimom ADK na koncentraciju ATP-a.



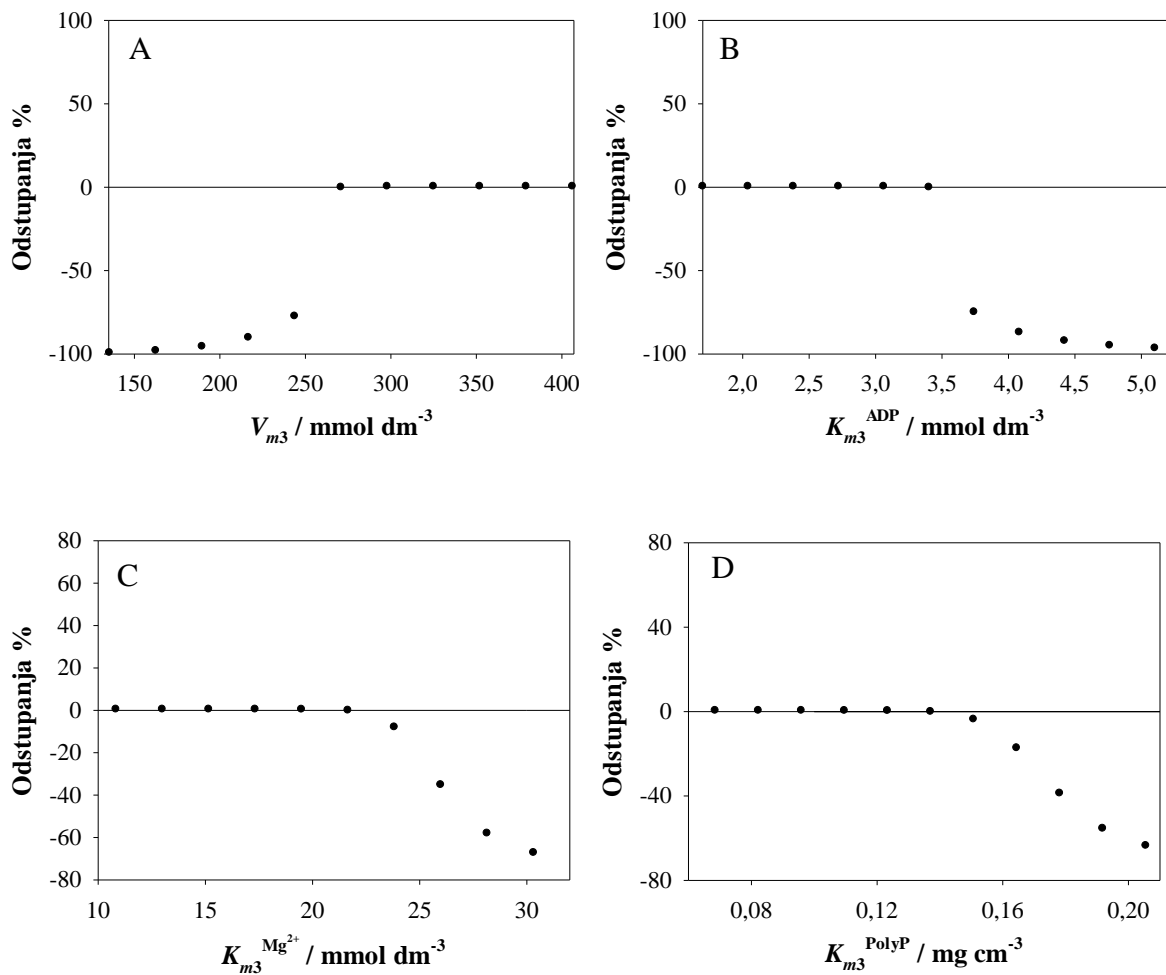
Slika 5.19. Utjecaj parametara A.  $V_{m2}$ , B.  $K_{m2}^{\text{AMP}}$ , C.  $K_{m2}^{\text{ADP}}$ , D.  $K_{m2}^{\text{Mg}^{2+}}$  na koncentraciju ATP-a ( $\gamma_{\text{ADK}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{adenozin}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $t = 24 \text{ h}$ )

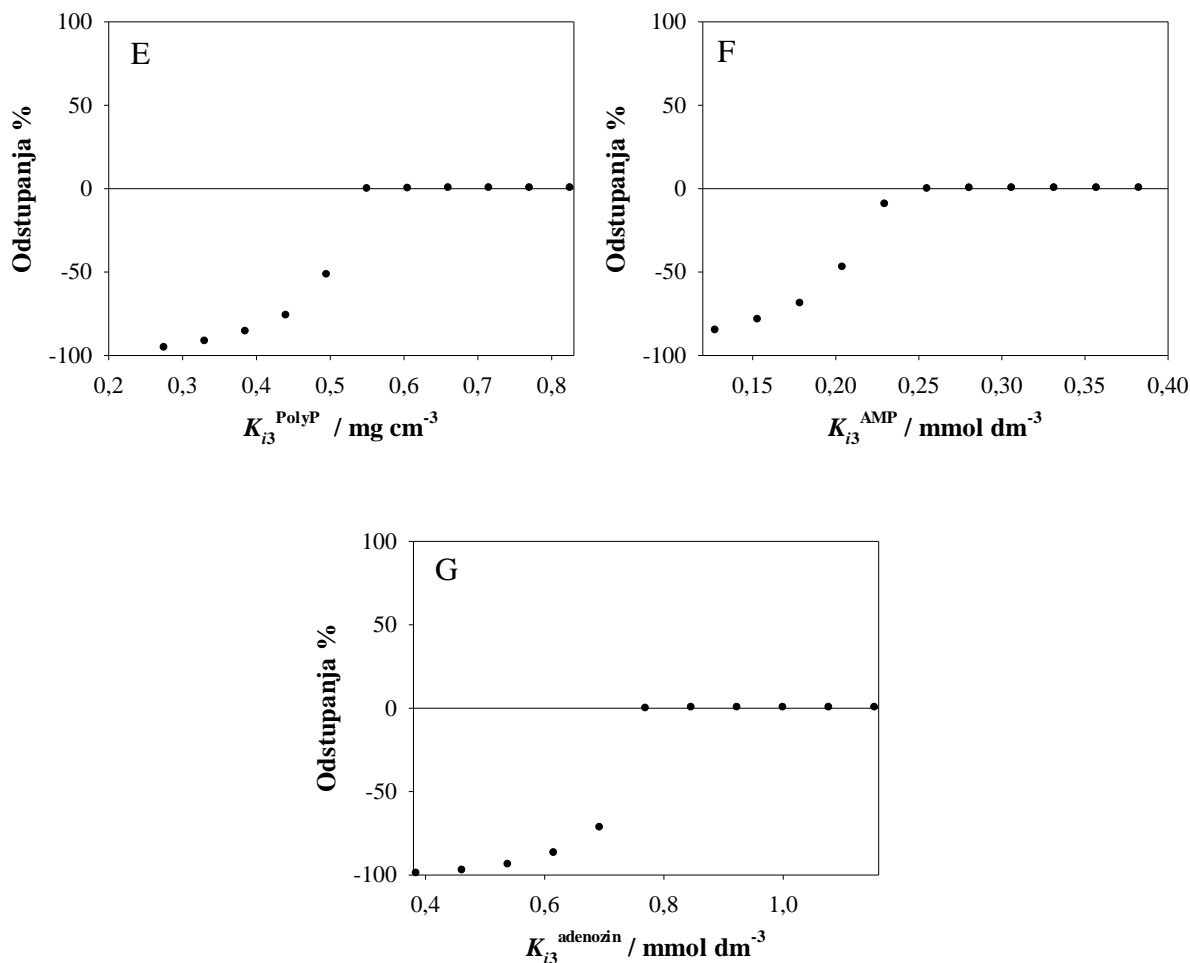
Iz slike 5.19.A je vidljivo da promjena vrijednosti maksimalne brzine povratne reakcije katalizirane enzimom ADK,  $V_{m2}$ , nema značajnog utjecaja na sustav jer je promjena koncentracije ATP-a manji od 1%. No u grafovima je primjećeno obrnuto ponašanje odstupanja nego u naprednoj reakciji kataliziranoj enzimom ADK. Porastom vrijednosti maksimalne brzine  $V_{m2}$  dolazi do opadanja koncentracije ATP-a, što znači da povratna reakcija postaje dominantnija u odnosu na naprednu. Slike 5.19.B, 5.19.C i 5.19.D pokazuju da

Michaelisove konstante  $K_{m2}^{\text{AMP}}$ ,  $K_{m2}^{\text{ADP}}$  i  $K_{m2}^{\text{Mg}^{2+}}$  također nemaju značajnog utjecaja na sustav, te je isto tako i ponašanje odstupanja za Michaelisove konstante obrnuto. Povećanjem vrijednosti Michaelisovih konstanti supstrata dolazi do blagog povećanja afiniteta enzima prema AMP-u, ADP-u i magneziju.

### 5.2.2. Analiza osjetljivosti parametara reakcije katalizirane enzimom PPK2-I

Slikom 5.20. su prikazani utjecaji kinetičkih parametara napredne reakcije katalizirane enzimom PPK2-I na koncentraciju ATP-a.





Slika 5.20. Utjecaj parametra A.  $V_{m3}$ , B.  $K_{m3}^{\text{ADP}}$ , C.  $K_{m3}^{\text{Mg}^{2+}}$ , D.  $K_{m3}^{\text{PolyP}}$ , E.  $K_{i3}^{\text{PolyP}}$ , F.  $K_{i3}^{\text{AMP}}$ , G.  $K_{i3}^{\text{adenozin}}$  na koncentraciju ATP-a ( $\gamma_{\text{ADK}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{adenozin}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $t = 24 \text{ h}$ )

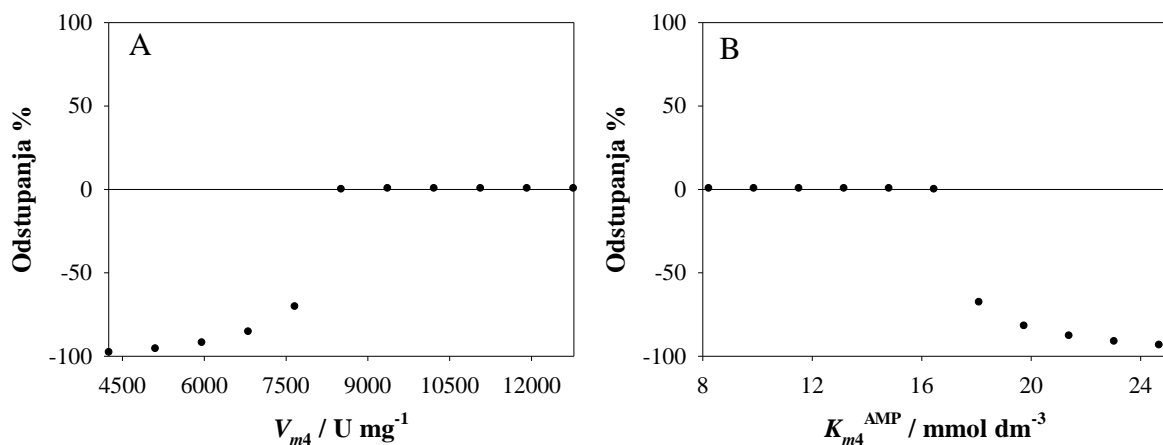
Utjecaj promjene vrijednosti maksimalne brzine napredne reakcije katalizirane enzimom PPK2-I,  $V_{m3}$ , na sustav je prikazan slikom 5.20.A. Sličan je utjecaj primjećen u variranju maksimalne brzine  $V_{m1}$  u naprednoj reakciji kataliziranoj enzimom ADK. Vidljivo je da već pri smanjenju vrijednosti  $V_{m3}$  od 10% dolazi do pada koncentracije ATP-a za više od 50%, a daljnjim smanjenjem do pada koncentracije za 100%. Na slici 5.20.B je vidljiv velik utjecaj variranja vrijednosti Michaelisove konstante  $K_{m3}^{\text{ADP}}$ , gdje već pri povećanju vrijednosti od 10% dolazi do smanjenja koncentracije ATP-a za 50%. Slike 5.20.C i 5.20.D prikazuju utjecaj variranja vrijednosti Michaelisovih konstanti  $K_{m3}^{\text{Mg}^{2+}}$  i  $K_{m3}^{\text{polyP}}$  na sustav te je u oba slučaja primjećen značajan pad koncentracije ATP-a pri promjenama vrijednosti parametara većim od 10%. Povećanjem vrijednosti svih Michaelisovih konstanti u ovoj reakciji, dolazi do

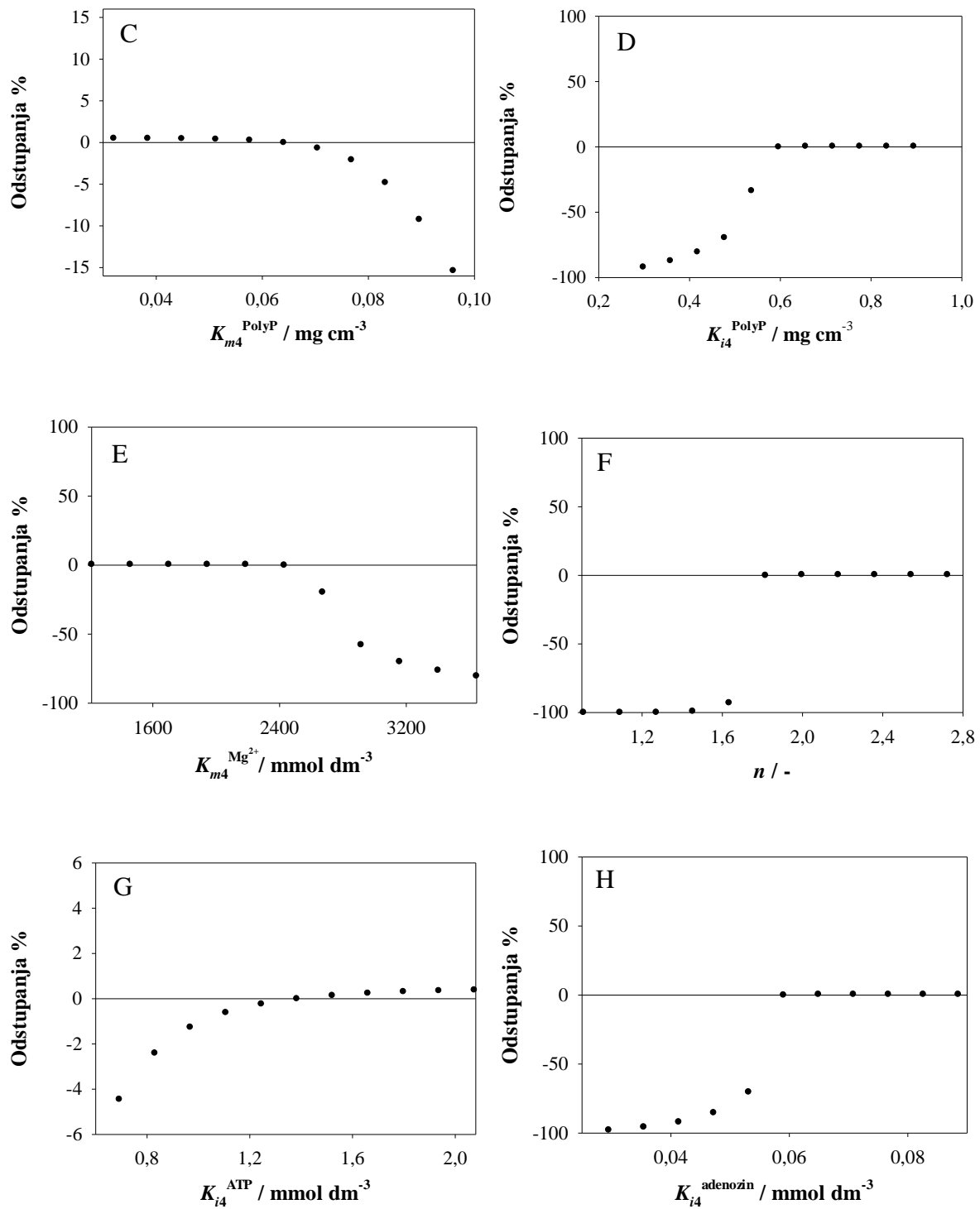
zmanjenja afiniteta enzima prema supstratima i kofaktoru te posljedično opadanja koncentracije ATP-a u sustavu. Vrlo izražen negativan utjecaj imaju konstante inhibicije  $K_{i3}^{AMP}$  i  $K_{i3}^{adenozin}$  kako je prikazano na slikama 5.20.F i 5.20.G. Konstanta inhibicije  $K_{i3}^{polyP}$ , kako prikazuje slika 2.20.E, također ima negativan utjecaj na sustav za razliku od  $K_{i1}^{polyP}$  u naprednoj reakciji kataliziranom enzimom ADK. Isto kao i u naprednoj reakciji kataliziranoj enzimom ADK, smanjenjem konstanti inhibicija smanjuje se granica koncentracije komponente pri kojoj ona počinje djelovati inhibitory. Smanjenje vrijednosti Michaelisovih konstanti i povećanje vrijednosti konstanti inhibicija u ovoj reakciji nema utjecaj na koncentraciju ATP-a.

### 5.2.3. Analiza osjetljivosti parametara reakcija kataliziranih enzimom PPK2-II

#### 5.2.3.1. Analiza osjetljivosti parametara napredne reakcije katalizirane enzimom PPK2-II

Na slici 5.21. su prikazani utjecaji kinetičkih parametara napredne reakcije katalizirane enzimom PPK2-II na koncentraciju ATP-a.





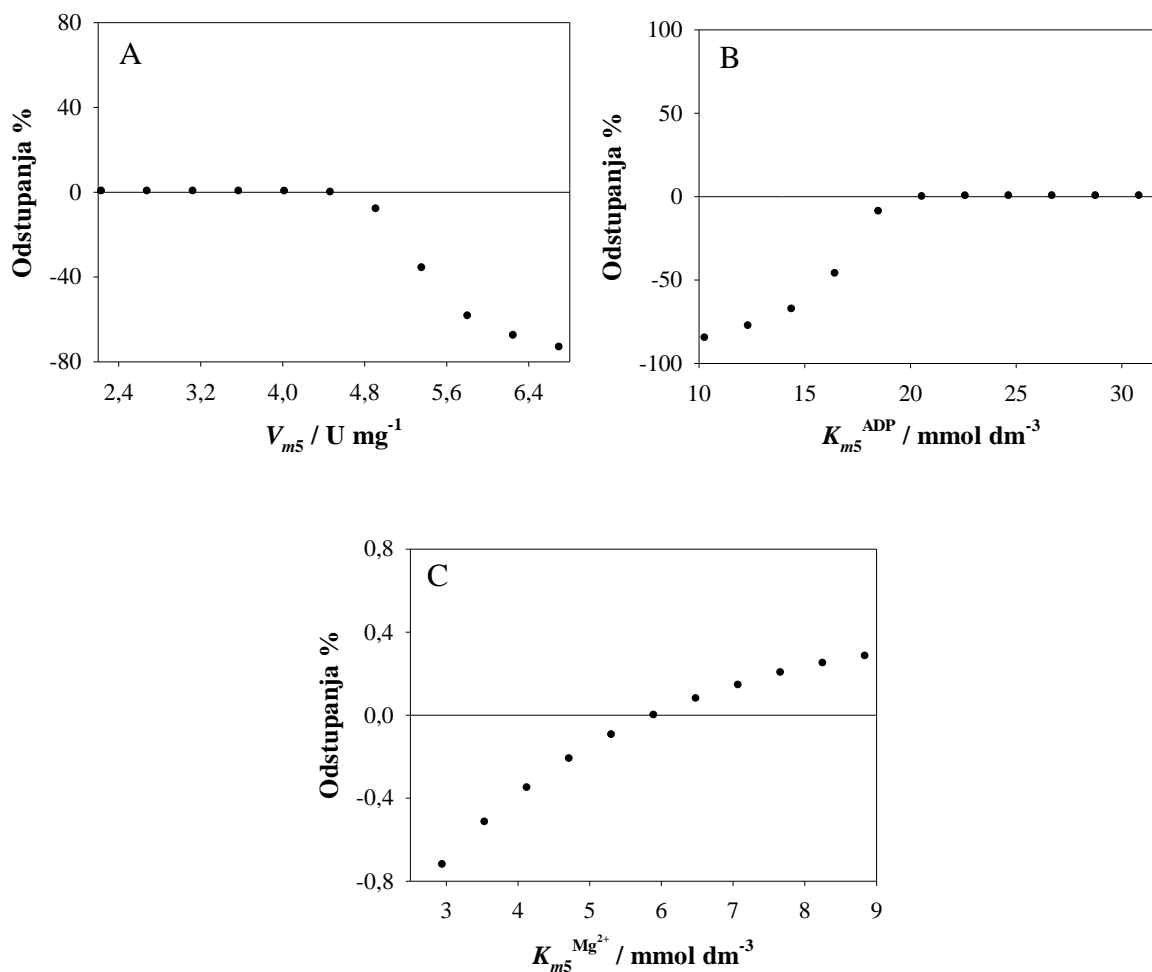
Slika 5.21. Utjecaj parametra A.  $V_{m4}$ , B.  $K_{m4}^{AMP}$ , C.  $K_{m4}^{PolyP}$ , D.  $K_{i4}^{PolyP}$ , E.  $K_{m4}^{Mg^{2+}}$ , F.  $n$ , G.  $K_{i4}^{ATP}$ , H.  $K_{i4}^{adenozin}$  na koncentraciju ATP-a ( $\gamma_{ADK} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{PPK2-I} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{PPK2-II} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{adenozin} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{polyP} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{AMP} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{Mg^{2+}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $t = 24 \text{ h}$ )



Slika 5.21.A prikazuje izražen negativan utjecaj smanjenja vrijednosti maksimalne brzine napredne reakcije katalizirane enzimom PPK2-II,  $V_{m4}$ , na sustav. Ponašanje odstupanja je slično kao u naprednoj reakciji kataliziranom enzimom ADK i naprednoj reakciji kataliziranoj enzimom PPK2-I. Povećanje vrijednosti Michaelisovih konstanti  $K_{m4}^{AMP}$  i  $K_{m4}^{Mg^{2+}}$ , prikazano na slikama 5.21.B i 5.21.E, pokazuje negativan utjecaj na sustav zbog izrazitog pada koncentracije ATP-a. Variranje Michaelisove konstante  $K_{m4}^{polyP}$  ne pokazuje značajan utjecaj na sustav prije povećanja njezine vrijednosti za 40% kako je prikazano na slici 5.21.C. Dakle, Michaelisova konstanta  $K_{m4}^{polyP}$  pokazuje najmanji utjecaj na reakciju od svih Michaelisovih konstanti u reakciji. Čak smanjenjem vrijednosti  $K_{m4}^{polyP}$  dolazi do vrlo malog povećanja koncentracije ATP-a. Konstante inhibicije  $K_{i4}^{adenozin}$  i  $K_{i4}^{polyP}$ , prikazane na slikama 5.21.H i 5.21.D, pokazuju negativan utjecaj na sustav pri manjim vrijednostima, s tim da  $K_{i4}^{adenozin}$  najviše utječe na reakciju od svih konstanti inhibicija zbog pada koncentracije ATP-a za više od 50% smanjenjem vrijednosti konstante inhibicije za  $K_{i4}^{adenozin}$ . Iz slike 5.21.G je vidljivo da konstanta inhibicije  $K_{i4}^{ATP}$  nema izrazito negativan utjecaj na sustav. Slikom 5.21.F je prikazan utjecaj variranja parametra  $n$  na sustav. Ponašanje odstupanja je slično kao za konstante inhibicija. Već pri smanjenju vrijednosti za 10% dolazi do velikog pada koncentracije ATP-a, tako da ovaj parametar pokazuje izrazito negativan utjecaj na sustav.

#### 5.2.3.2. Analiza osjetljivosti parametara povratne reakcije katalizirane enzimom PPK2-II

Slika 5.22. prikazuje utjecaje kinetičkih parametara povratne reakcije katalizirane enzimom PPK2-II na koncentraciju ATP-a.

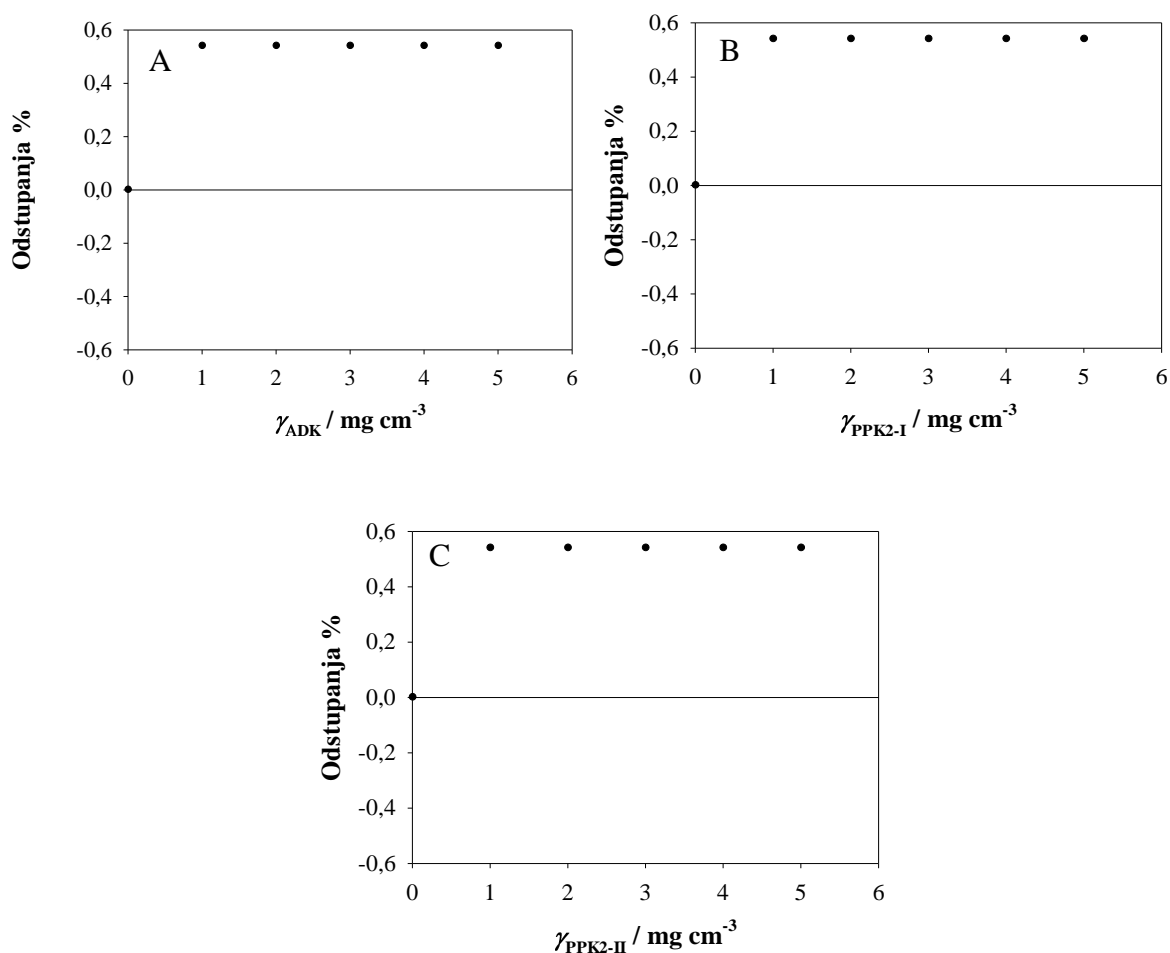


Slika 5.22. Utjecaj parametra A.  $V_{m5}$ , B.  $K_{m5}^{\text{ADP}}$ , C.  $K_{m5}^{\text{Mg}^{2+}}$  na koncentraciju ATP-a, ( $\gamma_{\text{ADK}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-I}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $\gamma_{\text{PPK2-II}} = 0,01 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{adenozin}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $t = 24 \text{ h}$ )

Na slici 5.22.A je prikazan utjecaj variranja maksimalne brzine povratne reakcije katalizirane enzimom PPK2-II,  $V_{m5}$ , na sustav. Povećanjem vrijednosti maksimalne brzine  $V_{m5}$  značajno opada koncentracija ATP-a, dok smanjenje vrijednosti  $V_{m5}$  ne utječe na sustav. Slika 5.22.B prikazuje negativan utjecaj smanjenja vrijednosti Michaelisove konstante  $K_{m5}^{\text{ADP}}$  na sustav, dok povećanje vrijednosti nema utjecaja. Iz slike 5.22.C je vidljivo da variranje Michaelisove konstante  $K_{m5}^{\text{Mg}^{2+}}$  nema značajnog utjecaja na sustav. Ponašanje odstupanja variranjem parametara u ovoj reakciji je identično povratnoj reakciji kataliziranom enzimom ADK jedino što povratna reakcija katalizirana enzimom PPK2-II ima veći utjecaj na sustav ako se gleda stupanj odstupanja.

#### 5.2.4. Utjecaj promjene koncentracije svakog enzima na koncentraciju ATP-a

Za svaki enzim korišten u kaskadi procijenjen je utjecaj promjene koncentracije enzima na koncentraciju ATP-a. Slikom 5.23. su prikazane ovisnosti koncentracije nastalog ATP-a o koncentraciji svakog enzima.



Slika 5.23. Utjecaj koncentracije enzima A, ADK, B. PPK2-I, C. PPK2-II na koncentraciju ATP-a pri procijenjenim vrijednostima kinetičkih parametara reakcija ( $c_{\text{adenozin}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{polyP}} = 0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{AMP}} = 0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 100 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $t = 24 \text{ h}$ )

Prema slikama 5.23.A, 5.23.B i 5.23.C povećanjem koncentracije svih enzima na  $1,01 \text{ mg cm}^{-3}$  dolazi do povećanja koncentracije ATP-a oko 0,6 %. Ukoliko se dalje povećava koncentracija bilo kojeg enzima u sustavu, ne dolazi do promjene koncentracije nastalog ATP-a.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju podataka dobivenih eksperimentima i provedenih simulacija kaskadne reakcije sinteze ATP-a može se zaključiti sljedeće:

1. Povratne reakcije u ovom kaskadnom procesu imaju bitno manju vrijednost maksimalne brzine reakcije u donosu na napredne.
2. Koncentracija polifosfata u sustavu bi trebala biti oko  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  sudeći prema konstanti inhibicije u naprednoj reakciji kataliziranoj enzimom PPK2-I i naprednoj reakciji kataliziranoj enzimom PPK2-II, dok bi koncentracija adenzina, AMP-a, i ATP-a trebala biti što manja.
3. Najveća koncentracija ATP-a od  $19,99 \text{ mmol dm}^{-3}$  je dobivena pri koncentracijama  $20 \text{ mmol dm}^{-3}$  adenzina i  $100 \text{ mmol dm}^{-3}$  magnezija.
4. Povećanje vrijednosti maksimalne brzine reakcije u naprednim reakcijama nema utjecaja na koncentraciju ATP-a, ali pri smanjenju te vrijednosti dolazi do smanjenja koncentracije ATP-a za 80 do 100%.
5. Napredna reakcija katalizirana enzimom PPK2-I ima najveći utjecaj na kaskadu zbog visokih odstupanja koncentracije ATP-a prilikom promjene svih kinetičkih parametara.
6. Povratna reakcija katalizirana enzimom ADK ima najmanji utjecaj na kaskadu zbog niskih odstupanja koncentracije ATP-a prilikom promjene svih kinetičkih parametara.
7. Povećanje koncentracije svakog od enzima korištenih u kaskadi na  $1,01 \text{ mg cm}^{-3}$  dovodi do povećanja nastajanja ATP-a oko 0,6 %, a daljnje povećanje koncentracija enzima u kaskadi nema nikakvog utjecaja na sustav.

## 7. LITERATURA

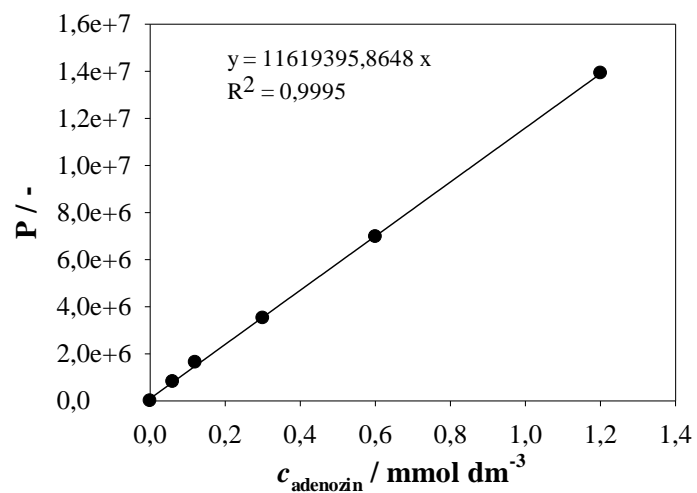
1. Asveld, L., Towards including social sustainability in green and sustainable chemistry., *Curr. Opin. Green Sustain. Chem.*, **19**, (2019) 61–65.
2. Sheldon, R. A., Woodley, J. M. Role of biocatalysis in sustainable chemistry., *Chem. Rev.*, **118**, (2018) 801–838.
3. Pollard, D. J., Woodley, J. M. Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now., *Trends Biotechnol.*, **25**, (2007) 66–73.
4. Sheldon, R. A., Brady, D. The limits to biocatalysis: pushing the envelope., *Chem. Commun.*, **54**, (2018) 6088–6104.
5. Mordhorst, S., Siegrist, J., Müller, M., Richter, M., Andexer, J. N. Catalytic Alkylation Using a cyclic S-adenosylmethionine regeneration system., *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **56**, (2017) 4037–4041.
6. Sudar, M., Vasić-Rački, Đ., Müller, M., Walter, A., Blažević, Z. F. Mathematical model of the MenD-catalyzed 1,4-addition (Stetter reaction) of  $\alpha$ -ketoglutaric acid to acrylonitrile., *J. Biotechnol.*, **268**, (2018) 71–80.
7. Chen, T. L., T.-L., Kim, H., Pan, S.-Y., Tseng, P.-C., Lin, Y.-P., Chiang, P.-C., Implementation of green chemistry principles in circular economy system towards sustainable development goals: challenges and perspectives., *Sci. Total Environ.* **716**, (2020), 136–988..
8. Loste, N., Chinarro, D., Gomez, M., Roldán, E., Giner, B. Assessing awareness of green chemistry as a tool for advancing sustainability., *J. Clean. Prod.*, **256**, (2020) 120–392.
9. Hanrahan, G., Key concepts environmental chemistry, Elsevier, Oxford, 2012., str 297–319.
10. Sheldon, R. A., Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design., *Chem. Soc. Rev.*, **41**, (2012), 1437–1451.
11. Yeung, A. W. K., Tzvetkov, N. T., Gupta, V. K., Gupta, S. C., Orive, G., Bonn, G. K., Atanasov, A. G., Current research in biotechnology: exploring the biotech forefront., *Curr. Res. Biotechnol.*, **1**, (2019) 34–40.

12. Kannan, M. Mubarakali, D., Thiyonila, B., Krishnan, M., Padmanaban, B., Shantkriti, S., Insect gut as a bioresource for potential enzymes - an unexploited area for industrial biotechnology, *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **18**, (2019) 1–5.
13. Fahmideh, L., Khodadadi, E., Khodadadi, E. A review of applications of biotechnology in the environment., *Int. J. Farming* **3**, (2014) 1319–1325.
14. Zheng, G. W.,. An efficient bioprocess for enzymatic production of L-menthol with high ratio of substrate to catalyst using whole cells of recombinant *E. coli.*, *J. Biotechnol.*, **150**, (2010) 108–114.
15. Adrio, J. L., Demain, A. L., Recombinant organisms for production of industrial products. *Bioeng. Bugs.*, **1**, (2010) 116–131.
16. Burk, M. J., Van Dien, S., Biotechnology for chemical production: challenges and opportunities., *Trends Biotechnol.*, **34**, (2016) 187–190.
17. Straathof, A. J. J., S. A., Benjamin, K. R., Takors, R., Wierckx, N., Noorman, H. J., Grand research challenges for sustainable industrial biotechnology., *Trends Biotechnol.*, **37**, (2019) 1042–1050.
18. Robinson, P. K., Enzymes: principles and biotechnological applications., *Essays Biochem.*, **59**, (2015) 1–41.
19. Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., Mehta, P. K., Microbial enzymes: industrial progress in 21st century., *3 Biotech*, **6**, (2016) 1–15.
20. Ringborg, R. H., Woodley, J. M. The application of reaction engineering to biocatalysis., *React. Chem. Eng.*, **1**, (2016) 10–22.
21. Shukla, P., Pletschke, B. I., *Advances in enzyme biotechnology.*, Springer, Grahamstown, 2013., str. 1–2.
22. Woodley, J. M., Integrating protein engineering with process design for biocatalysis., *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, **376**, (2018) 1–13.
23. Cutlan, R., De Rose, S., Isupov, M. N., Littlechild, J. A., Harmer, N. J., Using enzyme cascades in biocatalysis: highlight on transaminases and carboxylic acid reductases., *Biochim. Biophys. Acta-Proteins Proteomics.*, **1868**, (2020) 140–322.
24. Zubay, G., *Biochemistry Third edition*, WCB, Dubuque, 1993., str. 20–21.

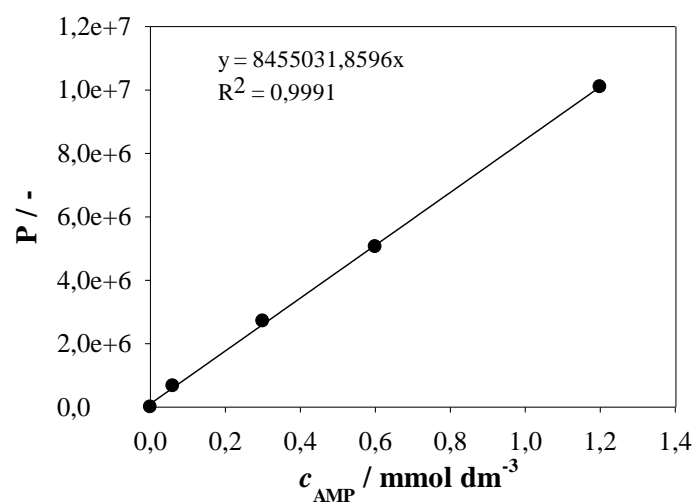
25. Nocek, B. P., Khusnutdinova, A. N., Ruszkowski, M., Flick, R., Burda, M., Batoryova, K., Brown, G., Mucha, A., Joachimiak, A., Berlicki, Ł., Yakunin, A. F. Structural insights into substrate selectivity and activity of bacterial polyphosphate kinases., *ACS Catal.*, **8**, (2018) 10746–10760.
26. Fawaz, M. V., Topper, M. E., Firestine, S. M., The ATP-grasp enzymes., *Bioorg. Chem.*, **39**, (2011) 185–191.
27. Argikar, U. A., Nagar, S., Tweedie, D. J., Enzyme kinetics in drug metabolism: fundamentals and applications, Humana Press, Totowa New Jersey, 2014, str. 9–22.
28. Dunn, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., Prenosil, J. E., Biological reaction engineering, Wiley-VCH, Weinheim, 2003, str. 9, 68–73.
29. Sperl, J. M., Sieber, V., Multienzyme cascade reactions-status and recent advances., *ACS Catal.*, **8**, (2018) 2385–2396.
30. Vasić-Rački, D., Findrik, Z., Vrsalović Presečki, A., Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91**, (2011) 845–856.
31. Findrik Blažević, F., Bioreaktori-nastavni materijali, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.
32. Hall, K. J., Quickenden, T. I., Watts, D. W., Rate constants from initial concentration data., *J. Chem. Educ.*, **53**, (1976) 493–494.
33. Sámano, V., Tirado, A., Félix, G., Ancheyta, J., Revisiting the importance of appropriate parameter estimation based on sensitivity analysis for developing kinetic models., *Fuel*, **267**, (2020) 117–113.
34. Volf, A., Kinetički model enzimske kaskadne reakcije za sintezu ATP-a iz adenzina, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2019.

## 8. PRILOZI

### 8.1. BAŽDARNI DIJAGRAMI

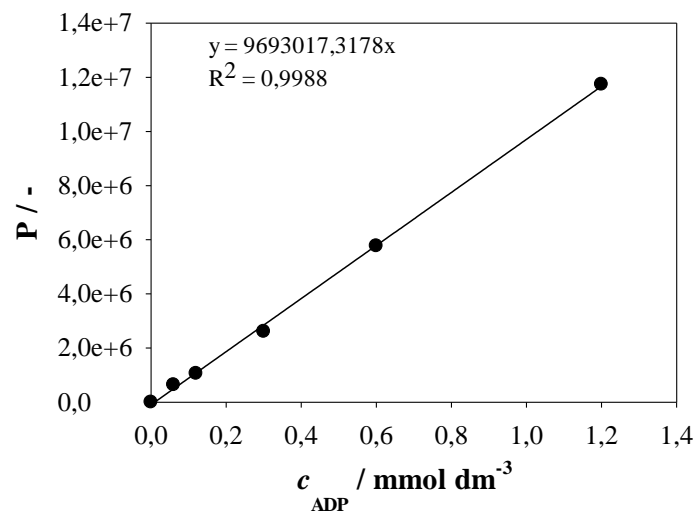


Slika 8.1.1. Baždarni dijagram za adenzin

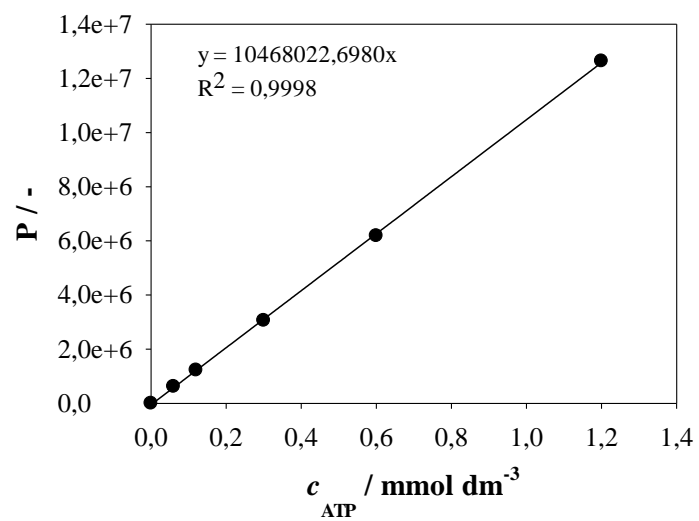


Slika 8.1.2. Baždarni dijagram za AMP





Slika 8.1.3. Baždarni dijagram za ADP



Slika 8.1.4. Baždarni dijagram za ATP

## 8.2. RAČUNALNI KOD ZA SIMULACIJU KASKADNE REAKCIJE

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: catp

Params: Vm1, Kmad1, Kmatp1, Kmmg1, Kiamp1, Kiadp1, Kipoly1, Vm2, Kmamp2, Kmadp2, Kmmg2, Vm3, Kmadp3, Kmmg3, Kmpoly3, Kipoly3, Kiamp3, Kiad3, Vm4, Kmamp4, Kmpoly4, Kipoly4, Kmmg4, n, Kiatp4, Kiad4, Vm5, Kmadp5, Kmmg5

$$r1 = (Vm1 * ce1 * cATP * cAD * cMg) / ((KmATP1 * (1 + (cAMP / KiAMP1) + (cADP / KiADP1)) + (cATP * (1 + cpoly / Kipoly1))) * (Kmad1 + cad) * (KmMg1 + cMg))$$

$$r2 = (Vm2 * ce1 * camp * cadp * cmg) / ((Kmamp2 + camp) * (Kmadp2 + cadp) * (Kmmg2 + cmg))$$

$$r3 = (Vm3 * ce2 * cADP * cpoly * cMg) / ((Kmpoly3 + cpoly + ((cpoly^2) / Kipoly3)) * (KmADP3 * (1 + (cAMP / KiAMP3) + (cad / Kiad3)) + cADP) * (KmMg3 + cMg))$$

$$r4 = (Vm4 * ce3 * camp * cpoly * cmg^n) / ((Kmmg4 + cmg^n) * (Kmpoly4 + cpoly + cpoly^2 / Kipoly4) * (Kmamp4 * (1 + catp / Kiatp4 + cad / Kiad4) + camp))$$

$$r5 = (Vm5 * ce3 * cADP * cMG) / ((KmMg5 + cMg) * (KmADP5 + cADP))$$

$$catp' = -r1 + r2 + r3$$

$$cadp' = r1 - r2 - r3 + r4 - r5$$

$$camp' = r1 - r2 - r4 + r5$$

$$cad' = -r1 + r2$$

$$t = 0$$

$$catp = 0$$

$$cadp = 0$$

$$camp = 0.1$$

$$cad = 0$$

$$cmg = 0$$

cpoly=0.5

ce1=0.01

ce2=0.01

ce3=0.01

Vm1=20.067

Kmad1=0.174

Kmatp1=1.202

Kmmg1=1.766

Kiamp1=1.469

Kiadp1=2.234

Kipoly1=10.081

Vm2=2.299

Kmamp2=0.831

Kmadp2=53.811

Kmmg2=9.214

Vm3=270.800

Kmadp3=3.401

Kmmg3=21.651

Kmpoly3=0.137

Kipoly3=0.550

Kiamp3=0.255

Kiad3=0.769

Vm4=8514.785

Kmamp4=16.456

$K_{mpoly4}=0.064$

$K_{ipoly4}=0.596$

$K_{mmg4}=2428.601$

$n=1.815$

$K_{iatp4}=1.383$

$K_{iad4}=0.059$

$V_{m5}=4.465$

$K_{madp5}=20.547$

$K_{mmg5}=5.895$

.....

## ŽIVOTOPIS

Wanda Plačko [REDACTED] upisuje osnovnu školu Trnsko, u Zagrebu. Za vrijeme osnovnoškolskog obrazovanja, sudjeluje na natjecanjima iz biologije. Nakon završene osnovne škole, 2010. godine upisuje IX. Gimnaziju u Zagrebu općeg usmjerenja. Preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2014. Tijekom studija kao slušatelj sudjeluje na radionicama *Workshop on advanced techniques for the analysis of trace emerging contaminants in environmental samples*, *Applications of statistical physics to biology* i na seminaru *Budućnost ugodnog stanovanja*, konferenciji o ugodnom stanovanju i energetske učinkovitosti kojega vodi Studentska udruga za promicanje energetske učinkovitosti i savjetovanje. Na kraju preddiplomskog studija obavlja stručnu praksu u farmaceutskoj kompaniji Pliva d.o.o. na čiju predloženu temu pod nazivom „Uloga testa biorazgradnje u upravljanju otpadnim vodama“ brani svoj završni rad. 2018. godine završava preddiplomski studij i stječe titulu Sveučilišne prvostupnice inženjerke ekoinženjerstva te pisuje diplomski studij Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija radi kao demonstrator na Zavodu za organsku kemiju na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije i sudjeluje na međunarodnom natjecanju MOL FRESHHH 2018 pod pokroviteljstvom INA-e d.d. Također, 2020. godine obavlja stručnu praksu na institutu Wetsus u Nizozemskoj u trajanju od 7 mjeseci na projektu *Proizvodnja i uporaba biopolimera iz aktivnog mulja u pilot postrojenju*.