

# Matematički model enzimatske sinteze 6-cijano-4-ketoheksan kiseline

---

Sokač, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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:149:307303>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Tea Sokač

**Matematički model enzimatske sinteze 6-cijano-4-ketoheksan kiseline**

**DIPLOMSKI RAD**

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

Članovi povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

dr. sc. Martina Sudar, zn. suradnica

izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2017.



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

*Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

*Ovom prilikom zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na uloženom vremenu, trudu i savjetima te ukazanom strpljenju tijekom izrade ovog rada. Također se zahvaljujem dr. sc. Martini Sudar na pomoći, savjetima i strpljenju pri izvođenju eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem svojoj obitelji, bratu, prijateljima i prijateljicama koji su uvijek bili uz mene.*

*I na kraju, najveću zaslugu za ono što sam postigla pripisujem svojim roditeljima koji su uvijek bili tu za mene, bez obzira radilo se o sretnim ili tužnim trenucima.*

## SAŽETAK

U ovom radu provedena je enzimska reakcija katalizirana enzimom sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD) uz  $\alpha$ -ketoglutarat kao donorski supstrat, akrilonitril kao akceptorski supstrat te uz magnezijev sulfat kao kofaktor i tiamin difosfat kao koenzim.

Provedeni su eksperimenti u kotlastom reaktoru radi praćenja stabilnosti  $\alpha$ -ketoglutarata i akrilonitrila. Na temelju dobivenih rezultata u programskom paketu *Scientist* procijenjene su konstante polimerizacije akrilonitrila. Porastom koncentracije akrilonitrila raste i brzina polimerizacije, a time i konstanta polimerizacije akrilonitrila. Koncentracija  $\alpha$ -ketoglutarata se vrlo malo smanjila nakon 48 sati što znači da je stabilan u reakcijskoj smjesi.

Reakcija između  $\alpha$ -ketoglutarata i akrilonitrila katalizirana enzimom MenD provedena je u kotlastom reaktoru. Tijekom reakcije praćene su koncentracije reaktanata i produkta. Rezultati pokazuju smanjenje koncentracije  $\alpha$ -ketoglutarata i akrilonitrila te povećanje koncentracije produkta. Pomoću matematičkog modela za ovu enzimsku reakciju, provedene su simulacije u programskom paketu *Scientist* te se može uočiti dobro slaganje s eksperimentalnim rezultatima.

**Ključne riječi:** MenD, kotlasti reaktor,  $\alpha$ -ketoglutarat, akrilonitril, Stetter reakcije

## ABSTRACT

In this work an enzymatic reaction catalyzed by enzyme synthase 2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylic acid (MenD) with  $\alpha$ -ketoglutarate as donor substrate, acrylonitrile as acceptor substrate, magnesium sulfate as cofactor and thiamine diphosphate as coenzyme was carried out.

Experiments were carried out to evaluate the stability of  $\alpha$ -ketoglutarate and acrylonitrile. Acrylonitrile polymerization constant was estimated in software-package *Scientist*. When the concentration of acrylonitrile is increasing, the rate of polymerization is increasing and the constant of polymerization is increasing too. The concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate decreased a little after 48 hours which means that it is stable in the reaction mixture.

The reaction between  $\alpha$ -ketoglutarate and acrylonitrile catalyzed by enzyme MenD was carried out in the batch reactor. During the reaction, concentrations of  $\alpha$ -ketoglutarate, acrylonitrile and product were followed. Results show that concentrations of substrates are decreasing and the concentration of product is increasing.

Mathematical model for this enzymatic reaction was used in *Scientist* for simulations and it is in good agreement with experimental results.

**Key words:** MenD, batch reactor,  $\alpha$ -ketoglutarate, acrylonitrile, Stetter reactions

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Biokatalizatori.....	2
2.1.1. Struktura enzima.....	3
2.1.2. Djelovanje enzima.....	4
2.1.3. Klasifikacija enzima.....	6
2.2. Sintaza 2-sukcinil-5-enolprijavil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD).....	7
2.3. Enzimski kinetika.....	8
2.4. Matematičko modeliranje.....	11
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	13
3.1. Aparatura.....	13
3.1.1. Analitička vaga.....	13
3.1.2. Homogenizator.....	13
3.1.3. Spektrofotometar.....	14
3.1.4. Tresilica.....	14
3.1.5. Uređaj za kapljevinsku kromatografiju visokog učinka (HPLC).....	15
3.2. Materijali.....	16
3.3. Analitičke metode.....	16
3.3.1. Određivanje koncentracije proteina pomoću Bradfordovog testa.....	16
3.3.2. HPLC metode.....	17
3.3.3. Provedba eksperimenata.....	18
4. MATEMATIČKI MODEL.....	21
5. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
5.1. Stabilnost akrilonitrila u reakcijskoj smjesi.....	23
5.2. Stabilnost $\alpha$ -ketoglutarata u reakcijskoj smjesi.....	29
5.3. Ispitivanje različitih biokatalizatora.....	30
5.4. Eksperimenti u kotlastom reaktoru.....	30
6. ZAKLJUČAK.....	33
7. LITERATURA.....	34
8. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA.....	37
9. PRILOZI.....	38
ŽIVOTOPIS.....	41

## 1. UVOD

Proizvodnja farmaceutika uključuje više koraka: izolaciju intermedijera te njegovu uporabu u sljedećem koraku proizvodnje što oduzima vrijeme i novac. Ta proizvodnja također podrazumijeva potrošnju kemikalija i energije. U posljednjih nekoliko desetljeća, znanstvenici se bave proučavanjem novih, integriranih procesa koji uključuju manje resursa i prihvatljiviji su za okoliš jer proizvode manje otpadnih tvari.<sup>1</sup> Razvoj tih procesa u skladu je s principima *Zelene kemije*.<sup>2</sup> Takvi procesi nazivaju se enzimski katalizirani procesi.

Enzimске reakcije imaju neke prednosti u odnosu na klasične kemijske reakcije: provode se pri blagim uvjetima, enzimi su enantioselektivni i stereoselektivni što je važno u farmaceutskoj industriji, iskorištenje reakcije je visoko, a troškovi prilikom pročišćavanja produkta su manji.<sup>1</sup> Ograničavajući faktor uporabe enzima jest njihova nestabilnost, stoga je važno povećati operacijsku stabilnost enzima, odnosno učiniti enzim stabilnijim kroz dulji vremenski period.<sup>3</sup>

Sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD) je jedan od enzima važnih za biosintetičko nastajanje menakinona, a katalizira Stetterovu reakciju, adiciju  $\alpha$ -ketoglutarata na izokorizmat, ali i razne druge supstrate.<sup>4</sup>



## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Biokatalizatori

Biokatalizatori ili enzimi (fermenti) su tvari biološkog podrijetla koje ubrzavaju kemijske reakcije potrebne za održavanje životnih funkcija. Oni ne djeluju samo u živim organizmima nego i izvan njih (npr. u laboratorijskim posudama). Industrijski se proizvode i djeluju kao izvanredno aktivni katalizatori, a sudjeluju i u izmjeni energije između stanice i njezine okoline. Ime enzim dolazi od grčke riječi “en zym” što znači u kvasu, a ime ferment dolazi od latinske riječi “fermentum” što također znači kvas. Oba naziva podsjećaju na najstariji poznati enzimski preparat, kvas ili kiselo tijesto, koji se već u antičkom Egiptu upotrebljavao u proizvodnji kruha.<sup>5</sup>

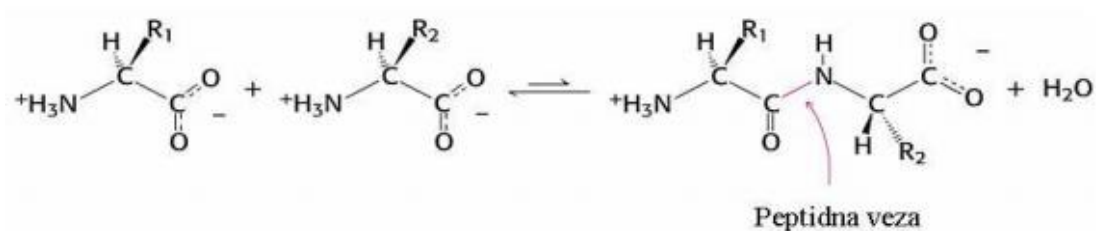
Enzimi iz sirovina biljnog i životinjskog podrijetla upotrebljavaju se odavno, a mnogi od njih upotrebljavat će se i u budućnosti jer su zbog svojih specifičnih svojstava pogodni za svrhe kojima služe. Danas je poznato oko 3500 vrsta enzima, a dobivaju se isključivo pomoću živih stanica. Većina enzima koristi se u prehrambenoj industriji.<sup>5</sup>

U odnosu na klasične kemijske katalizatore, biokatalizatori posjeduju neke prednosti: djeluju pri blagim reakcijskim uvjetima, što je važno ukoliko je u pitanju produkt koji je temperaturno osjetljiva tvar te ne zahtijevaju ekstremne pH vrijednosti. Biokatalizatori ubrzavaju reakcije i do  $10^{20}$  puta, a mogu djelovati izvan vodenog reakcijskog medija. Također pokazuju određenu selektivnost, obnovljivi su, ekološki prihvatljivi te su biorazgradivi. Osnovni nedostaci enzima kao biokatalizatora su relativno visoka cijena, pojava inhibicije supstratom ili produktom te sklonost deaktivaciji zbog čega se često imobiliziraju na čvrsti nosioc.<sup>6</sup> Osim navedenih nedostaka, može se navesti i to da ubrzavaju samo jednu reakciju, nestabilni su izvan prirodnog okruženja te se dobivaju u malim količinama.<sup>6</sup>

Imobilizacija enzima omogućuje njegovu višekratnu uporabu te ga čini stabilnijim. Tim postupkom se homogeni biokatalizator prevodi u heterogeni, a takvi biokatalizatori se nazivaju imobilizirani enzimi.<sup>6</sup> Imobilizirani enzimi mogu se ponovno koristiti, lako izdvojiti iz reakcijskog medija, a mogu se koristiti i u kontinuiranim procesima. Imobilizacija se može temeljiti na fizikalnim metodama (npr. adsorpcija) ili na kemijskim metodama uslijed djelovanja ionskih veza između enzima i određenih polimernih materijala.<sup>7</sup>

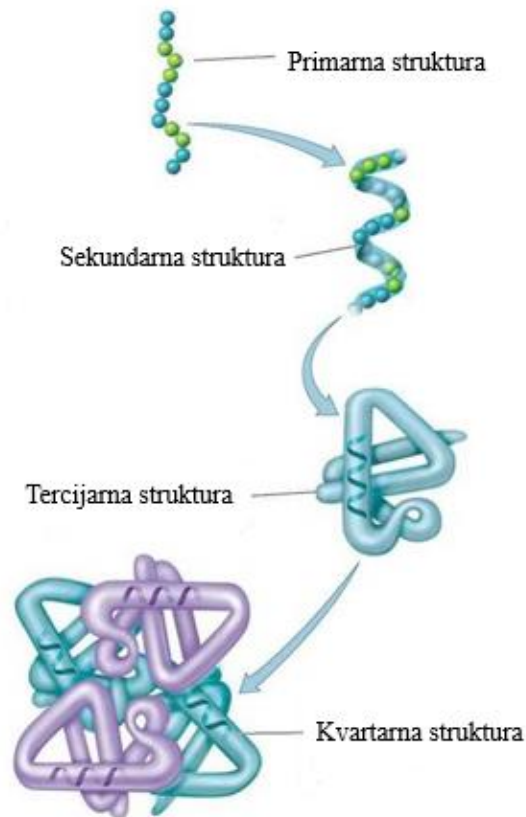
### 2.1.1. Struktura enzima

Enzimi su proteini koji nastaju kondenzacijom aminokiselina pri čemu nastaje peptidna veza (slika 1). Peptidna veza nastaje reakcijom karboksilne skupine jedne aminokiseline s karboksilnom skupinom druge aminokiseline. U prirodi postoji 20 aminokiselina u kojima se nalazi samo 5 elemenata periodnog sustava: ugljik, kisik, vodik, dušik i sumpor.<sup>8</sup>



**Slika 1.** Nastajanje peptidne veze<sup>8</sup>

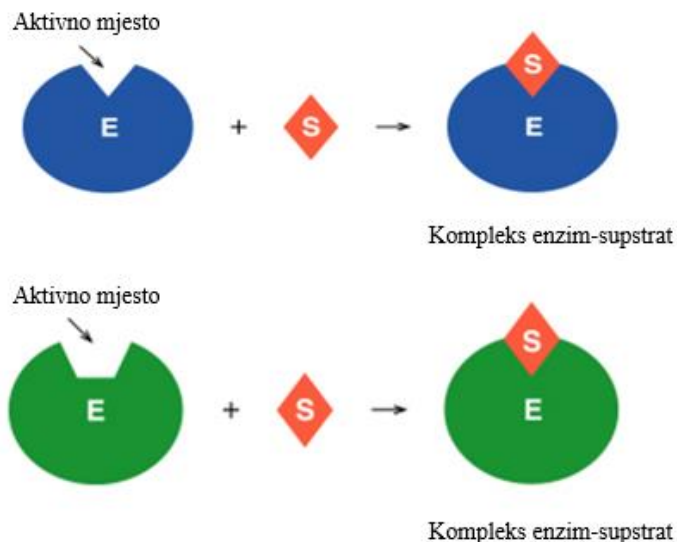
Enzimi se strukturno opisuju pomoću četiri različite strukture (slika 2). Primarnu strukturu čine kondenzacijski lanci aminokiselina povezani određenim redoslijedom. Sekundarna struktura je u obliku uzvojnice ili u nabranoj ravnini, a nastaje povezivanjem peptidnih lanaca vodikovim vezama u određeni oblik. Tercijarna struktura nastaje preklapanjem peptidnih lanaca i povezivanjem kovalentnim vezama tvoreći uvijenu strukturu, a kvartarna struktura je najkompleksnija struktura proteina koja je stabilizirana disulfidnim mostovima i sekundarnim valencijskim silama.<sup>9</sup>



**Slika 2.** Četiri različite strukture enzima<sup>8</sup>

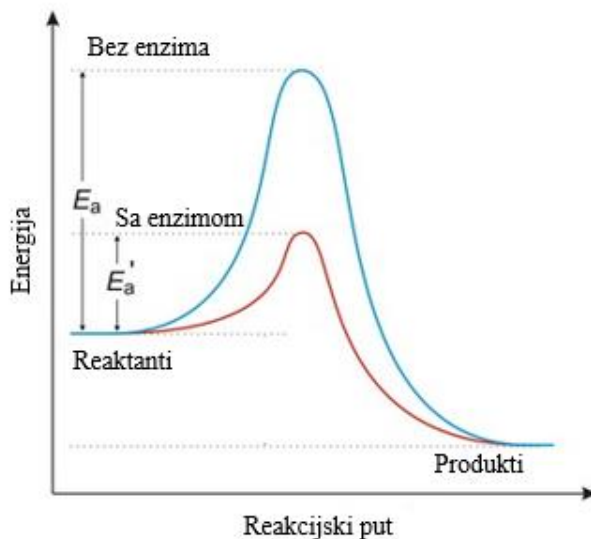
### 2.1.2. Djelovanje enzima

Za katalitičko djelovanje enzima odgovorno je aktivno mjesto koje nastaje od određenih dijelova polipeptidnog lanca posebnim nabiranjem. Pri denaturaciji proteina razara se konformacija te se zbog toga gubi katalitičko djelovanje iako je sekvenca aminokiselina ostala očuvana.<sup>10</sup> Predložena su dva modela vezanja supstrata za aktivno mjesto enzima (slika 3). Prvi model je model brava-ključ (eng. lock and key) pri čemu je aktivno mjesto enzima modelirano tako da se supstrat savršeno uklopi u njega. Pri tome je onemogućeno vezanje molekula neodgovarajućeg oblika. Drugi model naziva se model pobuđene prilagodbe (eng. induced fit) pri čemu se u trenutku vezanja supstrata, aktivno mjesto enzima modificira.<sup>11</sup>



**Slika 3.** Dva modela vezanja enzima i supstrata<sup>11</sup>

Enzimi djeluju tako da reakciju provode po reakcijskom putu na kojem je niža energija aktivacije te ju tako ubrzavaju.<sup>5</sup> Snižavanje energije aktivacije postiže se uzajamnim djelovanjem proteinskog djela enzima sa supstratom koji se povezuju u kompleks enzim-supstrat.<sup>10</sup> Reakcijski put s i bez enzima grafički je prikazan na slici 4.



**Slika 4.** Prikaz reakcijskog puta s i bez enzima<sup>11</sup>

Katalitička aktivnost mnogih enzima ovisi o prisutnosti neproteinskih komponenti koje se nazivaju kofaktori. Kofaktor može biti anorganski ion ( $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $K^+$ ) ili organska ili metaloorganska molekula koja se naziva koenzim (tiamin pirofosfat, flavin adenin nukleotid).<sup>11</sup>

Na aktivnost enzima utječu razni čimbenici kao što su pH, temperatura, koncentracija enzima i supstrata. Kao i u svim kemijskim reakcijama tako i u enzimskim reakcijama, brzina reakcije raste porastom temperature. Međutim, enzimskim reakcijama brzina raste s temperaturom samo do određenog maksimuma, a pri daljnjem povišenju temperature ona opada zbog sve veće toplinske denaturacije enzima. Što se tiče pH vrijednosti, postoji tzv. pH optimum pri kojemu je aktivnost enzima maksimalna. Neki enzimi ponašaju se atipično, a to znači da nemaju pH optimum nego im aktivnost raste s pH vrijednošću do određene vrijednosti nakon koje postaje konstantna.<sup>5</sup>

### 2.1.3. Klasifikacija enzima

Enzime klasificiramo na osnovu reakcije koju kataliziraju u 6 osnovnih skupina koje su prikazane u tablici 1.<sup>12</sup>

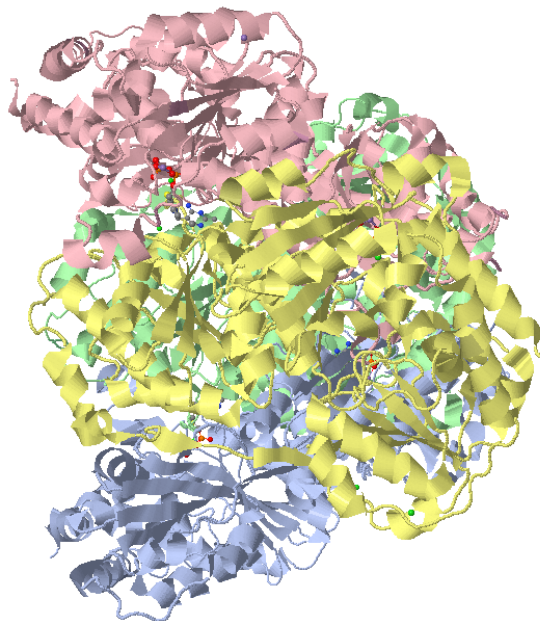
**Tablica 1.** Klasifikacija enzima

Vrsta enzima	Primjer enzima	Tip reakcije
Hidrolaze	Lipaze, proteaze	Hidroliza različitih spojeva
Izomeraze	Racemaze, mutaze	Izomerizacija
Ligaze	Karboksilaze, sintetaze	Spajanje dviju molekula kovalentnom vezom
Liaze	Dekarboksilaze, aldolaze	Cijepanje različitih spojeva oksidacijom i hidrolizom
Oksidoreduktaze	Oksidaze, dehidrogenaze	Redoks reakcije
Transferaze	Kinaze	Prijenos amino ili fosfatne skupine

## 2.2. Sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD)

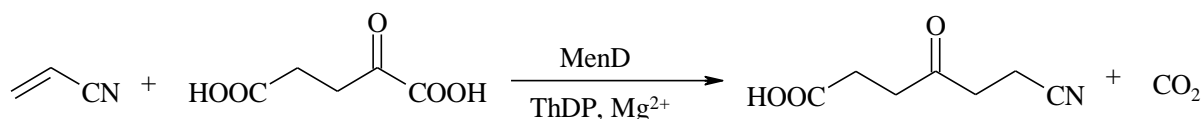
Prvi korak u klasičnoj sintezi menakinona (vitamina K<sub>2</sub>) je Stetterova reakcija katalizirana enzimom sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD).<sup>13,14</sup> Menakinon je važan u transportu elektrona u bakterijama te je neophodan za njihovo preživljavanje.<sup>14</sup> Stetterova reakcija je reakcija aromatskih aldehida (donorskih supstrata) i  $\alpha,\beta$ -nezasićenih karbonilnih spojeva (akceptorski supstrati) u prisutnosti cijanidnih iona pri čemu nastaju 1,4-adicijski produkti koji su vrlo zanimljivi jer se teško dobivaju ostalim katalitičkim metodama.<sup>15</sup> MenD pripada dekarboksilazama, a enzimi ove vrste ubrzavaju reakcije između donorskog i akceptorskog supstrata uz otpuštanje CO<sub>2</sub>.<sup>4</sup>

Na slici 5 prikazana je struktura enzima MenD. Sastoji se od 4 proteinska lanca, četiri tiamin pirofosfatna liganda, trinaest atoma klora i pet atoma mangana. Uz to u strukturu ulazi i 395 molekula vode.<sup>16</sup> MenD se najčešće izolira iz *Escherichia coli*.<sup>16</sup> Osim iz navedene bakterije, enzim MenD može se izolirati iz drugih vrsta mikroorganizama kao što su *Bacillus subtilis* i *Mycobacterium tuberculosis*.<sup>17</sup>



**Slika 5.** Struktura enzima MenD<sup>17</sup>

Budući da je aktivnost enzima MenD najveća u prisutnosti kofaktora, u ovom slučaju se kao kofaktor koristi  $Mg^{2+}$ , a mogu se koristiti i ioni drugih metala, poput  $Mn^{2+}$ .<sup>18</sup> U ovom radu, korišten je magnezijev klorid kao izvor magnezijevih iona. Aktivnost enzima MenD ovisi i o tiamin difosfatu (ThDP), koji je u ovom slučaju koenzim.<sup>20</sup> Na slici 6 prikazana je proučavana reakcija između akrilonitrila kao donorskog supstrata i  $\alpha$ -ketoglutarata kao akceptorskog supstrata koju katalizira enzim MenD.



**Slika 6.** Reakcija između  $\alpha$ -ketoglutarata i akrilonitrila katalizirana enzimom MenD<sup>19</sup>

### 2.3. Enzimska kinetika

Kinetika enzimskih reakcija opisuje se matematičkim modelom. Složenost matematičkog modela ovisi o karakteristikama promatrane enzimske reakcije: prisutnosti jednog ili više supstrata, prisutnosti inhibicije supstratom ili produktom te o deaktivaciji enzima.<sup>20</sup>

L. Michaelis i M. L. Menten su početkom 20. stoljeća istraživali kinetiku enzimskih reakcija te su pretpostavili da se prvo vežu enzim (E) i supstrat (S) dajući pri tome kompleks enzim-supstrat (ES) (jednadžba 1) uz pretpostavku da je to reverzibilna reakcija. Taj kompleks se pritom kemijski mijenja što rezultira stvaranjem produkta (P) i odvajanjem od enzima (E) (jednadžba 2).<sup>8</sup>



Ove jednadžbe vrijede za jednosupstratnu reakciju. Ako zanemarimo povratnu reakciju, početna brzina nastajanja produkta je proporcionalna koncentraciji kompleksa ES:<sup>8</sup>

$$r_0 = k_2 [ES] \quad (3)$$

Najveća brzina reakcije bit će ostvarena kada sve molekule enzima budu u obliku kompleksa ES. Ta brzina se definira kao maksimalna brzina enzimski katalizirane reakcije, a određuje se prema jednadžbi (4):<sup>8</sup>

$$V_m = k_2 [E_0] \quad (4)$$

Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) numerički izražava afinitet enzima prema supstratu, a definira se kao ona koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine, a ovisi o supstratu te o uvjetima okoline kao što su pH i temperatura. Eksperimentalno se određuje mjerenjem početne brzine reakcije ( $V_0$ ) kod različitih koncentracija supstrata, a računski se definira kao:<sup>21</sup>

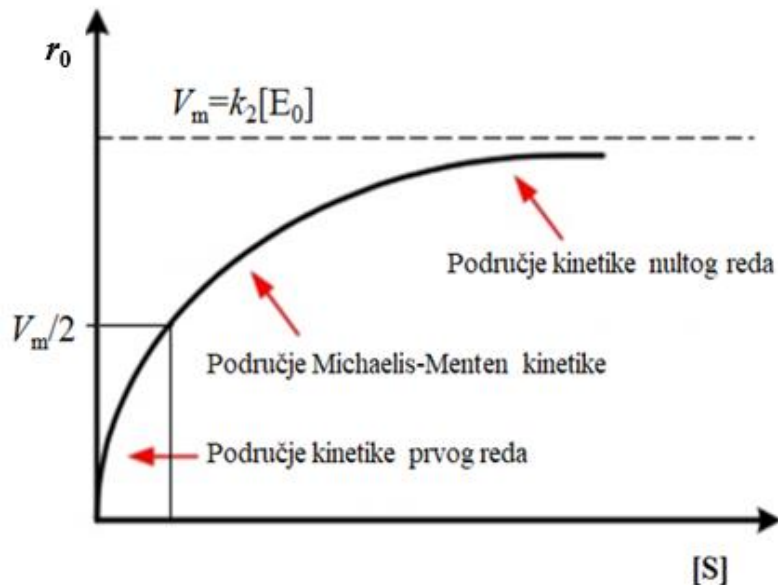
$$K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad (5)$$

Uvrštavanjem jednadžbi za ES i  $K_m$  u jednadžbu za  $V_m$  dobit ćemo Michaelis-Menteničinu jednadžbu:<sup>21</sup>

$$r_0 = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

Michaelis-Menteničina jednadžba opisuje jednosupstratnu reakciju, odnosno reakciju u kojoj reakcijska brzina ovisi o koncentraciji jednog supstrata.<sup>21</sup> Na sljedećoj slici (slika 7) prikazana je ovisnost početne brzine enzimski katalizirane reakcije o koncentraciji supstrata.





**Slika 7.** Ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menteničine kinetike<sup>21</sup>

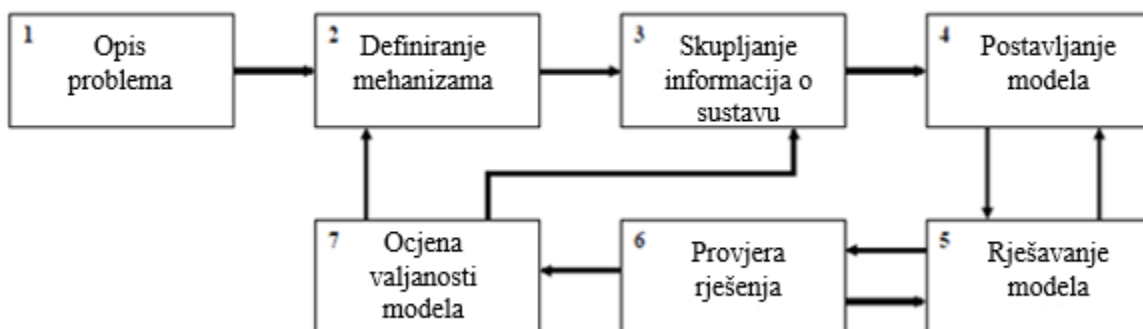
Michaelis-Menteničina krivulja prikazuje tri različita područja brzine reakcije. Pri vrlo niskim i vrlo visokim koncentracijama supstrata ovisnost reakcijske brzine o koncentraciji supstrata je linearna. Područje niskih koncentracija supstrata se može aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda, a područje visokih koncentracija supstrata se može aproksimirati kinetikom reakcije nultog reda.<sup>11</sup>

Vrlo često u enzimski kataliziranim sustavima dolazi do inhibicije i deaktivacije enzima. Inhibicija enzima je uzrokovana vezanjem neželjene komponente na aktivno mjesto enzima ili jednostavno vezanje nepoželjne komponente na enzim koji onemogućava daljnje vezanje supstrata na aktivno mjesto enzima. Time je reakcija djelomično ili potpuno onemogućena.<sup>11</sup>

## 2.4. Matematičko modeliranje

Matematičko modeliranje je postupak opisivanja realnog sustava matematičkim jednadžbama s ciljem razvoja i uporabe matematičkog modela za kasnije analize, projektiranja i optimiranja sustava za koji je model izrađen. Matematički model opisuje sustav pomoću skupova varijabli i jednadžbi koje opisuju odnose među varijablama.<sup>22</sup>

Varijable u modelu predstavljaju neka svojstva sustava (npr.  $T$ ,  $p$ ,  $c$ ,  $\rho$ ,  $v$ ). U modelu mogu postojati različiti tipovi varijabli: ulazne ili izlazne, zavisne ili nezavisne, varijable stanja i slučajne varijable. Matematički modeli mogu biti: linearni i nelinearni, stohastički i deterministički, statički i dinamički, diskontinuirani i kontinuirani te deduktivni i induktivni. Matematički modeli najčešće služe za optimiranje procesa koji opisuju.<sup>22</sup>



Slika 8. Sedam koraka postupka modeliranja<sup>23</sup>

Modeliranje kao temelj reakcijskog inženjerstva ima veliku ulogu u razvoju biokatalitičkih procesa, a njegova primjena će rasti s porastom upotrebe biokatalizatora u industriji. Postoje četiri važne stavke kada se govori o matematičkim modelima: biokatalizator (model opisuje katalizator na molekularnoj razini), katalitička reakcija (kinetički model opisuje mehanizam reakcije i njezinu brzinu), reaktor (model uključuje balance tvari i energije) i proces.<sup>24</sup>

Matematički model enzimske katalizirane reakcije sastoji se od kinetičke jednadžbe koja opisuje proces te od bilancnih jednadžbi koje su karakteristične s obzirom na reaktor u kojem se proces odvija (kotlasti reaktor, protočno kotlasti reaktor, reaktor s dotokom).<sup>24</sup>

Razvoj modela enzimske katalizirane reakcije temelji se na nekoliko važnih koraka. Prvi korak je karakterizacija biokatalizatora ovisno o pH vrijednosti i temperaturi. To je posebno važno kada je u sustavu prisutno više enzima te je potrebna optimalna vrijednost tih veličina jer u suprotnom može doći do deaktivacije enzima. Drugi korak uključuje ispitivanje svih komponenata u reakcijskom sustavu na brzinu reakcije. Treći korak uključuje procjenu kinetičkih parametara (npr.  $V_m$ ,  $K_m$ ) pomoću eksperimentalno dobivenih vrijednosti metodom nelinearne regresije. Sljedeći korak uključuje validaciju modela koja se provodi usporedbom eksperimentalnih rezultata sa simulacijama dobivenim pri istim uvjetima. Zadnji korak je uporaba modela za simulaciju procesa.<sup>24</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Aparatura

##### 3.1.1. Analitička vaga

Za vaganje potrebnih kemikalija korištena je laboratorijska analitička vaga AUW 120 Shimadzu (slika 9).



**Slika 9.** Laboratorijska analitička vaga

##### 3.1.2. Homogenizator

Za homogenizaciju uzoraka korišten je homogenizator IKA MS2 Minishaker (slika 10).



**Slika 10.** Homogenizator

### 3.1.3. Spektrofotometar

Koncentracija proteina (Bradfordov test) određivana je pomoću spektrofotometra Shimadzu UV-1601 (slika 11).



**Slika 11.** Shimadzu UV-1601 spektrofotometar

### 3.1.4. Tresilica

Eksperimenti su provedeni na Eppendorf tresilici prikazanoj na slici 12.



**Slika 12.** Eppendorf tresilica

### 3.1.5. Uređaj za kapljevinsku kromatografiju visokog učinka (HPLC)

Koncentracije reaktanata i produkta određivane su pomoću HPLC uređaja proizvođača Shimadzu (slika 13) sa sljedećim komponentama: Shimadzu DGU-20A<sub>3</sub> Prominence otplinjač; Shimadzu LC-20AT Prominence pumpa; Shimadzu LC-10AT VP pumpa; Shimadzu SIL-20AC HT Prominence uređaj za automatsko uzorkovanje; Shimadzu SPD-10A VP UV/VIS detector; Shimadzu CBM-20A Prominence upravljačka jedinica; Shimadzu CTO-20A termostat za kolonu.



**Slika 13.** Kapljevinski kromatograf visokog učinka

## 3.2. Materijali

Kemikalije korištene u radu prikazane su u tablici 2.

**Tablica 2.** Kemikalije korištene u radu

NAZIV KEMIKALIJE	PROIZVOĐAČ	ZEMLJA PODRIJETLA
Magnezijev klorid	Acros Organics	SAD
$\alpha$ -Ketoglutarat	Sigma Aldrich	Švicarska
MenD	Prozomix	Ujedinjeno Kraljevstvo
Tiamin difosfat (ThDP)	Sigma	Švicarska
Akrilonitril	Fluka	SAD
O-Benzilhidroksilamin	Acros Organics	SAD
Metanol	J.T. Baker	Nizozemska

## 3.3. Analitičke metode

### 3.3.1. Određivanje koncentracije proteina pomoću Bradfordovog testa

Za određivanje koncentracije proteina je korištena spektrofotometrijska metoda po Bradfordu.<sup>25</sup> Prije samog određivanja koncentracije proteina u uzorku enzima MenD, napravljen je baždarni pravac mjerenjem apsorbancije otopina albumina (BSA) poznatih koncentracija. Koncentracije standardnih otopina BSA su bile sljedeće: 1  $\mu\text{g cm}^{-3}$ , 2,5  $\mu\text{g cm}^{-3}$ ; 5  $\mu\text{g cm}^{-3}$ ; 7,5  $\mu\text{g cm}^{-3}$  i 10  $\mu\text{g cm}^{-3}$ . Pripremljene su razrjeđenjem otopine BSA koncentracije 0,1  $\text{mg cm}^{-3}$ . U 0,8  $\text{cm}^3$  standardne otopine dodano je 0,2  $\text{cm}^3$  reagensa Coomassie Brilliant Blue, te je nakon inkubacije od 5 min na sobnoj temperaturi izmjerena apsorbancija uzoraka (slika 14) pri valnoj duljini od 595 nm.

Jednadžba pravca potrebna za preračunavanje koncentracije proteina u uzorcima dobivena je iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina. Uzorci nepoznate koncentracije proteina su pripremljeni jednakim postupkom kao i uzorci za baždarni pravac. Uz pomoć ranije određenog baždarnog pravca je izračunata koncentracija proteina u uzorku. Baždarni pravac prikazan je u prilogu 1.



**Slika 14.** Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

### 3.3.2. HPLC metode

Analiza za određivanje koncentracija reaktanata provedena je pri 30°C uz protok mobilne faze od 1 mL min<sup>-1</sup> pri čemu je korištena Hypersil APS (HP) kolona (5 µL, 4,6 x 250 mm). Mobilna faza A je bila voda uz dodatak TFA (0,1%). Analiza je provedena pri 195 nm. Retencijsko vrijeme akrilonitrila je 3,95 min, a α-ketoglutarata je 6,7 min.

Produkt ove reakcije nije moguće detektirati prethodno opisanom metodom i zbog toga je provedena derivatizacija uzoraka. Derivatizacija je provedena na sljedeći način: 5 µL uzorka otpipetirano je u 50 µL otopine za derivatizaciju (sadrži: 200 mg O-benzilhidroksilamina, 6,6 mL piridina, 3 mL metanola i 0,4 mL vode), zatim je otopina termostatirana na tresilici 20 minuta pri 25°C. Nakon 20 minuta uzorcima je dodano 450 µL metanola, te su profiltrirani za analizu na HPLC-u.

Analiza za određivanje koncentracije produkta provedena je pri 30°C uz protok mobilne faze od 1,2 mL min<sup>-1</sup> pri čemu je korištena Phenomenex RP-18 LiChrosper C18 kolona (5 µm, 4 x 250 mm). Mobilna faza A je bila voda uz dodatak TFA (0,1%), a mobilna faza B je bila smjesa acetonitrila, vode i TFA u omjeru 80: 20: 0,095. Analiza je provedena pri 215 nm. Retencijsko vrijeme pika derivatiziranog produkta nalazi se na 19,5 min.

Za određivanje koncentracija akrilonitrila i α-ketoglutarata napravljeni su baždarni pravci. Baždarni pravac za akrilonitril napravljen je tako da su pripremljene otopine akrilonitrila sljedećih koncentracija: 0,1 mmol dm<sup>-3</sup>; 0,2 mmol dm<sup>-3</sup>; 0,5 mmol dm<sup>-3</sup>; 1 mmol dm<sup>-3</sup> i 1,9 mmol dm<sup>-3</sup> te su analizirane na HPLC-u. Baždarni pravac za akrilonitril nalazi se u Prilogu 2. Baždarni



pravac za  $\alpha$ -ketoglutarat napravljen je tako da su pripravljene otopine  $\alpha$ -ketoglutarata sljedećih koncentracija:  $0,1 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $0,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ;  $0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $0,9 \text{ mmol dm}^{-3}$  te su analizirane na HPLC-u. Baždarni pravac za  $\alpha$ -ketoglutarat nalazi se u Prilogu 3.

### 3.3.3. Provedba eksperimenata

#### 3.3.3.1. Stabilnost akrilonitrila pri različitim koncentracijama

Stabilnost akrilonitrila je ispitana da bi se utvrdio utjecaj njegove polimerizacije na tijek željene reakcije. Stabilnost je praćena u kotlastom reaktoru tijekom 48 sati, a sastav reakcijskih otopina prikazan je u tablici 3. Reakcijska smjesa sadrži sve komponente osim enzima, a volumen reaktora je bio 1 mL. Eksperiment je proveden na Eppendorf tresilici pri  $30^\circ\text{C}$  i 1000 okr/min. U određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci te su analizirani na HPLC-u.

**Tablica 3.** Sastav reakcijskih otopina za praćenje stabilnosti akrilonitrila

Otopina	$c \text{ [mmol dm}^{-3}\text{]}$				
	Reaktor 1	Reaktor 2	Reaktor 3	Reaktor 4	Reaktor 5
Akrilonitril	16	145,5	200	500	1000
$\alpha$ -Ketoglutarat	30,3	217,14	450	1023	2040
Magnezijev klorid	1,99	1,99	2,06	2,06	2,06
Tiamin difosfat	0,99	0,99	1,00	1,00	1,00

### 3.3.3.2. Stabilnost $\alpha$ -ketoglutarata u reakcijskoj smjesi

Osim stabilnosti akrilonitrila, praćena je i stabilnost  $\alpha$ -ketoglutarata također da bi se utvrdio utjecaj brzine njegova raspada na tijek željene reakcije. Stabilnost je praćena u kotlastom reaktoru tijekom 48 sati. Reakcijska smjesa sadržavala je sve komponente osim enzima, a koncentracije su sljedeće:  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 30,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{akrilonitril}} = 16 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ThDP}} = 0,99 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}} = 1,99 \text{ mmol dm}^{-3}$  te  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatni pufer pH 8,0. Volumen kotlastog reaktora bio je 1 mL, a eksperiment je proveden na Eppendorf tresilici pri  $30^\circ\text{C}$  i 1000 okr/min.

### 3.3.3.3. Ispitivanje razlićitih biokatalizatora

Pripremljeno je 11 kotlastih reaktora s 11 razlićitih biokatalizatora. Koncentracije u reaktorima su bile sljedeće:  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 30 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{akrilonitril}} = 15 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ThDP}} = 0,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}} = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatni pufer pH 8,0 i  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$  pojedinog enzima. Volumen reakcijske smjese iznosio je 1 mL, a reakcije su provedene na Eppendorf tresilici pri  $30^\circ\text{C}$  i 1000 okr/min. Uzorci su uzimani nakon 5 i 24 sata te su derivatizirani prema prethodno opisanom naćinu i analizirani na HPLC-u.

### 3.3.3.4. Provedba reakcije u kotlastom reaktoru

Reakcija između akrilonitrila i  $\alpha$ -ketoglutarata katalizirana enzimom MenD provedena je u kotlastom reaktoru. Sastav reakcijske otopine bio je sljedeći:  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 30,69 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{akrilonitril}} = 14,32 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ThDP}} = 0,99 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}} = 1,99 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatni pufer pH 8,0 i 50% v/v enzima MenD. Volumen reakcijske smjese bio je 1 mL, a reakcija je provedena na Eppendorf tresilici pri  $30^\circ\text{C}$  i 1000 okr/min. Uzimani su uzorci za praćenje potrošnje supstrata i nastajanje produkta te su analizirani na HPLC-u.

Osim navedenog eksperimenta proveden je i eksperiment u kotlastom reaktoru pri većim koncentracijama akrilonitrila i  $\alpha$ -ketoglutarata. U tom eksperimentu sastav reakcijske otopine bio

je sljedeći:  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 121,04 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{akrilonitril}} = 78,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ThDP}} = 0,99 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}} = 2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatni pufer pH 8,0 i 50% v/v enzima MenD. Volumen reakcijske smjese bio je 1 mL, a reakcija je provedena na Eppendorf tresilici pri 30 °C i 1000 okr/min.

## 4. MATEMATIČKI MODEL

Enzimatska sinteza 6-cijano-4-ketoheksan kiseline opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednađzbom (7). Potrebno je uzeti u obzir utjecaj magnezija te tiamin difosfata koji ne sudjeluju u reakciji, ali utječu na njezinu brzinu (jednađba 8). Osim kinetičkih jednađbi, model čine i bilancne jednađbe za  $\alpha$ -ketoglutarat (9), akrilonitril (10) i 6-cijano-4-ketoheksan kiselinu (11). Bilancna jednađba za akrilonitril uzima u obzir i polimerizaciju koja je opisana kinetikom prvog reda, a potrebno je uzeti u obzir i deaktivaciju enzima (jednađba 12).

$$r = \frac{V_m \cdot \gamma_{\text{MenD}} \cdot c_{\text{akrilonitril}} \cdot c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} \cdot f}{\left(K_m^{\text{akrilonitril}} + c_{\text{akrilonitril}}\right) \cdot \left(K_m^{\alpha\text{-ketoglutarat}} + c_{\alpha\text{-ketoglutarat}}\right)} \quad (7)$$

$$f = \left( \frac{c_{\text{ThDP}}}{K_m^{\text{ThDP}} + c_{\text{ThDP}}} \right) \cdot \left( \frac{c_{\text{Mg}^{2+}}}{K_m^{\text{Mg}^{2+}} + c_{\text{Mg}^{2+}} + \frac{c_{\text{Mg}^{2+}}^2}{K_i^{\text{Mg}^{2+}}}} \right) \quad (8)$$

$$\frac{dc_{\alpha\text{-ketoglutarat}}}{dt} = -r \quad (9)$$

$$\frac{dc_{\text{akrilonitril}}}{dt} = -r - k \cdot c_{\text{akrilonitril}} \quad (10)$$

$$\frac{dc_{\text{6-cijano-4-ketoheksan kiseline}}}{dt} = r \quad (11)$$

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \quad (12)$$

Za simulaciju eksperimenata u kotlastom reaktoru korišten je programski paket *Scientist*. Matematički model je napisan na temelju gore navedenih jednadžbi (7-12) i nalazi se u prilogu 4, a potrebni parametri preuzeti su iz literature i također su prikazani u tablici 4.<sup>19</sup>

**Tablica 4.** Kinetički parametri korišteni za simulaciju eksperimenta u kotlastom reaktoru

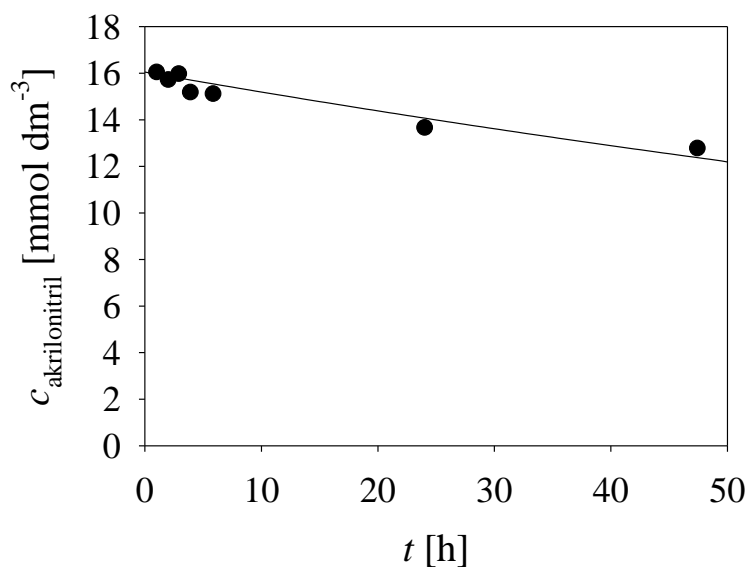
<b>PARAMETAR</b>	<b>MJERNA JEDINICA</b>	<b>VRIJEDNOST</b>
$V_m$	[U mg <sup>-1</sup> ]	210,50 ± 17,49
$K_m^{\text{ThDP}}$	[μmol dm <sup>-3</sup> ]	9,94 ± 0,81
$K_m^{\text{Mg}^{2+}}$	[μmol dm <sup>-3</sup> ]	15,05 ± 4,97
$K_i^{\text{Mg}^{2+}}$	[mmol dm <sup>-3</sup> ]	6,44 ± 2,59
$K_m^{\text{akrilonitril}}$	[mol dm <sup>-3</sup> ]	18,73 ± 1,88
$K_m^{\alpha\text{-ketoglutarat}}$	[μmol dm <sup>-3</sup> ]	46,09 ± 4,32

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu provedena je enzimska reakcija katalizirana enzimom sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD) uz  $\alpha$ -ketoglutarat kao donorski supstrat, akrilonitril kao akceptorski supstrat te uz magnezijev sulfat kao kofaktor i tiamin difosfat kao koenzim. Provedeni su i eksperimenti kojima je ispitana je stabilnost  $\alpha$ -ketoglutarata i akrilonitrila tijekom 48 sati te je razvijen matematički model ove reakcije.

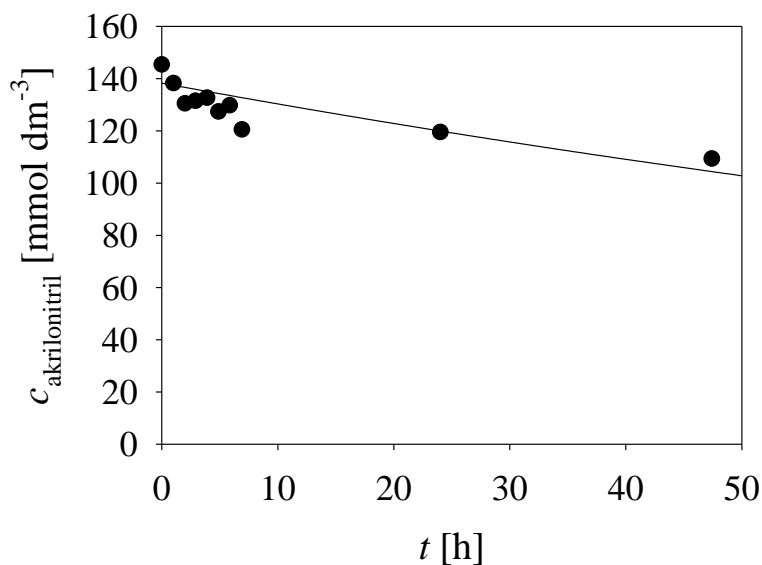
### 5.1. Stabilnost akrilonitrila u reakcijskoj smjesi

Ispitana je stabilnost akrilonitrila u reakcijskoj smjesi pri različitim koncentracijama  $\alpha$ -ketoglutarata i akrilonitrila. Reakcijska smjesa sadrži sve komponente potrebne za reakciju, osim enzima. Na slici 15 prikazana je ovisnost koncentracije akrilonitrila o vremenu, a početna koncentracija je bila  $16 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Eksperiment je proveden 48 sati, a može se uočiti smanjenje koncentracije akrilonitrila. Akrilonitril je vrlo nestabilna organska molekula koja lako može polimerizirati pa je pretpostavljeno da je do smanjenja koncentracije akrilonitrila došlo uslijed polimerizacije.<sup>26</sup> Koncentracija akrilonitrila nakon 48 sati iznosi  $13 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka procijenjena je konstanta brzine polimerizacije akrilonitrila. Pretpostavljeno je da se radi o kinetici prvog reda.



**Slika 15.** Stabilnost akrilonitrila u reakcijskoj smjesi (50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer pH 8,  $V_r = 1$  mL, 30 °C, 1000 rpm,  $c_{\text{akrilonitril}} = 16$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 30,3$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 1,99$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{ThDP}} = 0,99$  mmol dm<sup>-3</sup>)

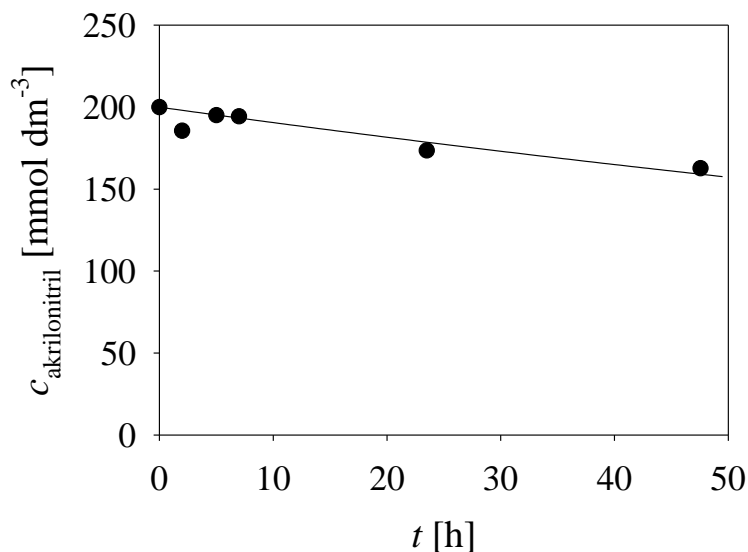
Slika 16 prikazuje ovisnost koncentracije akrilonitrila o vremenu, a njegova početna koncentracija u ovom slučaju bila je 145,5 mmol dm<sup>-3</sup>. Eksperiment je praćen 48 sati i može se primijetiti smanjenje koncentracije akrilonitrila također zbog polimerizacije. Nakon 48 sati njegova koncentracija iznosi 110 mmol dm<sup>-3</sup>. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka procijenjena je konstanta brzine polimerizacije akrilonitrila te je pretpostavljeno da se radi o kinetici prvog reda.



**Slika 16.** Stabilnost akrilonitrila u reakcijskoj smjesi (50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer pH 8,  $V_r = 1$  mL, 30 °C, 1000 rpm,  $c_{\text{akrilonitril}} = 145,5$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 217,14$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 1,99$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{ThDP}} = 0,99$  mmol dm<sup>-3</sup>)

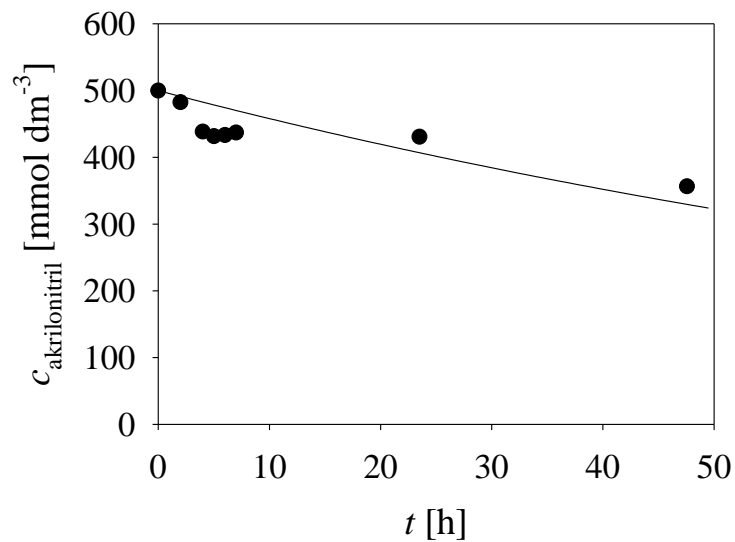
Slika 17 prikazuje ovisnost koncentracije akrilonitrila o vremenu, a njegova početna koncentracija iznosi 200 mmol dm<sup>-3</sup>. Koncentracija akrilonitrila se smanjuje te nakon 48 sati iznosi 160 mmol dm<sup>-3</sup> što znači da dolazi do polimerizacije. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka procijenjena je konstanta brzine polimerizacije akrilonitrila.





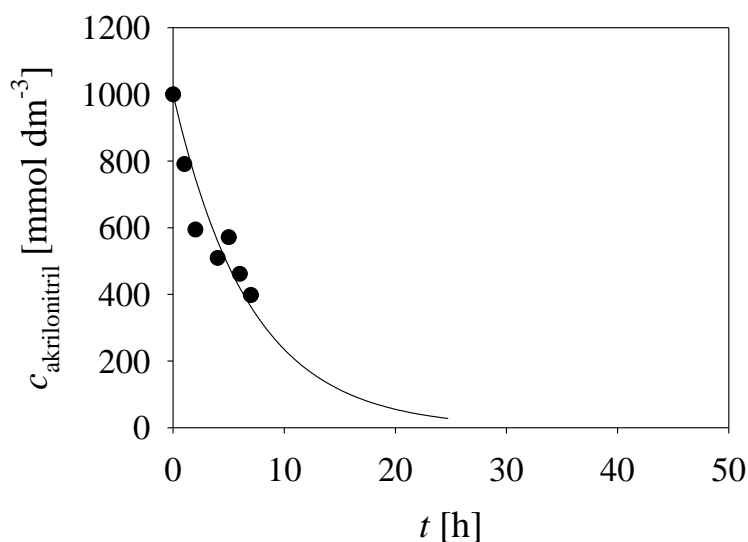
**Slika 17.** Stabilnost akrilonitrila u reakcijskoj smjesi ( $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatni pufer pH 8,  $V_r = 1 \text{ mL}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1000 \text{ rpm}$ ,  $c_{\text{akrilonitril}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 450 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,06 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ThDP}} = 1,00 \text{ mmol dm}^{-3}$ )

Slika 18 prikazuje ovisnost koncentracije akrilonitrila o vremenu, a njegova početna koncentracija je bila  $500 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Može se uočiti smanjenje koncentracije akrilonitrila, a nakon 48 sati koncentracija akrilonitrila je  $370 \text{ mmol dm}^{-3}$  jer dolazi do polimerizacije. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka procijenjena je konstanta brzine polimerizacije akrilonitrila.



**Slika 18.** Stabilnost akrilonitrila u reakcijskoj smjesi (50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer pH 8,  $V_r = 1$  mL, 30 °C, 1000 rpm,  $c_{\text{akrilonitril}} = 500$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 1023$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,06$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{ThDP}} = 1,00$  mmol dm<sup>-3</sup>)

Slika 19 prikazuje ovisnost koncentracije akrilonitrila o vremenu, a njegova početna koncentracija je bila 1000 mmol dm<sup>-3</sup>. Eksperiment je trajao 8 sati i može se uočiti da se koncentracija akrilonitrila smanjuje. Koncentracija akrilonitrila nakon 8 sati iznosi 400 mmol dm<sup>-3</sup> jer dolazi do polimerizacije. Na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka procijenjena je konstanta polimerizacije akrilonitrila.



**Slika 19.** Stabilnost akrilonitrila u reakcijskoj smjesi (50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer pH 8,  $V_r = 1$  mL, 30 °C, 1000 rpm,  $c_{\text{akrilonitril}} = 1000$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 2040$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,06$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{ThDP}} = 1,00$  mmol dm<sup>-3</sup>)

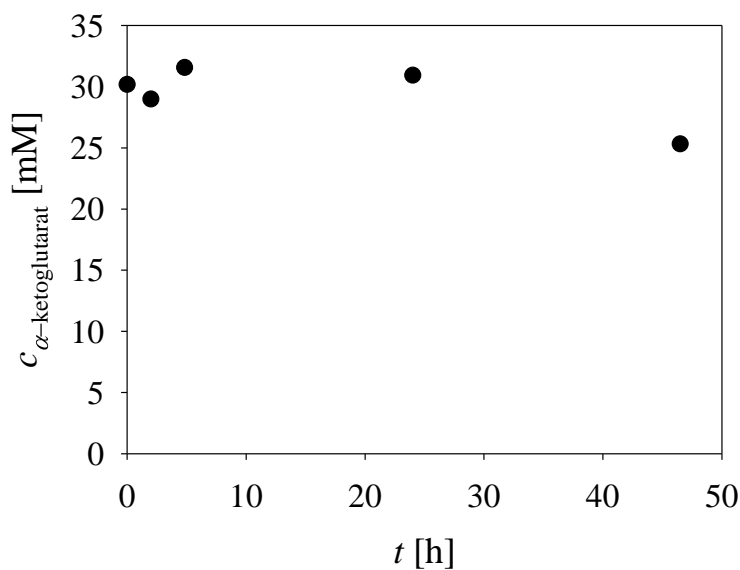
U programskom paketu *Scientist* procijenjene su konstante polimerizacije akrilonitrila uz pretpostavku da se reakcija odvija prema kinetici prvog reda. Vrijednosti su prikazane u tablici 5, a može se uočiti da porastom koncentracije akrilonitrila raste i brzina njegove polimerizacije te je posljedično i konstanta polimerizacije veća.

**Tablica 5.** Ovisnost konstante polimerizacije akrilonitrila o koncentraciji akrilonitrila (50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer pH 8,  $V_r = 1$  mL, 30 °C, 1000 rpm,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,06$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{ThDP}} = 1,00$  mmol dm<sup>-3</sup>)

$c_{\text{akrilonitril}}$ [mM]	$k$ [d <sup>-1</sup> ]
16,0	0,131 ± 0,013
145,5	0,142 ± 0,025
200	0,115 ± 0,023
500	0,210 ± 0,052
1000	3,48 ± 0,391

## 5.2. Stabilnost $\alpha$ -ketoglutarata u reakcijskoj smjesi

Osim stabilnosti akrilonitrila ispitana je i stabilnost  $\alpha$ -ketoglutarata u reakcijskoj smjesi. Slika 20 prikazuje ovisnost koncentracije  $\alpha$ -ketoglutarata o vremenu, a njegova početna koncentracija bila je  $30,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Eksperiment je trajao 48 sati te nakon tog vremena koncentracija  $\alpha$ -ketoglutarata iznosi  $26 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Iz prikazanih rezultata može se uočiti mala promjena koncentracije nakon 48 sati i zaključiti da je  $\alpha$ -ketoglutarat stabilan u reakcijskoj smjesi tijekom 24 sata.



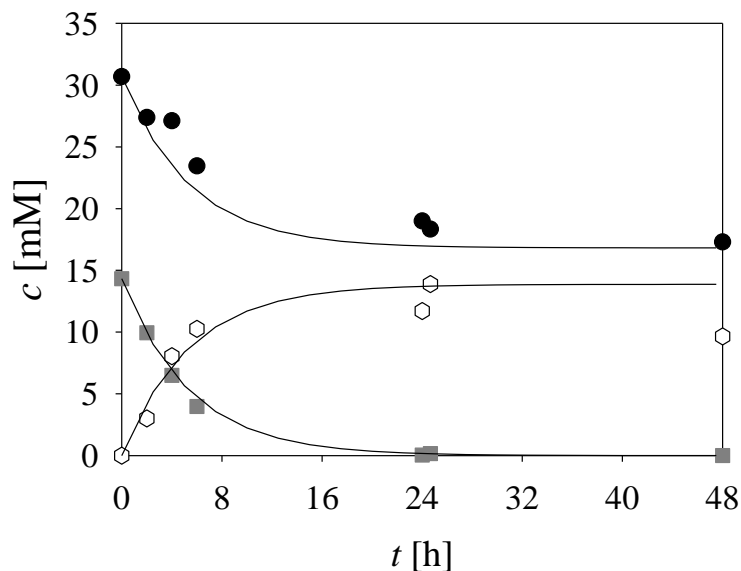
**Slika 20.** Stabilnost  $\alpha$ -ketoglutarata u reakcijskoj smjesi ( $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  fosfatni pufer pH 8,  $V_r = 1 \text{ mL}$ ,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $1000 \text{ rpm}$ ,  $c_{\text{akrilonitril}} = 16 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 30,3 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 1,99 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{ThDP}} = 0,99 \text{ mmol dm}^{-3}$ )

### 5.3. Ispitivanje različitih biokatalizatora

Provedne su reakcije između akrilonitrila i  $\alpha$ -ketoglutarata u kotlastom reaktoru koje su katalizirane s 11 različitih biokatalizatora (7 dekarboksilaza, 3 tranketolaze i MenD) da bi se dobio željeni produkt, 6-cijano-4-ketoheksan kiselina. S obzirom da niti jedan biokatalizator, osim MenD-a, uz navedene supstrate nije rezultirao željenim produktom, sva daljnja istraživanja su provedena uz MenD kao biokatalizator. Metodom po Bradfordu određena je koncentracija proteina u uzorku MenD i ona je iznosila  $3 \text{ mg mL}^{-1}$ .

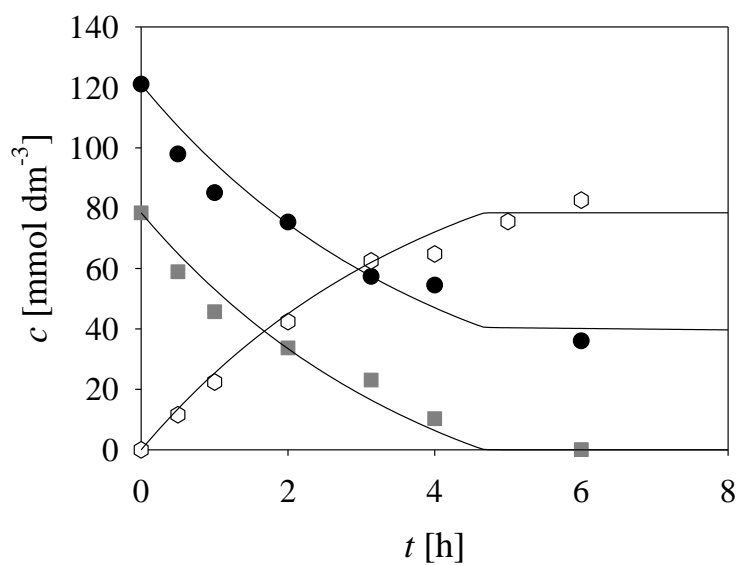
### 5.4. Eksperimenti u kotlastom reaktoru

Provedena je reakcija između akrilonitrila i  $\alpha$ -ketoglutarata uz početne koncentracije  $C_{\text{akrilonitril}} = 14,32 \text{ mmol dm}^{-3}$  i  $C_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 30,69 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Slika 21 prikazuje ovisnosti koncentracija reaktanata i produkta o vremenu. Reakcija je praćena 48 sati. Može se uočiti da se koncentracije akrilonitrila i  $\alpha$ -ketoglutarata smanjuju tijekom vremena, a koncentracija produkta se povećava. Koncentracija dobivenog produkta je nešto manja od početne koncentracije akrilonitrila koji je mjerodavni reaktant, zbog polimerizacije akrilonitrila tijekom reakcije. Matematički model (jednadžbe 7-12) koji uzima u obzir deaktivaciju enzima, polimerizaciju akrilonitrila te utjecaj tiamin difosfata i magnezijevih iona na brzinu reakciju dobro opisuje eksperimentalne rezultate.



**Slika 21.** Enzimaska sinteza 6-cijano-4-ketoheksan kiseline katalizirane enzimom MenD (50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer pH 8, V<sub>r</sub> = 1 mL, 30 °C, 1000 rpm, 50% enzima u reaktoru, c<sub>akrilonitril</sub> = 14,32 mmol dm<sup>-3</sup>, c<sub>α-ketoglutarat</sub> = 30,69 mmol dm<sup>-3</sup>, c<sub>Mg<sup>2+</sup></sub> = 1,99 mmol dm<sup>-3</sup>, c<sub>ThDP</sub> = 0,99 mmol dm<sup>-3</sup>)

Osim navedenog eksperimenata, provedena je i reakcija s većom koncentracijom akrilonitrila i α-ketoglutarata katalizirana enzimom MenD. Početne koncentracije reaktanata su bile c<sub>akrilonitril</sub> = 78,5 mmol dm<sup>-3</sup> i c<sub>α-ketoglutarat</sub> = 121,04 mmol dm<sup>-3</sup>. Reakcija je praćena 6 sati i također se može uočiti da se koncentracije reaktanata smanjuju, a koncentracija produkta se povećava. Koncentracija dobivenog produkta je nešto manja od početne koncentracije akrilonitrila koji je mjerodavni reaktant zbog toga što tijekom reakcije nastupa polimerizacija akrilonitrila. U ovom slučaju, matematički model (jednadžbe 7-12) također dobro opisuje eksperimentalne rezultate.



**Slika 22.** Enzimaska sinteza 6-cijano-4-ketoheksan kiseline katalizirane enzimom MenD (50 mmol dm<sup>-3</sup> fosfatni pufer pH 8,  $V_r = 1$  mL, 30 °C, 1000 rpm, 50% enzima u reaktoru,  $c_{\text{akrilonitril}} = 78,5$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 121,04$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{Mg}^{2+}} = 2,00$  mmol dm<sup>-3</sup>,  $c_{\text{ThDP}} = 0,99$  mmol dm<sup>-3</sup>)

Usporedbom reakcija provedenih pri različitim koncentracijama supstrata može se zaključiti da je pri većim početnim koncentracijama akrilonitrila i  $\alpha$ -ketoglutarata ( $c_{\text{akrilonitril}} = 78,5$  mmol dm<sup>-3</sup> i  $c_{\alpha\text{-ketoglutarat}} = 121,04$  mmol dm<sup>-3</sup>) reakcija brža, odnosno u kraćem vremenu nastaje veća koncentracija produkta.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu provedena je reakcija između akrilonitrila i  $\alpha$ -ketoglutarata katalizirana enzimom sintaza 2-sukcinil-5-enolpiruvil-6-hidroksi-3-cikloheksen-1-karboksilne kiseline (MenD). Reakcija se može opisati dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom.

Provedeni su eksperimenti kojima je ispitana stabilnost reaktanata, akrilonitrila i  $\alpha$ -ketoglutarata. U programskom paketu *Scientist* procijenjene su konstante polimerizacije akrilonitrila te se može uočiti da porastom koncentracije akrilonitrila raste i brzina polimerizacije, a time i konstanta polimerizacije. Na temelju eksperimentalnih rezultata, može se uočiti da je  $\alpha$ -ketoglutarat stabilan u reakcijskoj smjesi.

Tijekom provođenja reakcije između akrilonitrila i  $\alpha$ -ketoglutarata katalizirane enzimom MenD, koncentracija reaktanata se smanjuje, a koncentracija produkta se povećava. Koncentracija dobivenog produkta je nešto manja od početne koncentracije akrilonitrila koji je mjerodavni reaktant, a to se može objasniti polimerizacijom akrilonitrila tijekom reakcije.

Matematički model koji uzima u obzir deaktivaciju enzima, polimerizaciju akrilonitrila i utjecaj magnezijevih iona i tiamin difosfata na reakciju je dobro opisao eksperimentalne rezultate.



## 7. LITERATURA

1. Findrik Z., Vasić-Rački Đ., Overview on reactions with multi-enzyme systems, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 23 (2009) 545-553
2. Wohlgemuth R., Biocatalysis-key to sustainable industrial chemistry, *Current Opinion in Biotechnology*, 21 (2010) 713-715
3. Visković K., Utjecaj kalcijevih iona na stabilizaciju  $\alpha$ -amilaze pri hidrolizi škroba, Studentski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 5 (2009), 23-24
4. Beigi M., Waltzer S., Zarei M., Müller M., New Stetter reactions catalyzed by thiamine diphosphate dependent MenD from *E. coli*, *Journal of Biotechnology*, (2014) 1-5
5. Hranuelli F., Jakobović Z., Podlesnik V., Viličić F., Tehnička enciklopedija 5. dio, Zagreb, (1976), 334-345.
6. Loughlin W. A., Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technology*, 74 (2000) 49-62
7. Mohamad N. R., Marzuki N. H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A., An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29 (2015) 205-220
8. D. L. Nelson, A. L. Lehninger, M. M. Cox, *Principles of biochemistry*, Second edition, Worth Publishers, New York, (1993) 198-205, 211-214
9. Pine S.H., Hendrickson J.B., Cram D.J., Hammond D.S., *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb (1984), 784-824
10. Karlson P., *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, (1984) 34, 53, 194.
11. J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, *Biochemistry*, Fifth edition, W.H. Freeman and Company, New York, (2003) 189-195, 200-203
12. McMurry J., *Organic chemistry*, Third edition, Brooks Publishing Company, California (1992) 1071
13. Minjiao C., Ming J., Zhihong G., The thiamine-dependent enzyme of the vitamin K biosynthesis catalyzes reductive C-N bond ligation between nitroarenes and  $\alpha$ -ketoacids, *Science China Chemistry*, 56 (2012) 312-320

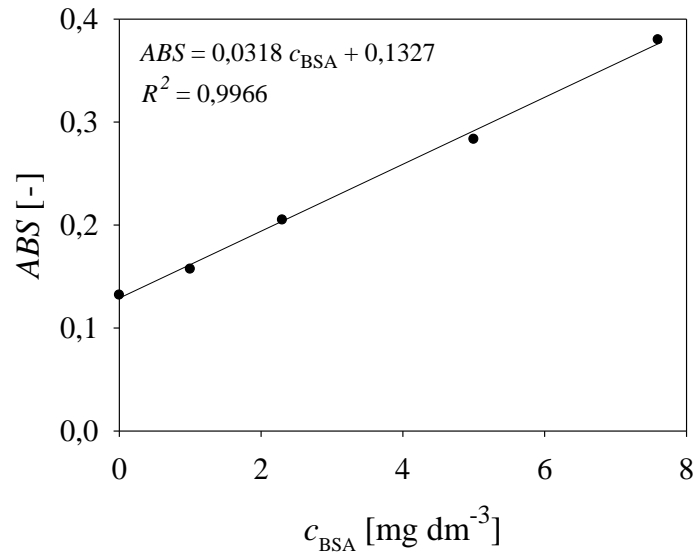
14. Dawson A., Chen M., Fyfe P. K., Guo Z., Hunter W.N., Structure and reactivity of *Bacillus subtilis* MenD catalyzing the first committed step in menaquinone biosynthesis, *Journal of Molecular Biology*, 401 (2010) 253-264
15. Kasparyan E., Richter M., Dresen C., Walter L.S., Fuchs G., Leeper F.J., Wacker T., Andrade S. L.A., Kolter G., Pohl M., Müller M., Asymmetric Stetter reactions catalyzed by thiamine diphosphate-dependent enzymes, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2014) 9681-9690
16. Jirgis E. N. M., Bashiri G., Bulloch E. M. M. , Johnston J. M., Baker E.N., Structural Views along the *Mycobacterium tuberculosis* MenD reaction pathway illuminate key aspects of thiamin diphosphate-depended enzyme mechanisms, *Structure*, 24 (2016) 1-11
17. <http://www.brenda-enzymes.info/enzyme.php?ecno=2.2.1.9> (pristup 1. lipnja 2017.)
18. Priyadarshi A., Saleem Y., Hyun Nam K., Kim K., Park S.Y., Kim E., Hwang K.Y., Structural insights of the MenD from *Escherichia coli* reveal ThDP affinity, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380 (2009) 797-801
19. Lešnjak D., Enzimatska sinteza 6-cijano-4-ketoheksan kiseline, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb (2016) 17
20. Dunn I.J., Heinze E., Ingham J., Prenosil J.E., Principles, Applications and Modelling with PC Simulations, *Biological Reaction Engineering*, Wiley-VCH, Weinheim (1992) 25-27
21. Voet D., Voet J.G., *Biochemistry*, Third edition, John Wiley and Sons, New York (2004) 478-480
22. Magdić D., Uvod u matematičko modeliranje, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, Osijek (2011) 1-7
23. Holzbecher E., *Environmental modelling using MATLAB*, Springer, Berlin (2007) 29-35
24. Vasić Rački Đ., Findrik Blažević Z., Vrsalović Presečki A., Modelling as a tool enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91 (2011) 4-8
25. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248-254

26. Brady S. G., Clauser H.R., Materials Handbook, Twelfth edition, McGraw-Hill Book Company, New York (1986) 13-14

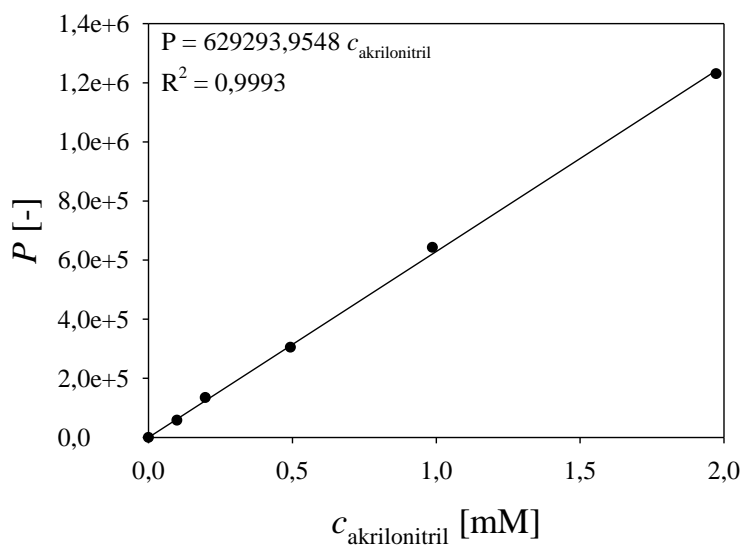
## 8. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

$c$	molarna koncentracija, mmol dm <sup>-3</sup>
$r_0$	početna brzina reakcije, μM min <sup>-1</sup>
$V_m$	maksimalna brzina reakcije, U mg <sup>-1</sup>
$K_m$	Michaelisova konstanta, mmol dm <sup>-3</sup>
$K_i$	konstanta inhibicije, mmol dm <sup>-3</sup>
$k$	konstanta polimerizacije, d <sup>-1</sup>
$t$	vrijeme, h
$r$	brzina reakcije, U mg <sup>-1</sup>
$\gamma_{MenD}$	masena koncentracija enzima MenD, mg mL <sup>-1</sup>
$V_r$	volumen reaktora, mL
$k_1, k_{-1}, k_2$	kinetički parametri, min <sup>-1</sup>
$k_d$	konstanta deaktivacije enzima, min <sup>-1</sup>
ThDP	tiamin difosfat
AKN	akrilonitril
KG	α-ketoglutarat
P	produkt
E	enzim
$f$	utjecaj magnezija i tiamin difosfata na reakciju
Mg <sup>2+</sup>	magnezijev ion

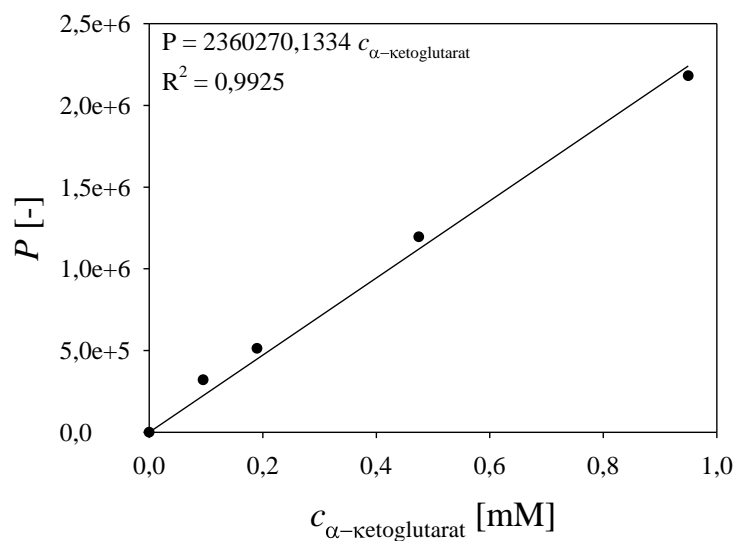
## 9. PRILOZI



**PRILOG 1** - Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom



**PRILOG 2** - Baždarni pravac za akrilonitril na HPLC-u uz korištenje metode na Hypersil koloni



**PRILOG 3** - Baždarni pravac za  $\alpha$ -ketoglutarat na HPLC-u uz korištenje metode na Hypersil koloni

## PRILOG 4 – Program u *Scientist-u*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: T

DepVars: cKG,cP,cAKN

Params: Vm,KmKG,KmThDP,KmAKN,KmMg,KiMg

$r = Vm * cKG * cAKN * E * f / ((KmKG + cKG) * (KmAKN + cAKN))$

$f = cThDP * cMg / ((KmThDP + cThDP) * (KmMg + cMg + (cMg * cMg / KiMg)))$

$r1 = k * cAKN$

$cKG' = -r$

$cAKN' = -r - r1$

$cP' = r$

$E' = -k_d * E$

$t = 0$

$cP = 0$

$cKG = 30.3$

$cAKN = 16$

$cMg = 1.99$

$cThdp = 0.99$

$E = 0.5$

$Vm = 210.50$

$KmKG = 0.04609$

$KmAKN = 18734.35$

$KmThDP = 0.00994$

$KmMg = 0.01505$

$KiMg = 6.44$

$k = 0.131$

\*\*\*

## ŽIVOTOPIS

Tea Sokač [REDACTED] Pohađala je Osnovnu školu Josipa Račića u Zagrebu. Nakon završene osnovne škole, 2007. godine upisuje Prirodoslovnu školu Vladimira Preloga, smjer prirodoslovna gimnazija u Zagrebu. 2011. godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Ekoinženjerstvo. Stručnu praksu odradila je u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo na odjelu za kontrolu voda. 2015. godine stječe naziv sveučilišna prvostupnica inženjerka ekoinženjerstva te iste godine nastavlja diplomski studij na istom usmjerenju. U ljetnom semestru 2. godine diplomskog studija odlazi na studentsku razmjenu u Češku (Brno). Tijekom razmjene pohađala je tečaj češkog jezika i radila je na projektu pod naslovom „Printed ozone dosimeter“.

Tijekom studija pohađala je tečaj njemačkog jezika u školi stranih jezika Studentski centar i položila je B2 razinu.