

Operacijska stabilnost YfaU - aldolaza

Jušić, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:390010>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUŠILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Nikolina Jušić

OPERACIJSKA STABILNOST YfaU – ALDOLAZA

ZAVRŠNI RAD

Mentor rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

doc. dr. sc. Dragana Vuk

Zagreb, rujan 2021.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na strpljenju, savjetima i uputama pri pisanju ovog završnog rada. Također hvala i mag. ing. oecoiing Neveni Milčić na velikoj pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela.

Hvala na bezuvjetnoj potpori i podršci mojoj obitelji, dečku i prijateljima jer bez njih ne bih uspjela.

Sažetak

U ovom radu proučavana je aldolna reakcija između piruvata i formaldehida katalizirana s tri enzima: YfaU WT, YfaU 3 i YfaU 5 - aldolazom. Radi se o tri verzije enzima od koje je prva ona prirodna, a preostale dvije su dobivene proteinskim inženjerstvom s ciljem poboljšanja svojstva stabilnosti. Kao produkt nastaje aldol natrijev 4-hidroksi-2-oksobutanoat. Natrijev piruvat je donorski supstrat, a formaldehid akceptorski supstrat.

Eksperimenti su provedeni u kotlastom reaktoru te su praćeni tijekom reakcije i operacijska stabilnost tri enzima. Na temelju dobivenih eksperimentalnih rezultata promjene aktivnosti enzima tijekom vremena, procijenjene su konstante deaktivacije enzima u reaktoru, pomoću programskog paketa Scientist. Osim različite brzine deaktivacije, rezultati pokazuju i različito napredovanje reakcije u reaktoru.

Iz rezultata se može zaključiti da se tijekom vremena kod sva tri enzima smanjuje aktivnost, odnosno dolazi do pada operacijske stabilnosti. Najstabilnija aldolaza u kotlastom reaktoru pokazala se YfaU 5, a najmanje stabilna YfaU WT iz čega se može zaključiti da je proteinskim inženjerstvom došlo do poboljšanja stabilnosti enzima.

Ključne riječi: operacijska stabilnost, YfaU - aldolaze, natrijev piruvat, formaldehid, aldolna reakcija

Abstract

The aldol reaction between pyruvate and formaldehyde catalyzed by three aldolases, i.e., YfaU WT, YfaU 3 and YfaU 5, was carried out in this work. These are three versions of the enzyme, the first of which is natural, and the remaining two were obtained by protein engineering with the aim of improving the stability properties. As a product, aldol sodium 4-hydroxy-2-oxobutanoate was formed. Sodium pyruvate was a donor substrate and formaldehyde was an acceptor substrate.

The experiments were carried out in a batch reactor. The course of the reaction and the operational stability of the three enzymes were monitored during the process. Based on the experimental results, i.e., the change in enzyme activity over time, the enzyme deactivation constants were estimated using the software package Scientist. In addition to different deactivation rates, the results also show different reaction progressions in the reactor.

It can be concluded from the results that the activity and operational stability of all three enzymes decreases over time. The most stable aldolase in the batch reactor was YfaU 5, and the least stable was YfaU WT. Thus, it can be concluded that protein engineering led to an improvement of the enzyme stability.

Key words: operational stability, YfaU - aldolase, sodium pyruvate, formaldehyde, aldol reaction

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	2
2.1. Enzimi	2
2.1.1. Općenito	2
2.1.2. Struktura enzima.....	3
2.1.3. Klasifikacija.....	3
2.1.4. Mehanizam djelovanja enzima	4
2.1.5. Stabilnost enzima	6
2.2. Aldolaze	7
2.2.1. Podjela aldolaza.....	7
2.2.2. Aldolaze u aldolnim reakcijama.....	8
2.2.3. YfaU - aldolaza	9
3. Eksperimentalni dio.....	10
3.1. Aparatura.....	10
3.1.1. Analitička vaga.....	10
3.1.2. Tresilica.....	10
3.1.3. Centrifuga.....	11
3.1.4. Amicon filter	12
3.1.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)	12
3.2. Materijali	13
3.3. Analitičke metode.....	14
3.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	14
3.3.2. Provedba eksperimenta.....	15
3.3.2.1. Provedba reakcije u kotlastom reaktoru	15
3.3.2.2. Provedba ispitivanja operacijske stabilnosti enzima	15
3.4. Matematički model za aktivnost enzima	16
4. Rezultati i rasprava.....	17
4.1. Aldolna adicija između piruvata i formaldehida katalizirana enzimima YfaU WT, YfaU	17
3 i YfaU 5 u kotlastom reaktoru.....	17
4.2. Određivanje stabilnosti enzima YfaU WT, YfaU 3 i YfaU 5 - aldolaza.....	22
5. Zaključak.....	25

6. Literatura	26
7. Popis simbola	29
8. Prilozi	30
Životopis.....	32

1. Uvod

Enzimi, odnosno biokatalizatori izrazito su važni za industrijske, ali i biološke procese tre posebnu važnost imaju u farmaceutskoj industriji. U prošlosti su se kao katalizatori reakcija koristili brojni kemijski spojevi, no danas je sve više zastupljeno korištenje enzima. Upravo je korištenje enzima jedno od osnovnih načela zelene kemije. Korištenjem enzima kao katalizatora osiguravamo ekološki prihvatljivije provođenje procesa.

Enzimi imaju brojne prednosti nad kemijskim katalizatorima: reakcije se mogu provoditi u blažim uvjetima, osiguravaju stereoselektivnost, daju visoko iskorištenje reakcije i jedan enzim može katalizirati nekoliko sličnih reakcija. No, postoje i mane koje se postupno uklanjaju razvojem proteinskog inženjerstva i drugih sličnih područja. Jedan od najvećih problema s enzimima je njihova operacijska stabilnost te je stoga potrebno pronaći odgovarajući način stabilizacije.

YfaU - aldolaze je važna skupina enzima. Primarno kataliziraju reakciju natrijeva piruvata i formaldehida te se kao produkt dobiva natrijev 4-hidroksi-2-oksobutanoat.

2. Opći dio

2.1. Enzimi

2.1.1. Općenito

Riječ enzim dolazi od grčke riječi "en zym" što znači u kvasu. Kvas je ujedno i najstariji enzimski preparat te ga u prošlosti nalazimo u starom Egiptu gdje se upotrebljavao za proizvodnju hrane i pića.¹ Uglavnom enzimi djeluju intracelularno, odnosno unutar stanice, no ima i onih koji djeluju ekstracelularno. Postoje probavni enzimi koji se sintetiziraju unutar žlijezda te su tamo neaktivni, ali kada izađu u probavni trakt tada postaju aktivni i ispunjavaju svoju zadaću u tijelu.² Danas je poznato oko 3500 biokatalizatora, a prva istraživanja krenula su u prvoj polovici 19. stoljeća.¹

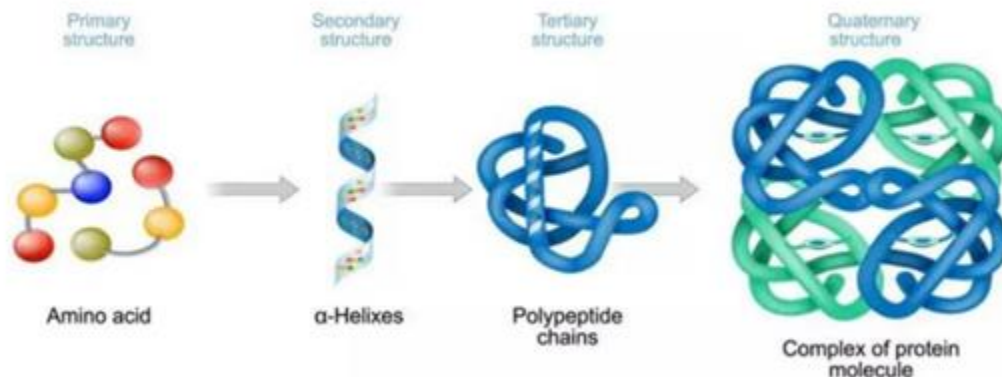
Enzimi su proteini koji nastaju kondenzacijom aminokiselina. Dolazi do nastajanja peptidne veze između amino i karbonilne skupine aminokiselina. Enzimi se sastoje od puno aminokiselinskih ostataka te njihov broj može ići od stotinjak pa sve do nekoliko stotina. Oni ubrzavaju kemijske reakcije, pogotovo one koje se odvijaju izrazito teško uobičajenom kemijskom sintezom. Enzimi imaju vrlo široku upotrebu. Najčešće se koriste za optimizaciju sinteza i modifikaciju organskih komponenata koje su kompleksne te mogu izazvati probleme u provođenju reakcije.²

Enzimi imaju mnogo prednosti, no mogu se istaknuti i određene mane. Neke prednosti enzima su to da najčešće reakcije koje kataliziraju možemo provoditi u blagim uvjetima, jedan enzim može ubrzavati jednu reakcija koristeći različite supstrate, odnosno nisu ograničeni na svoje prirodne supstrate, ali vrlo su selektivni. Također su i ekološki prihvatljiviji, odnosno ne stvaraju puno otpada budući da su biorazgradivi i proizvode se iz obnovljivih izvora. Nedostatci enzima su potencijalna inhibicija supstratom ili produktom, kompleksna priprema enzima te mala količina dobivenog produkta, što za posljedicu može imati visoku cijenu enzima. Enzimi su aktivni samo u vrlo uskom području optimalnih uvjeta, pa treba strogo kontrolirati reakciju.³ Također često dolazi do deaktivacije enzima što se može spriječiti imobilizacijom na čvrsti nosioc, kako bi se dobili stabilniji enzimi koje se mogu više puta upotrijebiti. Tako nastaju imobilizirani enzimi, koje nazivamo heterogenim biokatalizatorima. Heterogene katalizatore dijelimo u dvije skupine: biokatalizatore prve generacije, odnosno imobilizirane enzime i biokatalizatore druge generacije, odnosno imobilizirane cijele stanice.⁴

2.1.2. Struktura enzima

Enzimi imaju četiri različite strukture (slika 2.1.):

1. Primarna struktura predstavlja kondenzacijski lanac aminokiselina povezan točno određenim redoslijedom.
2. Sekundarna struktura je u obliku uzvojnice koja nastaje povezivanjem kondenzacijskih lanaca vodikovim vezama.
3. Tercijarna struktura koja ima kompaktnu strukturu koja nastaje povezivanjem lanaca pomoću kovalentnih veza.
4. Kvartarna struktura koja je ujedno i najsloženija te se sastoji od nekoliko lanaca (podjedinica) koji su stabilizirani disulfidnim mostovima i valencijskim silama.⁵



Slika 2.1. Prikaz četiri različite strukture enzima.⁶

2.1.3. Klasifikacija

Najčešća podjela enzima je na temelju mehanizma djelovanja, pa tako postoji 6 skupina enzima.

1. Hidrolaze kataliziraju reakcije hidrolize spojeva. U njih spadaju lipaze i proteaze.
2. Izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije. U njih spadaju racemaze i mutaze.
3. Ligaze kataliziraju nastajanje kovalentne veze između dvije molekule. U njih spadaju karboksilaze i sintetaze.
4. Liaze kataliziraju cijepanje spojeva reakcijama oksidacije i hidrolize. U njih spadaju dekarboksilaze i aldolaze.

5. Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije. U njih spadaju oksidaze i dehidrogenaze.
6. Transferaze kataliziraju funkcionalne skupine (najčešće amino ili fosfatne skupine). U njih spadaju kinaze.⁷

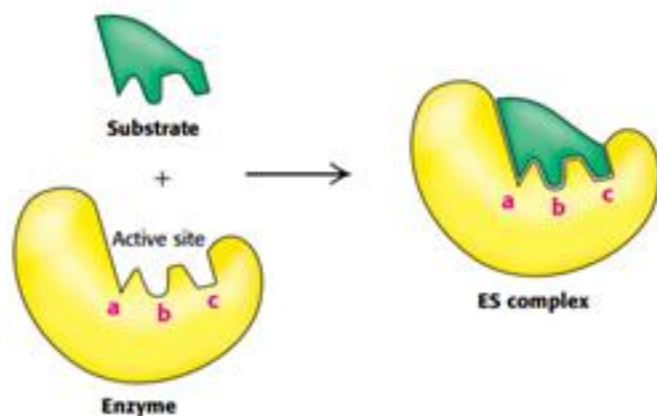
2.1.4. Mehanizam djelovanja enzima

Za katalitička svojstva enzima odgovorno je aktivno mjesto koje nastaje specifičnim nabiranjem peptidnog lanca. Budući da su enzimi proteini, njihovom denaturacijom pri višim temperaturama dolazi do slabljenja katalitičkih svojstava jer dolazi do razaranja strukture. Na aktivnost enzima utječu brojni čimbenici: pH, temperatura, koncentracije supstrata i produkta, otapalo, prisutstvo kofaktora i metalnih iona i dr.⁸

Postoje dva modela vezanja supstrata za aktivno mjesto enzima:

1. Model ključ – brava (eng. lock-and-key model)

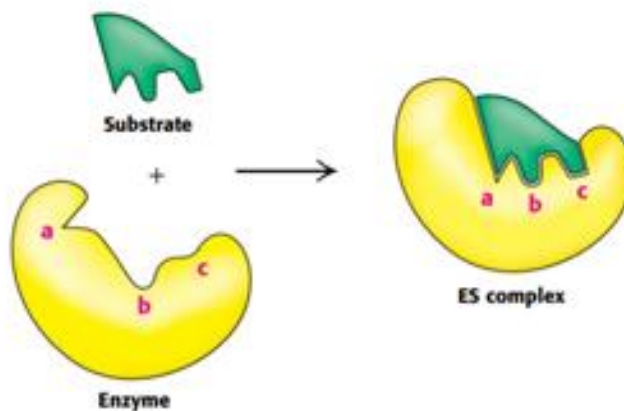
U ovom modelu naglasak je na tome da aktivno mjesto odgovara obliku supstrata te se on savršeno uklapa. To osigurava da se na enzim ne može vezati supstrat neodgovarajućeg oblika (slika 2.2.).²



Slika 2.2. Prikaz ključ – brava modela vezanja supstrata na aktivno mjesto enzima.²

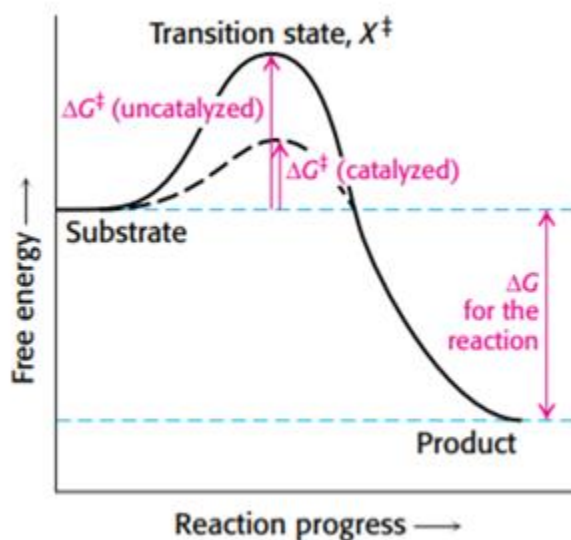
2. Model pobuđene prilagodbe (eng. induced fit)

Kod ovog modela, u trenutku vezanja supstrata, dolazi do modifikacije aktivnog mjesta enzima da bi se prilagodilo obliku supstrata (slika 2.3.).²



Slika 2.3. Prikaz modela pobuđene prilagodbe za vezanje supstrata na aktivno mjesto enzima.²

Enzimi ubrzavaju reakciju tako da ju provode po reakcijskom putu pri kojem je niža energija aktivacije. To snižavanje energije aktivacije postižu preko kompleksa enzim – supstrat (slika 2.4.).²



Slika 2.4. Prikaz potrebnih aktivacijskih energija za odvijanje procesa s enzimom i bez njega.²

2.1.5. Stabilnost enzima

Poznavanje stabilnosti enzima vrlo je bitno za provođenje reakcije. Stabilnost se izražava pomoću enzimске aktivnosti tijekom vremena. Svaki enzim u nekom trenutku gubi stabilnost, a to se događa zbog promjene njegove strukture. Postoje dvije vrste stabilnosti enzima: stabilnost u uvjetima skladištenja i operacijska stabilnost.⁹

Stabilnost u uvjetima skladištenja govori o zadržavanju aktivnosti tijekom vremena. Odnosi se na to kada se enzim čuva kao dehidrirani pripravak, otopina ili kao imobilizirani pripravak. O njoj ovisi rok upotrebe enzima.⁹

Operacijska stabilnost vrlo je važna prilikom provedbe reakcije. Definira se kao stabilnost enzima tijekom kontinuirane upotrebe. Izražava se kao vrijeme poluraspada enzima, $t_{1/2}$, odnosno vrijeme koje je potrebno da početna aktivnost enzima padne na polovinu početne vrijednosti.¹⁰ Ovisi o nekoliko faktora: pH, temperaturi, koncentracijama supstrata, produkta i enzima te o vrsti reaktora u kojem se odvija reakcija. Posebno je važno voditi računa o temperaturi zato što su enzimi proteini te pri većim temperaturama dolazi do denaturacije koja ima za posljedicu smanjenu stabilnost, kao i aktivnost.¹¹ Operacijsku stabilnost možemo procijeniti određivanjem konstante deaktivacije, k_d . Vrijeme poluraspada i konstanta deaktivacije povezani su preko sljedeće jednadžbe:

$$t_{1/2} = -\frac{\ln(0.5)}{k_d} \quad (1)$$

u kojoj pretpostavljamo da kinetika reakcije deaktivacije enzima odgovara kinetici prvoga reda.¹²

2.2. Aldolaze

Aldolaza je skupina enzima koja spada u liaze. Vrlo su korisne za proizvodnju biološki važnih spojeva zbog sposobnosti stvaranja nove ugljik – ugljik veze, kao i za dobivanje novih tipova struktura. Najčešće se koriste u farmaceutskoj industriji.¹³

Za veliki broj industrijskih procesa nema prirodnih enzima što je dovelo do razvoja proteinskog inženjerstva, pa time i samih enzima. To za posljedicu ima mogućnost stvaranja novih, odnosno modifikacije postojećih aldolaza koje mogu dovesti do enzima sa željenim svojstvima poput stabilnosti, specifičnosti prema supstratu i stereospecifičnosti.¹⁴

2.2.1. Podjela aldolaza

Budući da aldolaze imaju sposobnost koristiti veliki broj različitih aldehida kao akceptora, obično je donorski spoj taj koji je strukturno nepromjenjiv i upravo na tome se temelji prva podjela aldolaza pa ih dijelimo u 6 skupina kako slijedi:

1. piruvat/2-oksobutirat aldolaze,
2. dihidroxiaceton fosfat (DHAP) aldolaze,
3. DHA (dokosaheksaenoična kiselina) aldolaze,
4. glicin/alanin aldolaze i
5. acetaldehid aldolaze.

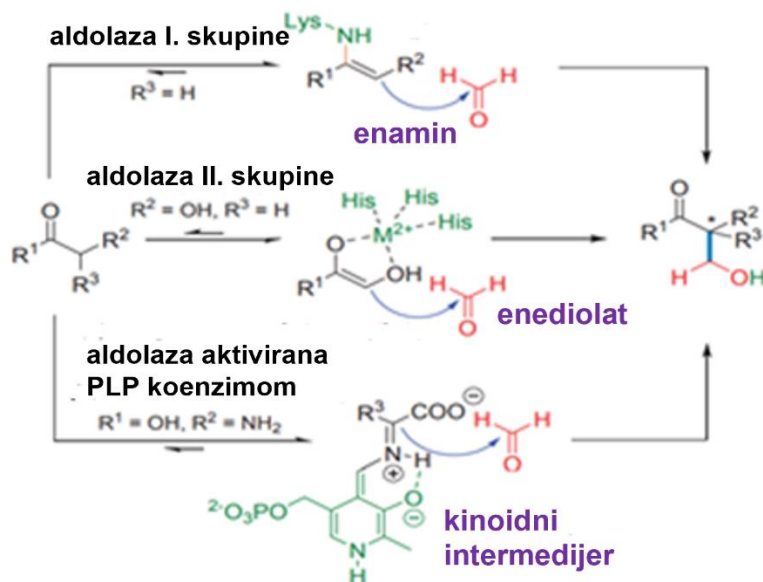
Druga podjela se temelji na enzimskom mehanizmu aktiviranja nukleofilne komponente, pa tu postoje tri skupine kako slijedi:

1. aldolaze I. skupine kojima se na aktivnom mjestu nalazi lizinski ostatak koji aktivira donorski spoj da bi se kao intermedijer reakcije dobio enamin,
2. aldolaze II. skupine kod kojih dvovalentni metalni ion uzrokuje enolizaciju donorskog spoja pomoću kompleksa Lewisove baze i
3. aldolaza koje se aktiviraju pomoću hidroksimetil pirodoksal 5' – fosfat (PLP) koenzima.¹³

2.2.2. Aldolaze u aldolnim reakcijama

Aldolne reakcije su jedne od najbitnijih reakcija stvaranja ugljik – ugljik veze u organskoj sintezi. Vrlo su korisne za sintezu enantiomerno čistih organskih molekula. Kako bi dobili takve molekule aldolne reakcije se moraju odvijati uz strogu kontrolu stereokemije na novonastaloj vezi, a to je moguće uz katalizator. Aldolaze mogu katalizirati reverzibilno stvaranje ugljik – ugljik veze tako da dodaju nukleofilni donor (najčešće ketonski enolat ili neki njegov analog) na elektrofilni akceptor (aldehid).¹³

Aldolne reakcije temelje se na mogućnosti stvaranja ugljik – ugljik veze između karbonilnog ugljika koji se može enolizirati (donor) i aldehida (akceptor). Aktivacija na donoru stvara nukleofilni ugljik koji se dodaje elektrofilnoj karbonilnoj skupini akceptora. Kao što je ranije spomenuto, donor se može aktivirati na tri načina. Neovisno o načinu aktivacije, donor je aktiviran katalitičkim centrom te mu je stupanj slobode smanjen i aldolaza ga orijentira te na taj način osigurava stereokemijsku kontrolu. Tijekom stvaranja ugljik – ugljik veze dolazi do nastajanja kiralnog centra C_{β} (slika 2.5.).¹⁵

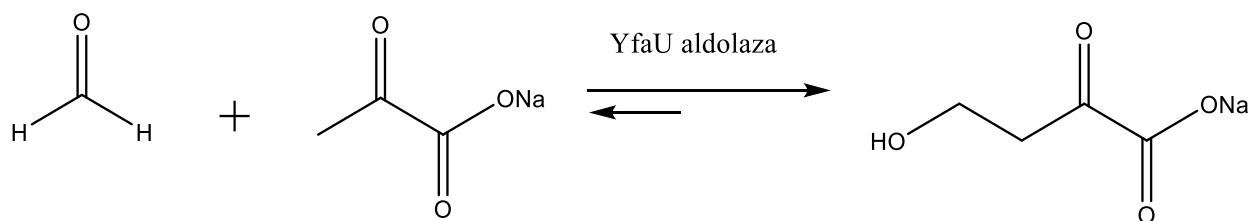


Slika 2.5. Prikaz tri različita mehanizma aktivacije donorskog spoja u aldolnoj reakciji s aldolazom¹⁵

2.2.3. YfaU - aldolaza

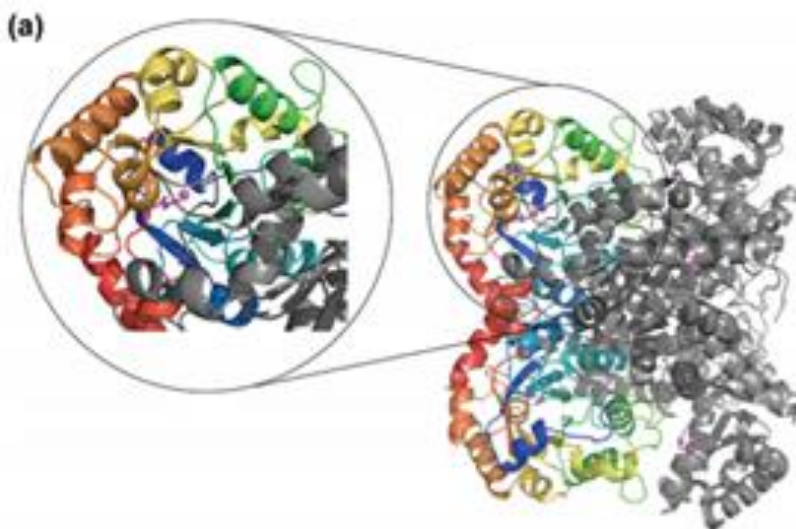
YfaU - aldolaze spadaju u klasu II piruvat aldolaza. Dio je funkcionalno neraspoređenog operona u *Escherichia coli* K12.¹⁶ Puno ime enzima je 2-keto-3-deoksi-L-ramnonat te je mutant 2-keto-3-deoksi-6-fosfoglukonata (KDP). Proizveden je kao topljivi fuzijski protein s prirodnim kofaktorom Mg^{2+} .¹⁵

YfaU - aldolaze kataliziraju aldolnu reakciju formaldehida (elektrofilni akceptor) i piruvata (nukleofilni donor). Kao produkt se dobiva natrijev 4-hidroksi-2-oksobutanoat (slika 2.6.).



Slika 2.6. Prikaz jednadžbe reakcije natrijeva piruvata i formaldehida katalizirana YfaU - aldolazama

U usporedbi s aldolazama I. klase, aldolaze II. klase, ujedno i YfaU - aldolaze bolje podnose velike koncentracije formaldehida (više od 1.4 M).¹⁵



Slika 2.7. Prikaz strukture YfaU - aldolaze

3. Eksperimentalni dio

3.1. Aparatura

3.1.1. Analitička vaga

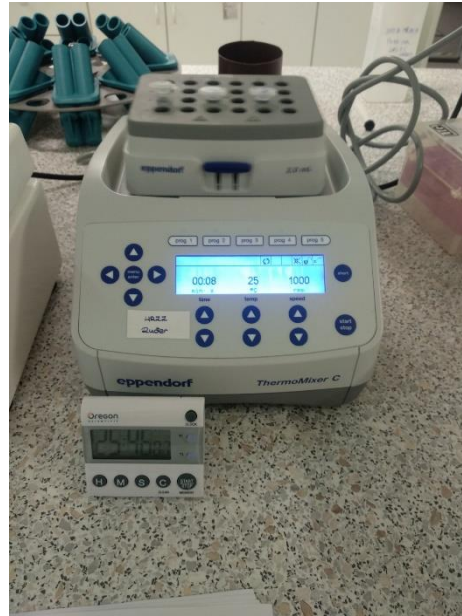
Svi uzorci vagani su na analitičkoj vagi *AUW120*, proizvođača *Shimadzu* prikazanoj na slici 3.1.



Slika 3.1. Analitička vaga *AUW120* (*Shimadzu*)

3.1.2. Tresilica

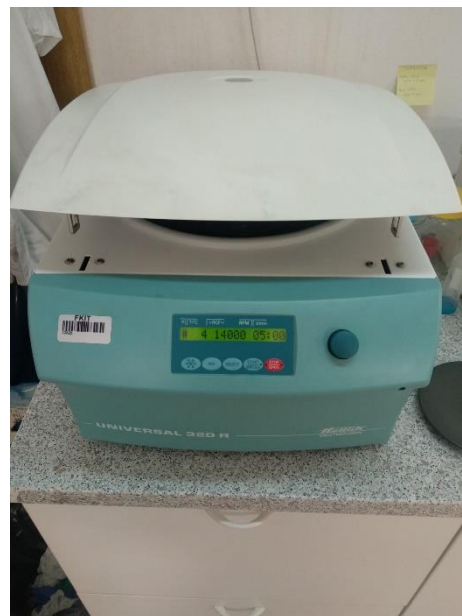
Svi eksperimenti provedeni su na treslici *ThermoMixer C*, proizvođača *Eppendorf* prikazanoj na slici 3.2.



Slika 3.2. Tresilica *ThermoMixer C* (Eppendorf)

3.1.3. Centrifuga

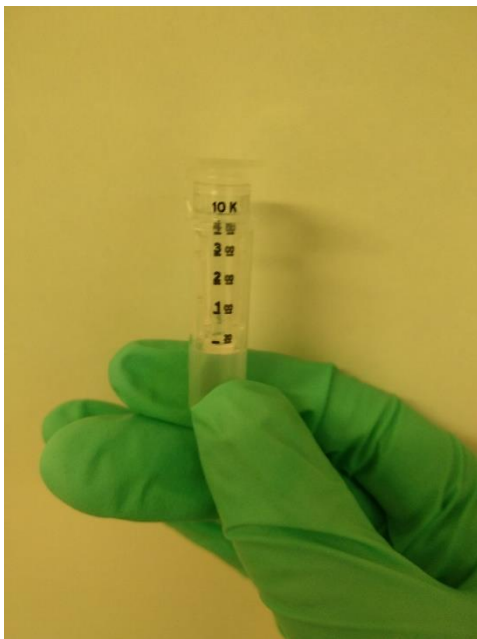
Centrifugiranje uzoraka provodilo se u centrifugi *Universal 320 R*, proizvođača *Hettich* prikazanoj na slici 3.3.



Slika 3.3. Centrifuga *Universal 320 R* (Hettich)

3.1.4. Amicon filter

Za ispitivanje operacijske stabilnosti enzima potrebno je reakcijsku smjesu filtrirati kroz Amicon® Ultra filter (0.5 mL).



Slika 3.4. Amicon filter

3.1.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)

Koncentracije formaldehida, natrij piruvata i adola određivane su pomoću HPLC-a s UV detektorom. Uređaj proizvođača *Shimadzu* prikazan je na slici 3.5.



Slika 3.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

3.2. Materijali

Kemikalije korištene u radu prikazane su u tablici 1.

Tablica 1. Popis kemikalija

NAZIV KEMIKALIJE	PROIZVOĐAČ	ZEMLJA PODRIJETLA
formaldehid	T.T.T. doo	Hrvatska
natrijev piruvat	Fluka	Kina
YfaU WT	Universidad Autónoma de Madrid (laboratorij prof. Hidalgo)	Španjolska
YfaU 3		
YfaU 5		
o-benzilhidroksilamin hidroklorida	Acros Organics	Belgija

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC) je najčešće korištena analitička separacijska tehnika. To je oblik kromatografije na stupcu. Analitički uređaj koji mjeri koncentraciju komponenti u analiziranom uzorku naziva se tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti.¹⁷

Princip rada HPLC-a je forsiranje prolaska analiziranog uzorka pumpanjem mobilne faze pod visokim tlakom kroz sam stupac koji je ispunjen česticama stacionarne faze.¹⁷ Zadatak injektora je unos tekućeg uzorka pod visokim tlakom u tok struje pokretne faze.¹⁸ Na kolona se odvija odvajanje komponenti uzorka na temelju kemijskih i fizikalnih svojstava koje uzrokuju kretanje molekula kroz kolonu različitim brzinama, te ih tako razdvajaju prema vremenu zadržavanja u koloni.¹⁷ Detektor mjeri količinu komponenti u ispitivanom uzorku.¹⁸ Prije mjerenja uzorka nepoznate koncentracije, potrebno je napraviti baždarni pravac za pojedine komponente uzorka. Na njemu se vidi veličina odaziva, odnosno veličina pika proporcionalna je koncentraciji komponente. Za svaku komponentu postoji različito vrijeme zadržavanja unutar kolone i na temelju toga se radi kvalitativna analiza.^{17,19}

Prilikom analize na HPLC instrumentu korištena je kolona Kinetex ® C18 (5 µm, 4.6 × 250 mm) proizvođača Phenomenex. Analiza se odvija uz mobilnu fazu A (0.095% v/v TFA u acetonitril/ ultračista voda 80:20) i mobilnu fazu B (0.1% v/v TFA u ultračistoj vodi).

Analiza je provedena gradijentnom metodom mijenjanjem koncentracije eluenta B od 90% do 0% tijekom 10 minuta, potom na 0% 2 minute, pa od 0% do 90% idućih 3 minute te na 90% 1 minutu pri temperaturi od 30 °C i valnoj duljini 215 nm. Protok eluenta je iznosio 1.5 mL min⁻¹.

Kromatogrami se nalaze u Prilogu 1.

Za određivanje koncentracija natrijeva piruvata i formaldehida napravljeni su baždarni pravci. Baždarni pravci napravljeni su tako da su pripremljene otopine natrijeva piruvata i formaldehida sljedećih koncentracija: 10 mmol dm⁻³ ; 5 mmol dm⁻³ ; 2 mmol dm⁻³ i 1 mmol dm⁻³ u 50 mmol dm⁻³ fosfatnom puferu te su analizirane na HPLC-u. Produkt reakcije, kao i reaktante, nije moguće detektirati opisanom metodom i zbog toga je provedena derivatizacija uzoraka prije same analize na HPLC-u. Derivatizacija je provedena na sljedeći način: 5 µL uzorka reakcijske

smjese otpipetirano je u Eppendorf epruvetu s 50 μL otopine za derivatizaciju ($\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$), zatim je otopina termostatorana na tresilici pri 1000 rpm pri 25°C tijekom 5 minuta. Nakon 5 minuta uzorcima je dodano 500 μL metanola te su centrifugirani pri 14000 rpm na 4°C tijekom 5 minuta. Derivatizacijska otopina $\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$ (130 mmol dm^{-3}) sastojala se od o-benzilhidroksilamin hidroklorida otopljenog u piridinu, metanolu i vodi u omjeru 33:15:2.

Dobiveni baždarni pravac za piruvat nalazi se u Prilogu 2, a baždarni pravac za formaldehid nalazi se u Prilogu 3.

3.3.2. Provedba eksperimenta

3.3.2.1. Provedba reakcije u kotlastom reaktoru

Reakcija formaldehida i natrijeva piruvata katalizirana je s tri enzima (YfaU WT, YfaU 3 i YfaU 5) i provedena je u kotlastom reaktoru. Sastav reakcijskih smjesa bio je sljedeći: $V_{\text{piruvat}} = 100 \mu\text{L}$ ($C_{\text{piruvat}} = 1 \text{ M}$), $V_{\text{formaldehid}} = 75 \mu\text{L}$ ($C_{\text{formaldehid}} = 1.343 \text{ M}$), $V_{\text{pufer}} = 225 \mu\text{L}$ ($C_{\text{pufer}} = 50 \text{ mM}$) i $V_{\text{enzim}} = 100 \mu\text{L}$ ($\gamma_{\text{enzim}} = 0.25 \text{ mg mL}^{-1}$). Otopine natrijeva piruvata i formaldehida pripremljene su u 50 mmol dm^{-3} otopini pufera te njihova koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosi 200 mmol dm^{-3} . Koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi iznosila je 0.05 mg mL^{-1} . Volumen reakcijske smjese bio je 0.5 mL, a reakcija je provedena na Eppendorf tresilici pri 25°C i 1000 rpm. U određenom vremenskom razmaku uzimani su uzorci za praćenje koncentracije reaktanata i produkta te su, nakon derivatizacije koja je ranije opisana, analizirani na HPLC-u. Za svako uzimanje reakcijske smjese iz kotlastog reaktora uzeta su dva razrijeđenja (1x i 10x).

3.3.2.2. Provedba ispitivanja operacijske stabilnosti enzima

Provedeni su eksperimenti u kotlastom reaktoru pri većim koncentracijama enzima YfaU WT, YfaU 3 i YfaU 5 radi praćenja operacijske stabilnosti enzima. U tim eksperimentima sastav reakcijskih otopina bio je sljedeći: $V_{\text{piruvat}} = 200 \mu\text{L}$ ($C_{\text{piruvat}} = 1 \text{ M}$), $V_{\text{formaldehid}} = 150 \mu\text{L}$ ($C_{\text{formaldehid}} = 1.343 \text{ M}$), $V_{\text{pufer}} = 650 \mu\text{L}$ ($C_{\text{pufer}} = 100 \text{ mM}$) i $V_{\text{enzim}} = 1000 \mu\text{L}$ ($\gamma_{\text{enzim}} = 0.25 \text{ mg mL}^{-1}$). Otopine natrijeva piruvata i formaldehida pripremljene su u 100 mmol dm^{-3} otopini pufera te njihova koncentracija u reakcijskoj smjesi iznosi 100 mmol dm^{-3} . Koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi iznosila je 0.125 mg mL^{-1} . Volumen reakcijske smjese bio je 2 mL, a reakcija je provedena na Eppendorf tresilici pri 25°C i 1000 rpm. U određenom vremenskom razmaku uzimani su uzorci reakcijske smjese za praćenje potrošnje reaktanata i nastajanje produkta te su, nakon derivatizacije koja je ranije opisana, analizirani na HPLC-u. Za svako uzimanje reakcijske smjese

iz kotlastog reaktora napravljen je uzorak koji nije razrijeđen te uzorak koji je razrijeđen 10 puta u 50 mmol dm⁻³ fosfatnom puferu (5 µL reakcijske smjese i 45 µL pufera). Iz ovih reakcijskih smjesa uzimaju se uzorci za ispitivanje operacijske stabilnosti enzima YfaU WT, YfaU 3 i YfaU 5.

Iz reakcijske smjese su uzimani uzorci za određivanje aktivnosti enzima u vremenima 0, 1 h, 2 h, 4 h i 24h. 40 µL uzorka se stavlja u Amicon filter zajedno s 100 µL 50 mM pufera i filtrira na centrifugi 5 minuta pri 4°C na 14000 rpm. Zatim se u filter dodaje dodatnih 100 µL 50 mM pufera kojim se uzorak ispiru. Enzim zaostaje na filteru, a pufer kao i ostatak reakcijske smjese prolazi kroz njega. Radi se nova reakcijska smjesa čiji je sastav sljedeći: $c_{\text{piruvat}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{formaldehid}} = 102.07 \text{ mM}$ i $\gamma_{\text{profiltrirani enzim}} = 0.02 \text{ mg mL}^{-1}$ uz 50 mM fosfatni pufer. Ponovo se u određenom vremenskom razmaku uzimaju uzorci iz novih reakcijskih smjesa, provodi se derivatizacija na opisan način te analiza na HPLC-u. Na temelju koncentracija novonastalog aldola dobivenih analizom u ovisnosti o vremenu, dobivaju se nagibi pravaca koji predstavljaju aktivnost aldolaza.

3.4. Matematički model za aktivnost enzima

Dobiveni eksperimentalni podaci za aktivnost enzima opisani su matematičkim modelom u programskom paketu Scientist.

Brzina deaktivacije opisana je kinetikom prvog reda:

$$r = k_d * A \quad (2)$$

gdje r predstavlja brzinu deaktivacije enzima, k_d konstantu deaktivacije, te A aktivnost enzima.

U zatvorenom sustavu deaktivacija enzima ovisi samo o koncentraciji aktivnog enzima, pa se brzina deaktivacije može prikazati sljedećom jednažbom:

$$r = -\frac{dA}{dt} = k_d * A. \quad (3)$$

Derivacijom navedene jednažbe dobiva se ovisnost aktivnosti enzima (A) o vremenu (t), uz određenu početnu vrijednost aktivacije enzima (A_0) i eksperimentalno određenu konstantu deaktivacije (k_d).^{20,21,22}

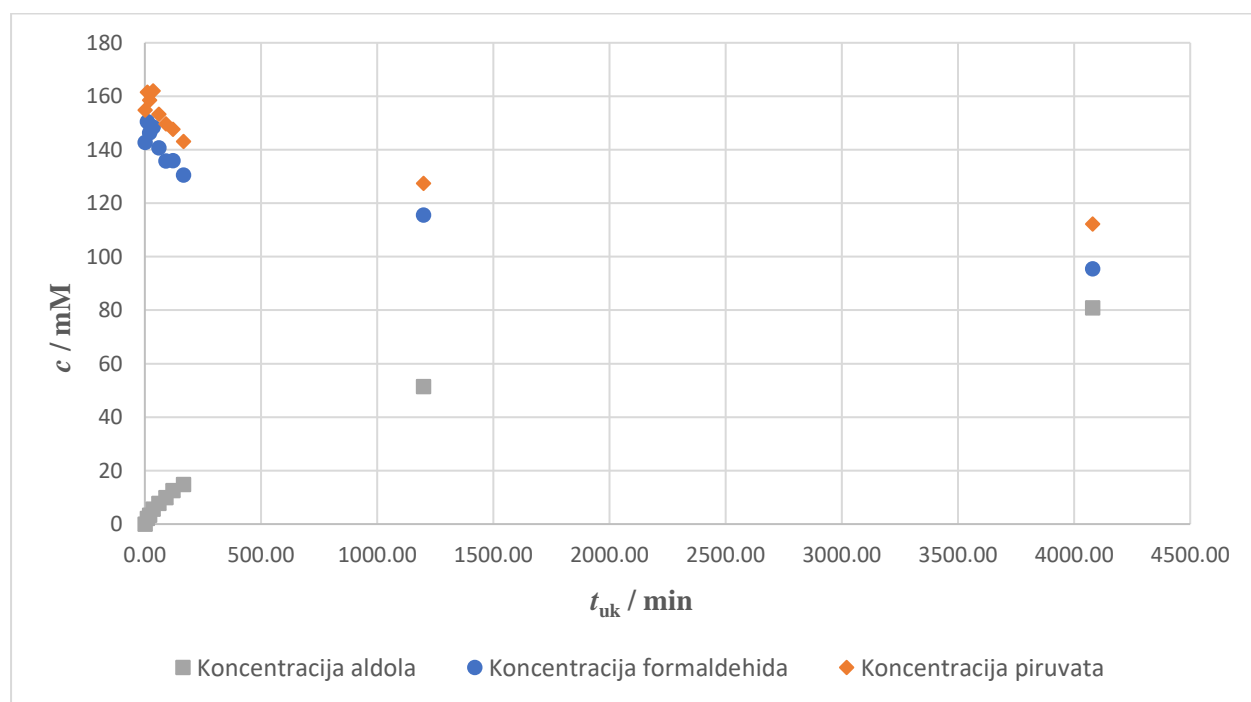
$$A = A_0 * e^{-k_d * t}. \quad (4)$$

4. Rezultati i rasprava

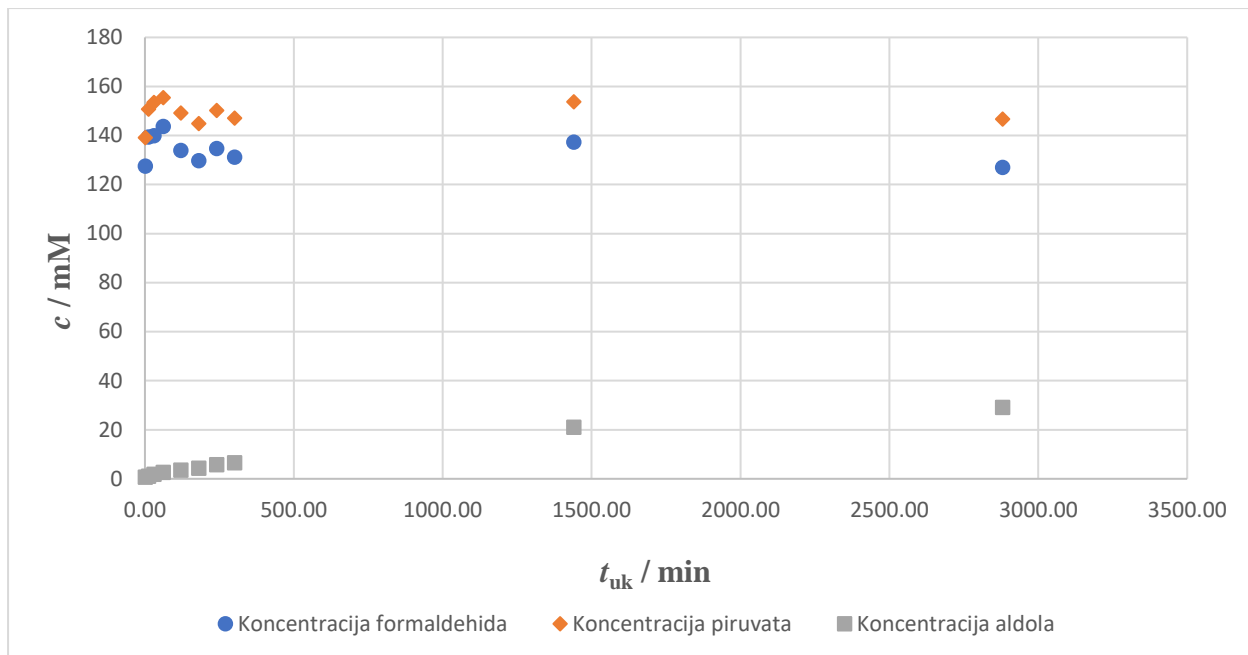
U ovom radu proučavana je aldolna adicija piruvata kao donorskog supstrata i formaldehida kao akceptorskog supstrata katalizirana s tri aldolaze: YfaU WT, YfaU 5 i YfaU 3. Kao produkt se dobiva natrijev 4-hidroksi-2-oksobutanoat. Reakcija je provedena u kotlastom reaktoru te su provedeni eksperimenti s ciljem određivanja operacijske stabilnosti navedenih enzima.

4.1. Aldolna adicija između piruvata i formaldehida katalizirana enzimima YfaU WT, YfaU 3 i YfaU 5 u kotlastom reaktoru

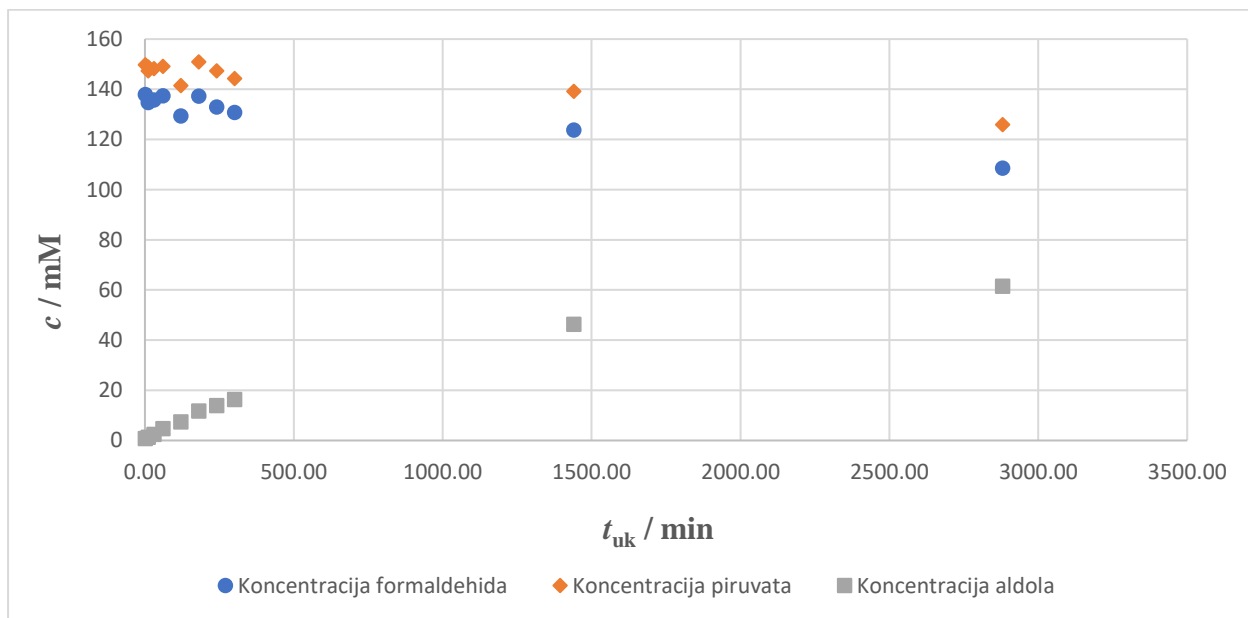
Provedena je aldolna adicija u kotlastom reaktoru katalizirana je aldolazama YfaU WT, YfaU 5 i YfaU 3. Praćena je potrošnja supstrata te nastanak produkta. Za svaki enzim reakcija se pratila u dva kotlasta reaktora u kojima je razlika bila volumen reaktora (0.5 i 2 mL) te koncentracija navedenih enzima (0.05 mg/mL i 0.125 mg/mL).



Slika 4.1. Aldolna adicija između piruvata i formaldehida katalizirana YfaU WT - aldolazom u kotlastom reaktoru ($\gamma_{enzim} = 0.05 \text{ mg/mL}$, 50 mM fosfatni pufer pH 7, 25°C, 1000 rpm, $V = 0.5 \text{ mL}$)



Slika 4.2. Aldolna adicija između piruvata i formaldehida katalizirana YfaU 3 - aldolazom u kotlastom reaktoru ($\gamma_{enzim} = 0.05 \text{ mg/mL}$, 50 mM fosfatni pufer pH 7, 25°C, 1000 rpm, $V = 0.5 \text{ mL}$)



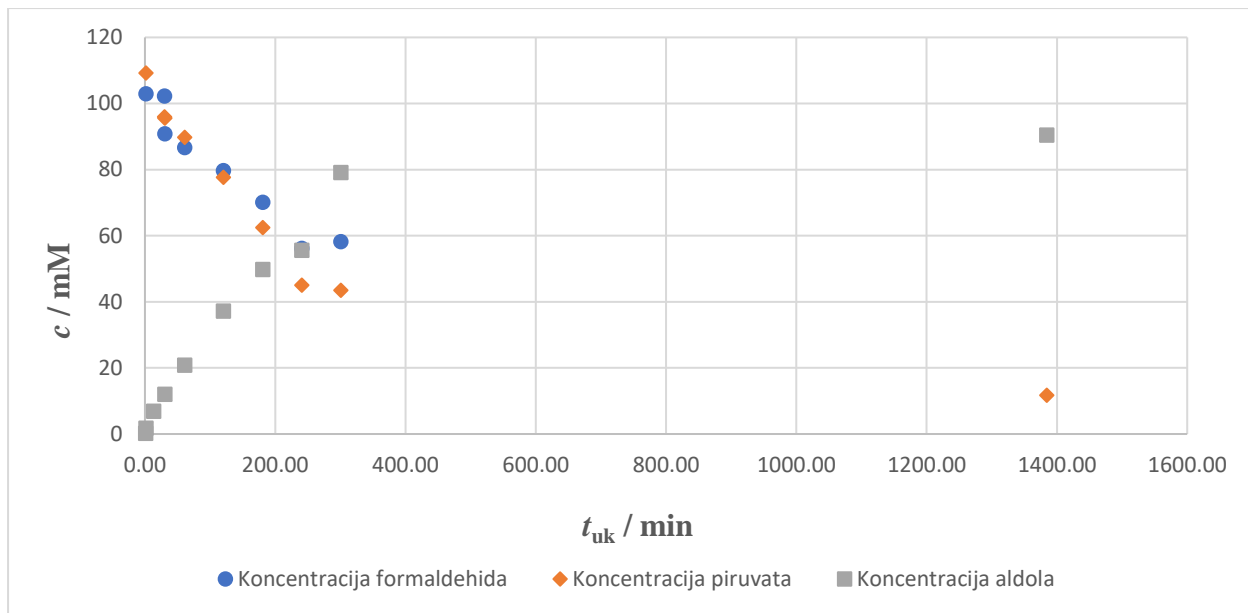
Slika 4.3. Aldolna adicija između piruvata i formaldehida katalizirana YfaU 5 - aldolazom u kotlastom reaktoru ($\gamma_{enzim} = 0.05 \text{ mg/mL}$, 50 mM fosfatni pufer pH 7, 25°C, 1000 rpm, $V = 0.5 \text{ mL}$)

Iz grafova koji prikazuju promjenu koncentracija supstrata i produkta u kotlastom reaktoru pri koncentraciji enzima 0.05 mg mL^{-1} (slika 4.1., slika 4.2. i slika 4.3.), može se zaključiti da je koncentracija enzima premala te se reakcija sporo odvija.

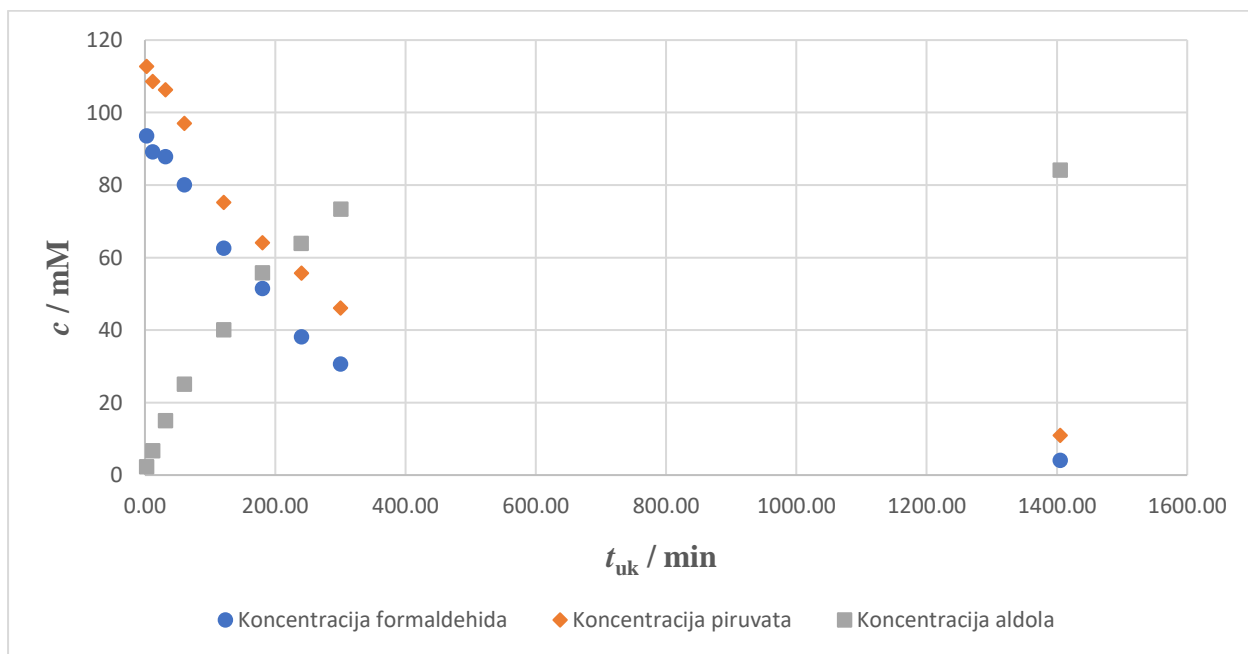
Tablica 2. Vrijednosti izračunatih konverzija piruvata i formaldehida te iskorištenja koje se odnosi na novonastali aldol za reakcijsku smjesu u kojoj je koncentracija enzima 0.05 mg/mL nakon 24 h

Enzim	$X_{\text{piruvat}} / \%$	$X_{\text{formaldehid}} / \%$	$I_{\text{aldol}} / \%$
YfaU WT	36.29	42.63	25.70
YfaU 3	23.17	31.88	10.50
YfaU 5	30.41	38.61	23.17

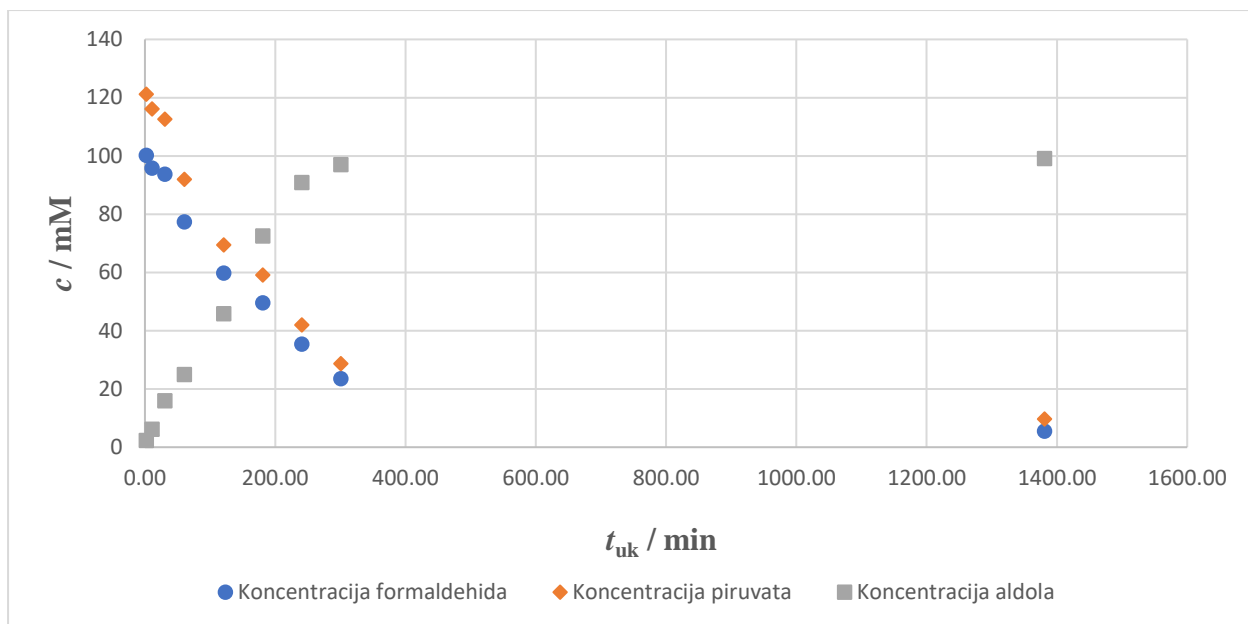
Koncentracija formaldehida i natrijeva piruvata se smanjuje, a koncentracija aldola povećava što se vidi iz navedenih grafova (slike 4.1. - 4.3.), kao i izračunatih vrijednosti konverzija supstrata i iskorištenja prikazanih u tablici 2. Potrebno je povećati koncentraciju enzima da bi se dobila zadovoljavajuća količina produkta u kraćem vremenu. Također se može zaključiti da enzim YfaU WT - aldolaza najbolje katalizira reakciju u uvjetima gdje je u kotlastom reaktoru koncentracija enzima jednaka 0.05 mg / mL , a koncentracija natrijeva piruvata i formaldehida 200 mM .



Slika 4.4. Aldolna adicija između piruvata i formaldehida katalizirana YfaU WT - aldolazom u kotlastom reaktoru ($\gamma_{\text{enzim}} = 0.125 \text{ mg/mL}$, 100 mM fosfatni pufer pH 7, 25°C, 1000 rpm, $V = 2 \text{ mL}$)



Slika 4.5. Aldolna adicija između piruvata i formaldehida katalizirana YfaU 3 - aldolazom u kotlastom reaktoru ($\gamma_{\text{enzim}} = 0.125 \text{ mg/mL}$, 100 mM fosfatni pufer pH 7, 25°C, 1000 rpm, $V = 2 \text{ mL}$)



Slika 4.6. Aldolna adicija između piruvata i formaldehida katalizirana YfaU 5 - aldolazom u kotlastom reaktoru ($\gamma_{enzim} = 0.125 \text{ mg/mL}$, 100 mM fosfatni pufer pH 7, 25°C, 1000 rpm, $V = 2 \text{ mL}$)

Tablica 3. Vrijednosti izračunatih konverzija piruvata i formaldehida te iskorištenja koje se odnosi na novonastali aldol za reakcijsku smjesu u kojoj je koncentracija enzima 0.125 mg/mL nakon 24 h

Enzim	$X_{piruvat} / \%$	$X_{formaldehid} / \%$	$I_{aldol} / \%$
YfaU WT	88.33	100	90.44
YfaU 3	89.03	95.93	84.18
YfaU 5	90.30	94.51	99.12

Na grafovima koji prikazuju ovisnost koncentracije supstrata i produkta o vremenu pri koncentraciji enzima od 0.125 mg/mL (slike 4.4. - 4.6.) vidi se znatno smanjenje koncentracija supstrata te povećanje koncentracije novonastalog aldola. U reakcijskoj smjesi ostalo je još neizreagiranih reaktanata. Isto možemo zaključiti iz izračunatih konverzija supstrata te iskorištenja prikazanih u tablici 3.

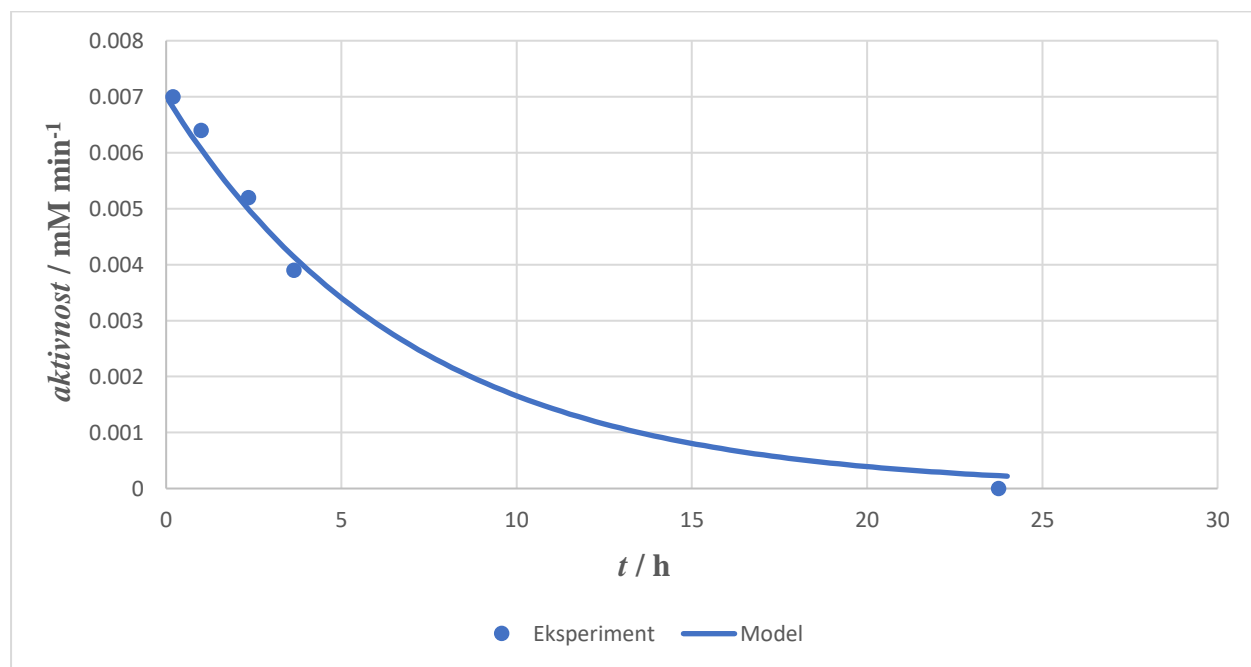
Najbolji rezultati u smislu koncentracije postignutog produkta su postignuti uz je YfaU 5 – aldolazu.

4.2. Određivanje stabilnosti enzima YfaU WT, YfaU 3 i YfaU 5 - aldolaza

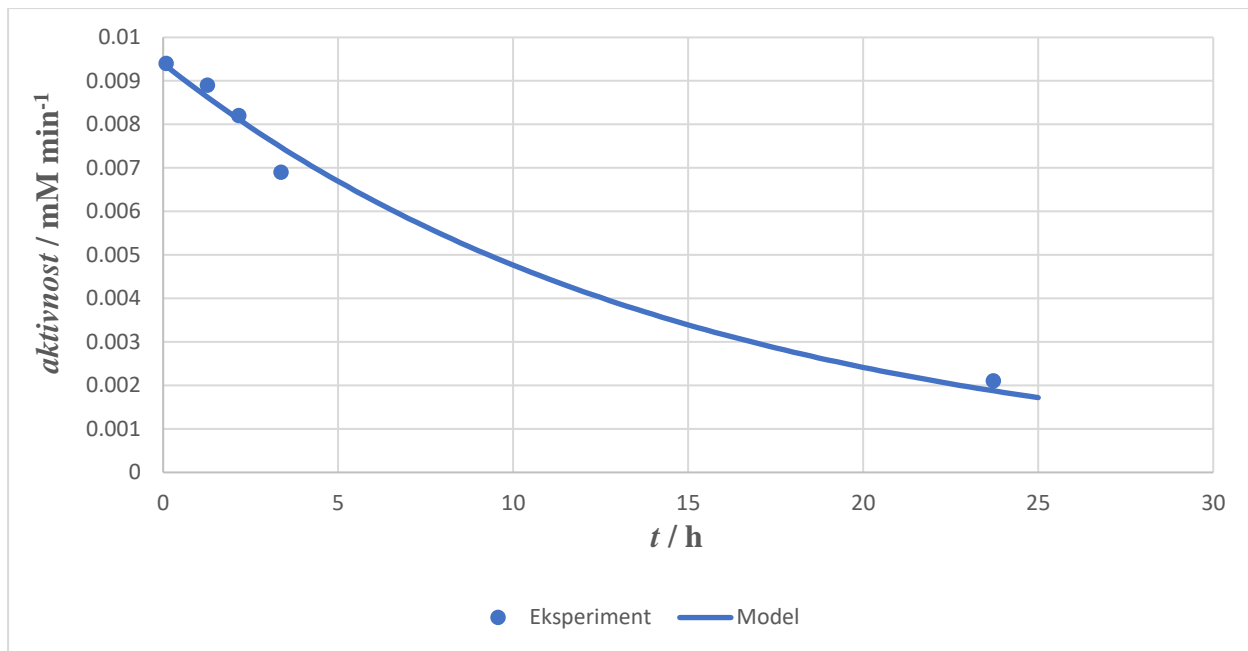
Vrijednosti aktivnosti enzima dobivamo određivanjem nagiba pravca iz grafa ovisnosti koncentracije aldola u ovisnosti o vremenu uzoraka koji su uzeti iz kotlastog reaktora u kojemu je koncentracija enzima 0.125 mg/mL (postupak provedenog eksperimenta opisan u 3.3.3.2.).

Za određivanje stabilnosti, kao i procjenu konstante deaktivacije, potrebni su grafovi ovisnosti aktivnosti enzima o vremenu (slike 4.7. - 4.9.). Uočava se da se aktivnost enzima smanjuje tijekom reakcije. Pretpostavljeno je da se aktivnost smanjuje prema kinetici prvoga reda (jed. 3).

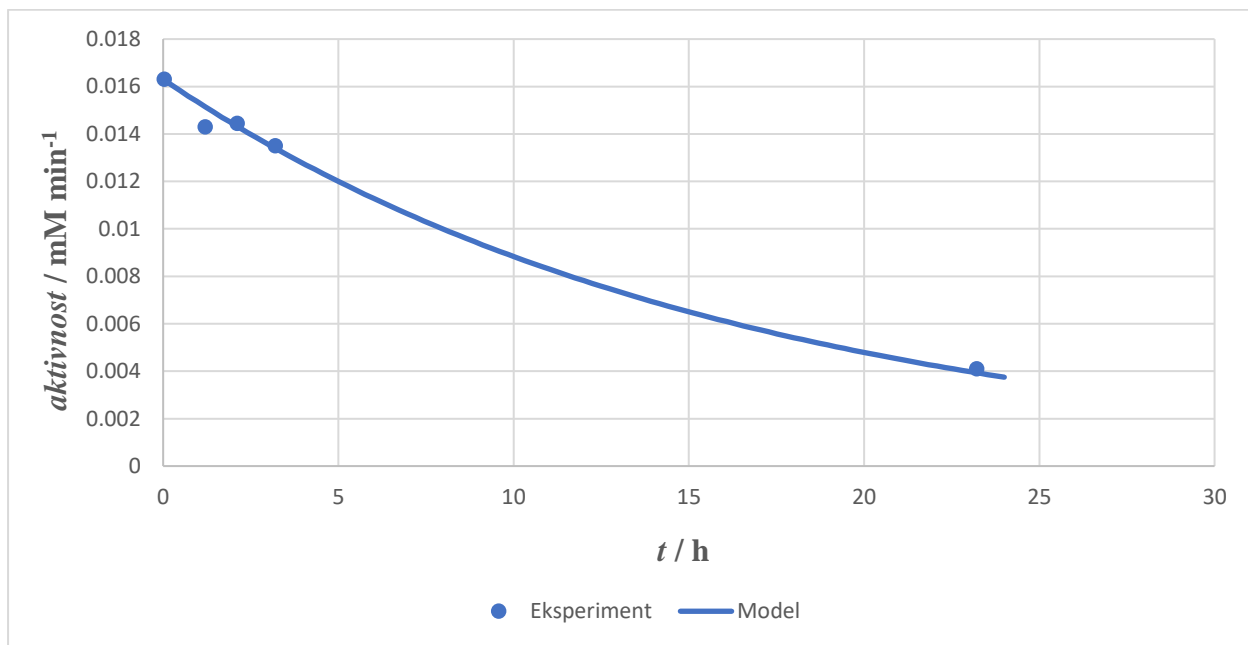
Iz rezultata (slike 4.7. - 4.9.) se uočava da enzim YfaU WT nakon 24 sata potpuno gubi aktivnost, dok enzim YfaU 5 - aldolaza nakon 24 sata u reakcijskoj smjesi zadržava četvrtinu početne vrijednosti aktivnosti. Slični rezultat je postignut i s YfaU 3 – aldolazom.



Slika 4.7. Aktivnost enzima YfaU WT - aldolaze u kotlastom reaktoru ($c_{\text{piruvat}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{formaldehid}} = 102.07 \text{ mM}$ te $\gamma_{\text{enzim}} = 0.02 \text{ mg/mL}$, 50 mM fosfatni pufer pH 7, 25°C, $V = 0.25 \text{ mL}$)



Slika 4.8. Aktivnost enzima YfaU 3 - aldolaze u kotlastom reaktoru. Sastav reakcijske smjese: $c_{\text{piruvat}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{formaldehid}} = 102.07 \text{ te}$ $\gamma_{\text{enzim}} = 0.02 \text{ mg/mL}$, 50 mM fosfatni pufer pH 7, 25°C , $V = 0.25 \text{ mL}$)



Slika 4.9. Aktivnost enzima YfaU 5 - aldolaze u kotlastom reaktoru. Sastav reakcijske smjese: $c_{\text{piruvat}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{formaldehid}} = 102.07 \text{ te}$ $\gamma_{\text{enzim}} = 0.02 \text{ mg/mL}$, 50 mM fosfatni pufer pH 7, 25°C , $V = 0.25 \text{ mL}$)

Pomoću programskog paketa Scientist, procijenjene su vrijednosti konstanti deaktivacije za sva tri enzima pomoću metode nelinearne regresije te su rezultati, zajedno s izračunatim vremenima poluraspada, prikazani u tablici 4.

Tablica 4. Prikaz vrijednosti procijenjenih konstanti deaktivacije i izračunatih vrijednosti vremena poluraspada

Enzim	k_d / min^{-1}	$t_{1/2} / \text{min}$
YfaU WT	0.144 ± 0.013	4.81
YfaU 3	0.068 ± 0.006	10.20
YfaU 5	0.061 ± 0.007	11.32

Iz tablice 4. uočava se da enzim YfaU 5 - aldolaza ima najmanju konstantu deaktivacije i najveće vrijeme poluraspada, dok enzim YfaU WT ima najveću konstantu deaktivacije, ali najmanje vrijeme poluraspada. Na temelju prikazanih rezultata može se zaključiti da YfaU 5 - aldolaza ima najveću operacijsku stabilnost u aldolnoj reakciji formaldehida i natrijeva piruvata, a enzim YfaU WT - aldolaza ima najmanju operacijsku stabilnost, čime se dokazuje da je proteinskim inženjerstvom došlo do poboljšanja enzima.

5. Zaključak

U ovom radu provedena je aldolna adicija između formaldehida i piruvata. Reakcija je katalizirana s tri različita enzima: YfaU WT - aldolazom, YfaU 3 - aldolazom i YfaU 5 - aldolazom. Kao produkt nastaje natrijev 4-hidroksi-2-oksobutanoat.

Provedeni su eksperimenti u kojima se ispitivala operacijska stabilnost enzima u kotlastom reaktoru. Pomoću programskog paketa Scientist procijenjene su konstante deaktivacije triju enzima. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da enzim YfaU 5 - aldolaza ima najveću operacijsku stabilnost u reakcijskoj smjesi, odnosno najveću vrijednost vremena poluraspada te najmanju vrijednost konstante deaktivacije. Nasuprot tome, enzim YfaU WT - aldolaza ima najmanju operacijsku stabilnost, odnosno ima najmanju vrijednost vremena poluraspada te najveću vrijednost konstante deaktivacije. Time se može zaključiti da je došlo do poboljšanja stabilnosti enzima proteinskim inženjerstvom.

Tijekom provođenja reakcije između natrijeva piruvata i formaldehida katalizirane enzimima, koncentracije supstrata se smanjuju, a koncentracija produkta, odnosno aldola, se povećava.

6. Literatura

1. Gurung N., Ray S., Bose S., Rai V., A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. *Biomed Res Int.*, **2013** (2013), 1-18
2. Berg J.M., Tymoczko J.L., Gatto G.J., Stryer L., *Biochemistry* 8th edition, W.H. Freeman and Company, New York (2015), 215-244
3. Loughlin, W.A., Biotransformations in organic synthesis. *Bioresource Technology*, **74** (2000), 49-62
4. Torres S., Castro G.R., Non-Aqueous Biocatalysis in Homogeneous Solvent Systems. *Food Technology and Biotechnology*, **42** (2004), 271-277
5. Stollar E.J., Smith D.P., Uncovering protein structure. *Essays Biochem*, **64, 4** (2020), 649-680
6. Golin A.P., Choi D., Ghahary A., Hand sanitizers: A review of ingredients, mechanisms of action, modes of delivery, and efficacy against coronaviruses. *American journal of infection control*, **48, 9** (2020), 1062-1067
7. Porto de Souza Vandenberghe L., Karp S.G., Binder Pagnoncelli M.G., *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Catalysis and Technologies* 1st edition, Elsevier, Amsterdam (2020), 11-30
8. Robinson P.K., *Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays in biochemistry*, **59** (2015), 1-41
9. Drago G.A., Gibson T.D., *Enzyme Stability and Stabilisation: Applications and Case Studies.* u Hofman M., Thonart P., ur, *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, **4**, Springer, Dordrecht (2001), 361-376
10. Bommarius A.S., Drauz K.H., Klenk H., Wandrey C., Operational stability of enzymes: Acylase-catalyzed resolution of N-acetyl amino acids to enantiomerically pure L-amino acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **672** (2006), 126-136
11. Asunción Longo M., Combes D., Analysis of the thermal deactivation kinetics of α -chymotrypsin modified by chemoenzymatic glycosylation. *Progress in Biotechnology*, **15** (1998), 135-140
12. Dutta N., Saha M.K., Immobilization of a Mesophilic Lipase on Graphene Oxide: Stability, Activity, and Reusability Insights., *Academic Press*, **609** (2018), 247-272

13. Clapés P., Fessner W.D., Sprenger G.A., Samland A.K., Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases. *Current Opinion in Chemical Biology*, **14** (2010), 154-167
14. Windle C.L., Müller M., Nelson A., Berry A., Engineering aldolases as biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*, **19** (2014), 25-33
15. Desmons S., Fauré R., Bontemps S., Formaldehyde as a Promising C1 Source: The Instrumental Role of Biocatalysis for Stereocontrolled Reactions. *ACS Catalysis*, **9** (2020), 9575-9588
16. Rea D., Hovington R., Rakus J.F., Gerlt J.A., Fülöp V., Bugg T.D., Roper D.I., Crystal structure and functional assignment of YfaU, a metal ion dependent class II aldolase from *Escherichia coli* K12. *Biochemistry*, **47** (2008), 9955-9965
17. Gazdag M., Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis, u Görög S., ur, Identification and Determination of Impurities in Drugs **4** (2000), 210-239
18. Malviya R., Bansal V., Pal O.P., Sharma P.K., High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, **2** (2010), 22-26
19. Bird I. M., High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ (Clinical research ed.)*, **299** (1989), 783-787
20. Cardoso J.P., Emery A.N., A new model to describe enzyme inactivation. *Biotechnol Bioeng*, **20** (1978), 1471-1477
21. Doran P.M., *Bioprocess Engineering Principles* 2nd edition, Elsevier, Amsterdam (2013), 599-703
22. Sadana A., Enzyme deactivation. *Biotechnology Advances*, **6** (1988), 349-446
23. Lambeth D.O., Muhonen W.W., High-performance liquid chromatography-based assays of enzyme activities. *J Chromatogr B Biomed Appl.*, **3** (1994), 143-157
24. Česnik M., Sudar M., Roldan R., Hernandez K., Parella T., Clapés P., Charnock S., Vasić-Rački Đ., Findrik Blažević Z., Model-based optimization of the enzymatic aldol addition of propanal to formaldehyde: A first step towards enzymatic synthesis of 3-hydroxybutyric acid. *Chemical Engineering Research and Design*, **150** (2019), 140-152
25. Česnik M., Sudar M., Hernández K., Charnock S., Vasić-Rački Đ., Clapés P., Findrik Blažević Z., Cascade enzymatic synthesis of L-homoserine – mathematical modelling as a tool for process optimisation and design. *Reaction Chemistry and Engineering*, **5** (2020), 747-759

26. Wang W., Seah S.Y.K., The role of a conserved histidine residue in a pyruvate-specific Class II aldolase. *FEBS Letters*, **582** (2008), 3385-3388
27. Zheng G.W., Xu J.H., New opportunities for biocatalysis: driving the synthesis of chiral chemicals. *Curr Opin Biotechnol.* **22** (2011), 784-792
28. Griffiths J.S., Cheriyan M., Corbell J.B., Pocivavsek L., Fierke C.A., Toone E.J., A bacterial selection for the directed evolution of pyruvate aldolases. *Bioorg Med Chem*, 12(2004), 4067-4074
29. Woodley J.M., Protein engineering of enzymes for process applications. *Current Opinion in Chemical Biology*, **17** (2013), 310-316
30. Liu Q., Xun G., Feng Y., The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization. *Biotechnology Advances*, **37** (2019), 530-537
31. Bisswanger H., Enzyme assays. *Perspectives in Science*, **1** (2014), 41-55
32. Resch V., Schrittwieser J.H., Siirola E., Kroutil W., Novel carbon-carbon bond formations for biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol*, **22** (2011), 793-799

7. Popis simbola

k_d – konstanta deaktivacije enzima [min^{-1}]

$t_{1/2}$ – vrijeme poluraspada enzima [min]

V_{piruvat} – volumen piruvata [μL]

$V_{\text{formaldehid}}$ – volumen formaldehida [μL]

V_{pufer} – volumen pufera [μL]

V_{enzim} – volumen enzima [μL]

c_{piruvat} – molarna koncentracija piruvata [mM]

$c_{\text{formaldehid}}$ – molarna koncentracija formaldehida [mM]

c_{pufer} – molarna koncentracija pufera [mM]

γ_{enzim} – masena koncentracija enzima [mg mL^{-1}]

A – aktivnost enzima [mM min^{-1}]

$X_{\text{formaldehid}}$ – konverzija formaldehida [%]

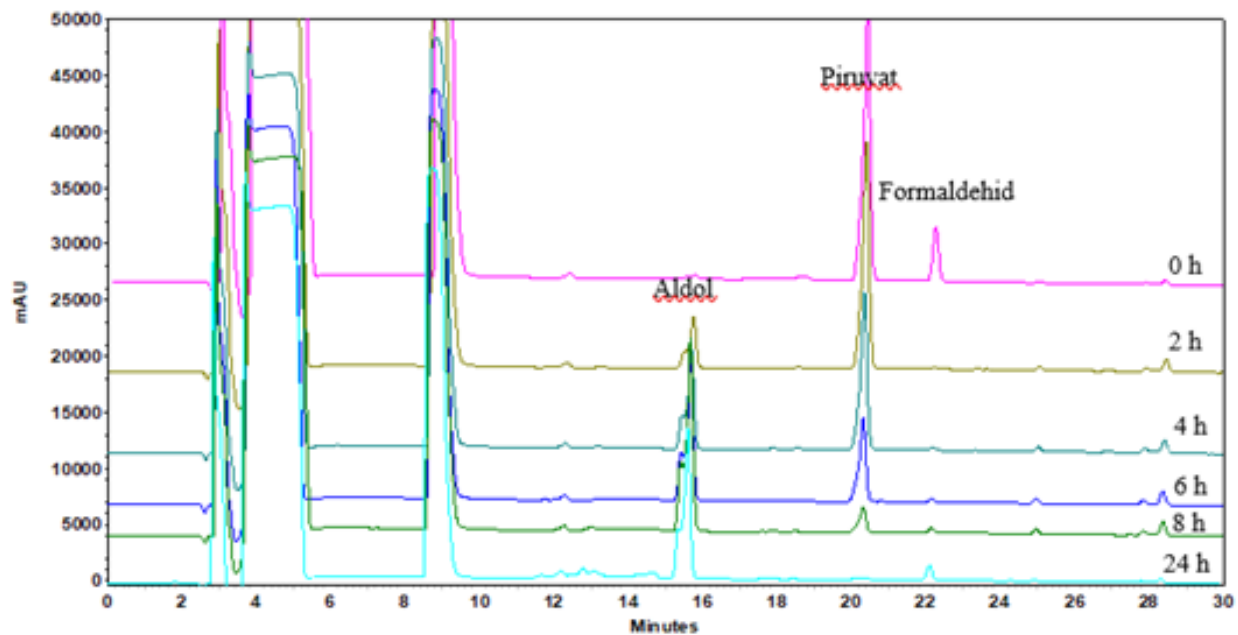
X_{piruvat} – konverzija piruvata [%]

I_{aldol} – iskorištenje [%]

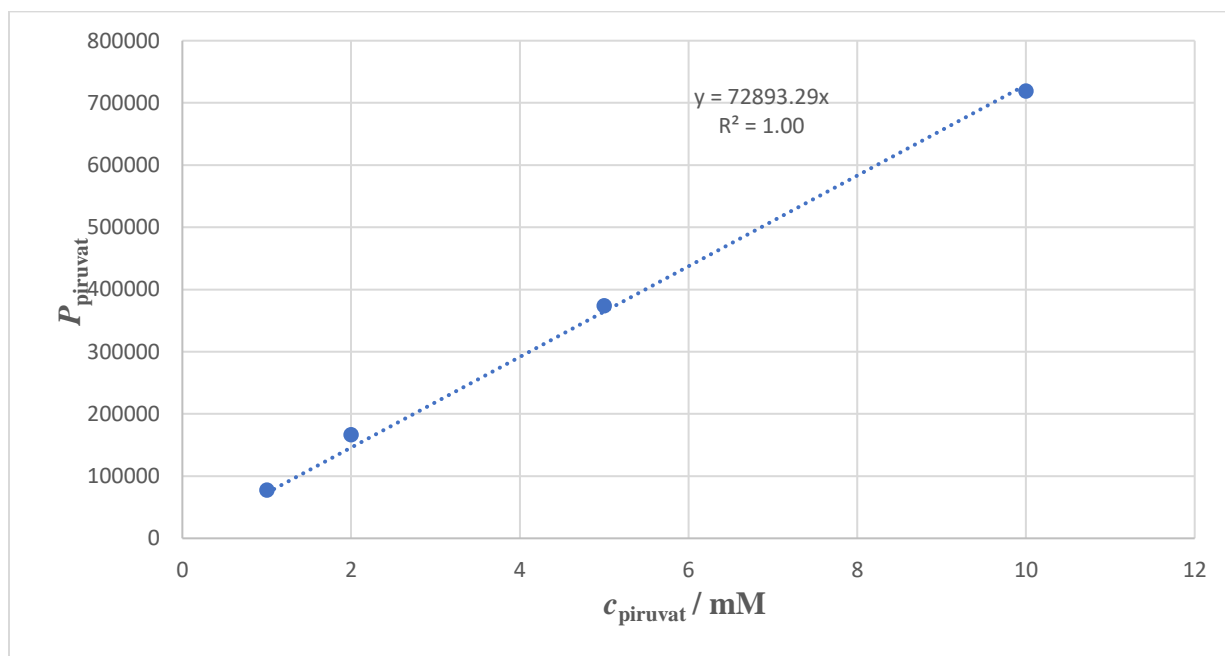
YfaU – 2-keto-3-deoksi-L-ramnonat aldolaza

HPLC – kromatografija visoke djelotvornosti

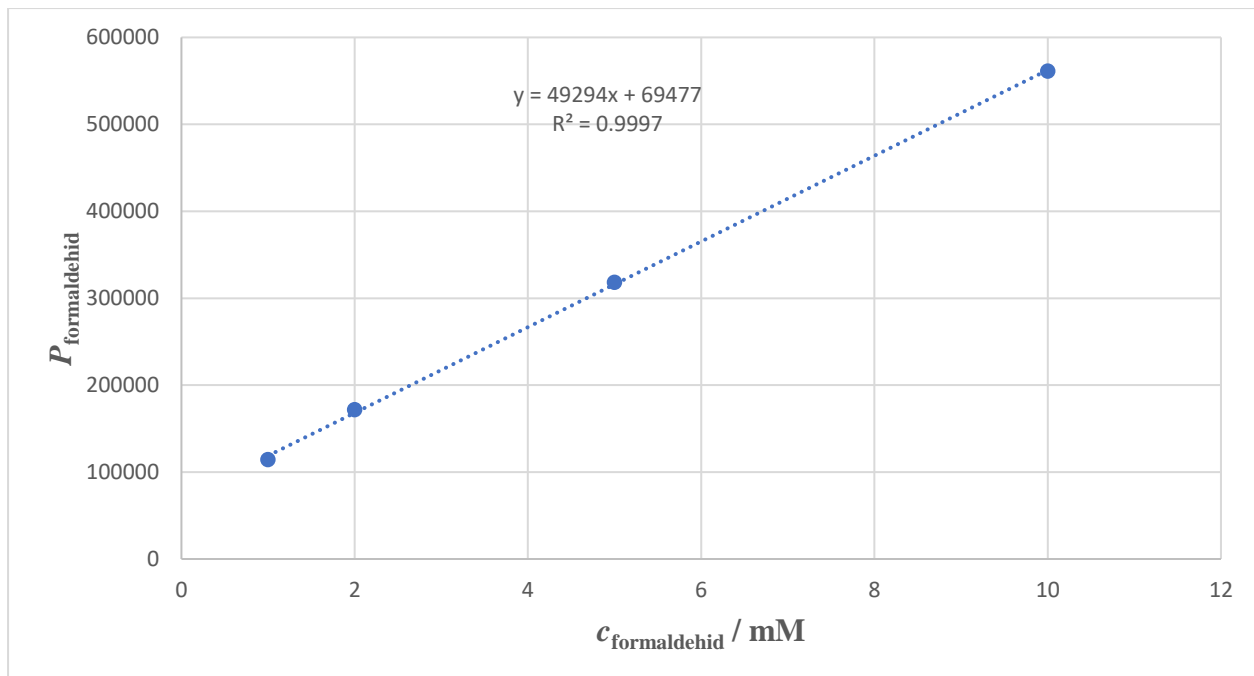
8. Prilozi



Prilog 1. Kromatogram analiziranih formaldehida, piruvata i aldola gradijentnom metodom na koloni Kinetex ® C18



Prilog 2. Baždarni pravac za piruvat na HPLC-u uz korištenje gradijentne metode na koloni Kinetex ® C18



Prilog 3. Baždarni pravac za formaldehid na HPLC-u uz korištenje gradijentne metode na koloni Kinetex ® C18

Životopis

Nikolina Jušić [REDACTED] Pohađala je V. gimnaziju (matematički smjer) u Zagrebu te maturirala 2017. Iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, studij Primijenjena kemija. Stručnu praksu odradila je u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo na odjelu za analizu općeuporabnih predmeta.