

# Proizvodnja optički aktivnog diola korištenjem višeenzimskog sustava

---

**Pintarić, Lela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*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:149:430829>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-01-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lela Pintarić

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lela Pintarić

PROIZVODNJA OPTIČKI AKTIVNOG DIOLA KORIŠTENJEM  
VIŠEENZIMSKOG SUSTAVA

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

izv. prof. dr. sc. Ana Lončarić Božić

Zagreb, srpanj 2015.

*Hvala!*

*Od srca, mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki, na Vašoj nesebičnosti, prenesenom znanju, strpljenju, potpori i brojnim savjetima kojima ste me vodili kroz ovaj rad. Veliko hvala na mentorstvu i pruženoj prilici te poticajima da idem dalje!*

*Mojim roditeljima i bratu, bez kojih ne bih bila ovdje i koji su vjerovali u mene kad možda ni sama nisam. Hvala, za svaki kolokvij i ispit koji ste proživljavali zajedno sa mnom, tješili me i slavili sa mnom. Uspjeli smo!*

*Nikoli, za sva ispitivanja i učenja sa mnom, danju i noću! Hvala na potpori, ohrabrenjima i vjeri u mene. Zajedno smo prošli i to, a znam da često nije bilo lako sa mnom.*

*Mojoj obitelji, Vedrani, prijateljima i kolegama koji su na razne načine sudjelovali u mom studentskom životu, upotpunili ga i učinili nezaboravnim!*

## SAŽETAK

### PROIZVODNJA OPTIČKI AKTIVNOG DIOLA KORIŠTENJEM VIŠEENZIMSKOG SUSTAVA

Enantiočisti kiralni alkoholi koriste se za sintezu različitih industrijski važnih kemikalija, kao što su lijekovi, herbicidi, insekticidi i sl. Jedan od najvažnijih načina njihove proizvodnje je asimetrična redukcija ketona. U ovom je radu, reakcijom benzaldehida i acetaldehida kataliziranom enzimom benzoilformat dekarboksilazom (BFD) iz bakterije *Pseudomonas putida*, sintetiziran (*S*)-2-hidroksipropiofenon ((*S*)-2-HPP). Iz njega je zatim proizveden (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol ((1*S*,2*S*)-1-FPD), a reakcija je katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz bakterije *Lactobacillus brevis* (*LbADH*). Reakcija je provedena uz regeneraciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida, NADH, koja je ostvarena dodatkom amonij formijata i enzima formijat dehidrogenaze iz kvasca *Candida boidinii* (*CbFDH*).

Kinetika enzima BFD opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom supstratom, acetaldehidom. Kinetika enzima *LbADH* uz prisustvo koenzima NADH opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NAD<sup>+</sup>, dok je kinetika povratne reakcije opisana kinetikom drugog reda. Kinetika enzima *CbFDH* opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NADH, s uključenom inhibicijom supstratima iz drugih reakcija, (*S*)-2-HPP i acetaldehidom.

Postavljen je matematički model procesa koji je validiran u kotlastom reaktoru. Usporedno su provedena dva eksperimenta s različitim početnim koncentracijama acetaldehida. Zaključeno je kako je eksperiment bolje provoditi uz više koncentracije acetaldehida, s obzirom na kraće trajanje reakcije i činjenicu da je deaktivacija korištenih enzima u oba slučaja podjednaka i neovisna o koncentraciji acetaldehida.

**Ključne riječi:** benzoilformat dekarboksilaza, alkohol dehidrogenaza, formijat dehidrogenaza, (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol

## ABSTRACT

### PRODUCTION OF OPTICALLY ACTIVE DIOLS BY MULTIENZYME CATALYSIS APPROACH

Enantiopure chiral alcohols are used for synthesis of various industrially important chemicals, such as medicines, herbicides, insecticides, etc. One of the most important methods used to produce them is asymmetric reduction of ketones. In this study, (*S*)-2-hydroxypropiophenone ((*S*)-2-HPP) was synthesized from benzaldehyde and acetaldehyde. The reaction was catalyzed by the enzyme benzoylformate decarboxylase (BFD) from bacteria *Pseudomonas putida*. Then, (1*S*,2*S*)-1-phenylpropane-1,2-diol ((1*S*,2*S*)-1-FPD) was synthesized from (*S*)-2-HPP. This reaction was catalyzed by the enzyme alcohol dehydrogenase from bacteria *Lactobacillus brevis* (*LbADH*). Simultaneously, regeneration of nicotinamide adenine dinucleotide coenzyme (NADH) was carried out by addition of ammonium formate and enzyme formate dehydrogenase from yeast *Candida boidinii* (*CbFDH*).

The BFD kinetics was described by the double substrate Michaelis – Menten model with a competitive inhibition by the substrate, acetaldehyde. The *LbADH* kinetics was described by double substrate Michaelis – Menten model with a competitive inhibition by product, NAD<sup>+</sup>, while the second-order model describes the reverse reaction kinetics. The *CbFDH* kinetics was described by double substrate Michaelis – Menten model with a competitive inhibition by product, NADH, and substrates from main reactions, (*S*)-2-HPP and acetaldehyde.

The mathematical model was developed and validated in a batch reactor. Two experiments with different initial concentrations of acetaldehyde were carried out. It is concluded that it is better to carry out experiments with higher acetaldehyde concentrations, considering shorter reaction time and the fact that the deactivation of the enzymes is equal in both cases and independent on the acetaldehyde concentration.

**Keywords:** benzoylformate decarboxylase, alcohol dehydrogenase, formate dehydrogenase, (1*S*,2*S*)-1-phenylpropane-1,2-diol

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. BOKATALIZATORI.....	2
2.1.1. Benzoilformat dekarboksilaza .....	3
2.1.1.1. Tiamin difosfat .....	4
2.1.2. Alkohol dehidrogenaza.....	5
2.1.2.1. Nikotinamid adenin dinukleotid .....	6
2.1.3. Formijat dehidrogenaza .....	7
2.2. $\alpha$ -HIDROKSI KETONI.....	8
2.3. KIRALNI ALKOHOLI.....	9
2.4. MODELIRANJE BIOTRANSFORMACIJA .....	11
2.4.1. Kinetički modeli enzimatskih reakcija .....	12
2.4.2. Reaktorski modeli.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	16
3.1. APARATURA.....	16
3.1.1. Kotlasti reaktor .....	16
3.1.2. Spektrofotometar .....	17
3.1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	17
3.1.4. Plinska kromatografija.....	18
3.2. ANALITIČKE METODE .....	19
3.2.1. Određivanje aktivnosti enzima benzoilformat dekarboksilaze iz <i>Pseudomonas putida</i> .....	19
3.2.2. Određivanje kinetike enzima benzoilformat dekarboksilaze iz <i>Pseudomonas putida</i> ..	21
3.2.3. Određivanje utjecaja acetaldehida na aktivnost enzima benzoilformat dekarboksilaze iz <i>Pseudomonas putida</i> .....	21
3.2.4. Određivanje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze iz <i>Lactobacillus brevis</i> .....	22
3.2.5. Određivanje kinetike enzima alkohol dehidrogenaze iz <i>Lactobacillus brevis</i> .....	23
3.2.6. Određivanje kinetike enzima formijat dehidrogenaze iz <i>Candida boidinii</i> .....	23
3.2.7. Određivanje koncentracije benzaldehida i ( <i>S</i> )-2-hidroksipropiofenona tekućinskom kromatografijom visokog učinka.....	24
3.2.8. Određivanje koncentracije ( <i>S</i> )-2-hidroksipropiofenona i (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> )-1-fenilpropan-1,2-diola na plinskom kromatografu.....	25
3.3. PROVEDBA EKSPERIMENTATA U REAKTORU.....	26
3.4. OBRADA PODATAKA .....	27

4. MATEMATIČKI MODEL PROCESA PROIZVODNJE (1S,2S)-1-FENILPROPAN-1,2-DIOLA U VIŠEENZIMSKOM SUSTAVU UZ REGENERACIJU KOENZIMA NADH U KOTLASTOM REAKTORU .....	29
4.1.1. Kinetički model .....	29
4.1.2. Reaktorski model.....	31
5. REZULTATI I RASPRAVA .....	32
5.1. KINETIKA ENZIMA BENZOILFORMAT DEKARBOKSILAZE IZ <i>Pseudomonas putida</i> .....	32
5.2. UTJECAJ ACETALDEHIDA NA AKTIVNOST ENZIMA BENZOILFORMAT DEKARBOKSILAZE IZ <i>Pseudomonas putida</i> .....	34
5.3. KINETIKA ENZIMA ALKOHOL DEHIDROGENAZE IZ <i>Lactobacillus brevis</i> .....	35
5.4. KINETIKA ENZIMA FORMIJAT DEHIDROGENAZE IZ <i>Candida boidinii</i> .....	37
5.5. PROIZVODNJA (1S,2S)-1-FENILPROPAN-1,2-DIOLA U VIŠEENZIMSKOM SUSTAVU UZ REGENERACIJU KOENZIMA NADH U KOTLASTOM REAKTORU.....	41
6. ZAKLJUČAK .....	48
7. LITERATURA.....	49
8. PRILOZI.....	53
9. SIMBOLI I SKRAĆENICE .....	57
ŽIVOTOPIS .....	60



## 1. UVOD

Enantiočisti kiralni alkoholi koriste se za sintezu različitih industrijski važnih kemikalija, kao što su lijekovi, herbicidi, insekticidi i sl. Jedan od najvažnijih načina njihove proizvodnje je asimetrična redukcija ketona. Iako se u tu svrhu u industriji najčešće koriste dobro uhodane kemijske metode, u posljednje se vrijeme razvijaju nove, biokatalitičke metode. Razlog tome su bolja svojstva biokatalizatora (enzima) u odnosu na kemijske katalizatore, što se odnosi ponajviše na veliku selektivnost odnosno specifičnost biokatalizatora. Upravo zbog navedenih svojstava smanjuje se i mogućnost nastajanja nusprodukata, odnosno povećava se produktivnost reakcije. Prednosti biokatalizatora, koje su također razlog porasta interesa za razvojem biokatalitičkih metoda, su i blagi uvjeti (tlak, temperatura, pH) u kojima se provode reakcije, a time i manji energetske zahtjevi i troškovi procesne opreme te činjenica da su biokatalizatori produkti živih stanica zbog čega se na kraju procesa lako razgrađuju u okolišu. Sinteza enantiočistog  $\alpha$ -hidroksi ketona, korištenog za proizvodnju optički aktivnog diola, provedena je iz aldehida također biokatalitičkom reakcijom.

Biokatalitičke reakcije mogu biti katalizirane izoliranim biokatalizatorima ili korištenjem cijelih stanica. Prednosti korištenja izoliranih biokatalizatora su izbjegavanje neželjenih reakcija te njihova viša aktivnost. Biokatalizatori su ovisni o koenzimima (kofaktorima) čije prisustvo u sustavu osigurava njihovu katalitičku aktivnost. S obzirom na visoku cijenu koenzima, ne koriste se kao stehiometrijski reagensi već ih je potrebno regenerirati.

U ovom je radu proizveden keton, (*S*)-2-hidroksipropiofenon, iz benzaldehida i acetaldehida, biokatalitičkom reakcijom uz biokatalizator benzoilformat dekarboksilazu izoliranu iz bakterije *Pseudomonas putida* i koenzim tiamin difosfat. Iz ketona je zatim proizveden kiralni alkohol, (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol, također biokatalitičkom reakcijom, uz biokatalizator alkohol dehidrogenazu izoliranu iz bakterije *Lactobacillus brevis* i koenzim nikotinamid adenin dinukleotid. Istovremeno je provedena i regeneracija navedenog koenzima uz biokatalizator formijat dehidrogenazu izoliranu iz kvasca *Candida boidinii*.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BIODKATALIZATORI

Biokatalizatori ili enzimi su organske molekule velike molekulske mase koje kataliziraju biokemijske reakcije te su po svom sastavu proteini. (Denniston et al., 2008) Kataliziraju specifične reakcije (hidrolize, oksidacije i redukcije, izomerizacije i sl.) koje se odvijaju u blagim uvjetima, sličnim onim u živoj stanici, na način da snižavaju energiju aktivacije kemijske reakcije promjenom reakcijskog puta što uzrokuje porast brzine reakcije. U odsutstvu enzima i pri blagim uvjetima tlaka i temperature, većina biokemijskih reakcija odvijala bi se vrlo sporo ili se uopće ne bi odvijala.

Prednosti biokatalizatora u odnosu na konvencionalne kemijske katalizatore su blagi procesni uvjeti (sobna temperatura, atmosferski tlak, neutralni pH), a samim time i manji energetski zahtjevi kao i troškovi procesne opreme. Kao prednost biokatalizatora izdvaja se i njihova selektivnost, odnosno specifičnost. Razlikujemo četiri vrste specifičnosti: apsolutna (kataliziranje reakcije u kojoj sudjeluje točno određeni supstrat), grupna (kataliziranje reakcije u kojoj sudjeluje supstrat s određenom atomskom grupom), reakcijska (kataliziranje određenog tipa reakcije) i stereospecifičnost (kataliziranje reakcija u kojima je zastupljeni supstrat određene stereokemijske forme). (Findrik, 2004) Upravo kataliziranje reakcija u vrlo uskom području supstrata, odnosno kataliziranje isključivo odabranih reakcija, eliminira mogućnost stvaranja nepoželjnih nusprodukata čime se povećava i produktivnost reakcije. Produkti koji nastaju su vrlo čisti pa se smanjuju i troškovi njihove izolacije kao i opterećenje okoliša koje proces uzrokuje. (Mayer, 2011, Wohlgemuth, 2011) Ipak, primjena biokatalizatora u industriji ograničena je uslijed njihovih nedostataka kao što su visoka tržišna cijena izoliranih biokatalizatora, njihova nestabilnost i dostupnost u malim količinama. Također, topljivi su u vodi te ih je zahtjevno i skupo separirati iz reakcijske smjese na kraju katalitičkog procesa. (D'Souza, 1999)

U prirodi postoji oko 25.000 različitih biokatalizatora, a do sada ih je izolirano preko 3.000. (Loughlin, 2000) Mogu se podijeliti ([http://www.bionet-skola.com/w/Enzimi#Podela\\_enzima](http://www.bionet-skola.com/w/Enzimi#Podela_enzima)):

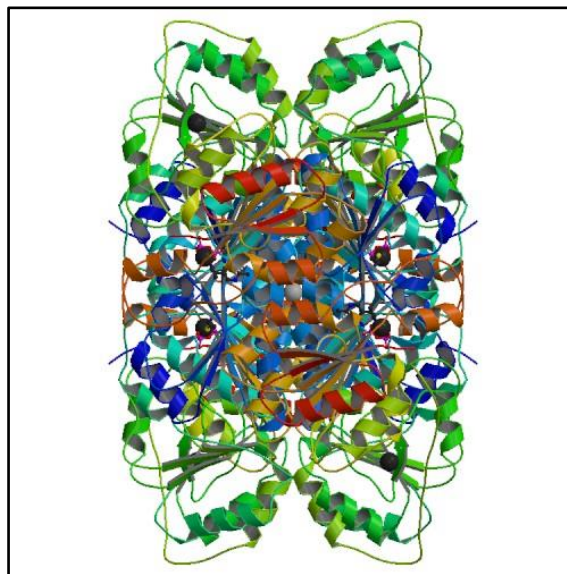
- prema građi: jednostavni (čisti protein) i složeni enzimi (protein i neproteinski dio, npr. koenzim);
- prema mjestu djelovanja: endoenzimi, egzoenzimi i proenzimi;

- prema katalitičkom djelovanju: oksidoreduktaze (dehidrogenaze, oksidaze, peroksidaze, hidrosilaze, oksigenaze), transferaze, hidrolaze, liaze (karboksilaze, aldolaze, dehidrataze itd.), izomeraze (racemaze, cis-trans izomeraze, epimeraze) i ligaze.

Katalitičko djelovanje određenih vrsta enzima ovisi o koenzimima ili kofaktorima, niskomolekularnim komponentama odnosno malim neproteinskim česticama koje su vezane za enzim jačim ili slabijim vezama. Oni služe za prijenos kemijskih grupa od jednog do drugog reaktanta, a mnoge katalitičke sposobnosti enzima ovise o njima jer vezanjem koenzima za enzim, enzim postaje katalitički aktivan. (Loughlin, 2000, Poljanac, 2004) Jedan od najvažnijih koenzima je nikotinamid adenin dinukleotid – oksidirani oblik ( $\text{NAD}^+$ ) koji primanjem hidrida sa supstrata prelazi u svoj reducirani oblik (NADH).

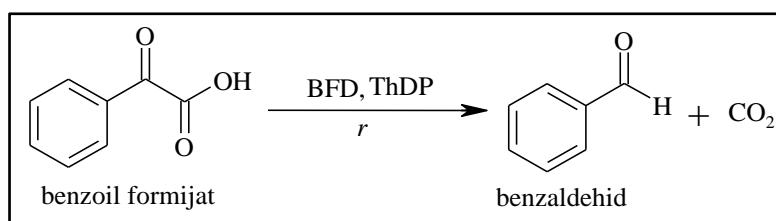
### 2.1.1. Benzoilformat dekarboksilaza

Enzim benzoilformat dekarboksilaza (BFD; Slika 2.1) može se izolirati iz bakterija kao što su *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoaeticus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Ubraja se u skupinu liaza koje kataliziraju adiciju ili eliminaciju kovalentnih veza (najčešće C – C, C – O i C – N) uz nastanak dvostruke veze. Supstrat liazama, za dobivanje alkohola, najčešće su ketoni i aldehidi.



Slika 2.1 Kristalna struktura benzoilformat dekarboksilaze (Izvor: RCSB PDB, unos 1BFD)

Osnovna enzimatska reakcija BFD je neoksidativna dekarboksilacija benzoil formijata do benzaldehida (Slika 2.2). Potencijal enzima BFD da katalizira nastajanje C – C veze prvi su uočili Wilcocks i suradnici (Wilcocks et al., 1992) promatrajući formaciju (S)-2-hidroksi-1-fenil-propanona kada je benzoil formijat bio dekarboksiliran uz prisustvo acetaldehida korištenjem sirovog ekstrakta stanica *Pseudomonas putida*. Slični rezultati dobiveni su korištenjem benzaldehida i acetaldehida za karboligaciju. (Demir et al., 1999)



Slika 2.2 Općenita shema reakcije neoksidativne dekarboksilacije benzoil formijata do benzaldehida koju katalizira biokatalizator benzoilformat dekarboksilaza uz prisustvo koenzima tiamin difosfata

Benzoilformat dekarboksilaza može se izolirati u većim količinama iz bakterije *Pseudomonas putida*. Kvartarne je strukture i ovisan o koenzimu tiamin difosfatu. Prihvaća širok spektar aldehida kao supstrata za katalizu enantioselektivne sinteze  $\alpha$ -hidroksi ketona, koji su vrlo korisni u preparativnoj organskoj kemiji. (Demir et al., 1999) Primjerice, koriste se za proizvodnju antifungalnih lijekova, antidepresiva i lijekova za odvikavanje od pušenja. (Pepper et al., 2011)

### 2.1.1.1. Tiamin difosfat

Tiamin difosfat (*engl. Thiamine diphosphate; ThDP*) je koenzim dekarboksilaza  $\alpha$ -keto kiselina i aldehyd transferaza. Enzimi ovisni o ThDP imaju potencijal za stvaranje i kidanje C – C veza, a obje reakcije katalizirane su enzimima poput dekarboksilaze  $\alpha$ -keto kiseline, trans-ketolaze, acetolaktat sintaze i ThDP dehidrogenaze. (Iding et al., 1998) Zajednička značajka enzima ovisnih o ThDP je stvaranje intermedijera ThDP vezanog karbaniona nakon cijepanja C – C veze (dekarboksilacija). Dobiveni intermedijer naziva se „aktivni aldehyd“ i upravo se prema vrsti „aktivnog aldehyda“ koji nastaje razlikuju enzimi ove skupine. Dekarboksilaza  $\alpha$ -keto kiseline omogućava protoniranje intermedijera, a kao glavni produkti nastaju odgovarajući aldehydi.

Enzimi ovisni o koenzimu ThDP mogu katalizirati i reakciju aciloiniske kondenzacije koja dovodi do nastajanja kiralnih  $\alpha$ -hidroksi ketona, zbog čega su zanimljivi katalizatori za biotransformacije. Kiralni  $\alpha$ -hidroksi ketoni su višenamjenske sirovine u organskoj kemiji te se koriste u farmaciji za sintezu vitamina E i antifugalnih lijekova. (Iding et al., 1998)

### 2.1.2. Alkohol dehidrogenaza

Enzim alkohol dehidrogenaza (ADH; Slika 2.3) pripada skupini oksidoreduktaza. Katalizira enantioselektivnu redukciju ketona pri čemu nastaju odgovarajući alkoholi. Pritom dolazi do redukcije koenzima nikotinamid adenin dinukleotida ( $\text{NAD}^+$ ), o čijem prisustvu ovisi reakcija, a koji prelazi u svoj reducirani oblik (NADH).

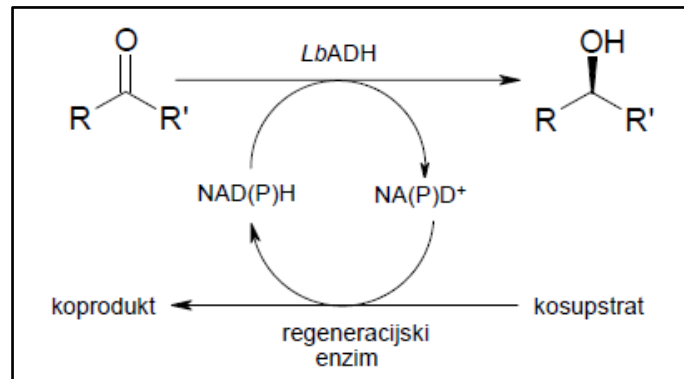


Slika 2.3 Kristalna struktura alkohol dehidrogenaze izolirane iz jetre konja, kompleksirane s oksidiranom formom nikotinamid adenin dinukleotida i supstituirane s benzil alkoholima (Izvor: RCSB PDB, unos 1HLD)

Alkohol dehidrogenaza iz bakterije *Lactobacillus brevis* (*LbADH*) po strukturi je dimer molekularne mase između 104 – 107 kDa (Hummel et al., 1997, Niefind et al., 2000) te se sastoji od dviju identičnih podskupina (homodimer). Aktivnost mu je prilično visoka i iznosi oko  $A_5 = 90 \text{ U mg}^{-1}$ . (Trivedi et al., 2005) Upravo su visoka aktivnost ovog biokatalizatora za širok raspon supstrata (jednostavni aromatični ketoni, keto-esteri, razgranati derivati acetofenona, itd.) i njegova visoka stabilnost u različitim vrstama medija razlozi porasta interesa za primjenu *LbADH*. (Riebel et al., 2003, Leuchs & Greiner, 2011) Ipak, stabilnost

*LbADH* ovisi o prisustvu aditiva ili organskih otapala, pH i prirodni pufera, ionskoj jakosti, temperaturi i sl. Stoga je važno ispitati stabilnost *LbADH* u uvjetima u kojima se želi provesti reakcija.

Općenita shema asimetrične redukcije ketona uz prisustvo enzima *LbADH* i koenzima nikotinamid adenin dinukleotida te njegovu istovremenu regeneraciju odgovarajućim enzimom prikazana je Slikom 2.4.



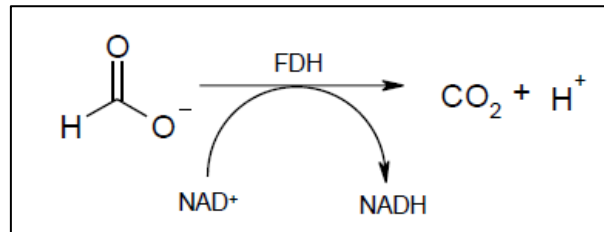
Slika 2.4 Općenita shema reakcije redukcije ketona u optički aktivan oblik alkohola koju katalizira biokatalizator alkohol dehidrogenaza iz *Lactobacillus brevis* uz prisustvo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida te njegovu regeneraciju

### 2.1.2.1. Nikotinamid adenin dinukleotid

Nikotinamid adenin dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) je najvažniji oksidoreduktazni koenzim koji primanjem vodikovog iona prelazi u reducirani oblik (NADH). Reverzibilni transfer vodikovog iona iz reduciranog supstrata u NAD<sup>+</sup> i obrnuto je stereoselektivan i karakterističan za svaki pojedini enzim. (Bruiee & Benkovic, 1965) Nikotinamid koenzimi obično se ne vežu na enzime kovalentnom vezom pa se lagano disociraju. Preskupi su da bi ih se koristilo kao stehiometrijske reagense zbog čega je potrebno pronaći način njihove regeneracije ukoliko enzim zahtjeva prisustvo koenzima. Regeneracijom se može utjecati i na pomicanje reakcijske ravnoteže, odnosno termodinamički nepovoljnu reakciju može se pretvoriti u termodinamički povoljnu, sprječavanjem akumulacije produkta koenzima koji bi mogao inhibirati proces. (Vrsalović Presečki, 2006)

### 2.1.3. Formijat dehidrogenaza

Enzim formijat dehidrogenaza (FDH) ubraja se u skupinu  $\text{NAD}^+$  ovisnih oksidoreduktaza koje se međusobno razlikuju u kvartarnoj strukturi, prisustvu i tipu neproteinske skupine te u specifičnosti prema supstratu. Katalizira oksidaciju iona formijata do ugljikova dioksida pri čemu donira elektrone  $\text{NAD}^+$  koji se reducira do NADH (Slika 2.5). Zanimljivo je da prilikom ove reakcije ne dolazi do otpuštanja vodikovog iona kao kod drugih dehidrogenaza.



Slika 2.5 Shema reakcije oksidacije formijata u ugljikov dioksid katalizirane formijat dehidrogenazom uz redukciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida

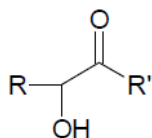
Formijat dehidrogenaza je po strukturi dimer molekularne mase između 74 – 84 kDa (Schüte et al., 1976), koji se sastoji od dviju identičnih podskupina, ne sadrži metalne ione ili neproteinske skupine te je visoko specifičan za formijat i  $\text{NAD}^+$ . (Tishkov & Popov, 2004) Ima dosta malu aktivnost, svega  $A_5 = 3 \text{ U mg}^{-1}$ , no najuspješnije regeneracije koenzima NADH dosad su bile postignute upravo korištenjem enzima FDH. (Riebel et al., 2003) Glavna prednost mu je što je katalitička reakcija praktički ireverzibilna i gotovo 100 %-tne konverzije. (Schirwitz et al., 2007) Također, formijat i ugljikov dioksid nemaju značajniji utjecaj na aktivnost preostalih prisutnih enzima koji koriste nastali NADH. (Goldberg et al., 2007) Općenito su formijat dehidrogenaze aktivne za širok raspon pH (pH = 5,5 – 11,0) zbog čega se istovremeno mogu primijeniti s drugim dehidrogenazama. (Schirwitz et al., 2007) Jedna od najčešće korištenih formijat dehidrogenaza za regeneraciju koenzima NADH u reakcijama koje se provode u bioreaktorima je formijat dehidrogenaza izolirana iz kvasca *Candida boidinii* (CbFDH; Slika 2.6). (Sakai et al., 1997, Goldberg et al., 2007)



Slika 2.6 Kristalna struktura  $\text{NAD}^+$  ovisne formijat dehidrogenaze izolirane iz kvasca *Candida boidinii* (Izvor: RCSB PDB, unos 2J6I)

## 2.2. $\alpha$ -HIDROKSI KETONI

Enantiočisti  $\alpha$ -hidroksi ketoni (Slika 2.7) važna su sirovina pri sintezi biološki aktivnih spojeva. Upravo zbog toga je jedan od glavnih fokusa istraživanja farmaceutske industrije razvoj učinkovite sinteze enantiočistih  $\alpha$ -hidroksi ketona s obzirom na njihovu zastupljenost u antidepresivima, selektivnim inhibitorima pri proizvodnji amiloid- $\beta$  proteina (koriste se u liječenju Alzheimerove bolesti) i antitumorskim lijekovima. Isto tako, zbog sposobnosti izgradnje većih molekula, od posebne su važnosti za dobivanje finih kemikalija, a mogu se koristiti i u pripremi drugih važnih struktura, poput amino alkohola i diola. (Kurlemann & Liese, 2004)



Slika 2.7 Općenita struktura  $\alpha$ -hidroksi ketona

Postoje tri različita biokatalitička pristupa za efikasnu proizvodnju  $\alpha$ -hidroksi ketona. Prvi se odnosi na primjenu liaz ovisnih o tiamin difosfatu (ThDP – liaz) za katalizu karboligacije aldehida čime nastaju enantiočisti  $\alpha$ -hidroksi ketoni iz jeftinih aldehida.



Korištenje dvofaznog medija s rekombinantnim cijelim stanicama koje sadrže liaze rezultira produktivnošću od 80 – 100 g L<sup>-1</sup> s visokom enantiospecifičnošću. Sljedeći pristup za proizvodnju  $\alpha$ -hidroksi ketona obuhvaća primjenu hidrolaza koje uspješno razgrađuju racemate. Maksimalno iskorištenje ovakvog pristupa je 50% i tradicionalna kataliza lipazom kombinira se s racemizacijom preostalog supstrata. Navedeno se može provesti *in situ* ili u različitim odjeljcima čime se postiže visoka konverzija (> 90%) i vrlo visoka enantiospecifičnost (> 99%). Treći pristup za proizvodnju  $\alpha$ -hidroksi ketona je redoks postupak s cijelim stanicama, kataliziran različitim mikroorganizmima, pomoću izoliranog enzima ili cijelih stanica. Primjenom redoks mehanizma, mogu se koristiti različiti postupci za postizanje visoke konverzije i dobivanje enantiočistih produkata. Neki enantiočisti  $\alpha$ -hidroksi ketoni mogu nastati redukcijom diketona i selektivnom oksidacijom susjednih diola.

Navedena tri pristupa predstavljaju korisne i ekološki prihvatljive načine sinteze, primjer su kako biokataliza pomaže u standardnim procesima sinteze te kako se njihovom integracijom može postići veća konverzija i enantioselektivnost nastalih produkata. (Hoyos et al., 2010)

### 2.3. KIRALNI ALKOHOLI

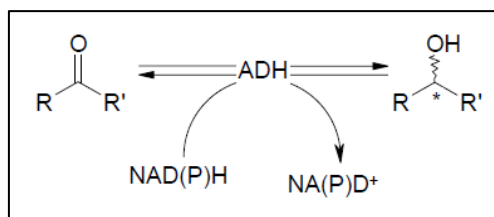
Kiralne molekule (enantiomeri) su molekule koje su u zrcalnom odnosu, tj. odnose se kao predmet i njegova zrcalna slika, a uzajamno se ne mogu preklopiti. Premda se čini da su razlike između enantiomera neznatne, svojstvo nemogućnosti preklapanja pojedinih spojeva s njihovim zrcalnim slikama ima značajnu ulogu u prirodnim procesima. Primjerice, esencijalne aminokiseline mogu se pojaviti kao enantiomerni parovi, no, u većini slučajeva, samo će jedan enantiomer iz para biti biološki aktivan, odnosno iskoristiv živim organizmima. (Pine, 1994)

Enantiomeri se odlikuju svojstvom optičke aktivnosti, odnosno zakreću ravninu polariziranog svjetla. Iako je kiralnost potreban uvjet za optičku aktivnost, kiralni spojevi ne moraju nužno pokazati optičku aktivnost. Određeni spojevi su smjesa dvaju jednako zastupljenih enantiomera od kojih svaki zakreće ravninu polariziranog svjetla za isti iznos, ali u suprotnim smjerovima i optička se aktivnost tada ne može zapaziti. Kiralni spojevi koji ne pokazuju optičku aktivnost nazivaju se racemični spojevi. (Pine, 1994) Aktivnost optički čiste komponente obično je veća od aktivnosti racematne smjese.

Kiralne komponente mogu se primjenjivati direktno u prehrani ili kao gradivni elementi u proizvodnji kompleksnih molekula kao što su lijekovi, herbicidi, insekticidi, itd. Navedeni proizvodi tradicionalno se dobivaju i prodaju kao racemati koji čine 90% ukupnog broja optički aktivnih komponenti na farmaceutskom tržištu. (Poljanac, 2004)

Jedna od najvažnijih reakcija proizvodnje enantiočistih kiralnih alkohola je asimetrična redukcija ketona, a dobiveni produkti mogu se koristiti za sinteze različitih industrijski važnih kemikalija. Asimetrična redukcija ketona može se ostvariti primjenom dviju metoda: kemijske i biokatalitičke. (Nakamura et al., 2003) U industriji se najčešće koriste dobro uhodane kemijske metode, no u posljednjih desetak godina raste interes za proizvodnjom enantiočistih kiralnih molekula primjenom biokatalitičkih metoda. (Goldberg et al., 2007) Navedeni porast interesa može se pripisati vrlo dobrim svojstvima biokatalizatora u odnosu na kemijske katalizatore (visoka enantio-, regio- i kemoselektivnost), sigurnosti reakcije (blagi uvjeti u kojima se reakcije provode; otapalo je često voda) kao i činjenici da su biokatalizatori produkti živih stanica koji se na kraju procesa lako razgrađuju u okolišu. (Nakamura et al., 2003, Patel, 2008) Isto tako, u posljednje vrijeme tržište traži isključivo optički čiste supstance, s obzirom na to da samo jedan enantiomer ima odgovarajuću aktivnost dok drugi oblik može biti neškodljiv, ali i imati posve različita svojstva koja pak mogu uzrokovati opasne sekundarne efekte. Budući da je obično vrlo teško separirati enantiomere, potrebno je razvijati metode visoko stereoselektivne sinteze. (Poljanac, 2004)

Dobivanje kiralnih alkohola primjenom stereospecifičnih biokatalizatora također je moguće na dva načina. Prvi način odnosi se na optičku rezoluciju racemičnih alkohola ili njihovih derivata; npr. stereospecifična razgradnja jednog stereoizomera u racemičnoj smjesi ili asimetrična hidroliza racemata. Drugi način je direktna sinteza kiralnih alkohola iz prokiralnog spoja. Prednost ovog načina je dostupnost supstrata jer je početni materijal (racemični alkohol) jednak onome u standardnoj kemijskoj rezolucijskoj metodi. Još jedna prednost navedenog načina je teoretska mogućnost proizvodnje kiralnog alkohola iz odgovarajućeg ketona s iskorištenjem od 100%. Stoga je enzimatski katalizirana reakcija dobivanja kiralnih alkohola putem asimetrične redukcije prokiralnih spojeva vrlo obećavajuća za industrijsku proizvodnju. (Goldberg et al., 2007) Shema asimetrične redukcije ketona, kojom nastaje odgovarajući alkohol s kiralnim centrom, u prisutnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) uz istovremenu oksidaciju koenzima NADH prikazana je Slikom 2.8.



Slika 2.8 Asimetrična redukcija ketona katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom uz prisustvo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida

## 2.4. MODELIRANJE BIOTRANSFORMACIJA

Biokatalitički procesi u mnogočemu su slični kemijskim procesima. Najznačajnija razlika je u tome što biokatalitički procesi moraju uzeti u obzir enzimatsku kinetiku i stabilnost enzima. Prije nekoliko godina, modeliranje biotransformacija nije se smatralo važnim u industrijskoj praksi, ali se ta situacija promijenila s potrebom za brzim razvojem biokatalitičkih procesa. (Vasić – Rački et al., 2011)

Matematički model procesa uključuje kinetički i reaktorski model, odnosno bilance tvari komponenata, koji ovise o tipu reaktora. Za razvoj modela potrebno je odrediti kinetiku reakcije. Posebnu pažnju treba obratiti na značajke reakcijskog sustava (pH, temperatura, koncentracija supstrata, produkta i enzima), značajke reakcije (termodinamičke i kinetičke konstante), značajke biokatalizatora (mehanička čvrstoća, aktivnost, stabilnost, molekulska masa) te njihovu međusobnu zavisnost i utjecaj na proces. (Vasić – Rački, 1990)

Enzimatski kinetički model razvija se prema sljedećim koracima: eksperimentalno određivanje početne brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata, matematička obrada dobivenih rezultata i formuliranje izraza za brzinu reakcije, procjenjivanje parametara, matematičko formuliranje ukupne brzine reakcije, eksperimentalno potvrđivanje predviđanja modela, kombiniranje s konfiguracijom reaktora kako bi se pronašla veza između brzine reakcije i koncentracije reaktanata te izračunavanje i predviđanje parametara na temelju razvijenog modela. (Murphy et al., 2002)

Pravilnim odabirom matematičkog modela, osobito kada je povezan s modernim računalnim tehnikama, učinkovito se mogu odrediti optimalni radni uvjeti i mikrookoliš za biokatalizator s ciljem konačnog optimiranja produktivnosti i konverzije supstrata. (Vasić – Rački et al., 2011)

### 2.4.1. Kinetički modeli enzimatskih reakcija

Kod jednosupstratnih reakcija brzina enzimske reakcije opisuje se Michaelis – Menteničinom kinetičkom jednačbom (2.1), koja opisuje ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata i enzima.

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S} \quad (2.1)$$

U navedenom izrazu  $r_S$  je brzina potrošnje supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ],  $c_S$  je koncentracija supstrata [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ],  $V_m$  je maksimalna brzina reakcije [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ], dok  $K_m^S$  predstavlja Michaelis – Menteničinu konstantu [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]. Michaelis i Menten predložili su da se prvo enzim (E) veže sa supstratom (S) stvarajući pritom kompleks enzim – supstrat (ES) (2.2). Kompleks potom može disocirati na enzim i supstrat ili se kemijski promijeniti što rezultira stvaranjem produkta (P) i njegovim odvajanjem od enzima (2.3).



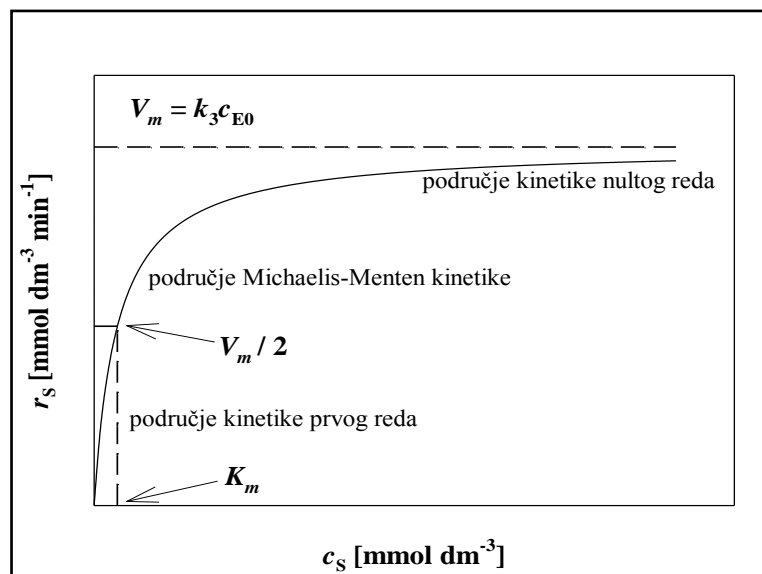
Ključni parametri Michaelis – Menteničine kinetike su  $V_m$ , koji ovisi o koncentraciji enzima  $E_0$  (2.4), i  $K_m^S$ , koji ovisi o konstantama brzina prethodno prikazanih reakcija (2.5).

$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.4)$$

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

Za jednosupstratne reakcije koje slijede Michaelis – Menteničinu kinetiku karakteristična je hiperbolična ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata (Slika 2.9). Brzina reakcije određuje se iz Michaelis – Menteničinog izraza (2.1) te se mogu uočiti tri područja brzine reakcije: područje kinetike prvog reda, područje Michaelis – Menteničine kinetike i područje kinetike nultog reda. U području niske koncentracije supstrata,  $c_S \ll K_m^S$ , pri stalnoj koncentraciji enzima,  $E$ , brzina reakcije je linearno proporcionalna koncentraciji supstrata i to je područje koje se aproksimira kinetikom reakcije prvog reda. Kinetikom nultog reda aproksimira se područje visoke koncentracije supstrata,  $c_S \gg K_m^S$ , u kojem brzina reakcije ne

ovisi o koncentraciji supstrata. Područje koje se nalazi između prethodno opisanih je područje Michaelis – Menteničine kinetike.



Slika 2.9 Grafički prikaz ovisnosti reakcijske brzine o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis – Menteničine kinetike

Dvosupstratna enzimatska kinetika opisuje većinu enzimskih reakcija (Blanch & Clark, 1993), a drugi supstrat najčešće je koenzim. Prikazana dvosupstratna reakcija (2.6) opisuje se jednačbom koja slijedi Michaelis – Menteničinu kinetiku i dana je izrazom (2.7).



$$r = \frac{V_m \cdot c_{S_1} \cdot c_{S_2}}{(K_m^{S_1} + c_{S_1}) \cdot (K_m^{S_2} + c_{S_2})} \quad (2.7)$$

U biokatalitičkim reakcijama često dolazi do promjene aktivnosti enzima koja se očituje smanjenjem brzine enzimске reakcije, odnosno dolazi do inhibicije reakcije uslijed vezanja nekog kemijskog spoja, inhibitora, na aktivno mjesto enzima i samim time do smanjivanja brzine reakcije. Inhibitor može biti supstrat ili produkt neke kemijske reakcije. Razlikujemo tri tipa inhibicije enzima: kompetitivnu, nekompetitivnu i antikompetitivnu. Kompetitivna inhibicija (2.8) odnosi se na slučaj kada se inhibitor veže za aktivno mjesto na enzimu i pritom se sa supstratom natječe za to mjesto. Inhibitor, dakle, konkurira za aktivno mjesto i smanjuje na njemu koncentraciju supstrata što se očituje smanjenjem brzine reakcije pri niskim koncentracijama supstrata. Nekompetitivna inhibicija (2.9) podrazumijeva

ireverzibilno vezanje inhibitora na aktivno mjesto enzima ili njegovo vezanje na mjesto različito od aktivnog mjesta čime se mijenja oblik enzima te se na taj način ometa vezanje supstrata na aktivno mjesto i inhibira brzina enzimske reakcije. (Duraković, 1996) Antikompetitivna inhibicija (2.10) je kombinacija kompetitivne i nekompetitivne inhibicije.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + (1 + \frac{c_i}{K_i}) + c_s} \quad (2.8)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s \cdot (1 + \frac{c_i}{K_i})} \quad (2.9)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(K_m^s + c_s) \cdot (1 + \frac{c_i}{K_i})} \quad (2.10)$$

U navedenim izrazima (2.8 – 2.10)  $c_i$  predstavlja koncentraciju inhibitora [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ], a  $K_i$  konstantu inhibicije [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ].

#### 2.4.2. Reaktorski modeli

Bioreaktori su vrsta kemijskih reaktora u kojima se odvijaju bioprocesi. Koriste se za proizvodnju biomase ili bioprodukta pomoću mikroorganizama ili životinjskih stanica te za biotransformacije pomoću enzima. S obzirom na to mora li proces biti kataliziran biokatalizatorima ili se neke tvari proizvode samo pomoću mikroorganizama, bioreaktore dijelimo na fermentore i enzimske reaktore. Fermentori su bioreaktori u kojima se reakcije odvijaju uz pomoć živih mikroorganizama ili njihovih dijelova (stanica). Enzimski reaktori su bioreaktori u kojima se odvijaju procesi katalizirani biokatalizatorima. Postoji više različitih izvedbi bioreaktora, a tri osnovna tipa su: kotlasti, protočno kotlasti i cijevni reaktor.

Osnovni kriteriji na temelju kojih se odabire tip bioreaktora su tip reakcijskog medija, tip kinetike i oblik biokatalizatora. Cilj je postići što veću produktivnost, odnosno dobiti što više produkta po jedinici reaktorskog volumena, jedinici enzimske aktivnosti biokatalizatora i jedinici vremena. (Vasić – Rački, 1990)

Kotlasti (šaržni ili *batch*) reaktor je zatvoreni sustav u kojemu za vrijeme reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom. Uz pretpostavku idealnog miješanja, sastav je u svakoj točki isti, tj. reakcijska smjesa je homogena. Kotlasti reaktor uvijek radi u nestacionarnom stanju, odnosno sve veličine stanja (sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije i količina oslobođene ili utrošene topline) ovise o vremenu. Temperatura je jedina veličina u reaktoru koja se ne mijenja, odnosno pretpostavlja se izotermni rad. Isto tako, pretpostavlja se da je volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu, tj. da ne dolazi do promjene gustoće. Kotlaste reaktore tehnički je najlakše ostvariti, jednostavne su izvedbe i prilagodljivi su različitim uvjetima i zahtjevima što ih čini nezamjenjivim procesnim jedinicama u kemijskoj industriji. Zbog ekonomičnosti se često koriste za proizvodnju malih količina produkata, a uglavnom se koriste za provedbu reakcija u kapljevitoj fazi.

Bilanca tvari za kotlasti reaktor, uz pretpostavku idealnog miješanja, opisana je izrazom (2.11).

$$r_A \cdot V = - \frac{d(V \cdot c_A)}{dt} \quad (2.11)$$

Uz pretpostavku da je i volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu, odnosno da nema promjene gustoće s vremenom izraz (2.11) se zapisuje kao izraz (2.12).

$$r_A = - \frac{dc_A}{dt} \quad (2.12)$$

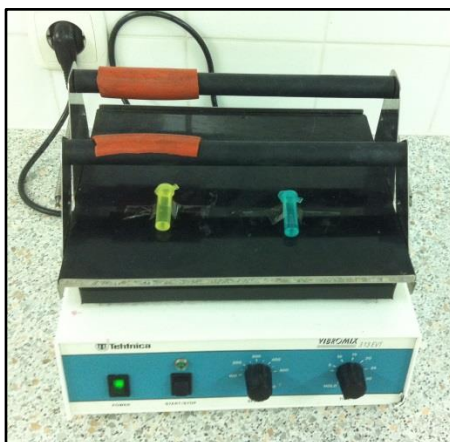
### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. APARATURA

##### 3.1.1. Kotlasti reaktor

Kotlasti (šaržni ili *batch*) reaktor je zatvoreni sustav u kojem za vrijeme reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom. Uz pretpostavku idealnog miješanja, sastav je u svakoj točki isti, tj. reakcijska smjesa je homogena. Kotlasti reaktor radi u nestacionarnom stanju, odnosno sve veličine stanja; sastav reakcijske smjese, brzina kemijske reakcije i količina oslobođene ili utrošene topline, ovise o vremenu. Jedina veličina u reaktoru koja se ne mijenja je temperatura, tj. pretpostavljamo izotermni rad kotlastog reaktora. Uz to, pretpostavlja se i da je volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu, odnosno da ne dolazi do promjene gustoće.

U ovom radu kotlasti reaktori volumena  $V = 10 \text{ cm}^3$  korišteni su za određivanje aktivnosti, odnosno mjerenje kinetike enzima benzoilformat dekarboksilaze, alkohol dehidrogenaze i formijat dehidrogenaze. Isti reaktori korišteni su i za provedbu prvog ciklusa dvaju eksperimenata s različitim početnim koncentracijama reaktanata, acetaldehida i benzaldehida, kojima je proizveden (*S*)-2-hidroksipropiofenon ((*S*)-2-HPP) pri čemu je reakcijski volumen bio  $V = 5 \text{ cm}^3$ . Kotlasti reaktori volumena  $V = 2 \text{ cm}^3$  korišteni su za provedbu drugog i trećeg ciklusa eksperimenata kojima je proizveden (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol ((1*S*,2*S*)-1-FPD) pri čemu je reakcijski volumen bio  $V = 2 \text{ cm}^3$  u drugom, odnosno  $1,5 \text{ cm}^3$  u trećem ciklusu eksperimenata. Svi eksperimenti provedeni su na sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje ostvareno pomoću tresilice (Slika 3.1).



Slika 3.1 Provođenje eksperimenata na tresilici



### 3.1.2. Spektrofotometar

Spektrofotometar je mjerni uređaj kojim se mjeri količina svjetla koju apsorbira uzorak. Apsorpcija svjetlosti kroz otopine matematički se opisuje Beer – Lambertovim zakonom danim izrazom (3.1).

$$ABS = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (3.1)$$

U navedenom izrazu *ABS* predstavlja apsorbanciju na određenoj valnoj duljini svjetlosti,  $\varepsilon$  je molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ], svojstven svakoj molekulskoj vrsti i ovisan o valnoj duljini svjetlosti, *b* je duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm] dok *c* predstavlja koncentraciju tvari u otopini [ $\text{mol dm}^{-3}$ ].

U ovom radu, dvoznačni spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* (Slika 3.2) korišten je za određivanje aktivnosti benzoilformat dekarboksilaze, aktivnosti i kinetike alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis* te kinetike formijata dehidrogenaze iz kvasca *Candida boidinii* pri valnoj duljini  $\lambda = 340 \text{ nm}$ .



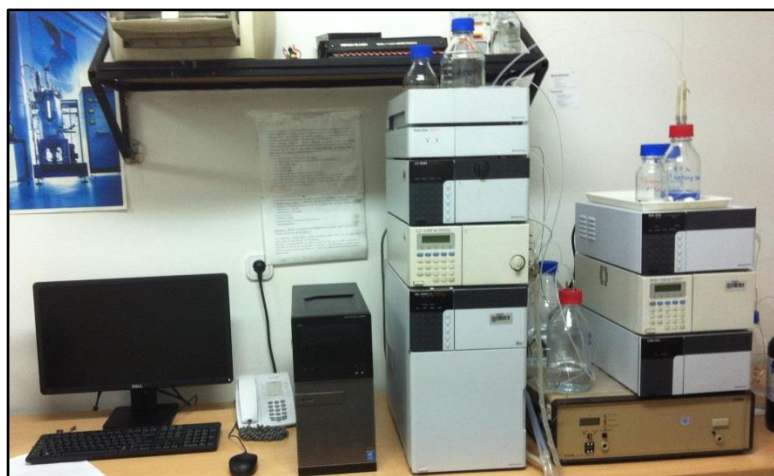
Slika 3.2 Dvoznačni spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

### 3.1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. High performance liquid chromatography; HPLC*) je kromatografska tehnika za analizu i separaciju smjese supstancija. Otopina uzorka injektira se u mobilnu fazu i putuje kroz kolonu, punjenu stacionarnom fazom, pod visokim pritiskom. Interakcije uzorka i mobilne faze sa stacionarnom fazom određuju brzinu eluiranja i separaciju komponenata uzorka, pa se komponente eluiraju s kolone različitom brzinom (imaju različita vremena zadržavanja). Uzorak, nakon kolone, ulazi u UV – detektor koji mjeri apsorbanciju svjetla kod određene valne

duljine što rezultira karakterističnim signalom u kromatogramu. Korištenjem visokog tlaka, povećava se linearna brzina te se komponentama daje manje vremena za zadržavanje čime se poboljšava rezolucija kromatograma. Osnovne komponente sustava su HPLC pumpa, otplinjač, termostat za kolonu, UV detektor, jedinica za vođenje i računalo sa softverom za prikupljanje podataka, *LC Solution*. Potrebni su i odgovarajuća kolona te eluenti. ([https://www.fkit.unizg.hr/images/50010643/KATALOG\\_FKIT.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/images/50010643/KATALOG_FKIT.pdf))

Na HPLC uređaju su tijekom ovog rada mjerene koncentracije benzaldehida i (*S*)-2-hidroksipropiofenona.



Slika 3.3 Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti *Shimadzu* s UV detektorom

#### 3.1.4. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (*engl. Gas chromatography; GC*) je analitička metoda koja se zasniva na različitoj raspodjeli komponenti uzorka između dvije faze od kojih je jedna stacionarna (nepokretna), a druga mobilna (pokretna). Stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna je plinovita. Komponente se pod utjecajem mobilne faze kreću kroz stacionarnu fazu različitom brzinom i tako se razdvajaju. Dobiveni kromatogrami kvalitativno i kvantitativno određuju sastav plinskog ili tekućeg uzorka. Kvalitativna analiza se provodi prema vremenu zadržavanja komponenti, dok kvantitativna analiza uzorka podrazumijeva integriranje pikova odgovarajućih komponenti. Osnovne komponente sustava (Slika 3.4) su Parker 9150 generator vodika, plinski kromatograf koji se sastoji od peći za grijanje kolone, injektora, regulatora tlaka plina nosača, odnosno zraka, te plameno ionizacijskog detektora (*engl. Flame ionization detector; FID*). Cijelim sustavom upravlja softver *GC Solution*. ([https://www.fkit.unizg.hr/images/50010643 /KATALOG\\_FKIT.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/images/50010643 /KATALOG_FKIT.pdf))

Na GC-u su tijekom ovog rada mjerene koncentracije (S)-2-hidroksipropiofenona i (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola.

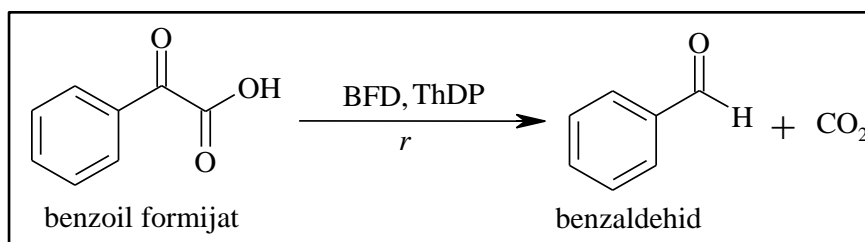


Slika 3.4 Plinski kromatograf *Shimadzu GC – 2014* i *Parker 9150* generator vodika

## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. Određivanje aktivnosti enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida*

Mjerenje aktivnosti enzima benzoilformat dekarboksilaze temeljeno je na reakciji kidanja C – C veze benzoil formijata (Slika 3.5). (Iding et al., 2000)



Slika 3.5 Reakcija dekarboksilacije benzoil formijata katalizirana enzimom benzoilformat dekarboksilazom uz koenzim tiamin difosfat

Aktivnost enzima benzoilformat dekarboksilaze određivana je spektrofotometrijski, praćenjem pada koncentracije benzoil formijata pri valnoj duljini  $\lambda = 340$  nm. Mjerenja su provedena u fosfatnom puferu  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,15$  M, pH = 6, pri sobnoj temperaturi. Za određivanje aktivnosti enzima BFD, osim otopine fosfatnog pufera pH = 6 s 2 mM MgSO<sub>4</sub> i

0,5 mM ThDP, korištena je i otopina benzoil formijata u puferu koncentracije  $c_{\text{benzoil formijat}} = 250 \text{ mmol dm}^{-3}$  te otopina enzima koncentracije  $c_{\text{BFD}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ . Sastav testa za određivanje aktivnosti BFD dan je Tablicom 3.1.

Tablica 3.1 Sastav testa za određivanje aktivnosti enzima benzoilformat dekarboksilaze

OTOPINA	V [cm <sup>3</sup> ]
Fosfatni pufer	0,9
Benzoil formijat	0,05
Enzim BFD	0,05

Komponente testa pomiješane su u kvarcnim kivetama te je na spektrofotometru praćena promjena apsorbancije u vremenu ( $\Delta ABS/\Delta t$ ) iz koje su određene volumna aktivnost ( $A_V$ ), prema izrazu (3.2), i specifična aktivnost enzima ( $A_S$ ), prema izrazu (3.3).

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

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

U navedenim izrazima  $V_r$  je ukupni volumen uzorka u kiveti [cm<sup>3</sup>],  $V_{BFD}$  je volumen dodanog enzima [cm<sup>3</sup>],  $\epsilon_{340}$  je ekstincijski koeficijent [cm<sup>2</sup> μmol<sup>-1</sup>] pri valnoj duljini  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ,  $d$  predstavlja promjer kivete ( $d = 1 \text{ cm}$ ), dok  $\Delta ABS/\Delta t$  predstavlja promjenu apsorbancije u vremenu [min<sup>-1</sup>]. Volumna aktivnost enzima označena je s  $A_V$  [U cm<sup>-3</sup>], specifična aktivnost s  $A_S$  [U mg<sup>-1</sup>], dok  $c_{BFD}$  predstavlja koncentraciju enzima [mg cm<sup>-3</sup>].

Ekstincijski koeficijent za mjerenje aktivnosti enzima benzoilformat dekarboksilaze izračunat je oduzimanjem ekstincijskog koeficijenta benzaldehida od ekstincijskog koeficijenta benzoil formijata, s obzirom na to da obje komponente apsorbiraju svjetlost na navedenoj valnoj duljini, i iznosi  $\epsilon_{340}^{\text{BFD}} = 0,0534 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ . (Husanović, 2012)

### 3.2.2. Određivanje kinetike enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida*

Kinetika enzima benzoilformat dekarboksilaze u reakciji sinteze (*S*)-2-hidroksipropiofenona određena je metodom početnih brzina. Mjerenja su provedena u kotlastom reaktoru u fosfatnom puferu koncentracije  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=7,5$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$  pri sobnoj temperaturi. Reakcijski volumen bio je  $V = 5 \text{ cm}^3$ , a koncentracija enzima benzoilformat dekarboksilaze iznosila je  $c_{\text{BFD}} = 0,25 \text{ mg dm}^{-3}$ . Mjeren je utjecaj različitih koncentracija benzaldehida,  $c_{\text{benzaldehyd}} = 0 - 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ , na početnu reakcijsku brzinu uz konstantnu koncentraciju acetaldehida,  $c_{\text{acetaldehyd}} = 356,41 \text{ mmol dm}^{-3}$ , odnosno utjecaj različitih koncentracija acetaldehida,  $c_{\text{acetaldehyda}} = 0 - 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pri konstantnoj koncentraciji benzaldehida  $c_{\text{benzaldehyd}} = 49,19 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

Iz reaktora su u prvih deset minuta reakcije u pravilnim vremenskim razmacima uzimani uzorci za određivanje aktivnosti enzima, odnosno početne reakcijske brzine. Uzorci su miješani s acetonitrilom u omjeru 1:1 kako bi se zaustavila reakcija te su profiltrirani kako bi se uklonile molekule velike molekulske mase (enzimi). U tako dobivenim uzorcima na HPLC uređaju određena je koncentracija benzaldehida i (*S*)-2-hidroksipropiofenona. Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka promjene koncentracije benzaldehida i (*S*)-2-hidroksipropiofenona s vremenom, određena je aktivnost enzima benzoilformat dekarboksilaze prema izrazu (3.4).

$$A_s = \frac{\frac{dc}{dt}}{c_{\text{BFD}}} \quad (3.4)$$

Primjer određivanja aktivnosti enzima BFD metodom početnih brzina za koncentraciju benzaldehida  $c_{\text{benzaldehyd}} = 6 \text{ mmol dm}^{-3}$  dan je u Prilogu 1 (Slika 8.1 A i B).

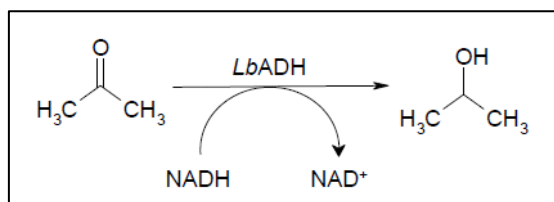
### 3.2.3. Određivanje utjecaja acetaldehida na aktivnost enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida*

S obzirom na to da je u literaturi pronađeno da acetaldehyd značajno utječe na deaktivaciju enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida* (Iding et al., 2000), odnosno da brzina deaktivacije enzima ovisi o njegovoj koncentraciji u otopini, ispitan je utjecaj različitih koncentracija acetaldehida na deaktivaciju enzima. U tu svrhu provedeni su eksperimenti s

različitim početnim koncentracijama acetaldehida,  $c_{\text{acetaldehid}} = 0 - 356 \text{ mmol dm}^{-3}$  i konstantnom koncentracijom enzima,  $c_{\text{BFD}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ . Iz reaktora su u pravilnim vremenskim intervalima uzimani uzorci u kojima je određivana aktivnost enzima BFD na način opisan u poglavlju 3.2.1.

### 3.2.4. Određivanje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis*

Mjerenje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis* (LbADH) u kotlastom reaktoru temeljeno je na reakciji redukcije acetona u izopropanol uz istovremenu oksidaciju koenzima nikotinamin adenin dinukleotida (NADH) (Slika 3.6).



Slika 3.6 Redukcija acetona katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis* uz istovremenu oksidaciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida

Aktivnost enzima LbADH određivana je spektrofotometrijski, praćenjem pada koncentracije NADH na valnoj duljini  $\lambda = 340 \text{ nm}$ , pri kojoj je molarni ekstincijski koeficijent NADH  $\varepsilon_{340}^{\text{NADH}} = 6220 \text{ cm}^2 \text{ mmol}^{-1}$ . Otopine koje su korištene su: fosfatni pufer koncentracije  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1 \text{ M}$ , pH = 7,0, otopina NADH koncentracije  $c_{\text{NADH}} = 2 \text{ mg cm}^{-3}$  i koncentrirana otopina acetona. Sastav testa prikazan je u Tablici 3.2.

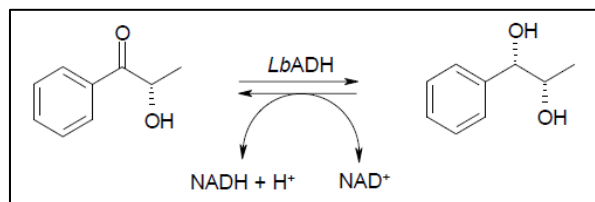
Tablica 3.2 Sastav testa za određivanje aktivnosti enzima LbADH

Komponenta	V [cm <sup>3</sup> ]
Fosfatni pufer	0,89
Otopina NADH	0,05
Aceton	0,05
Uzorak iz reaktora	0,01

Komponente testa pomiješane su u kvarcnim kivetama te je na spektrofotometru praćen pad koncentracije NADH, odnosno promjena apsorbancije u vremenu ( $\Delta ABS/\Delta t$ ) iz koje su određene volumna aktivnost ( $A_V$ ), prema izrazu (3.2), i specifična aktivnost enzima ( $A_S$ ), prema izrazu (3.3).

### 3.2.5. Određivanje kinetike enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis*

Kinetika enzima *LbADH* u reakciji redukcije (*S*)-2-hidroksipropiofenona u (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol (Slika 3.7) određena je spektrofotometrijski metodom početnih brzina.



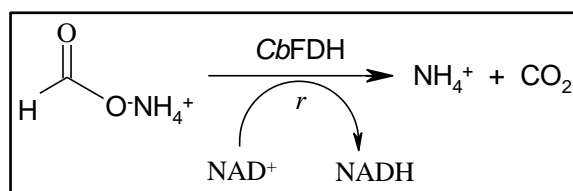
Slika 3.7 Redukcija (*S*)-2-hidroksipropiofenona katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis* uz istovremenu oksidaciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida

Mjerenja su provedena u kotlastom reaktoru u fosfatnom puferu koncentracije  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=7,5$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$  pri valnoj duljini  $\lambda = 340 \text{ nm}$ . Ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji (*S*)-2-HPP mjerena je pri koncentraciji NADH  $c_{\text{NADH}} = 0,138 \text{ mmol dm}^{-3}$ , dok je koncentracija (*S*)-2-HPP varirana u rasponu od  $c_{(\text{S})\text{-2-HPP}} = 0 - 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Prilikom mjerenja ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentraciji NADH, koncentracija (*S*)-2HPP bila je  $c_{(\text{S})\text{-2-HPP}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ , dok je koncentracija NADH varirana u rasponu od  $c_{\text{NADH}} = 0 - 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Ispitan je i utjecaj produkta,  $\text{NAD}^+$ , na početnu reakcijsku brzinu na način da su koncentracije supstrata u reakciji redukcije bile konstantne,  $c_{(\text{S})\text{-2-HPP}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{NADH}} = 0,138 \text{ mmol dm}^{-3}$ , dok je koncentracija  $\text{NAD}^+$  varirana u rasponu od  $c_{\text{NAD}^+} = 0 - 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Koncentracija enzima alkohol dehidrogenaze iznosila je  $c_{\text{LbADH}} = 1 \text{ mg dm}^{-3}$ .

Na temelju eksperimentalno dobivenih podataka promjene apsorbancije s vremenom ( $\Delta\text{ABS}/\Delta t$ ) prema izrazima (3.2) i (3.3) izračunate su volumna, odnosno specifična aktivnost enzima *LbADH* uz korištenje ekstincijskog koeficijenta za NADH.

### 3.2.6. Određivanje kinetike enzima formijat dehidrogenaze iz *Candida boidinii*

Kinetika enzima formijat dehidrogenaze iz kvasca *Candida boidinii* (*CbFDH*) određivana je metodom početnih brzina u reakciji oksidacije amonij formijata u ugljikov dioksid i amonijev ion i istovremenu redukciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (Slika 3.8).



Slika 3.8 Reakcija oksidacije formijata u ugljikov dioksid i vodu katalizirana enzimom formijat dehidrogenazom iz *Candida boidinii* uz istovremenu redukciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida

Mjerenja su provedena u fosfatnom puferu koncentracije  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7,5$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ . Provedene su četiri serije mjerenja kako bi se odredili kinetički parametri. U prvoj seriji mjerenja određivana je aktivnost *CbFDH* s obzirom na promjenu koncentracije amonij formijata,  $c_{\text{amonij formijat}} = 2 - 300 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pri čemu je koncentracija  $\text{NAD}^+$  bila konstantna i jednaka koncentraciji zasićenja,  $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ . U drugoj seriji mjerenja, koncentracija amonij formijata bila je konstantna i jednaka koncentraciji zasićenja,  $c_{\text{amonij formijat}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a mijenjana je koncentracija  $\text{NAD}^+$  u rasponu od  $c_{\text{NAD}^+} = 0,001 - 1,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ . U trećoj i četvrtoj seriji mjerenja, ispitivan je utjecaj produkta  $\text{NADH}$  te utjecaj (*S*)-2-HPP na početnu brzinu reakcije. Prilikom navedenih mjerenja, koncentracije  $\text{NAD}^+$  i amonij formijata bile su konstantne,  $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{amonij formijat}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a koncentracije  $\text{NADH}$  i (*S*)-2-HPP varirane su u rasponu od  $c_{\text{NADH}} = 0 - 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , odnosno  $c_{(\text{S})-2\text{-HPP}} = 0 - 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ . U svim serijama mjerenja koncentracija enzima *CbFDH* bila je  $c_{\text{CbADH}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ .

Opisana mjerenja provedena su na spektrofotometru, a brzina reakcije bila je proporcionalna količini nastalog  $\text{NADH}$  u vremenu. Iz dobivenih vrijednosti promjene apsorbancije s vremenom ( $\Delta \text{ABS}/\Delta t$ ), prema izrazima (3.2) i (3.3), izračunate su volumna i specifična aktivnost enzima uz korištenje ekstincijskog koeficijenta za  $\text{NADH}$ .

### 3.2.7. Određivanje koncentracije benzaldehida i (*S*)-2-hidroksipropiofenona tekućinskom kromatografijom visokog učinka

Za određivanje koncentracije benzaldehida i (*S*)-2-hidroksipropiofenona na HPLC uređaju korištena je kolona *LiChrospher* 100, RP-8 ( $5 \mu\text{m}$ ), duljine  $l = 25 \text{ cm}$  termostatorana na  $T = 30^\circ\text{C}$ . Kao mobilne faze korišteni su redestilirana voda (eluent B) i acetonitril (eluent A). Prvih 25 minuta gradijent eluenta B smanjivao se s 80% na 35%, dok je od 25. do



30. minute gradijent eluenta B ponovno rastao s 35% na 80%. Protok mobilne faze iznosio je  $q = 1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Vrijeme zadržavanja benzaldehida iznosi  $t_{\text{benzaldehyd}} = 13,2$  minute, a (*S*)-2-hidroksipropiofenona  $t_{(S)\text{-2-HPP}} = 10,2$  minute. Valna duljina mjerenja iznosila je  $\lambda = 250 \text{ nm}$ .

Baždarni dijagram za benzaldehid dobiven je na način da su pripremljene standardne otopine benzaldehida, otapanjem određenih količina benzaldehida u redestiliranoj vodi. Određeni volumen pripremljenih otopina pomiješan je s acetonitrilom u omjeru 1:1 te su ovako pripremljeni uzorci ( $V = 1.000 \text{ }\mu\text{L}$ ) analizirani na HPLC uređaju. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije benzaldehida (Prilog 2, Slika 8.2) konačno je prikazan kao ovisnost površine pika benzaldehida o njegovim koncentracijama.

### **3.2.8. Određivanje koncentracije (*S*)-2-hidroksipropiofenona i (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola na plinskom kromatografu**

Koncentracije (*S*)-2-hidroksipropiofenona i (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola određivane su plinskim kromatografom *Shimadzu GC-2014 Gas Chromatograph* s plameno ionizacijskim detektorom, korištenjem helija kao plina nosioca linearne brzine  $u = 25 \text{ cm min}^{-1}$ . Korištena je kolona *CP-Chirasil-Dex CB* ( $l = 25 \text{ m}$ ,  $ID = 0,25 \text{ mm}$ ,  $df = 0,25 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $V = 1 \text{ }\mu\text{L}$ ). Temperatura injektora iznosila je  $T = 280^\circ\text{C}$ , detektora  $T = 240^\circ\text{C}$ , a kolone  $T = 140^\circ\text{C}$ .

Baždarni dijagram za (*S*)-2-hidroksipropiofenon dobiven je na način da su pripremljene otopine (*S*)-2-HPP u rasponu koncentracija  $c_{(S)\text{-2-HPP}} = 0,107 - 5,327 \text{ mmol dm}^{-3}$ , razrjeđivanjem (*S*)-2-HPP koncentracije  $c_{(S)\text{-2-HPP}} = 10,654 \text{ mmol dm}^{-3}$  u fosfatnom puferu. Uzorci pripremljenih otopina volumena  $V$  (uzorka) =  $10 \text{ }\mu\text{L}$  razrijeđeni su s etilacetatom,  $V_{\text{etilacetat}} = 390 \text{ }\mu\text{L}$ , dobro promiješani i centrifugirani četiri minute pri temperaturi  $T = 4^\circ\text{C}$  na  $14.000 \text{ okr/min}$ . Izdvojeni organski sloj stavljen je na analizu u plinski kromatograf. Baždarni dijagram za određivanje koncentracije (*S*)-2-HPP (Prilog 2, Slika 8.3) konačno je prikazan kao ovisnost površine pika (*S*)-2-hidroksipropiofenona o njegovim koncentracijama.

Baždarni dijagram za (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol pretpostavljen je na temelju eksperimentalnih rezultata dobivenih provođenjem redukcije (*S*)-2-HPP u kotlastom reaktoru, s obzirom na to da za (1*S*,2*S*)-1-FPD ne postoji standard. Pretpostavljeno je da je koncentracija (1*S*,2*S*)-1-FPD koji nastaje jednaka potrošenoj količini (*S*)-2-HPP. Baždarni

dijagram za (1*S*,2*S*)-1-FPD također je prikazan kao ovisnost površine pika (1*S*,2*S*)-1-FPD o njegovim koncentracijama (Prilog 2, Slika 8.4).

### 3.3. PROVEDBA EKSPERIMENTATA U REAKTORU

Proizvodnja optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola pomoću višeenzimskog sustava provedena je usporedno u dva kotlasta reaktora. Oba eksperimenta izvedena su kao ponovljivi šaržni eksperimenti (svaki se sastojao od tri ciklusa) u fosfatnom puferu  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 7,5$  koji je sadržavao  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ , pri sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje ostvareno pomoću tresilice.

U prvom ciklusu oba eksperimenta, u kotlastom reaktoru volumena  $V = 10 \text{ cm}^3$  proizveden je (*S*)-2-hidroksipropiofenon iz benzaldehida i acetaldehida. Reakcija je katalizirana enzimom benzoilformat dekarboksilazom uz prisustvo koenzima tiamin difosfata. Početna koncentracija benzaldehida u oba eksperimenta bila je  $c_{\text{benzaldehyd}} = 20,07 \text{ mmol dm}^{-3}$ , dok je koncentracija acetaldehida u prvom eksperimentu bila  $c_{\text{acetaldehyd}} = 40,63 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a u drugom dvostruko više,  $c_{\text{acetaldehyd}} = 80,55 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Ukupni reakcijski volumen u oba slučaja iznosio je  $V = 5 \text{ cm}^3$ . Početak reakcija aproksimiran je dodatkom enzima BFD u reaktor, gdje mu je koncentracija u oba slučaja iznosila  $c_{\text{BFD}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ . Uzorci iz reakcijske smjese uzimani su u određenim vremenskim razmacima, miješani s acetonitrilom za zaustavljanje reakcije i profiltrirani zbog uklanjanja enzima. Uzorcima je na HPLC uređaju određivana koncentracija benzaldehida i (*S*)-2-HPP. Aktivnost BFD mjerena je spektrofotometrijski. Prvi ciklus eksperimenata završio je kada se supstrat, u ovom slučaju benzaldehid, potrošio.

U drugom ciklusu provedena je redukcija (*S*)-2-hidroksipropiofenona u (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis* uz prisustvo i regeneraciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida pomoću enzima formijat dehidrogenaze iz *Candida boidinii*. U kotlaste reaktore volumena  $V = 2 \text{ cm}^3$  stavljene su otopine iz prethodnog ciklusa, svaka reakcijskog volumena  $V = 2 \text{ cm}^3$ , u koje su dodani enzim *LbADH*, koenzim NADH te amonij formijat, kao supstrat, i *CbFDH*, kao enzim, za regeneraciju koenzima. Njihove početne koncentracije u oba eksperimenta iznosile su:  $c_{\text{LbADH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{NADH}} = 9,44 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{CbFDH}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $c_{\text{amonij formijat}} = 111,01 \text{ mmol dm}^{-3}$ , dok je početna koncentracija (*S*)-2-HPP u prvom

eksperimentu bila  $c_{(S)\text{-}2\text{-HPP}} = 19,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a u drugom  $c_{(S)\text{-}2\text{-HPP}} = 20,88 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Početak reakcije u oba eksperimenta ponovo je aproksimiran dodatkom enzima u reaktor. Uzorci iz reakcijske smjese uzimani su u određenim vremenskim razmacima, miješani s acetonitrilom za zaustavljanje reakcije i profiltrirani zbog uklanjanja enzima te analizirani na HPLC i GC uređaju. Aktivnost *LbADH* određivana je spektrofotometrijski. Ovaj ciklus eksperimenata završen je kada je potrošen (*S*)-2-HPP u reaktoru.

Treći ciklus eksperimenata podrazumijevao je dodavanje nove količine početnih reaktanata u reaktore. Stoga su, u određeni volumen otopina iz drugog ciklusa ( $V = 1,5 \text{ cm}^3$ ), dodani benzaldehid i acetaldehid tako da je njihova koncentracija u reaktoru u prvom eksperimentu iznosila  $c_{\text{benzaldehyd}} = 10,49 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{acetaldehyd}} = 26,14 \text{ mmol dm}^{-3}$ , odnosno u drugom eksperimentu  $c_{\text{benzaldehyd}} = 10,49 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $c_{\text{acetaldehyd}} = 49,89 \text{ mmol dm}^{-3}$ . U oba eksperimenta dodana je i određena količina enzima BFD tako da je njegova koncentracija u oba reaktora iznosila  $c_{\text{BFD}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ . Uzorci iz reakcijske smjese i u ovom ciklusu su uzimani u određenim vremenskim razmacima, miješani s acetonitrilom za zaustavljanje reakcije i profiltrirani zbog uklanjanja enzima te analizirani na HPLC i GC uređaju. Aktivnost BFD i *LbADH* određivana je spektrofotometrijski. Treći ciklus provođenja eksperimenata završen je kada su potrošeni sav benzaldehid i (*S*)-2-HPP.

### 3.4. OBRADA PODATAKA

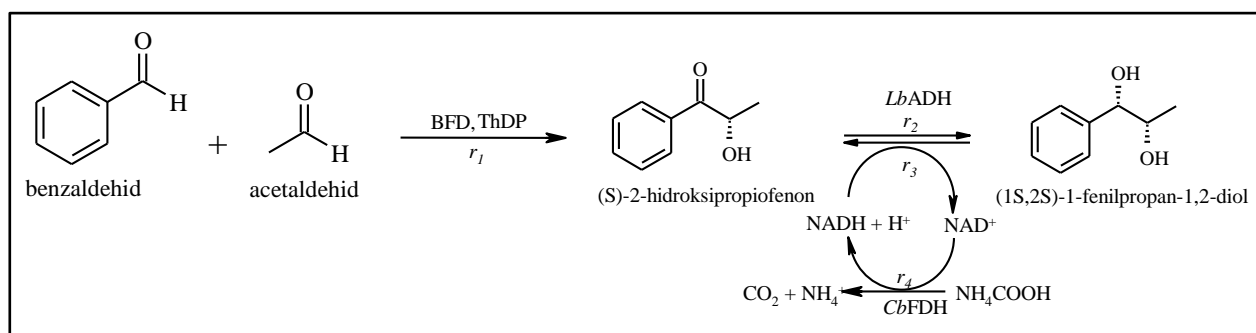
Eksperimentalni podaci obrađeni su u programskom paketu *Scientist* u kojemu je provedena simulacija na temelju napisanog modela (Prilog 3) i eksperimentalnih podataka. Nelinearnom regresijom pomoću metode najmanjih kvadrata i simpleks metode procijenjeni su parametri. Metode procjene parametara imaju za cilj pronaći minimalni zbroj kvadrata greške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela. Simpleks metoda se koristi kada je velika razlika između početne vrijednosti parametra i njegove prave vrijednosti i dobra je za određivanje približne vrijednosti parametara.

Na temelju napisanog modela i procijenjenih parametara provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi određenog modela. Numeričke metode za rješavanje seta diferencijalnih jednadžbi koje koristi *Scientist* su: Euler-ova metoda, metoda Runge Kutta IV, Bulirsch – Stoer metoda i Episode algoritam.

Parametri kao što su maksimalne brzine reakcije, Michaelis – Menteničine konstante i konstante inhibicije procijenjeni su iz kinetičkih mjerenja, tj. ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji. Ovi parametri su korišteni za simulacije pomoću modela, odnosno za predviđanje promjena koncentracija reaktanata i produkata s vremenom u različitim reaktorskim sustavima. Parametri modela deaktivacije, kao i konstanta u reakciji oksidacije (1*S*,2*S*)-1-FPD uz *LbADH*, procijenjeni su iz eksperimenata u reaktoru.

#### 4. MATEMATIČKI MODEL PROCESA PROIZVODNJE (1S,2S)-1-FENILPROPAN-1,2-DIOLA U VIŠEENZIMSKOM SUSTAVU UZ REGENERACIJU KOENZIMA NADH U KOTLASTOM REAKTORU

Matematički model procesa proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (Slika 4.1) u kotlastom reaktoru sastoji se od kinetičkog i reaktorskog modela. Postavljen je na temelju eksperimentalnih podataka i pretpostavki da je reakcijski volumen konstantan, miješanje u reaktoru idealno, a temperatura konstantna.



Slika 4.1 Shema procesa proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima

##### 4.1.1. Kinetički model

Kinetički model razvijen je na temelju sheme reakcije (Slika 4.1), eksperimentalnih rezultata i procijenjenih kinetičkih parametara. Sastoji se od nekoliko kinetičkih jednadžbi.

Kinetika proizvodnje (S)-2-hidroksipropiofenona iz benzaldehida i acetaldehida katalizirane enzimom benzoilformat dekarboksilazom iz *Pseudomonas putida* uz prisustvo koenzima tiamin difosfata opisana je Michaelis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom (acetaldehidom) i prikazana je jednadžbom (4.1). (Pepper et al., 2011)

$$r_1 = \frac{V_m^{BFD} \cdot c_{benzaldehyd} \cdot c_{acetaldehyd} \cdot c_{BFD}}{(K_m^{benzaldehyd} + c_{benzaldehyd}) \cdot (K_m^{acetaldehyd} + c_{acetaldehyd} \cdot (1 + \frac{c_{acetaldehyd}}{K_i^{acetaldehyd}}))} \quad (4.1)$$

Deaktivacija enzima benzoilformat dekarboksilaze opisana je bieksponecijalnim modelom (Aymard & Belarbi, 2000, Polaković & Bryjak, 2002) koji je prikazan jednadžbom

(4.2) te pretpostavlja postojanje dva izoenzima s određenim udjelima pojedinog izoenzima u ukupnoj količini enzima,  $a$  i  $b$ . Navedeni izoenzimi deaktiviraju se različitim brzinama deaktivacije koje su opisane konstantama  $k_1$  i  $k_2$  te vrijedi da je  $b = 1 - a$ .

$$\frac{V_m^{BFD}}{V_{m0}} = a^{BFD} \cdot e^{-k_1^{BFD} \cdot t} + b^{BFD} \cdot e^{-k_2^{BFD} \cdot t} \quad (4.2)$$

Kinetika proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola, redukcijom (S)-2-HPP, katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis* uz prisustvo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida i njegovu regeneraciju opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom,  $NAD^+$ , te je prikazana jednadžbom (4.3). Kinetika povratne reakcije zbog nedostupnosti (1S,2S)-1-FPD nije eksperimentalno određena, već je opisana kinetikom drugog reda, odnosno kinetikom prvog reda u odnosu na svaki supstrat koji sudjeluje u reakciji, te je prikazana jednadžbom (4.4). Kinetika regeneracije koenzima NADH pomoću amonij formijata i enzima formijat dehidrogenaze iz kvasca *Candida boidinii* opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NADH, s uključenom inhibicijom supstratima iz drugih reakcija, (S)-2-hidroksipropiofenonom i acetaldehidom (4.5).

$$r_2 = \frac{V_m^{LbADH} \cdot c_{(S)-2-HPP} \cdot c_{NADH} \cdot c_{LbADH}}{(K_m^{(S)-2-HPP} + c_{(S)-2-HPP}) \cdot (K_m^{NADH} + c_{NADH} \cdot (1 + \frac{c_{NAD^+}}{K_i^{NAD^+}}))} \quad (4.3)$$

$$r_3 = k_3 \cdot c_{LbADH} \cdot c_{NAD^+} \cdot c_{(1S,2S)-1-FPD} \quad (4.4)$$

$$r_4 = \frac{V_m^{FDH} \cdot c_{NAD^+} \cdot c_{NH_4COOH} \cdot c_{FDH}}{(K_m^{NH_4COOH} + c_{NH_4COOH} \cdot (1 + \frac{c_{(S)-2-HPP}}{K_i^{(S)-2-HPP}} + \frac{c_{acetaldehid}}{K_i^{acetaldehid}})) \cdot (K_m^{NAD^+} + c_{NAD^+} \cdot (1 + \frac{c_{NADH}}{K_i^{NADH}}))} \quad (4.5)$$

Deaktivacija enzima alkohol dehidrogenaze opisana je također bieksponecijalnim modelom te je prikazana jednadžbom (4.6).

$$\frac{V_m^{LbADH}}{V_{m0}} = a^{LbADH} \cdot e^{-k_1^{LbADH} \cdot t} + b^{LbADH} \cdot e^{-k_2^{LbADH} \cdot t} \quad (4.6)$$

U navedenim izrazima  $r_i$  predstavlja molarnu brzinu pojedine reakcije [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ],  $V_m^i$  je maksimalna aktivnost pojedinog enzima, odnosno maksimalna molarna reakcijska brzina [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ],  $K_m^i$  označava Michaelis – Menteničinu konstantu za određenu komponentu [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ], dok je  $K_i^i$  konstanta inhibicije određene komponente [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]. Parametri  $k_1^i$  i  $k_2^i$  predstavljaju konstante brzine deaktivacije određenog izoenzima, dok  $k_3$  predstavlja konstantu brzine povratne reakcije [ $\text{dm}^3 \text{mmol}^{-1} \text{min}^{-1}$ ]. Koncentracija pojedine komponente označena je s  $c_i$  [ $\text{mmol dm}^3$ ].

#### 4.1.2. Reaktorski model

Reaktorski model proizvodnje optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u kotlastom reaktoru sastoji se od bilancnih jednažbi (4.7 – 4.13) koje opisuju promjene koncentracije pojedinih reaktanata i produkata s vremenom.

$$\frac{dc_{\text{benzaldehyd}}}{dt} = -r_1 \quad (4.7)$$

$$\frac{dc_{\text{acetaldehyd}}}{dt} = -r_1 \quad (4.8)$$

$$\frac{dc_{(S)-2-HPP}}{dt} = r_1 - r_2 + r_3 \quad (4.9)$$

$$\frac{dc_{(1S,2S)-1-FPD}}{dt} = r_2 - r_3 \quad (4.10)$$

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = -r_2 + r_3 + r_4 \quad (4.11)$$

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = r_2 - r_3 - r_4 \quad (4.12)$$

$$\frac{dc_{\text{NH}_4\text{COOH}}}{dt} = -r_4 \quad (4.13)$$

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je biokatalitička sinteza (*S*)-2-hidroksipropiofenona iz benzaldehida i acetaldehida uz prisustvo enzima benzoilformat dekarboksilaze, izolirane iz bakterije *Pseudomonas putida*, i koenzima tiamin difosfata. Redukcijom navedenog ketona, uz prisustvo enzima alkohol dehidrogenaze, izolirane iz bakterije *Lactobacillus brevis*, i koenzima nikotinamid adenin dinukleotida, proizveden je optički aktivni (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol. Istovremeno je provedena i regeneracija koenzima uz dodatak amonijevoformijata i enzima formijat dehidrogenaze izolirane iz kvasca *Candida boidinii*.

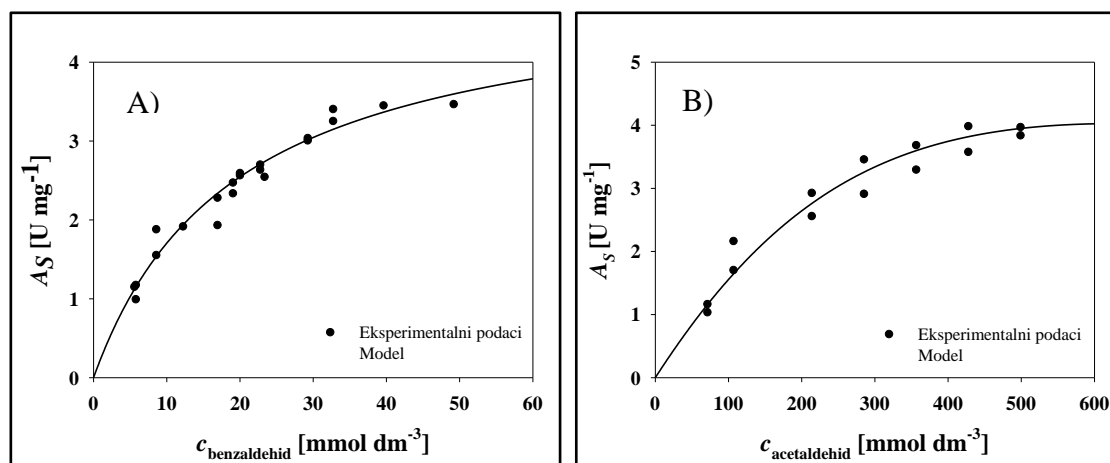
Enzimi korišteni u radu, benzoilformat dekarboksilaza, alkohol dehidrogenaza i formijat dehidrogenaza kinetički su karakterizirani, postavljen je matematički model reakcije biokatalitičke proizvodnje optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola uz regeneraciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida te je provedena ocjena valjanosti modela u kotlastom reaktoru.

### 5.1. KINETIKA ENZIMA BENZOILFORMAT DEKARBOKSILAZE IZ *Pseudomonas putida*

Kinetika enzima benzoilformat dekarboksilaze izolirane iz bakterije *Pseudomonas putida*, odnosno reakcije proizvodnje (*S*)-2-hidroksipropiofenona iz benzaldehida i acetaldehida u kotlastom reaktoru određena je metodom početnih brzina i prikazana kao ovisnost početne reakcijske brzine o koncentracijama supstrata (Slika 5.1 A i B).

Kinetika je opisana dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom jednadžbom s kompetitivnom inhibicijom supstratom (jednadžba 4.1). Vrijednosti Michaelis – Menteničinih konstanti za benzaldehyd ( $K_m^{\text{benzaldehyd}}$ ) i acetaldehyd ( $K_m^{\text{acetaldehyd}}$ ) preuzete su iz literature (Pepper et al., 2011) dok su maksimalna molarna brzina reakcije, odnosno maksimalna aktivnost enzima ( $V_m^{\text{BFD}}$ ) i konstanta inhibicije acetaldehydom ( $K_i^{\text{acetaldehyd}}$ ) procijenjeni nelinearnom regresijom u programskom paketu *Scientist*. Svi navedeni parametri prikazani su u Tablici 5.1.





Slika 5.1 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji sinteze (*S*)-2-hidroksipropiofenona uz izolirani enzim BFD o koncentraciji: A) benzaldehida ( $c_{\text{benzaldehyd}} = 0 - 50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{acetaldehyd}} = 356,41 \text{ mmol dm}^{-3}$ ); B) acetaldehida ( $c_{\text{acetaldehyd}} = 0 - 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{benzaldehyd}} = 49,19 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) ( $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $c_{\text{BFD}} = 0,25 \text{ mg dm}^{-3}$ )

Tablica 5.1 Kinetički parametri u reakciji proizvodnje (*S*)-2-hidroksipropiofenona iz benzaldehida i acetaldehida uz enzim benzoilformat dekarboksilazu izoliranu iz bakterije *Pseudomonas putida*

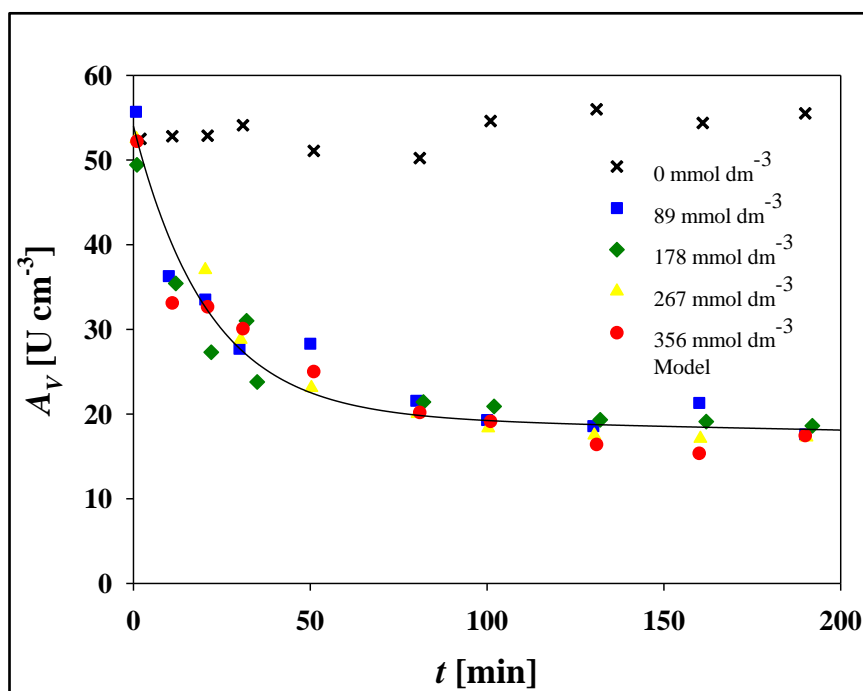
Parametar	Vrijednost
$V_m^{\text{BFD}} [\text{U mg}^{-1}]$	$19,40 \pm 2,37$
$K_m^{\text{benzaldehyd}} [\text{mmol dm}^{-3}] *$	19,40
$K_m^{\text{acetaldehyd}} [\text{mmol dm}^{-3}] *$	775,00
$K_i^{\text{acetaldehyd}} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$514,17 \pm 52,88$

\* Pepper et al., 2011

Vrijednost Michaelis – Menteničine konstante,  $K_m^S$ , opisuje afinitet enzima prema supstratu, odnosno što je navedena vrijednost niža, enzim će biti specifičniji za određeni supstrat. Stoga, prema literaturnim podacima za Michaelis – Menteničine konstante za benzaldehyd i acetaldehyd, možemo zaključiti da je, za korišteni enzim BFD, benzaldehyd značajno specifičniji supstrat u odnosu na acetaldehyd. Također, prema procijenjenoj konstanti inhibicije acetaldehydom može se zaključiti da acetaldehyd u određenoj mjeri inhibira enzim.

## 5.2. UTJECAJ ACETALDEHIDA NA AKTIVNOST ENZIMA BENZOILFORMAT DEKARBOKSILAZE IZ *Pseudomonas putida*

S obzirom na to da brzina deaktivacije enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida* ovisi o koncentraciji acetaldehida u otopini, ispitan je utjecaj različitih koncentracija acetaldehida na aktivnost enzima. Rezultati ispitivanja prikazani su kao ovisnost volumne aktivnosti enzima BFD ( $A_V$ ) o vremenu trajanja reakcije za različite koncentracije acetaldehida (Slika 5.2).



Slika 5.2 Utjecaj različitih koncentracija acetaldehida na aktivnost enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida* ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $c_{\text{BFD}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ )

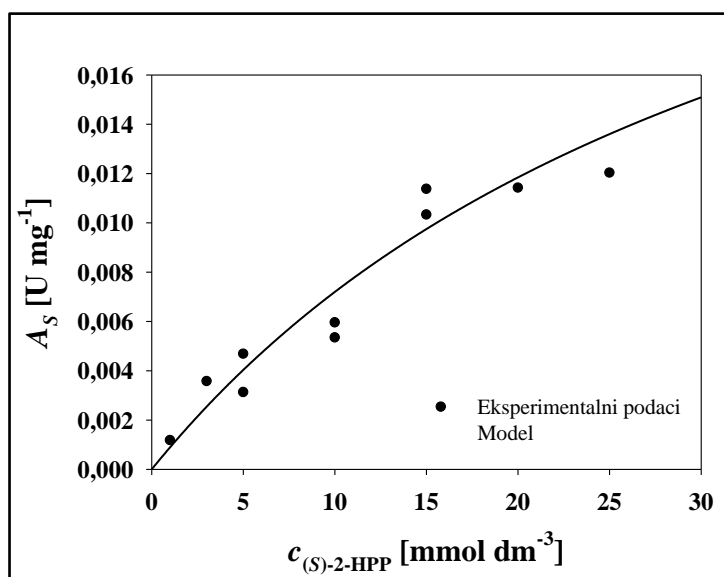
Prema Slici 5.2 može se zaključiti da prisustvo acetaldehida uzrokuje značajniju deaktivaciju enzima benzoilformat dekarboksilaze, koja je približno ista pri većim koncentracijama acetaldehida u otopini. Deaktivacija enzima BFD opisana je bieksponecijalnim modelom (jednadžba 4.2), a parametri navedenog modela procijenjeni su na temelju provedenog ispitivanja utjecaja acetaldehida te su prikazani Tablicom 5.2.

Tablica 5.2 Parametri bieksponecijalnog modela deaktivacije enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida* procijenjeni u programskom paketu *Scientist*

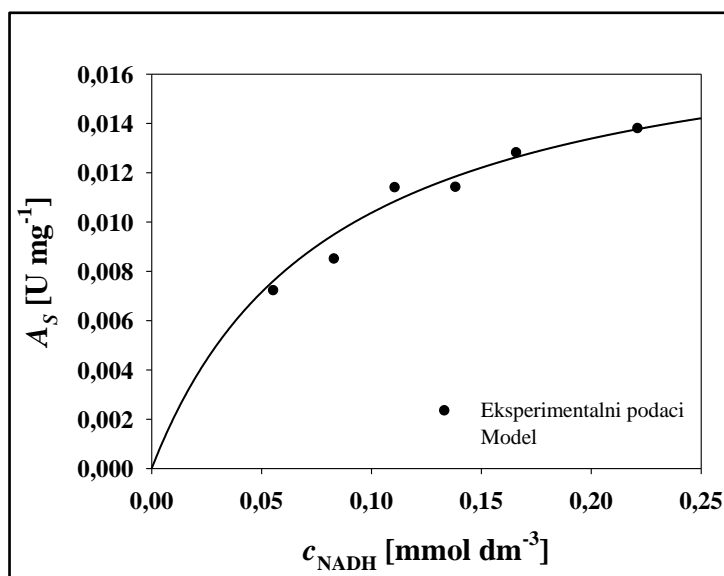
Parametar	Eksperiment
$a^{\text{BFD}}$ [-]	$0,367 \pm 0,033$
$b^{\text{BFD}}$ [-]	$0,633 \pm 0,033$
$k_1^{\text{BFD}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0,00045 \pm 0,00006$
$k_2^{\text{BFD}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0,0476 \pm 0,0030$

### 5.3. KINETIKA ENZIMA ALKOHOL DEHIDROGENAZE IZ *Lactobacillus brevis*

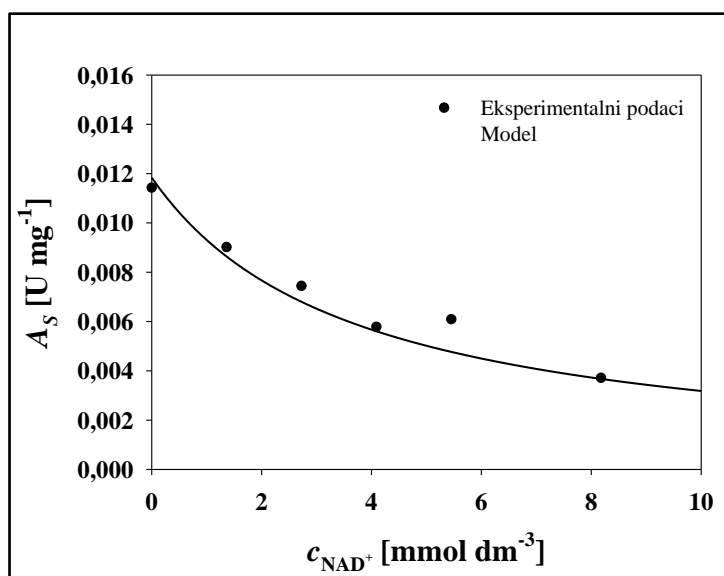
Kinetika enzima alkohol dehidrogenaze izolirane iz bakterije *Lactobacillus brevis*, odnosno reakcije proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola iz (*S*)-2-hidroksipropiofenona uz prisustvo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida i njegovu regeneraciju pomoću enzima formijat dehidrogenaze u kotlastom reaktoru, određena je spektrofotometrijski, metodom početnih brzina. Prikazana je kao ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji supstrata, (*S*)-2-HPP (Slika 5.3). Mjeren je i utjecaj koenzima NADH te produkta reakcije, NAD<sup>+</sup>, na početnu reakcijsku brzinu (Slike 5.4 i 5.5).



Slika 5.3 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola uz izolirani enzim *LbADH* i koenzim NADH o koncentraciji (*S*)-2-hidroksipropiofenona ( $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni puffer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{NADH}} = 0,138 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{(S)\text{-}2\text{-HPP}} = 0 - 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{LbADH} = 1 \text{ mg dm}^{-3}$ )



Slika 5.4 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola uz izolirani enzim *LbADH* o koncentraciji reduciranog nikotinamid adenin dinukleotida ( $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{NADH}} = 0 - 0,25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{(S)\text{-2-HPP}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{LbADH} = 1 \text{ mg dm}^{-3}$ )



Slika 5.5 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola uz izolirani enzim *LbADH* i koenzim NADH o koncentraciji produkta, oksidiranog nikotinamid adenin dinukleotida ( $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{NADH}} = 0,138 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{(S)\text{-2-HPP}} = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{NAD}^+} = 0 - 10 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{LbADH} = 1 \text{ mg dm}^{-3}$ )

Kinetika proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola, redukcijom (*S*)-2-HPP, katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis* uz prisustvo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom jednadžbom s kompetitivnom inhibicijom produktom (jednadžba 4.3). Vrijednosti Michaelis – Menteničinih konstanti za (*S*)-2-hidroksipropiofenon ( $K_m^{(S)-2-HPP}$ ) i koenzim NADH ( $K_m^{NADH}$ ), konstanta inhibicije za  $NAD^+$  ( $K_i^{NAD^+}$ ) i maksimalna molarna brzina reakcije, odnosno maksimalna aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze ( $V_m^{LbADH}$ ) procijenjene su nelinearnom regresijom u *Scientistu* te su prikazane Tablicom 5.3. Kinetika povratne reakcije opisana je kinetikom drugog reda, odnosno kinetikom prvog reda u odnosu na svaki supstrat koji sudjeluje u reakciji (jednadžba 4.4). Konstanta brzine povratne reakcije,  $k_3$ , procijenjena je u prethodnim radovima i iznosi  $k_3 = 0,0004972 \text{ dm}^6 \text{ mmol}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . (Švarc, 2013)

Tablica 5.3 Kinetički parametri u reakciji proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola iz (*S*)-2-hidroksipropiofenona uz enzim alkohol dehidrogenazu izoliranu iz bakterije *Lactobacillus brevis* i prisustvo koenzima nikotinamid adenin difosfata

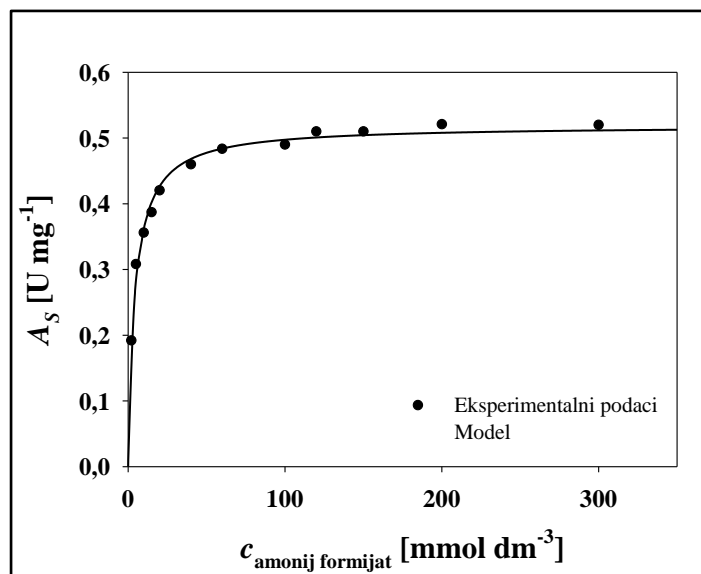
Parametar	Vrijednost
$V_m^{LbADH} [\text{U mg}^{-1}]$	$0,0532 \pm 0,0031$
$K_m^{(S)-2-HPP} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$36,4168 \pm 3,3073$
$K_m^{NADH} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$0,0818 \pm 0,0083$
$K_i^{NAD^+} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$1,3681 \pm 0,2758$

Prema procijenjenim vrijednostima Michaelis – Menteničine konstante može se zaključiti kako je NADH znatno specifičniji supstrat za *LbADH* u odnosu na (*S*)-2-HPP. Također, prema procijenjenoj konstanti inhibicije za  $NAD^+$  može se zaključiti da navedeni produkt inhibira enzim.

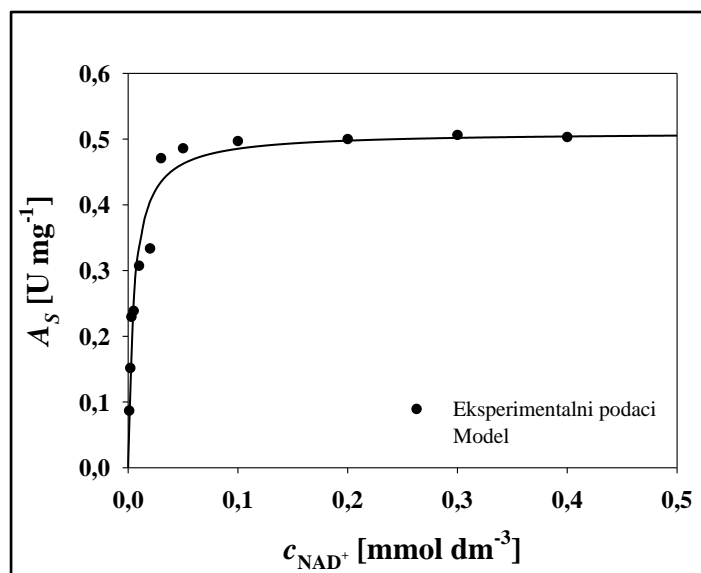
#### 5.4. KINETIKA ENZIMA FORMIJAT DEHIDROGENAZE IZ *Candida boidinii*

Kinetika enzima formijat dehidrogenaze izolirane iz kvasca *Candida boidinii*, određena je spektrofotometrijski metodom početnih brzina u reakciji regeneracije koenzima NADH, odnosno u reakciji oksidacije amonij formijata u ugljikov dioksid i amonijev ion uz istovremenu redukciju  $NAD^+$  u NADH. Prikazana je kao ovisnost početne reakcijske brzine o koncentracijama supstrata, amonij formijata i  $NAD^+$  (Slike 5.6 i 5.7). Ispitan je i utjecaj

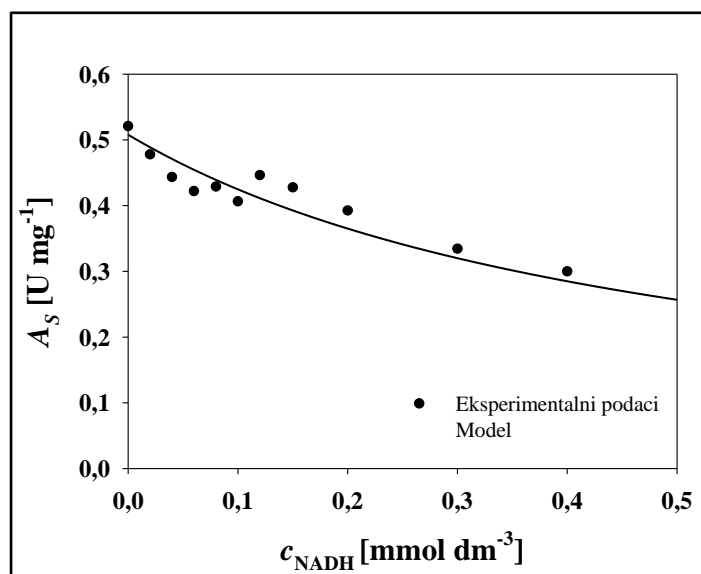
produkta, NADH (Slika 5.8), te utjecaj supstrata iz drugih reakcija, (S)-2-HPP i acetaldehida (Slika 5.9 i 5.10), na početnu reakcijsku brzinu.



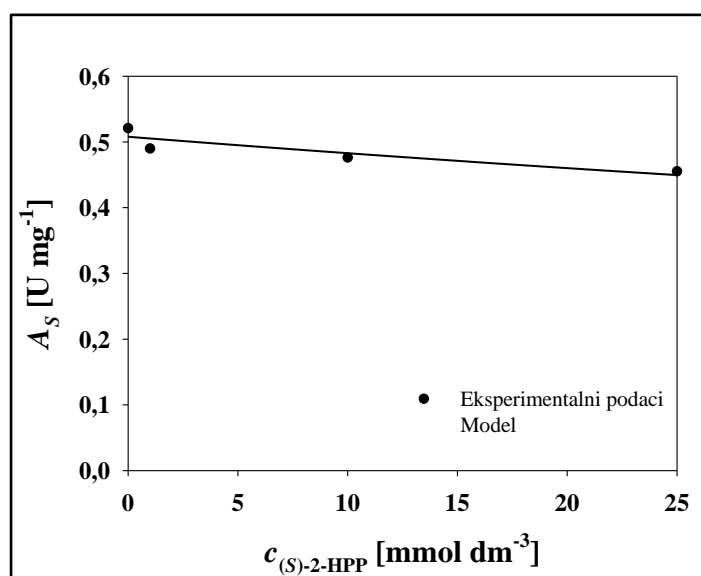
Slika 5.6 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim *CbFDH* o koncentraciji amonij formijata ( $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{amonij formijat}} = 2 - 300 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{CbFDH}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ )



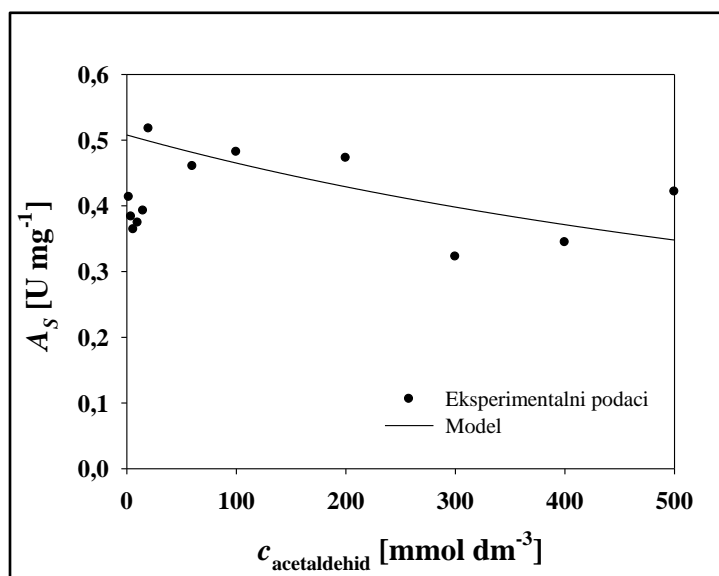
Slika 5.7 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim *CbFDH* o koncentraciji supstrata, nikotinamid adenin dinukleotida ( $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{NAD}^+} = 0,001 - 1,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{amonij formijat}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{CbFDH}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ )



Slika 5.8 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim *CbFDH* o koncentraciji produkta, NADH ( $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{amonij formijat}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{NADH}} = 0 - 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{CbFDH}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ )



Slika 5.9 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim *CbFDH* o koncentraciji (*S*)-2-HPP ( $T = 25^\circ\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{amonij formijat}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{(S)\text{-2-HPP}} = 0 - 25 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{CbFDH}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ )



Slika 5.10 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim *CbFDH* o koncentraciji acetaldehida ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ;  $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{amonij formijat}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{CbFDH}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{acetaldehyd}} = 2 - 500 \text{ mmol dm}^{-3}$ )

Prema grafičkim prikazima ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentracijama produkta reakcije, NADH, i supstrata iz drugih reakcija, (*S*)-2-HPP i acetaldehida (Slike 5.8, 5.9 i 5.10), može se zaključiti da navedene komponente inhibiraju reakciju, odnosno smanjuju aktivnost enzima. Stoga je kinetika regeneracije koenzima nikotinamid adenin dinukleotida pomoću amonij formijata i enzima formijat dehidrogenaze izolirane iz kvasca *Candida boidinii* opisana dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NADH, s uključenom inhibicijom supstratima iz drugih reakcija, (*S*)-2-hidroksipropiofenonom i acetaldehidom (jednadžba 4.5). Vrijednosti Michaelis – Menteničinih konstanti za amonij formijat i  $\text{NAD}^+$  ( $K_m^{\text{amonij formijat}}$  i  $K_m^{\text{NAD}^+}$ ), konstante inhibicije za NADH, (*S*)-2-HPP i acetaldehyd ( $K_i^{\text{NADH}}$ ,  $K_i^{(\text{S})-2\text{-HPP}}$  i  $K_i^{\text{acetaldehyd}}$ ) te maksimalne aktivnosti enzima *CbFDH*, odnosno maksimalne molarne reakcijske brzine ( $V_m^{\text{CbFDH}}$ ) procijenjene su nelinearnom regresijom u *Scientistu* i prikazane Tablicom 5.5.

Prema procijenjenim vrijednostima Michaelis – Menteničine konstante može se zaključiti kako je  $\text{NAD}^+$  znatno specifičniji supstrat za korišteni enzim, *CbFDH*, u odnosu na amonij formijat. Iz procijenjenih konstanti inhibicije, može se zaključiti da NADH značajno inhibira reakciju oksidacije amonij formijata uz korišteni enzim, dok prisutnost supstrata iz drugih reakcija, (*S*)-2-HPP i acetaldehida, nema značajan utjecaj na brzinu reakcije.



Tablica 5.4 Kinetički parametri u reakciji regeneracije koenzima nikotinamid adenin dinukleotida, odnosno oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim formijat dehidrogenazu izoliranu iz kvasca *Candida boidinii*

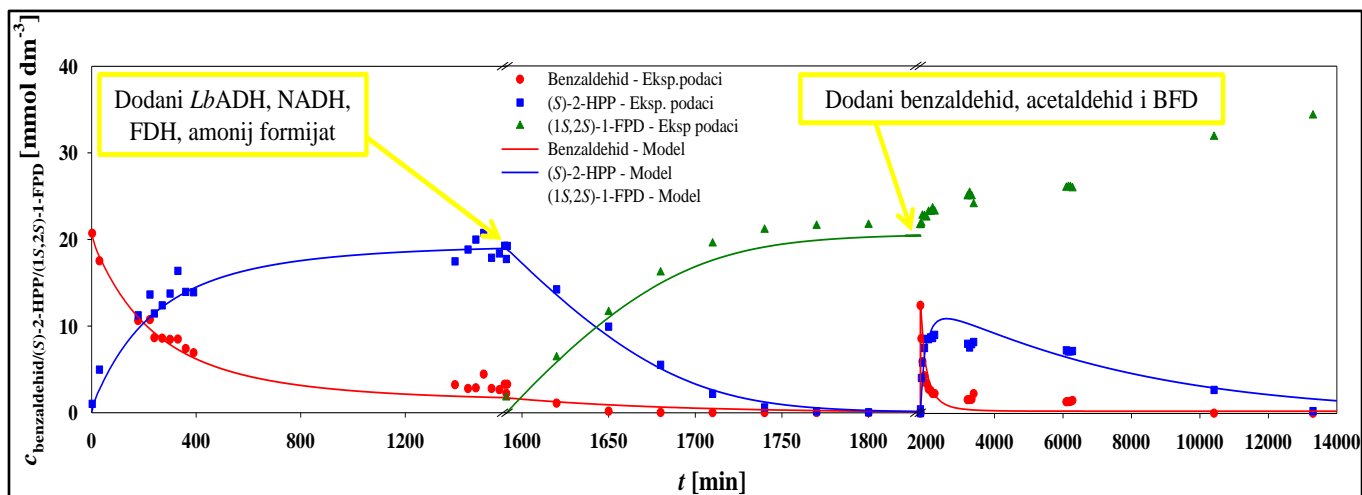
Parametar	Vrijednost
$V_m^{CbFDH}$ [U mg <sup>-1</sup> ]	0,5216 ± 0,0160
$K_m^{\text{amonij formijat}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	4,3409 ± 0,9982
$K_m^{NAD^+}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	0,0052 ± 0,0010
$K_i^{NADH}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	0,0026 ± 0,0006
$K_i^{(S)\text{-}2\text{-HPP}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	4,0989 ± 2,2790
$K_i^{\text{acetaldehid}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	23,1085 ± 10,8176

### 5.5. PROIZVODNJA (1*S*,2*S*)-1-FENILPROPAN-1,2-DIOLA U VIŠEENZIMSKOM SUSTAVU UZ REGENERACIJU KOENZIMA NADH U KOTLASTOM REAKTORU

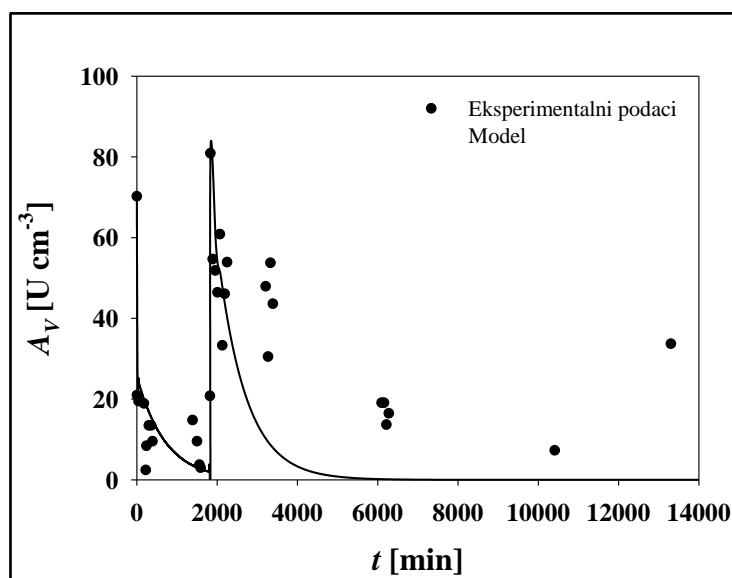
Proizvodnja optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola provedena je u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru na dva načina. Oba eksperimenta provedena su kao ponovljivi šaržni eksperimenti, odnosno svaki eksperiment sastojao se od tri ciklusa. Tijekom provođenja eksperimenata, osim koncentracija benzaldehida, (S)-2-hidroksipropiofenona i (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola (Slika 5.11 i 5.14), praćena je i aktivnost enzima BFD u prvom i trećem (Slika 5.12 i 5.15), odnosno enzima *LbADH* u drugom i trećem ciklusu eksperimenata (Slika 5.13 i 5.16).

Kao što je vidljivo i prema Slici 5.11, u prvom ciklusu prvog eksperimenta proizveden je (S)-2-hidroksipropiofenon iz benzaldehida i acetaldehida čije su početne koncentracije bile u omjeru  $c_{\text{benzaldehyd}}:c_{\text{acetaldehyd}} = 1:2$ . Navedena reakcija katalizirana je enzimom BFD uz prisustvo koenzima ThDP. Nakon 1.590 minuta reakcije postignuta je konverzija benzaldehida od  $X_{\text{benzaldehyd}} = 84,53\%$ . U drugom ciklusu eksperimenta provedena je redukcija (S)-2-HPP u (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol katalizirana enzimom *LbADH* uz prisustvo koenzima NADH i njegovu istovremenu regeneraciju. Regeneracija je provedena uz dodatak amonijeva formijata i enzima *CbFDH*. Koncentracija (S)-2-HPP na početku drugog ciklusa eksperimenta iznosila je  $c_{(S)\text{-}2\text{-HPP}} = 19,25 \text{ mmol dm}^{-3}$  te je bilo potrebno oko 240 minuta da se postigne njegova potpuna konverzija u (1*S*,2*S*)-1-FPD. U trećem ciklusu eksperimenta dodane su nove količine benzaldehida i acetaldehida, tako da je omjer njihovih početnih koncentracija u reaktoru bio  $c_{\text{benzaldehyd}}:c_{\text{acetaldehyd}} = 1:2,5$ . Dodana je i nova količina enzima BFD. Gotovo

potpuna konverzija benzaldehida postignuta je nakon 8.580 minuta, dok je vrijeme potrebno za gotovo potpunu konverziju (S)-2-HPP iznosilo oko 11.475 minuta.



Slika 5.11 Proizvodnja optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola provedena u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni puffer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM}$   $\text{MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM}$   $\text{ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $c_{\text{benzaldehyd},1} = 20,07 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{acetaldehyd},1} = 40,63 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{BFD},1} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{LbADH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{NADH}} = 9,44 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{FDH}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{amonij formijat}} = 111,01 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{benzaldehyd},2} = 10,49 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{acetaldehyd},2} = 26,14 \text{ mmol dm}^{-3}$ )



Slika 5.12 Promjena aktivnosti enzima benzoilformat dekarboksilaze tijekom provođenja prvog eksperimenta

Prema Slici 5.12 može se zaključiti da dolazi do deaktivacije enzima benzoilformat dekarboksilaze zbog prisutnosti acetaldehida u reaktoru. Deaktivacija je opisana bieksponecijalnim modelom (jednadžba 4.2) čiji su parametri procijenjeni na temelju provedenih eksperimenata te su dani Tablicom 5.5. Može se zaključiti kako koncentracija acetaldehida, koja je u trećem ciklusu eksperimenta veća u odnosu na onu u prvom ciklusu, ne utječe značajno na brzinu deaktivacije benzoilformat dekarboksilaze.

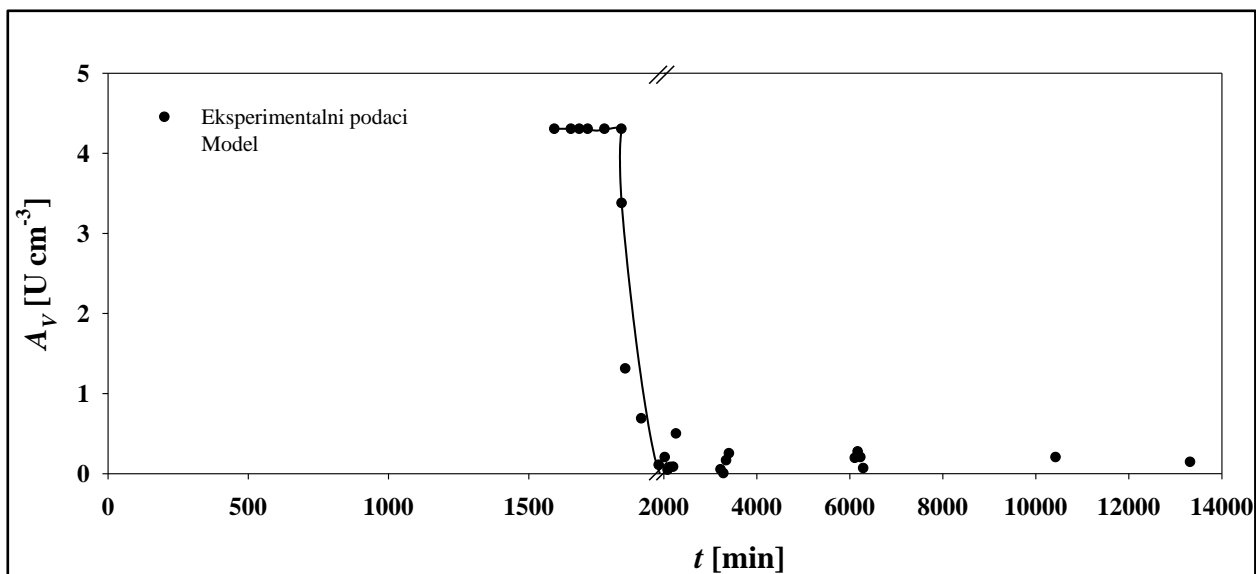
Tablica 5.5 Parametri bieksponecijalnog modela deaktivacije enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida* procijenjeni u programskom paketu *Scientist* na temelju provedenog eksperimenta

Parametar	Eksperiment 1.	
	I. ciklus	III. ciklus
$a^{\text{BFD}}$ [-]	0,3182	0,36703
$b^{\text{BFD}}$ [-]	0,6818	0,63297
$k_1^{\text{BFD}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	0,00142	0,00142
$k_2^{\text{BFD}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	0,24595	0,00576

Prema prikazu promjene aktivnosti enzima *LbADH* (Slika 5.13) može se zaključiti da tijekom drugog ciklusa eksperimenta ne dolazi do njegove deaktivacije. Može se pretpostaviti da je razlog tome mala koncentracija acetaldehida u otopini, koji se u prethodnom ciklusu djelomično potrošio i ispario zbog niske temperature vrelišta. Nakon dodatka acetaldehida i benzaldehida u trećem ciklusu naglo pada aktivnost *LbADH*, odnosno dolazi do njegove brze deaktivacije. Posljedica deaktivacije enzima *LbADH* je i dulje trajanje trećeg ciklusa eksperimenta. Deaktivacija *LbADH* je opisana bieksponecijalnim modelom (jednadžba 4.6), a parametri navedenog modela procijenjeni su u *Scientistu* na temelju provedenog eksperimenta te su prikazani Tablicom 5.6.

Tablica 5.6 Parametri bieksponecijalnog modela deaktivacije enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis* procijenjeni u programskom paketu *Scientist* na temelju provedenog eksperimenta

Parametar	Eksperiment 1.	
	III. ciklus	
$a^{\text{LbADH}}$ [-]	0,1012	
$b^{\text{LbADH}}$ [-]	0,8988	
$k_1^{\text{LbADH}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	0,01974	
$k_2^{\text{LbADH}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	0,10102	

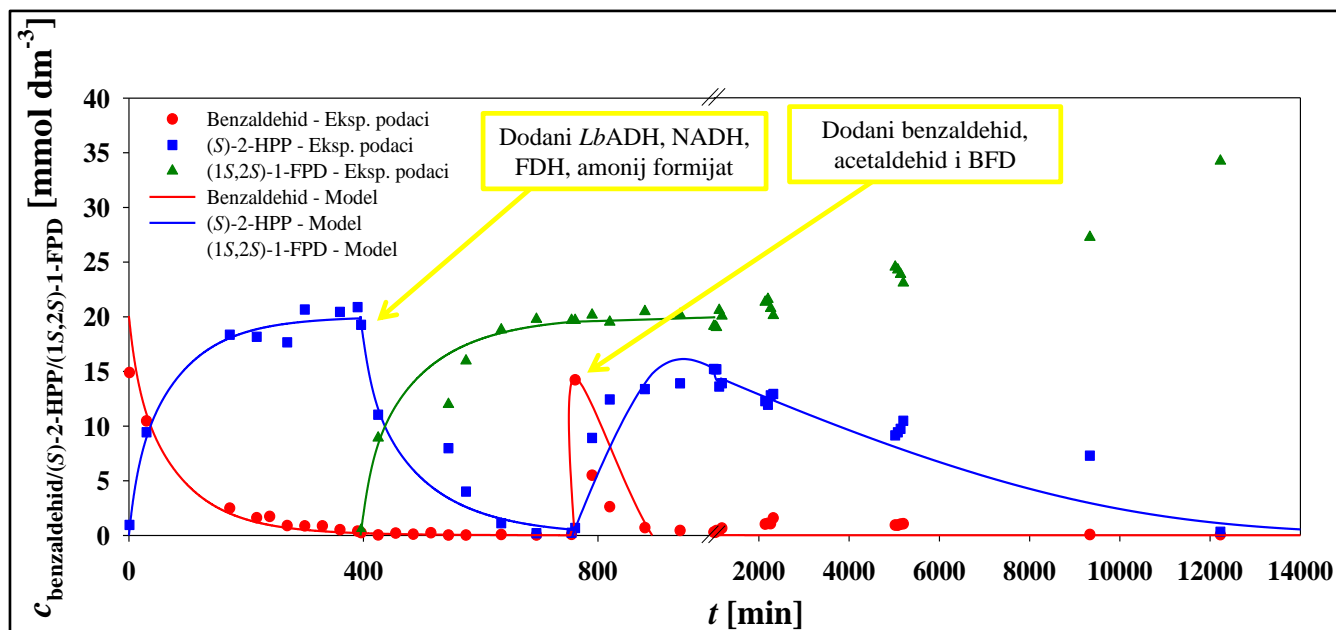


Slika 5.13 Promjena aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze tijekom provođenja prvog eksperimenta

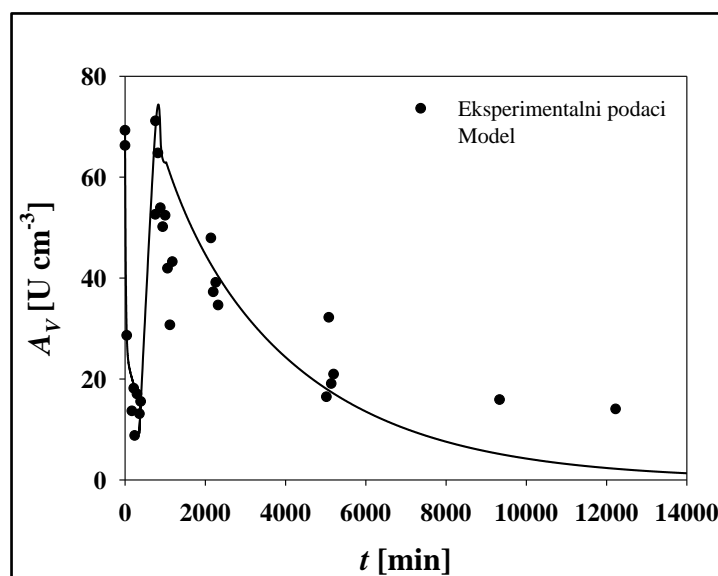
Drugi eksperiment (Slika 5.14) proveden je također kroz tri ciklusa. U prvom ciklusu ponovo je provedena reakcija nastajanja (*S*)-2-hidroksipropiofenona iz benzaldehida i acetaldehida katalizirana enzimom BFD uz prisustvo koenzima ThDP. Početne koncentracije reaktanata u ovom slučaju bile su u omjeru  $c_{\text{benzaldehyd}}:c_{\text{acetaldehyd}} = 1:4$ . Gotovo potpuna konverzija benzaldehida,  $X_{\text{benzaldehyd}} = 97,44\%$ , u ovom je slučaju postignuta nakon 390 minuta provođenja eksperimenta. Kao i u prvom eksperimentu, zatim je provedena redukcija nastalog (*S*)-2-HPP u (1*S*,2*S*)-1-FPD katalizirana enzimom *LbADH* uz prisustvo koenzima NADH i njegovu istovremenu regeneraciju. Koncentracija (*S*)-2-HPP na početku drugog ciklusa u ovom je slučaju bila nešto veća,  $c_{(S)\text{-2-HPP}} = 20,87 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a za njegovu gotovo potpunu konverziju ( $X_{(S)\text{-2-HPP}} = 98,83\%$ ) bilo je potrebno oko 360 minuta. U trećem ciklusu dodane su nove količine benzaldehida i acetaldehida, tako da je omjer njihovih početnih koncentracija u ovom slučaju bio  $c_{\text{benzaldehyd}}:c_{\text{acetaldehyd}} = 1:5$ . Ponovno je dodana i nova količina enzima BFD. U drugom eksperimentu za potpunu konverziju benzaldehida bilo je potrebno oko 8.575 minuta, dok je za gotovo potpunu konverziju (*S*)-2-HPP bilo potrebno oko 11.467 minuta.

Prema Slici 5.15 može se zaključiti da i u ovom slučaju dolazi do deaktivacije enzima benzoilformat dekarboksilaze uslijed povećane koncentracije acetaldehida u reaktoru. Deaktivacija je opisana bieksponecijalnim modelom (jednadžba 4.2) čiji su parametri procijenjeni na temelju provedenih eksperimenata te su dani Tablicom 5.7. Kao i u prvom eksperimentu koncentracija acetaldehida, koja je u trećem ciklusu eksperimenta veća u

odnosu na onu u prvom ciklusu, ne utječe značajno na brzinu deaktivacije benzoilformat dekarboksilaze.



Slika 5.14 Proizvodnja optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola provedena u višenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru ( $T = 25^{\circ}\text{C}$ ;  $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,05 \text{ M}$  s  $2 \text{ mM}$   $\text{MgSO}_4$  i  $0,5 \text{ mM}$   $\text{ThDP}$ ;  $\text{pH} = 7,5$ ;  $c_{\text{benzaldehyd},1} = 20,07 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{acetaldehyd},1} = 80,55 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{BFD},1} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{LbADH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{NADH}} = 9,44 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{FDH}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$ ;  $c_{\text{amonij formijat}} = 111,01 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{benzaldehyd},2} = 10,49 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $c_{\text{acetaldehyd},2} = 49,89 \text{ mmol dm}^{-3}$ )

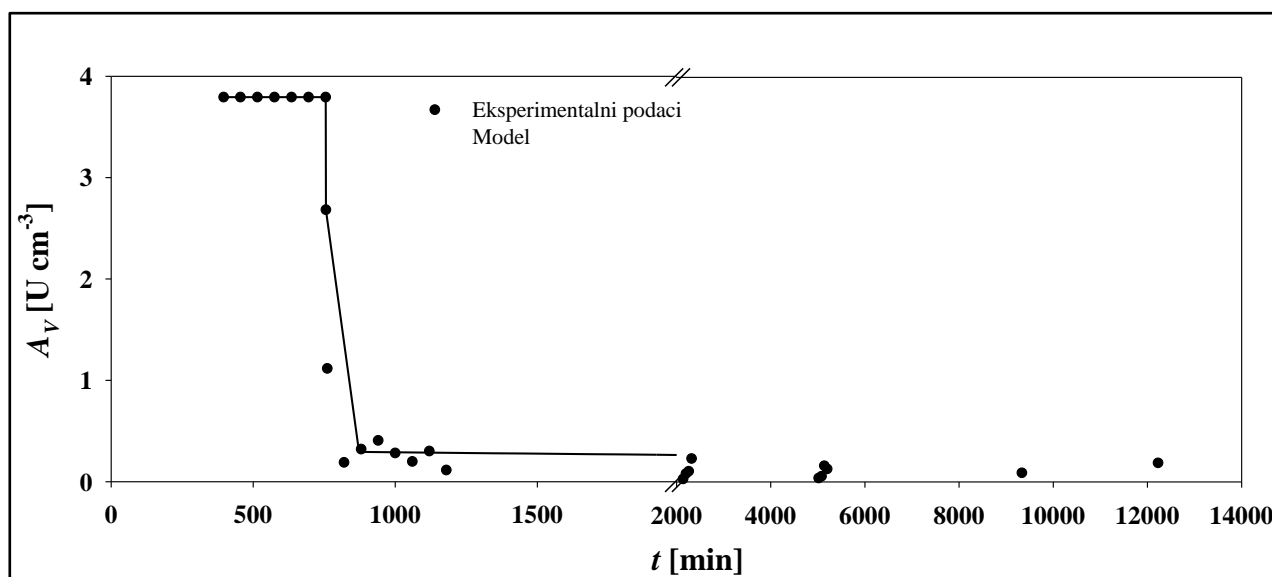


Slika 5.15 Promjena aktivnosti enzima benzoilformat dekarboksilaze tijekom provođenja drugog eksperimenta

Tablica 5.7 Parametri bieksponencijalnog modela deaktivacije enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida* procijenjeni u programskom paketu *Scientist* na temelju provedenog eksperimenta

Parametar	Eksperiment 1.	
	I. ciklus	III. ciklus
$a^{\text{BFD}}$ [-]	0,36703	0,36703
$b^{\text{BFD}}$ [-]	0,63297	0,63297
$k_1^{\text{BFD}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	0,00142	0,00142
$k_2^{\text{BFD}}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	0,052177	0,000291

Prema Slici 5.16 može se zaključiti da ni u drugom eksperimentu tijekom provođenja drugog ciklusa eksperimenta nije došlo do deaktivacije enzima *LbADH*, što je posljedica male koncentracije acetaldehida u otopini, koji se u prethodnom ciklusu djelomično potrošio i ispario zbog niske temperature vrelišta. U trećem ciklusu ovog eksperimenta, nakon dodatka acetaldehida i benzaldehida, došlo je do značajnije deaktivacije enzima *LbADH*, a posljedica navedenog je i dulje trajanje trećeg ciklusa. Deaktivacija je opisana bieksponencijalnim modelom (jednadžba 4.6), a parametri navedenog modela procijenjeni su u *Scientistu* na temelju provedenih eksperimenata te su prikazani Tablicom 5.8.



Slika 5.16 Promjena aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze tijekom provođenja drugog eksperimenta

Tablica 5.8 Parametri bieksponecijalnog modela deaktivacije enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis* procijenjeni u programskom paketu *Scientist* na temelju provedenog eksperimenta

Parametar	Eksperiment 2.	
	III.	ciklus
$a^{LbADH}$ [-]	0,1109	
$b^{LbADH}$ [-]	0,8891	
$k_1^{LbADH}$ [min <sup>-1</sup> ]	$9,55 \cdot 10^{-5}$	
$k_2^{LbADH}$ [min <sup>-1</sup> ]	0,2133	

Na temelju provedenih eksperimenata i procijenjenih parametara može se zaključiti da je deaktivacija enzima benzoilformat dekarboksilaze u oba opisana slučaja manja u trećem ciklusu eksperimenata. Može se pretpostaviti da je navedeno posljedica veće koncentracije proteina u sustavu tijekom provođenja ovog ciklusa eksperimenta, koji djeluju kao stabilizatori enzima te smanjuju deaktivaciju BFD. Unatoč predviđenom, da će deaktivacija alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis* biti manja u prvom provedenom eksperimentu uslijed niže koncentracije acetaldehida u sustavu, do navedenog nije došlo. Deaktivacija *LbADH* u oba je eksperimenta približno ista što se vidi i prema duljini trajanja trećeg ciklusa eksperimenata koja je također gotovo ista. Iz navedenog se može zaključiti da prisustvo acetaldehida u sustavu utječe na deaktivaciju *LbADH*, dok njegova koncentracija u sustavu nema značajan utjecaj na brzinu deaktivacije enzima te je bolje provoditi eksperiment s višim početnim koncentracijama acetaldehida, s obzirom na kraće trajanje prva dva ciklusa eksperimenta.

Pretpostavljeni matematički model (jednadžbe 4.1 – 4.13) je uz procijenjene parametre (Tablice 5.1 – 5.8) vrlo dobro opisao eksperimentalne rezultate.

## 6. ZAKLJUČAK

U radu je provedena biokatalitička sinteza (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru.

Kinetika enzima BFD opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom supstratom, acetaldehidom. Zaključeno je da je benzaldehid značajno specifičniji supstrat za BFD u odnosu na acetaldehid kao i da acetaldehid značajno deaktivira BFD. Deaktivacija BFD ne ovisi značajno o koncentracijama acetaldehida, a opisana je bieksponecijalnim modelom.

Kinetika enzima *LbADH* uz prisustvo koenzima NADH opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom,  $\text{NAD}^+$ , dok je kinetika povratne reakcije opisana kinetikom drugog reda. Iz provedenih ispitivanja proizlazi da je NADH značajno specifičniji supstrat za *LbADH* u odnosu na (*S*)-2-HPP.

Kinetika enzima *CbFDH* opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NADH, s uključenom inhibicijom supstratima iz drugih reakcija, (*S*)-2-HPP i acetaldehidom. Prema rezultatima provedenih ispitivanja može se vidjeti da je  $\text{NAD}^+$  znatno specifičniji supstrat za *CbFDH* u odnosu na amonij formijat.

Na temelju rezultata dobivenih iz provedenih eksperimenata zaključeno je da u trećem ciklusu dolazi do deaktivacije *LbADH* te je pretpostavljeno da je razlog tome veća koncentracija acetaldehida u sustavu. Deaktivacija je opisana bieksponecijalnim modelom. Konačno, zaključeno je kako je eksperiment bolje provoditi uz više koncentracije acetaldehida, s obzirom na kraće trajanje reakcije i činjenicu da je deaktivacija korištenih enzima u oba slučaja podjednaka, odnosno neovisna o koncentraciji acetaldehida.

Pretpostavljeni matematički model je uz procijenjene parametre vrlo dobro opisao eksperimentalne dobivene rezultate.



## 7. LITERATURA

1. Aymard, C., Belarbi, A., Kinetics of thermal deactivation of enzymes: a simple three parameters phenomenological model can describe the decay of enzyme activity, irrespectively of the mechanism, *Enzyme and Microbial Technology* 27 (2000), str. 612-618
2. Blanch, H.W., Clark, D.D., Biochemical Engineering, Marcel Dekker, Inc., New York (1993)
3. Bruice, T.C., Benkovic, S.J., Biorganic mechanisms, Benjamin, New York (1965), pp. 301
4. Demir, A.S., Dünnwald, T., Iding, H., Pohl, M., Mülle, M., Asymetric benzoin reaction catalyzed by benzoylformate decarboxylase, *tetrahedron-Asymetry* 10 (1999), str. 4769-4774
5. Denniston, K., Topping, J., Caret, R. General, Organic and Biochemistry, McGraw-Hill, New York (2008), str. 652
6. Duraković, S., Opća mikrobiologija, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb (1996), str. 231-232
7. D'Souza, S.F., Immobilized enzymes in bioprocess, *Curent Science in India* 77 (1999), str. 69-79
8. Findrik, Z., *Biokatalitička oksidacija L-DOPE*, magistrski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (2004)
9. Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., Biocatalytic ketone reduction- - a powerful tool for the production of chiral alcohols-part II: whole-cell reductions, *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (2007), str. 237-248
10. Hoyos, P., Sinisterra, J., Molinari, F., Alcantara, A. R., De Maria, P.D., Biocatalytic strategies for asymmetric synthesis of  $\alpha$ -hidroxy ketones, *Accounts of Chemical Research* 43 (2) (2010), str. 288-299
11. [http://www.bionet-skola.com/w/Enzimi#Podela\\_enzima](http://www.bionet-skola.com/w/Enzimi#Podela_enzima) (pristup 13. lipnja 2015.)
12. [https://www.fkit.unizg.hr/images/50010643/KATALOG\\_FKIT.pdf](https://www.fkit.unizg.hr/images/50010643/KATALOG_FKIT.pdf) (pristup 15. lipnja 2015.)
13. Hummel, W., New alcohol dehydrogenases for the synthesis of chiral compounds, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 58 (1997), str. 145-184

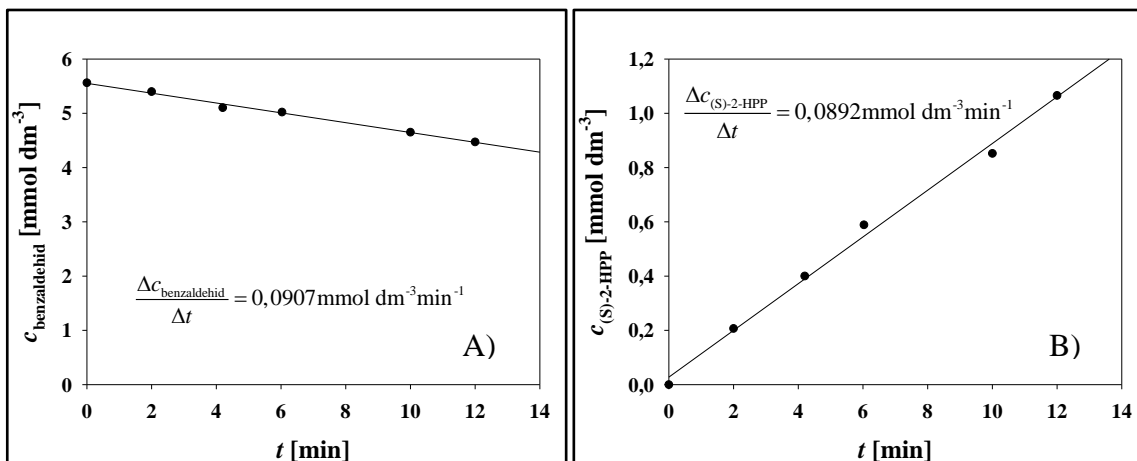
14. Husanović, D., *Proizvodnja (S)-2-hidroksipropiofenona katalizirana benzoilformat dekarboksilazom u različitim tipovima reaktora*, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2012)
15. Iding, H., Dunwald, T., Greiner, L., Liese, A., Muller, M., Siegert, P., Grotzinger, J., Demir, A.s., Pohl, M., Benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* as stable catalyst for the synthesis of chiral 2-hydroxy ketones, *Chemistry-a European Journal* 6 (2000), str. 1483-1495
16. Iding, H., Siegert, P., Mesch, K., Pohl, M., Application of  $\alpha$ -keto acid decarboxylases in biotransformations, *Biochimica et Biophysica Acta* 1385 (1998), str. 307-322
17. Kurlemann, N., Liese, A., Immobilization of benzaldehyde lyase and its application as a heterogeneous catalyst in the continuous synthesis of chiral 2-hydroxy ketone, *Tetrahedron-Asymmetry* 15 (2004), str. 2955-2958
18. Leuchs, S., Greiner, L., Alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*: a versatile robust catalyst for enantioselective transformations, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 25 (2) (2011), str. 267-281
19. Loughlin, W.A., Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technology* 74 (1) (2000), str. 49-62
20. Mayer, H.-P., Sustainability and Biotechnology, *Organic Process Research and Development* 15 (2011), str. 180-188
21. Murphy, E.F., Gilmour, S.G. i Crabble, M.J., Effective experimental design: enzyme kinetics in bioinformatics era, *Drug Discovery Today* 7 (20) (2002), str. 187-191
22. Nakamura, K., Yamanaka, R., Matsuda, T., Harada, T., Recent developments in asymmetric reduction of ketones with biocatalysts, *Tetrahedron: Asymmetry* 14 (2003), str. 2659-2681
23. Niefind, K., Riebel, B., Mueller, J., Hummerl, W., Schomburg, D., Crystallization and preliminary characterization of crystals of R-alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*, *Acta Crystallographica Section D* 56 (12) (2000), str. 1696-1698
24. Patel, R.N., Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis, *Coordination Chemistry Reviews* 252 (2008), str. 660-661
25. Pepper, S., Kara, S., Long, W.S., Liese, A., Niemeyer, B., Immobilization and characterization of benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida* on spherical silica carrier, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 34 (2011), str. 671-680
26. Pine, S.H., *Organska kemija, Školska knjiga*, Zagreb (1994), str. 164-167

27. Polakovič, M., Bryjak, J., Modelling of the kinetics of thermal inactivation of glucoamylase from *Aspergillus niger*, *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 19-20 (2002), str. 443-450
28. Poljanac, M., *Optimiranje biokatalitičke sinteze hidroksi-dope*, magistrski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (2004)
29. Riebel, B.R., Gibbs, P.R., Wellborn, W.B., Bommarius, A.S., Cofactor regeneration of both NAD<sup>+</sup> from NADH and NADP<sup>+</sup> from NADPH: NADH oxidase from *Lactobacillus safanciscensis*, *Advanced Synthesis & Catalysis* 345 (6-7) (2003), str. 707-712
30. Sakai, Y., Murdanoto, A.P., Konishi, T., Iwamatsu, A., Kato, N., Regulation of the Formate Dehydrogenase Gene, FDH1, in the Methylophilic Yeast *Candida boidinii* and Growth Characteristics of an FDH-Disrupted Strain on Methanol, Methylamine, and Choline, *Journal of Bacteriology* 179 (14) (1997), str. 4480-4485
31. Schirwitz, K., Schmidt, A., Lamzin, V.S., High-resolution structures of formate dehydrogenase, *Protein Science* 16 (2007), str. 1146-1156
32. Schüte, H., Flossdorf, J., Sahm, H., Kula, M.R., Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*, *European Journal of Biochemistry* 62 (1) (1976), str. 151-160
33. Švarc, A., Matematičko modeliranje procesa proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol katalizirane alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis*, rad za Rektorovu nagradu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2013)
34. Tishkov, V., Popov, V.O., Catalytic mechanism and application of formate dehydrogenase, *Biochemistry (moscow)* 69 (11) (2004), str. 1252-1767
35. Trivedi, A., Heinemann, M., Spiess, A.C., Dausmann, T., Buechs, J., Optimization of adsorptive immobilization of alcohol dehydrogenases, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 99 (4) (2005), str. 340-347
36. Vasić-Rački, Đ., Biokemijsko inženjerstvo, *Kemija u industriji* 39 (10) (1990), str. 459-467
37. Vasić-Rački, Đ., Findrik, Z., Vrsalović Presečki, A., Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (4) (2011), str. 845-856
38. Vrsalović Presečki, A., Studij fumaraze i alkohol dehidrogenaze u biotransformacijama, disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2006)

39. Wilcocks, R., Ward O., Collins S., Dewdney N., Hong Y., Prosen E., Acyloin formation by benzoylformate decarboxylase from *Pseudomonas putida*, *Applied and Environmental Microbiology* 58 (1992), str. 1699-1704
40. Wohlgemuth, R., Molecular and engineering perspectives of the biocatalysis interface to the chemical synthesis, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* 25 (1) (2011), str. 125-134

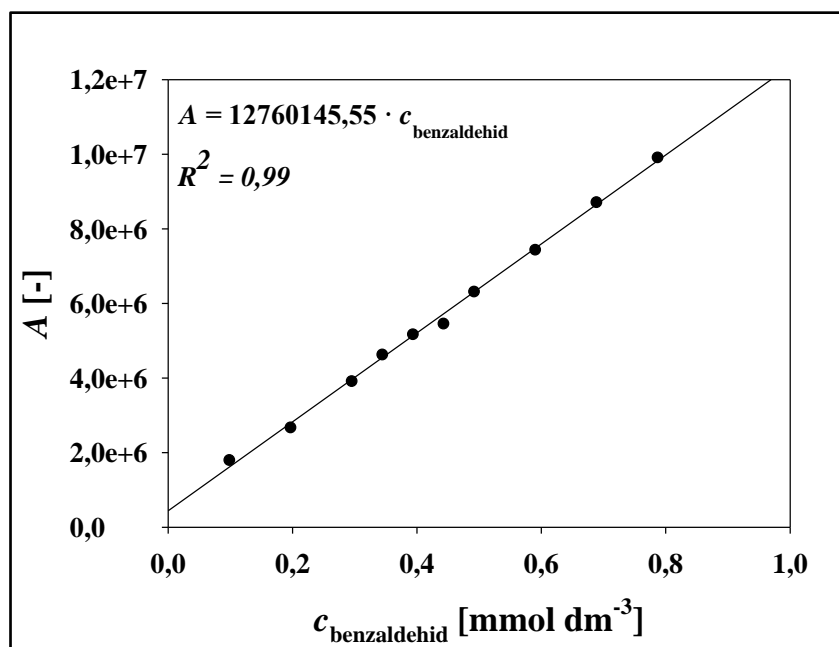
## 8. PRILOZI

### Prilog 1 – Primjer određivanja aktivnosti enzima benzoilformat dekarboksilaze metodom početnih brzina

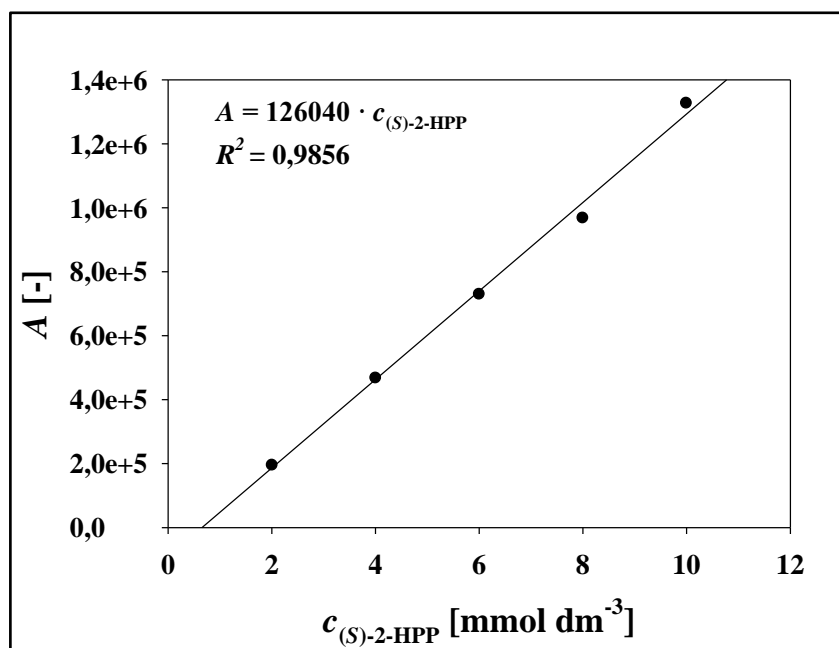


Slika 8.1 Primjer određivanja početne reakcijske brzine za enzim benzoilformat dekarboksilazu u reakciji proizvodnje (S)-2-hidroksipropiofenona: A) praćenjem pada koncentracije benzaldehida; B) praćenjem porasta koncentracije (S)-2-hidroksipropiofenona

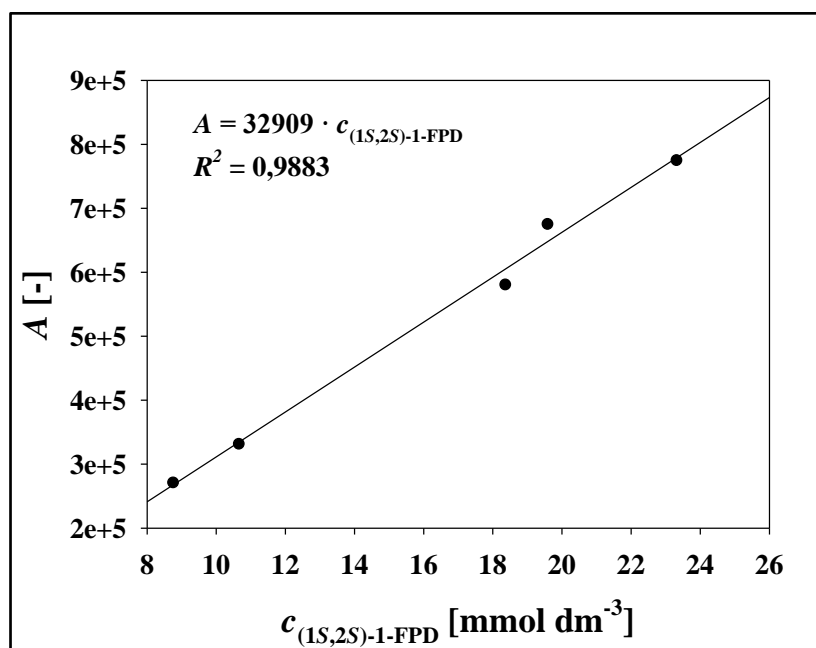
### Prilog 2 – Baždarni dijagrami



Slika 8.2 Baždarni dijagram za benzaldehid



Slika 8.3 Baždarni dijagram za (S)-2-hidroksipropiofenon



Slika 8.4 Baždarni dijagram za (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diol

### Prilog 3 – Model

```
// Prvi ciklus
IndVars:t
DepVars: ba,hpp,aa,Vm
Params: kba,kaa,Vm0,k1,k2

r=ce*Vm*ba*aa/((ba+kba)*(aa*(1+aa/Kis)+kaa))

Vm0=19.403
kba=19.4
kaa=775
Kis=514.1746
ce=1
t=0
aa=40.63
ba=20.07
hpp=0

Vml=0.36703
k1=0.00142
k2=0.24595

aa'=-r
ba'=-r
hpp'=r
Vm=Vm0*(Vml*exp(-k1*t)+(1-Vml)*exp(-k2*t))
***
```

```
// Drugi ciklus
IndVars:t
DepVars: ba,hpp,diol,aa,nad,nadh,f
Params: kba,kaa,Vm0,kb1,kb2,Vm2,khpp,vmf,Kinadh

r1=ce*Vm1*ba*aa/((ba+kba)*(aa*(1+aa/Kis)+ka
a))
r2=adh*Vm2*hpp*nadh/((hpp+khpp)*(nadh+kna
dh*(1+nad/Kinadh)))
r3=k3*nad*diol
r4=fdh*Vmf*nad*f/((f+kf*(1+hpp/Kihpp+aa/Kiaa
))*(nad+knad*(1+nadh/Kinadh)))

Kiaa=23109
Kihpp=4.09894031
Kinadh=0.00264880751
vmf=0.521638
kf=4.340856
knad=0.0052091
k3=0.002486326173876155
vm2=0.053225386843093657
khpp=36.4167742086461814
knadh=0.08180332486767225
Kinad=1.36810421414009453
Vm0=8.3678
kba=19.4
kaa=775
Kis=514.1746
ce=1

t=1591
aa=21.655
ba=1.725
hpp=18.975
adh=5
fdh=1
nadh=9.439
diol=0
nad=0
f=111.005

Vmlb=0.36703
kb1=0.00142
kb2=0.24595
Vm1=Vm0*(Vmlb*exp(-kb1*t)+(1-Vmlb)*exp(-
kb2*t))

aa'=-r1
ba'=-r1
hpp'=r1-r2+r3
nadh'=r3-r2+r4
diol'=r2-r3
nad'=r2-r3-r4
f'=-r4

***
```

```

// Treci ciklus
IndVars:t
DepVars: ba,hpp,diol,bfd,adh,aa,nad,nadh,f
Params: kba,kaa,Vm0,kb1,kb2,Vm2,khpp,vmf,Kinadh,ka1,ka2,Vmlb

r1=ce*Vm1*ba*aa/((ba+kba)*(aa*(1+aa/Kis)+kaa))
r2=ad*Vm2*hpp*nadh/((hpp+khpp)*(nadh+knadh*(1+nad/Kinadh)))
r3=k3*ad*Vm2/Vm20*nad*diol
r4=fdh*Vmf*nad*f/((f+kf*(1+hpp/Kihpp+aa/Kiaa))*(nad+knadh*(1+nadh/Kinadh)))

Kiaa=23109
Kihpp=4.09894031
Kinadh=0.00264880751
vmf=0.521638
kf=4.340856
knadh=0.0052091
k3=0.0004972
vm20=0.053225386843093657
khpp=36.4167742086461814
knadh=0.08180332486767225
Kinadh=1.36810421414009453
Vm0=8.3678
kba=19.4
kaa=775
Kis=514.1746
ce=1

t=1830
aa=46.061
ba=12.9
hpp=0.13198
ad=5
fdh=1
nadh=9.439
diol=20.437
nad=4.43e-5
f=90.568

Vmlb=0.36703
kb1=0.00142
kb2=0.000265
Vmla=0.101178159796636
ka1=0.0000873784750259568
ka2=0.0864972488892967
bf0=80.9
ad0=3.38
Vm1=Vm0*(Vmlb*exp(-kb1*(t-1830))+(1-Vmlb)*exp(-kb2*(t-1830)))
Vm2=Vm20*(Vmla*exp(-ka1*(t-1830))+(1-Vmla)*exp(-ka2*(t-1830)))
aa'=-r1
ba'=-r1
hpp'=r1-r2+r3
nadh'=r3-r2+r4
diol'=r2-r3
nad'=r2-r3-r4
f'=-r4
adh=ad0*(Vmlb*exp(-ka1*(t-1830))+(1-Vmlb)*exp(-ka2*(t-1830)))
bfd=bf0*(Vmla*exp(-kb1*(t-1830))+(1-Vmla)*exp(-kb2*(t-1830)))

***

```



## 9. SIMBOLI I SKRAĆENICE

### GRČKI SIMBOLI

$\Delta$  – promjena [-]

$\epsilon$  – molarni apsorpcijski (ekstincijski) koeficijent [ $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]

$\lambda$  – valna duljina [nm]

### SIMBOLI

$a^i$  – udio izoenzima [-]

$A$  – površina [-]

$ABS$  – apsorbancija [-]

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

$A_V$  – volumna aktivnost enzima [ $\text{U cm}^{-3}$ ]

$b^i$  – udio izoenzima [-]

$b$  – duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm]

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

$d$  – promjer kivete [cm]

$k_1, k_2$  – konstante bieksponecijalnog modela deaktivacije enzima [ $\text{min}^{-1}$ ]

$k_3$  – konstanta brzine povratne reakcije [ $\text{dm}^6 \text{mmol}^{-1} \text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$ ]

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

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

$l$  – duljina kolone [cm]

$q$  – protok [ $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$ ]

$r$  – reakcijska brzina [ $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ]

$t$  – vrijeme [min]

$T$  – temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ]

$u$  – linearna brzina [ $\text{cm min}^{-1}$ ]

$V$  – volumen [ $\text{dm}^3$ ]

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

$X$  – konverzija [%]

## SKRAĆENICE

(1*S*,2*S*)-1-FPD – (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol

(*S*)-2-HPP – (*S*)-2-hidroksipropiofenon

ADH – enzim alkohol dehidrogenaza

BFD – enzim benzoilformat dekarboksilaza

*Cb*FDH – enzim formijat dehidrogenaza izolirana iz kvasca *Candida boidinii*

E – enzim

ES – kompleks enzim – supstrat

FID – plameno ionizacijski detektor (*engl. Flame ionization detector*)

FDH – enzim formijat dehidrogenaza

GC – plinska kromatografija (*engl. Gas chromatography*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*engl. High performance liquid chromatography*)

*Lb*ADH – enzim alkohol dehidrogenaza izolirana iz bakterije *Lactobacillus brevis*

$\text{NAD}^+$  – koenzim nikotinamid adenin dinukleotid, oksidirani oblik

NADH – koenzim nikotinamid adenin dinukleotid, reducirani oblik

P – produkt

S – supstrat

ThDP – tiamin difosfat (*engl. Thiamine diphosphate*)

## ŽIVOTOPIS

Lela Pintarić rođena je 1. ožujka 1991. godine u Koprivnici. Osnovno obrazovanje stječe u Osnovnoj školi „Antun Nemčić Gostovinski, Koprivnica“, nakon koje 2005. godine upisuje Gimnaziju „Fran Galović“, opći smjer, također u Koprivnici. Maturirala je s odličnim uspjehom 2009. godine. Preddiplomski studij Ekoinženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2009., a završava 2013. godine obranom završnog rada na temu *Procesi proizvodnje i primjena kationskih tenzida*. Iste godine upisuje Diplomski studij Ekoinženjerstva tijekom kojeg sudjeluje u izradi znanstvenog rada na temu *Modeliranje biokatalitičke sinteze nanočestica CaCO<sub>3</sub>* prijavljenog na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.