

Kinetička karakterizacija ketoreduktaze

Pakšec, Vanda

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

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:149:718130>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Vanda Pakšec

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Vanda Pakšec

KINETIČKA KARAKTERIZACIJA KETOREDUKTAZE

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, srpanj 2019.

Zahvaljujem se svojoj mentorici , izv. prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na pomoći, vremenu i savjetima prilikom izrade završnog rada.

SAŽETAK

KINETIČKA KARAKTERIZACIJA KETOREDUKTAZE

U ovom radu ispitivana je kinetika reakcije redukcije propanala uz biokatalizator ketoreduktazu (KRED), koji za svoju aktivnost zahtijeva prisustvo koenzima nikotin-amid-adenin-dinukleotid-fostata (NADPH). Kinetika je određena metodom početnih brzina reakcije, mjerenjem ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata (propanal, NADPH). Također ispita se i utjecaj produkta (propanola i NADP^+) na početnu brzinu reakcije. Kinetika reakcije je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktima, a parametri su procijenjeni nelinearnom regresijom. Ispitivanje aktivnosti enzima u povratnoj reakciji pokazalo je da KRED ne katalizira reakciju oksidacije propanola. Provedena su mjerenja utjecaja propanala na stabilnost biokatalizatora, variranjem koncentracije propanala u reaktoru. Na temelju izmjerenih ovisnosti postavljen je matematički model enzimske reakcije, te su napravljene simulacije procesa.

Ključne riječi: enzimska kinetika, simulacija procesa, matematički model, ketoreduktaze

ABSTRACT

KINETIC CHARACTERIZATION OF THE KETOREDUCTASE

In this paper, the kinetics of ketoreductase (KRED) was investigated in the reaction of propionaldehyde reduction. For its activity, this enzyme requires the use of coenzyme nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH). The kinetics was determined by the initial reaction rate method, by measuring dependence on reaction rate on substrate concentration (propionaldehyde and NADPH). Also, the impact of product (propanol and NADP^+) on initial reaction rate was examined. Reaction kinetics was described by double substrate Michaelis–Menten kinetics with include competitive product inhibition. Kinetic parameters of Michaelis-Menten equation were estimated by nonlinear regression. The enzyme did not show any measurable activity in reverse reaction, oxidation of propanol. Stability of enzyme was measured in the presence of different concentrations of propionaldehyde. Based on the experimental data mathematical model was set and the process simulations have been done.

Keywords: enzyme kinetics, process simulation, mathematical modelling, ketoreductase

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Biokatalizatori	2
2.1.1. Podjela biokatalizatora	2
2.1.2. Prednosti i nedostaci biokatalizatora	3
2.1.3. Stabilnost enzima	3
2.2. Oksidoreduktaze	4
2.3. Koenzimi	4
2.3.1. Regeneracija koenzima	5
2.4. Modeliranje biotransformacija	6
2.4.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija	6
2.4.1.1. Inhibicija enzima	8
2.4.2. Reaktorski model	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Aparatura	11
3.1.1. Analitička vaga	11
3.1.2. Homogenizator	11
3.1.3. Spektrofotometar	11
3.1.4. pH metar	12
3.1.5. Kotlasti reaktor	13
3.2. Analitički dio	13
3.2.1. Kinetička karakterizacija ketoreduktaze	13
3.2.1.1. Mjerenje kinetike ketoreduktaze u reakciji redukcije propanala	14
3.2.1.2. Mjerenje kinetike ketoreduktaze u reakciji oksidacije propanola	15
3.2.1.3. Stabilnost ketoreduktaze u otopini propanala	15
3.3. Obrada podataka	16
4. MATEMATIČKI MODEL PROCESA	17
4.1. Kinetički model	17
4.2. Reaktorski model	17
5. REZULTATI I RASPRAVA	18
5.1. Kinetička karakterizacija u reakciji redukcije propanala	18
5.2. Utjecaj propanala na stabilnost ketoreduktaze	21
5.3. Simulacija reakcije redukcije propanala	24

6.	ZAKLJUČAK	27
7.	LITERATURA	28
8.	PRILOZI	29
9.	SIMBOLI I SKRAĆENICE	30

1. UVOD

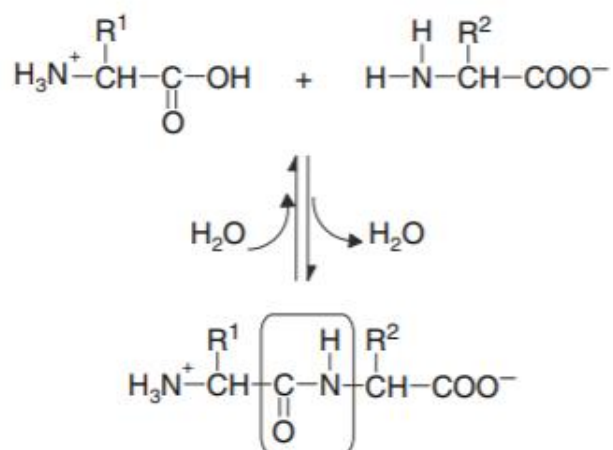
Primjena biokatalizatora dobiva sve više na važnosti u sve većem broju industrijskih područja. Tako se njihova primjena može pronaći u kemijskoj, farmaceutskoj, prehrambenoj i drugim industrijama. Bioprocеси su posebno cijenjeni zbog toga što nemaju negativni utjecaj na okoliš jer za njihovo provođenje nisu potrebna štetna otapala. Također biokatalizatore karakterizira visoka selektivnost, aktivnost i rad u blagim uvjetima procesa.

U ovom radu provodila su se mjerenja na reakciji redukcije enzimom ketoreduktazom. Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije u kojima dolazi do prijenosa elektrona, kisikovih ili vodikovih atoma. (*Illanes, 2008*) Za vođenje procesa ovi enzimi zahtijevaju prisustvo koenzima. Oni iz reakcije izlaze promijenjeni, odnosno u svom oksidiranom ili reduciranom obliku. Zbog visokih cijena takvih molekula, radi se na načinima kojima bi se oni mogli regenerirati te ponovno upotrijebiti u daljnjim reakcijama. U ovom radu istražuje se reakcija redukcije propionaldehida uz ketoreduktazu koja bi se potencijalno mogla koristiti za tu svrhu. Za navedenu reakciju ispitati će se kinetika i stabilnost enzima, te postaviti matematički model procesa. Naime za razvoj kinetičkih modela enzimatski kataliziranih reakcija omogućava proračun vremena reakcije i ukupno iskorištenje, kao i predviđanje brzina pri različitim koncentracijama supstrata. (*Findrik 2017.*)

2. OPĆI DIO

2.1. Biokatalizatori

Biokatalizatori ili enzimi su organske makromolekule- globularni proteini koji djeluju kao katalizatori u biokemijskim reakcijama. (*Findrik, 2017*) Nastaju kondenzacijom aminokiselina pri čemu nastaje peptidna veza koja se formira između ugljikovog atoma karboksilne skupine jedne aminokiseline i dušikovog atoma α -amino skupine druge (Slika 2.1.). Svaki enzim katalizira točno određenu reakciju, odnosno poredak aminokiselina u kondenziranom lancu ovisi o strukturi i funkciji biokatalizatora.



Slika 2.1. Nastajanje peptidne veze između dviju α -aminokiselina

2.1.1. Podjela biokatalizatora

Obzirom na vrstu reakcije koju kataliziraju enzimi su podijeljeni u 6 razreda.

- 1) Oksidoreduktaze - enzimi koji kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije, za svoju aktivnost uglavnom zahtijevaju prisustvo koenzima
- 2) Transferaze – enzimi koji kataliziraju reakcije u kojima dolazi do prijenosa funkcionalnih grupa, od donora do akceptora
- 3) Hidrolaze – kataliziraju hidrolitičke reakcije

- 4) Liaze - kataliziraju nehidrolitičko cijepanje kemijske veze
- 5) Izomeraze – kataliziraju reakcije pretvorbe supstrata u njegov izomer
- 6) Ligaze - kataliziraju reakcije tvoreći kovalentnu vezu između dviju molekula

2.1.2. Prednosti i nedostaci biokatalizatora

Enzimi su iz više razloga poželjni kao katalizatori u kemijskim reakcijama. Pogodni su za procese u kojima su nužni blagi reakcijski uvjeti (zbog nestabilnosti supstrata ili produkta, te mogućih neželjenih sporednih reakcija), biorazgradivi su što ih čini ekološki prihvatljivijima od kemijskih katalizatora, puno su aktivniji od klasičnih katalizatora ubrzavaju reakciju i do 10^{20} puta te mogu imati više aktivnih centara. Važno svojstvo je i njihova enantioselektivnost, zbog kojeg su široko primijenjeni u farmaceutskoj industriji.

No, treba i navesti njihove nedostatke. Visoke cijene izolacije i pročišćavanja, porastom temperature njihova stabilnost/aktivnost pada, potreba za koenzimom a često dolazi i do inhibicije supstratima ili produktima reakcije. Također, nestabilni su izvan prirodnog okruženja. (*Findrik 2017*)

Unatoč navedenih nedostacima, biokatalizatori su široko korišteni u kemijskoj i farmaceutskoj industriji zbog istaknutih karakteristika koji mnogi procesi zahtijevaju.

2.1.3. Stabilnost enzima

Za razumijevanje stabilnosti enzima potrebno je poznavati veze koje se nalaze unutar enzima. Unutar enzima postoje pet tipova veza:

1. vodikove veze između polarnih aminokiselina
2. vodikove veze između peptidnih veza,
3. hidrofobne interakcije između nepolarnih aminokiselina
4. ionske veze između suprotno nabijenih pokrajnjih lanaca
5. kovalentne veze između molekula cisteina-disulfidni mostovi

Ove veze svrstavaju se u slabe veze te je onda jasno zašto su enzimi osjetljivi na promjenu pH, ionske jakosti, temperaturu itd. Nestabilnost enzima uzrokuju fizički (toplina, hladnoća, zračenje...), kemijski (kislina, lužine, soli...) i biološki (proteaze) denaturanti.

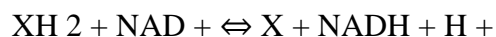
Stabilnost enzima se definira kao ostatak enzimске aktivnosti nakon određenog vremena. Postoje dvije vrste stabilnosti, a to su operacijska stabilnost enzima i stabilnost enzima u uvjetima skladištenja. Operacijska stabilnost se definira kao stabilnost enzima tijekom kontinuirane uporabe koja se često izražava kao vrijeme poluraspada enzima ($t_{1/2}$). To je vrijeme potrebno da se njegova početna aktivnost snizi na polovinu početne vrijednosti. Za njeno definiranje također postoji procjenjivanje vrijednosti konstante inaktivacije, k_d .

Stabilnost u uvjetima skladištenja ovisi o fizikalnom stanju biokatalizatora (liofilizat, suspenzija, otopina), o sredini u kojoj se čuva, o dodatku supstrata, efektora, inhibitora ili stabilizatora, te o temperaturi na kojoj se čuva. (Findrik, 2017)

2.2. Oksidoreduktaze

Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije u bioprocima. Dijelimo ih na dehidrogenaze, oksigenaze i oksidaze. (Illanes, 2008) Katalitičko djelovanje ovih enzima ovisi o niskomolekularnoj komponenti koja je nazvana koenzim.

Dehidrogenaze kataliziraju prijelaz elektrona sa supstrata na nikotinamid-adenin dinukleotidni kofaktor (NAD^+) odnosno elektron akceptor. Oksidaze kataliziraju prijelaz vodika sa supstrata na molekularni kisik.



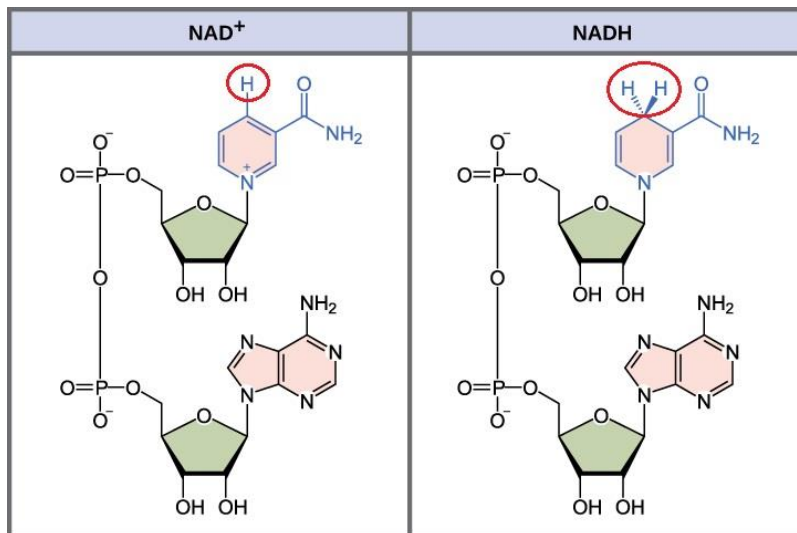
Slika 2.2. Shematski prikaz principa odvijanja reakcije enzimom oksidoreduktazom

Slika 2.2. prikazuje princip odvijanja reakcija. U ispitivanoj reakciji redukcije propanala, NADPH je reducens (elektron donor). Supstrat se tek nakon djelovanje koenzima može vezati na aktivno mjesto na enzimu što rezultira produktom. Enzim zatim izlazi iz reakcije nepromijenjen.

2.3 Koenzimi

Neki enzimi za svoje djelovanje zahtijevaju prisustvo kofaktora. Kofaktore dijelimo u dvije skupine, metali i koenzimi. (P. Karlson) Koenzimi su niskomolekularne organske molekule koje sudjeluju u kemijskoj reakciji te iz nje izlaze promijenjene. Iz tog razloga koenzime nazivamo kosupstratima.

Koenzime se može podijeliti prema reakcijama u kojima sudjeluju pri katalizi. Na prvom mjestu nalaze se koenzimi prenosioci vodika od kojih su glavni predstavnici nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) i nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADP^+) (slika 2.3.). Druga skupina je vrlo velika i obuhvaća koenzime koji sudjeluju pri prijenosu grupa (npr. vitamini B6, B12, biotin).



Slika 2.3. Prikaz strukture NAD^+ i NADH

2.3.1. Regeneracija koenzima

Gotovo jedna petina svih registriranih enzima za svoju aktivnost zahtjeva koenzime. Budući da koenzimi, za razliku od enzima, podliježu kemijskoj reakciji sa supstratom tokom katalitičke reakcije gdje prijeđu u svoj reducirani/oksidirani oblik, oni su preskupi da se koriste u stehiometrijskim količinama bez odgovarajuće metode regeneracije (*Wu et al 2013*).

Metode regeneracije koenzima podjeljene su u 4 kategorije ovisno o mehanizmu regeneracije a to su elektrokemijska, kemijska, fotokemijska i enzimaska regeneracija. Metoda koja se odabere za regeneraciju na industrijskoj razini mora pokazivati karakteristike poput jednostavnosti, ekonomičnosti i visoke selektivnosti. Također, mora imati i visoki TTN (total turnover number) koji se definira kao molovi produkta formiranih po molu kofaktora korištenih u reakciji (*Hummel 1999*). Enzimaska regeneracija je najčešće primjenjivana

metoda na industrijskim razinama. Prednosti su visoka selektivnost, visoki TNN, te je ekološki prihvatljiva.

2.4. Modeliranje biotransformacija

Sa razvojem biokatalitičkih procesa pojavila se potreba za većim poznavanjem odnosno razvojem biokatalitičkih procesa. Oni su u mnogočemu slični kemijskim procesima, no pri biotransformacijama treba uzimati u obzir enzimatsku kinetiku i stabilnost enzima. (*Bommarius, 2004*) Razvoj modela za biokatalitički proces sastoji se od postavljanja modela za kinetiku enzima, te model reaktora, pri čemu je masa tvari konstantna tijekom cijele reakcije (kotlasti reaktor, reaktori uz idealno miješanje, itd.).

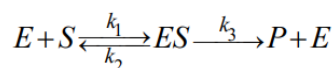
Pri postavljanju modela važno je voditi računa o svim važnim parametrima (svojstava biokatalizatora o pH, temperaturi, te koncentraciji supstrata, utjecaj svih komponenti na brzinu reakcije) procesa te njihovom utjecaju na proces. Na taj način samo postavljanje modela nam pruža bolje razumijevanje biotransformacija budući da pri njegovom razvijanju sve relevantne teorije moraju biti obuhvaćene.

2.4.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija

Brzinu enzimske reakcije izražavamo kinetičkim modelom. Kinetički model opisuje vezu između brzine reakcije i ostalih parametara u procesu poput: temperature, koncentracije i tlaka (*Findrik 2017*) (jedn. 2.1.). Bez poznavanja matematičkog modela nije moguće provesti simulaciju ili dizajnirati reaktor.

$$r_A = f(c_A, c_B, \dots, c_C, T, p) \quad (2.1.)$$

Kod biokatalitičkih reakcija govori se o Michaelis-Menteničinom tipu kinetike. Oni su pretpostavili da enzimske reakcije slijede mehanizam reakcije prikazan na slici 2.4. Supstrat reagira sa enzimom u ravnotežnoj reakciji te se stvara međuprodukt, ES, koji se povratnom reakcijom ponovo raspada na početni supstrat i nevezani enzim. Međukompleks ES se nepovratno raspada u konačni produkt i nepromijenjeni biokatalizator.

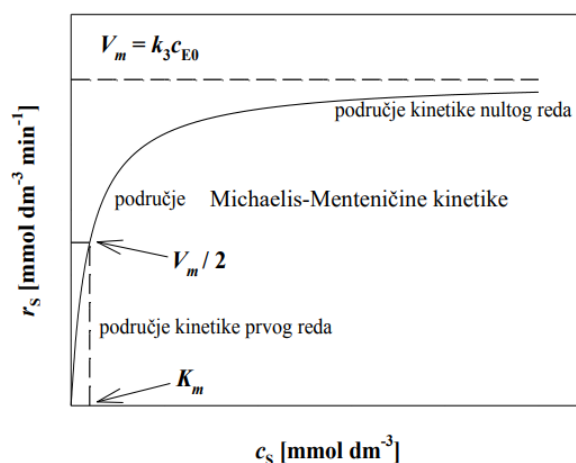


Slika 2.4 Mehanizam enzimske reakcije

Na slici 2.4 konstanta k_1 predstavlja konstantnu brzinu napredujuće reakcije nastajanja međukompleksa, k_2 konstantnu brzinu povratne reakcije raspada međukompleksa, k_3 konstanta brzinu nastajanja produkta. Osnovna jednačba Michaelis-Menteničine kinetike za jednosupstratnu reakciju dana je izrazom 2.2.

$$r_s = \frac{V_m * c_s}{K_m + c_s} \quad (2.2.)$$

U navedenom izrazu, r_s predstavlja brzinu potrošnje supstrata [$\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$], V_m je maksimalna reakcijska brzina koja je ostvarena kada se molekule enzima nalaze u obliku kompleksa ES [$\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$], c_s je koncentracija supstrata [mmol dm^{-3}], a K_m je Michaelis - Menteničina konstanta koja govori o afinitetu enzima prema supstratu te je jednaka koncentraciji supstrata pri kojoj reakcijska brzina postiže polovicu svoje vrijednosti [mmol dm^{-3}]. Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis-Menteničinu kinetiku može se prikazati hiperbolom. (Slika 2.5.)



Slika 2.5. Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis-Menteničinu kinetiku

Krivulju možemo podjeliti na 3 područja. Pri niskim koncentracijama supstrata nalazi se područje kinetike prvog reda, zatim slijedi područje Michaelis-Menteničine kinetike dok kod

visokih koncentracija supstrata brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata (područje kinetike nultog reda) . V_m predstavlja maksimalnu brzinu reakcije te je izražena kao umnožak koncentracije enzima i njegove konstante brzine reakcije (jedn. 2.3.). Michaelisova konstanta (jedn. 2.4.) izražena je kao omjer kinetičkih konstanti a ako je velika to znači da enzim nema dobar afinitet prema supstratu (*Findrik, 2017*). Također, određuje se i kao koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka jednoj polovini maksimalne brzine, što se zorno vidi na slici 2.5.

$$V_m = k_3 * c_{E1} \quad (2.3.)$$

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.4.)$$

Većina enzimatskih reakcija je dvosupstratna, gdje je drugi supstrat najčešće koenzim, stoga kinetički model postaje kompleksniji. Michaelis-Menteničin izraz za dvosupstratnu reakciju dan je izrazom 2.6., a mehanizam reakcije opisan je izrazom 2.5.



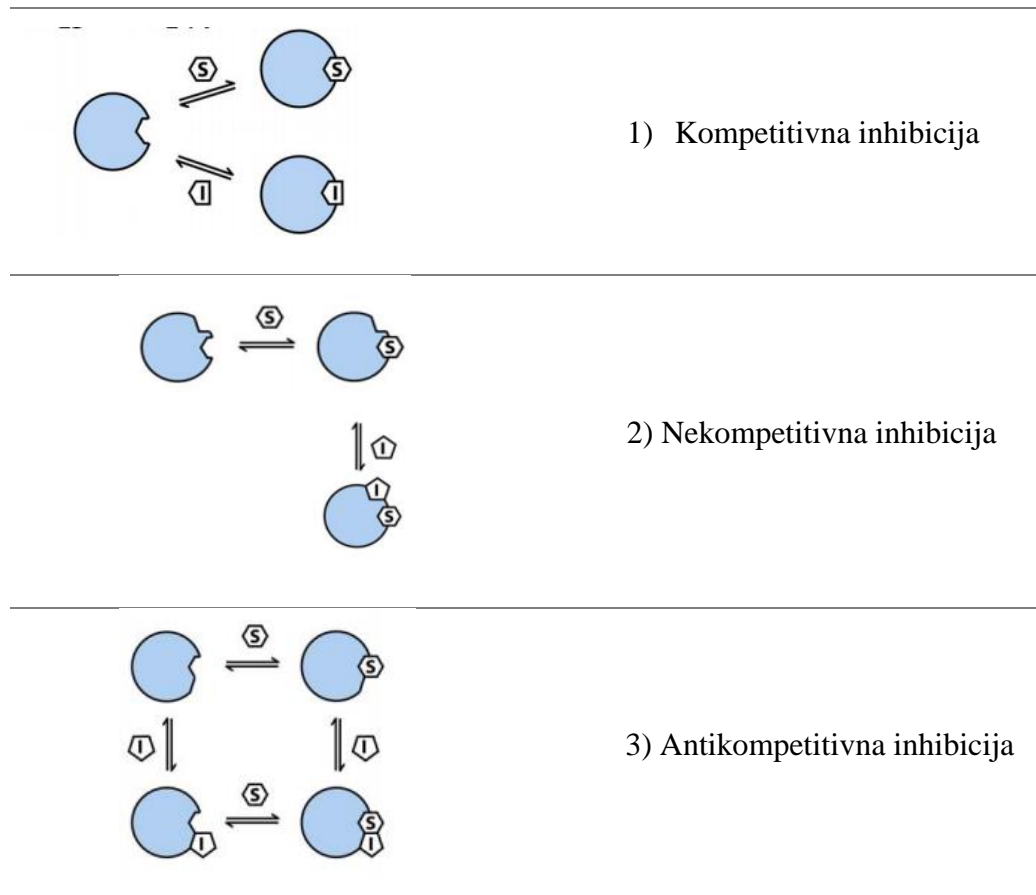
$$r = \frac{V_m * c_{S1} * c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) * (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (2.6.)$$

2.4.1.1. Inhibicija enzima

Do smanjenja brzine enzimatski katalizirane reakcije može doći ukoliko se na aktivno mjestu na enzimu žele vezati i neke druge molekule, supstrati ili produkti. Njih nazivamo inhibitorima te oni u potpunosti ili djelomično onemogućuju željenu reakciju. Inhibicija enzima može biti povratna (reverzibilna) ili nepovratna (ireverzibilna). Za reverzibilne inhibitore karakteristična je brza disocijacija inhibitor-enzim kompleksa ,dok je za ireverzibilne inhibitore disocijacija enzim-inhibitor kompleksa vrlo spora. (*Karlson 1983*)

Reverzibilni inhibitori inhibiraju enzime na tri osnovna načina: kompetitivnom inhibicijom, antikompetitivnom inhibicijom i nekompetitivnom inhibicijom (Tablica 2.1).

Tablica 2.1. Prikaz triju inhibicija



Kompetitivni inhibitor veže se na aktivno mjesto enzima dok se nekompetitivni inhibitor ne veže za slobodni enzim već se veže samo kad postoji ES kompleks. Antikompetitivni inhibitor se može vezati i za enzim kao i za ES kompleks.

Ukoliko u enzimatskoj reakciji dolazi do nekih od navedenih inhibicija, njih je potrebno uključiti u Michaelis-Menteničin izraz (Tablica 2.2.).

Tablica 2.2. Kinetika enzimске inhibicije

$r_A = \frac{V_m * c_A}{K_m + c_A + \frac{c_A^2}{K_i}}$	Kompetitivna inhibicija
$r_A = \frac{V_m * c_A}{K_m + c_A * (1 + \frac{c_P}{K_{i,P}})}$	Antikompetitivna inhibicija

$$r_A = \frac{V_m * c_A}{K_m * \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right) + c_A} \quad \text{Nekompetitivna inhibicija}$$

2.4.2. Reaktorski model

Bioprocesi odvijaju se u bioreaktorima. Prema izvedbi bioreaktora, razlikujemo kotlasti (*batch*), protočno-kotlasti te cijevni reaktor. Pri odabiru reaktora potrebno je poznavati parametre reakcijskog sustava poput temperature i pH pri kojima se reakcija treba provesti. Isto tako potrebno je definirati koncentracije supstrata i enzima kako bi se postigla koncentracija produkta koja će biti zadovoljavajuća za industrijska mjerila (*Findrik 2017*). Također, važno je uzeti u obzir u kojem obliku je biokatalizator (homogen ili imobiliziran). Zbog pojednostavljenja modela, za reaktore često pretpostavljamo da su idealni.

Kotlasti reaktor je zatvoreni sustav, za vrijeme reakcije s okolinom se ne razmjenjuje reakcijska masa. Ostvaruje se idealno miješanje odnosno imamo homogenost mase unutar reaktora. Često se koristi u industriji, uglavnom za reakcije u kapljevitoj fazi. (*Kosar, 2017*)

Opća bilanca za množinu tvari, uz sve navedene pretpostavke za idealni reaktor je dana izrazom 2.7..

$$r_A * V = - \frac{dn_A}{dt} \quad (2.7)$$

Uz pretpostavku konstantnog volumena integriranjem jednadžbe 2.7. dobije se izraz 2.8:

$$r_A = - \frac{dc_A}{dt} \quad (2.8)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Analitička vaga

Za potrebe eksperimentalnih mjerenja, sve odvage vagane su na analitičkoj vagi *Shimadzu* (slika 3.1).



Slika 3.1 Analitička vaga *Shimadzu*

3.1.2. Homogenizator

Uzorci su homogenizirani na homogenizatoru *MS2 Minishaker IKA* (slika 3.2.).



Slika 3.2 Homogenizator *MS2 Minishaker IKA*

3.1.3. Spektrofotometar

Mjerni uređaj koji se zasniva na tome da određene tvari apsorbiraju elektromagnetska zračenja na određenoj valnoj duljini, stoga je intenzitet izlazne svjetlosti manji od intenziteta ulazne svjetlosti. Apsorpcija se matematički opisuje Lambert-Beerovim zakonom (jedin. 3.1.).

(3.1.)

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon * c * b$$

Intenzitet ulazne svjetlosti I_0 smanjuje se prolaskom kroz otopinu određene koncentracije tvari c koja apsorbira elektromagnetsko zračenje. Apsorpcija zračenja ovisi o koncentraciji otopine, c , duljini puta prolaska svjetlosti, b i molarnom apsorpcijskom koeficijentu, ε , koji je specifičan za svaku tvar i mijenja se s valnom duljinom.

Za potrebe eksperimentalnog mjerenja korišten je UV-VIS spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* (slika 3.3).



Slika 3.3 UV-VIS spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

3.1.4. pH metar

Za pripremu otopine pufera korišten je pH metar *Handylab Ph11* (slika 3.4).



Slika 3.4 pH metar *Handylab Ph11*

3.1.5. Kotlasti reaktor

Reakcija se provodila u kotlastom reaktoru (kiveti) volumena $V=1,5\text{ cm}^3$, dok je radni volumen bio $V = 1\text{cm}^3$. Prilikom određivanja stabilnosti ketoreduktaze, u uzorcima je bilo ostvareno konstantno miješanje pomoću tresilice (slika 3.5).

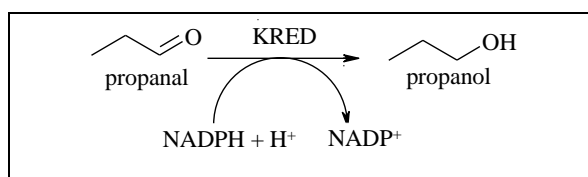


Slika 3.5 Tresilica

3.2. Analitički dio

3.2.1. Kinetička karakterizacija ketoreduktaze

U ovom radu kinetika enzima ketoreduktaze određena je u naprednoj reakciji redukcije propanala. Supstrati u reakciji su propanal i koenzim NADPH, dok su produkti propanol i NADP^+ (slika 3.6).



Slika 3.6 Reakcija redukcije propanala

Kinetika enzima u reakciji redukcije propanala ispitana je spektrofotometrijski mjerenjem ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, propanala i NADPH.

Sva mjerenja provedena su pri sobnoj temperaturi u fosfatnom puferu koncentracije 0,1 M i pH vrijednosti 8. Ukupan volumen komponenti u kiveti je iznosio 1 mL. Sva mjerenja provedena su na spektrofotometru pri valnoj duljini $\lambda = 340\text{nm}$. Mjerila se promjena

apsorbancije u vremenu $\Delta ABS/\Delta t$, koja ujedno predstavlja nagib pravca. Preko izraza (jedn. 3.2 i 3.3) izračunata je volumna aktivnost, A_V [$U\text{ cm}^{-3}$] te specifična aktivnost enzima, A_S [$U\text{ mg}^{-1}$].

$$A_V = \frac{V_r}{\epsilon_{340} * d * V_E} * \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad (3.2)$$

$$A_S = \frac{A_V}{C_{KRED}} \quad (3.3)$$

U navedenim izrazima V_r predstavlja ukupni volumen u kvarcnoj kiveti [mL], ϵ_{340} ekstinkcijski koeficijent pri $\lambda=340\text{ nm}$ [$\epsilon(\text{NADPH})_{340} = 6,22\text{ cm}^2/\mu\text{mol}$], d je promjer kvarcne kivete [cm], V_E je volumen dodanog enzima [mL], γ_E je koncentracija dodanog enzima [mg/mL], a $\Delta ABS/\Delta t$ je promjena apsorbancije u vremenu [min^{-1}].

3.2.1.1 Mjerenje kinetike ketoreduktaze u reakciji redukcije propanala

Za određivanje kinetike reakcije provelo se niz ispitivanja gdje se ispitivao utjecaj supstrata na reakciju. Utjecaj propanala ispitivao se na način da su se koncentracije NADPH i enzima držale konstantnima dok se koncentracija propanala mijenjala u svakom ispitivanom uzorku. Također, utjecaj koncentracije NADPH istraživao se na isti način, uz držanje koncentracije propanala i enzima konstantnima (tablica 3.1).

Inhibicija produktima također je bila ispitivana. Pri konstantnim koncentracijama supstrata mijenjala se koncentracija propanola, a u drugoj seriji mjerenja variralo se koncentracijom NADP^+ (tablica 3.1).

Tablica 3.1. Koncentracije supstrata i produkata prilikom ispitivanja kinetike enzima ketoreduktaze u reakcije redukcije propanala

Reakcija redukcije	C_{NADPH} [mM]	$C_{propanal}$ [mM]	C_{NADP^+} [mM]	$C_{propanol}$ [mM]	γ_{ENZIM} [mg/mL]
Variranje NADPH	0,0233-0,2328	683,5	-	-	1,0
Variranje propanala	0,1	13,7-2734,2	-	-	1,0
Variranje propanola	0,035	683,5	-	0-669	1,0
Variranje $NADP^+$	0,035	683,5	0-19,71	-	1,0

3.2.1.2. Mjerenje kinetike ketoreduktaze u reakciji oksidacije propanola

Ispitana je i kinetika povratne reakcije oksidacije propanola. Mjerenja su izvedena spektrofotometrijskom metodom pri valnoj duljini $\lambda = 340\text{nm}$ metodom početnih brzina, uz iste uvjete pH i pri sobnoj temperaturi. Koncentracija $NADP^+$ i enzima držane su konstantnima. Nije zabilježena nikakva aktivnost enzima stoga nije bilo daljnjih mjerenja.

3.2.1.3. Stabilnost ketoreduktaze u otopini propanala

Ovo mjerenja su napravljena kako bi se utvrdio utjecaj propanala na stabilnost ketoreduktaze. Mjerenja su se provodila u kotlastom reaktoru volumena $V=0,5\text{ cm}^3$ koji se miješao na tresilici. Koncentracija enzima je iznosila $\gamma_{enzim} = 20\text{ mg/mL}$, dok su koncentracije propanala u svakom pojedinom reaktoru bile u rasponu od 0-503 mM.

Mjerenja su se provodila tijekom 3 h, tokom kojih se uzimao uzorak od $V=0,03\text{ cm}^3$ za određivanje aktivnosti u određenim vremenskim razmacima. Uzorak je dodan u priređenu otopinu u kiveti (Tablica 3.2) te je istovremeno započelo mjerenje na spektrofotometru.

Tablica 3.2 Sastav otopine za provođenje mjerenja

Komponenta	Volumen, [cm ³]
pufer	0,908
NADPH	0,012
propanal	0,050

Za svaki reaktor određene su konstante deaktivacije prvog reda prema jednadžbi 3.4, odnosno drugog drugog reda prema jednadžbi 3.5.

$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A \quad (3.4)$$

$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A^2 \quad (3.5)$$

U navedenim izrazima k_d je konstanta deaktivacije enzima [min^{-1}], a A relativna aktivnost enzima u reaktoru.

3.3 Obrada podataka

Rezultati eksperimentalnih mjerenja obrađeni su u računalnom paketu *Scientist*. Kinetički parametri (maksimalna brzina reakcije, Michaelis-Menteničina konstanta, konstanta inhibicije i konstanta deaktivacije) procijenjeni su nelinearnom regresijom koristeći metodu najmanjih kvadrata i simpleks metodu.

Na temelju napisanog matematičkog modela i eksperimentalnih podataka provedene su simulacije. Programski paket za rješavanje diferencijalnih jednadžbi koristi 4 numeričke metode: Eulerova metoda, Runge-Kutta IV, Bulirsch-Stoer metoda.

4. MATEMATIČKI MODEL PROCESA

Matematički model biokatalitičke reakcije redukcije propanala čine kinetički i reaktorski model. Model je postavljen prema shemi procesa (slika 3.6) te uz pretpostavku idealnog reaktora, odnosno konstantnog volumena, idealnog miješanja i konstantne temperatura, te na temelju eksperimentalnih podataka.

4.1. Kinetički model

Kinetika reakcije redukcije propanala ketoreduktazom opisana je dvosupstratnom Michaelis-Mentiničinom jednažbom, s inhibicijom produktima, NADP⁺ i propanolom (jedm. 4.1)

$$r_1 = \frac{V_m * c_{propanal} * c_{NADPH} * \gamma_{ENZIM}}{\left(K_m^{propanal} * \left(1 + \frac{c_{Propanol}}{K_{i,Propanol}}\right) + c_{propanal} * \left(K_m^{NADPH} * \left(1 + \frac{c_{NADP+}}{K_{i,NADP+}}\right) + c_{NADPH}\right)} \quad (4.1)$$

4.2. Reaktorski model

Reakcije su vođene u kotlastom reaktoru gdje se pretpostavljaju idealni uvjeti. Model se sastoji od bilanca jednažbi koje izražavaju promjenu koncentracije supstrata i produkata u vremenu (jedm. 4.2-4.5).

$$-r_1 = \frac{dc_{propanal}}{dt} \quad (4.2)$$

$$r_1 = \frac{dc_{propanol}}{dt} \quad (4.3)$$

$$-r_1 = \frac{dc_{NADPH}}{dt} \quad (4.4)$$

$$r_1 = \frac{dc_{NADP+}}{dt} \quad (4.5)$$

Deaktivacija enzima opisana je modelom drugog reda (jedm.4.6).

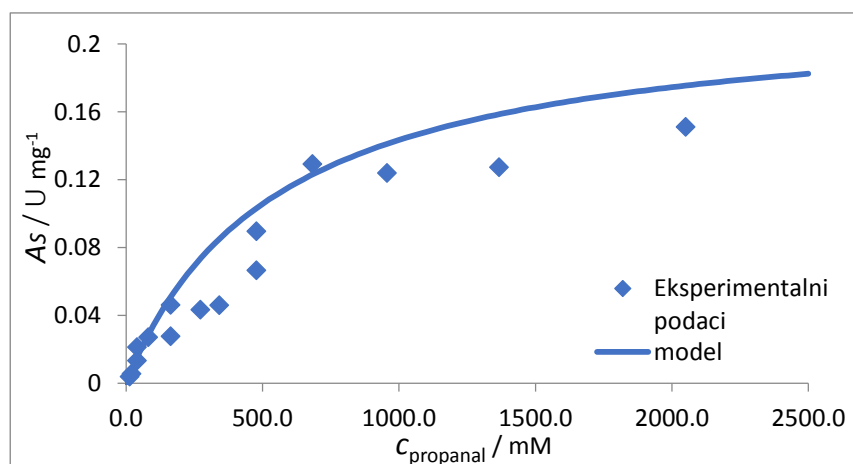
$$\frac{dA}{dt} = -k_d * A^2 \quad (4.6)$$

5. REZULTATI I RASPRAVA

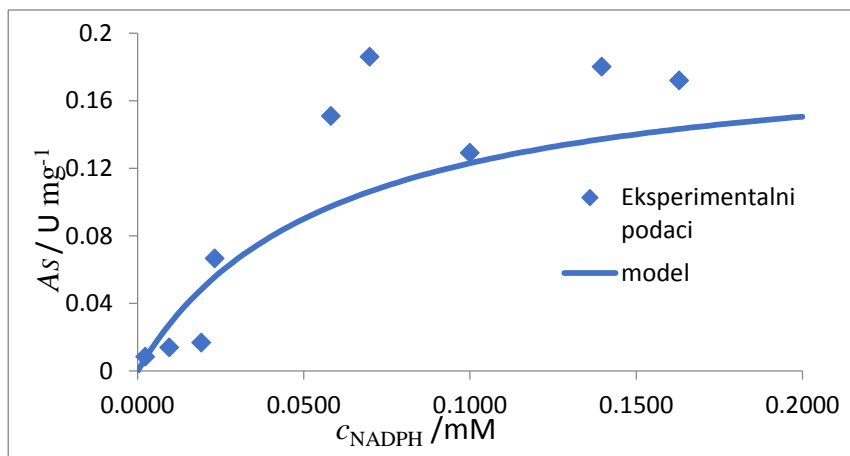
Cilj rada je bio ispitati kinetiku reakcije redukcije propanala katalizirane ketoreduktazom. U ovoj reakciji supstrati su koenzim NADPH te propanal, dok su produkti reakcije oksidirani oblik koenzima, NADP^+ i primarni alkohol propanol. Kinetika reakcije trebala bi pokazati da li je ova reakcija pogodan sustav za metodu regeneracije koenzima NADP^+ .

5.1. Kinetička karakterizacija u reakciji redukcije propanala

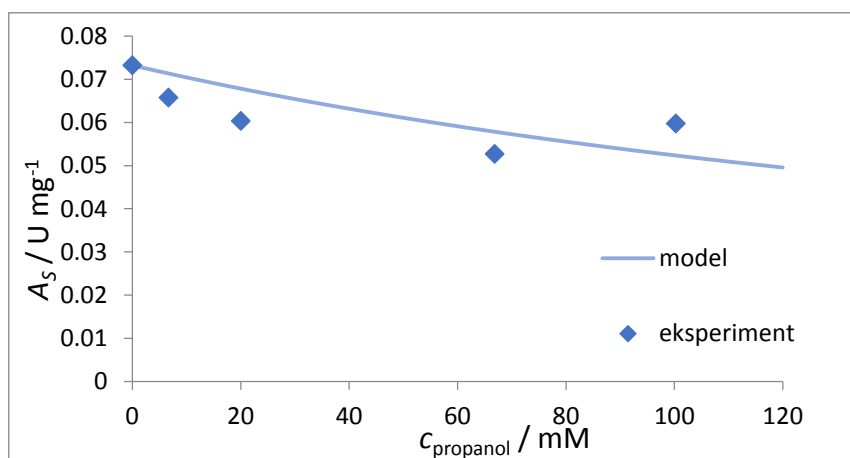
Kinetika reakcije redukcije propanala određena je mjerenjem ovisnosti početne brzine reakcije o različitim koncentracijama supstrata, tj. propanala (slika 5.1) i NADPH (slika 5.2). Ispitan je i utjecaj inhibicije produktima, propanolom i NADP^+ (slike 5.3 i 5.4). Na grafičkim prikazima (slike 5.1 i 5.2) vidi se ovisnost početne brzine reakcije o promjeni koncentracije supstrata, propanala i NADPH.



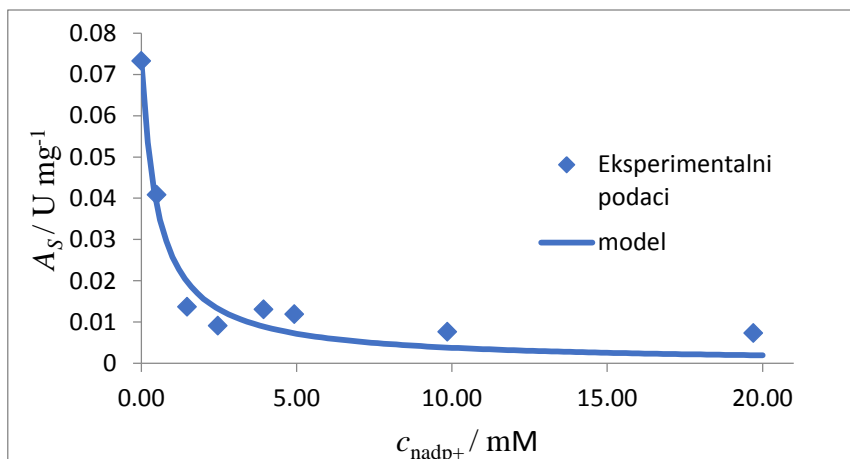
Slika 5.1 Ovisnost početne reakcijske brzine redukcije propanala o koncentraciji propanala ($T = 25^\circ\text{C}$, $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$, $\text{pH} = 8$, $\gamma_{\text{enzim}} = 1,0 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{NADPH}} = 0,1 \text{ mM}$, $c_{\text{propanal}} = 13,7\text{-}2734,2 \text{ mM}$)



Slika 5.2. Ovisnost početne reakcijske brzine redukcije propanala o koncentraciji NADPH ($T = 25^\circ\text{C}$, $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$, $\text{pH} = 8$, $\gamma_{\text{enzim}} = 1,0 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{NADPH}} = 0,0024\text{-}0,1630 \text{ mM}$, $c_{\text{propanal}} = 683,5\text{mM}$)



Slika 5.3. Ovisnost početne reakcijske brzine redukcije propanala o koncentraciji propanola ($T = 25^\circ\text{C}$, $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$, $\text{pH} = 8$, $\gamma_{\text{enzim}} = 1,0 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{NADPH}} = 0,035 \text{ mM}$, $c_{\text{propanal}} = 683,5\text{mM}$, $c_{\text{propanol}} = 0\text{-}669 \text{ mM}$)



Slika 5.4. Ovisnost početne reakcijske brzine redukcije propanala o koncentraciji NADP^+ ($T = 25^\circ\text{C}$, $c_{\text{fosfatni pufer}} = 100 \text{ mM}$, $\text{pH} = 8$, $\gamma_{\text{enzim}} = 1,0 \text{ mg/mL}$, $c_{\text{NADPH}} = 0,035 \text{ mM}$, $c_{\text{propanal}} = 683,5 \text{ mM}$, $c_{\text{NADP}^+} = 0-19,71 \text{ mM}$)

Iz grafičkih prikaza može se uočiti da ne dolazi do inhibicije supstratima, dok je pri mjerenjima gdje se ispitivao utjecaj produkata na reakciju, uočena inhibicija produktom NADP^+ , te propanolom.

Kinetika reakcije redukcije je zato opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom (jedn. 4.1) sa uključenom kompetitivnom inhibicijom, produktima NADP^+ i propanolom. Parametri modela procijenjeni su na temelju eksperimentalnih podataka (tablica 5.1). Iz procijenjenih parametara može se zaključiti da je NADPH specifičniji supstrat od propanala. NADP^+ znatno više inhibira reakciju od propanola, ali obzirom da je Michaelis Menteničina konstanta za NADPH znatno niža od konstante inhibicije od produkta NADP^+ enzim nije značajno inhibiran navedenim produktom.

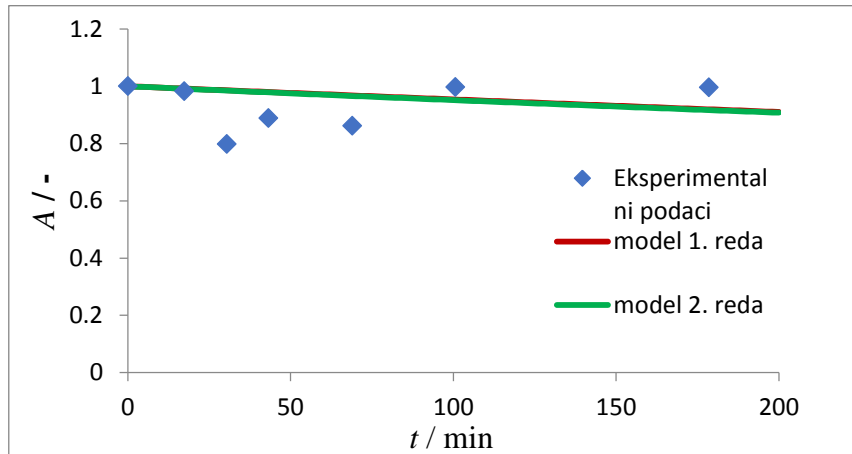
Tablica 5.1. Eksperimentalno procijenjeni parametri modela

Parametar	Vrijednost
$V_M / \text{U mg}^{-1}$	$0,351 \pm 0,128$
$K_{m,\text{propanal}} / \text{mM}$	$554,992 \pm 277,997$
$K_{m,\text{NADPH}} / \text{mM}$	$0,057 \pm 0,0458$
$K_{i,\text{NADP}^+} / \text{mM}$	$0,337 \pm 0,054$
$K_{i,\text{propanol}} / \text{mM}$	$112,569 \pm 36,709$

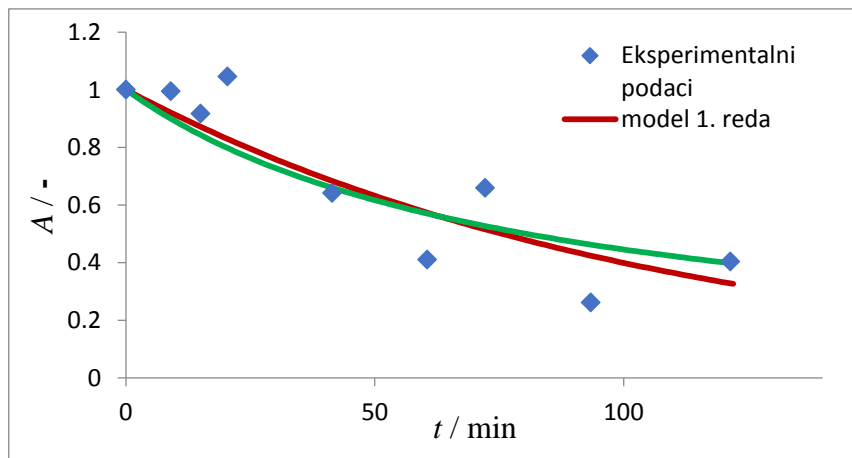
Provođenjem mjerenja za kinetiku povratne reakcije uočeno je da enzim ne pokazuje aktivnost u povratnoj reakciji oksidacije propanola.

5.2. Utjecaj propanala na stabilnost ketoreduktaze

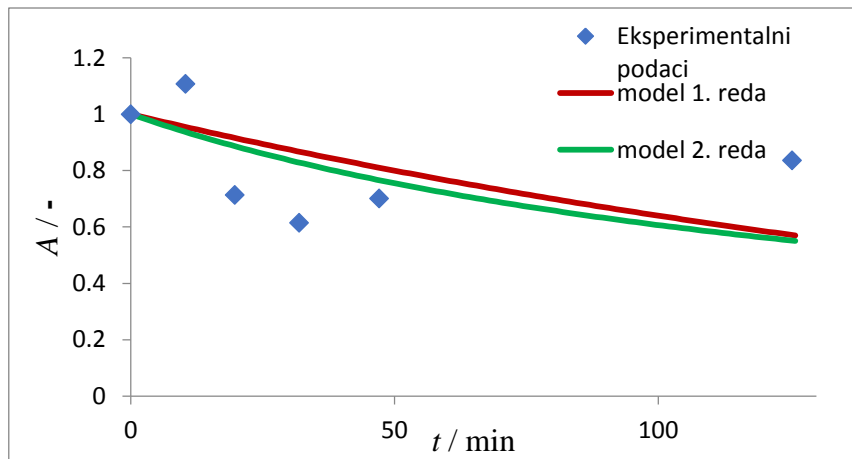
Prema ranije spomenutim postupkom (poglavlje 3.2.1.3.), provedena su mjerenja sa svrhom utvrđivanja kako različite koncentracije propanala utječu na stabilnost enzima, odnosno njihovu brzinu deaktivacije, kroz definirani vremenski period (slike 5.5-5.9).



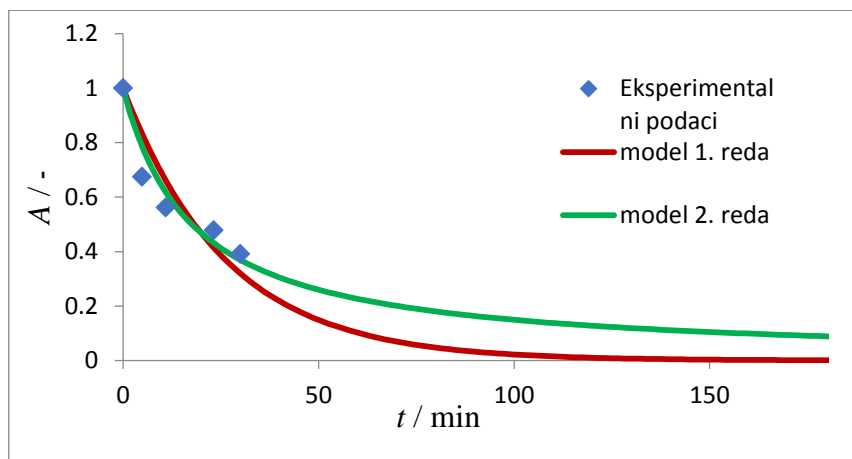
Slika 5.5 Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji propanala od 0 mM



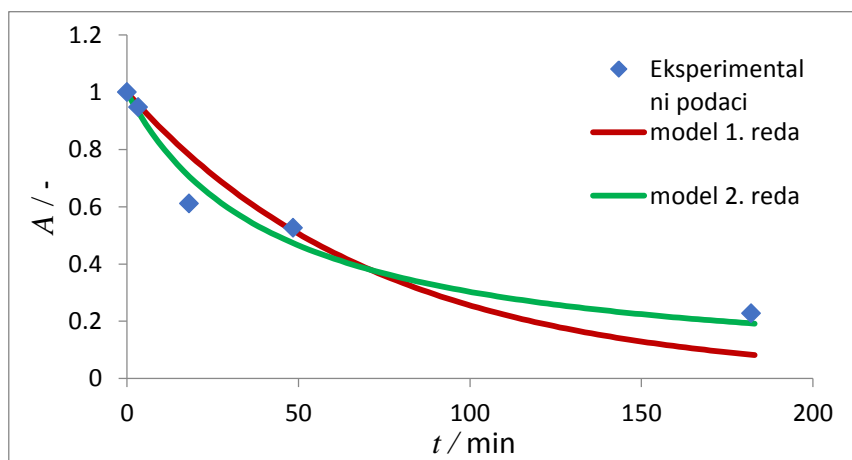
Slika 5.6. Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji propanala od 9,60 mM



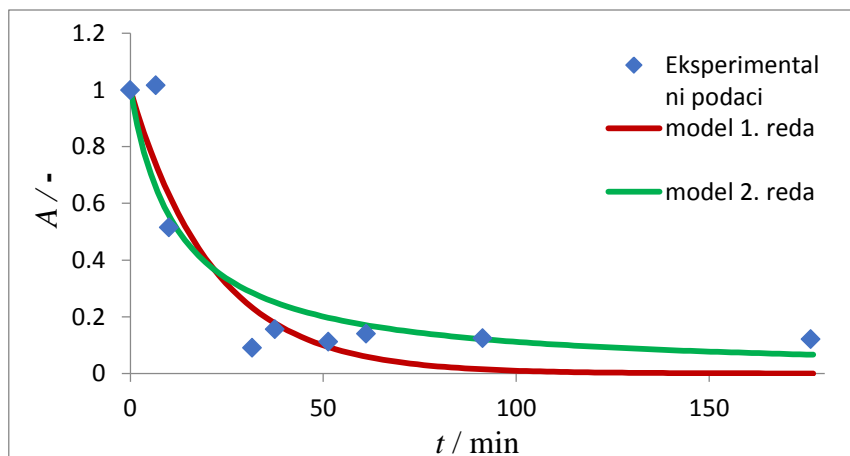
Slika 5.7. Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji propanala od 50,8 mM



Slika 5.8. Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji propanala od 101,7 mM



Slika 5.8. Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji propanala od 203,30 mM



Slika 5.9. Operacijska stabilnost enzima pri koncentraciji propanala od 503 mM

Iz prikazanih grafičkih prikaza zaključuje se da povećanjem koncentracije propanala brže dolazi do pada aktivnosti enzima, no i u slučaju gdje nema propanala primjećuje se pad aktivnosti enzima.

Deaktivacija enzima opisana je modelom 1. i 2. reda (jedn. 3.4 i 3.5). Parametri procijenjeni iz eksperimentalnih podataka prikazani su u tablici 5.2. U tablici je također dan statistički pokazatelj, koeficijent determinacije, R^2 .

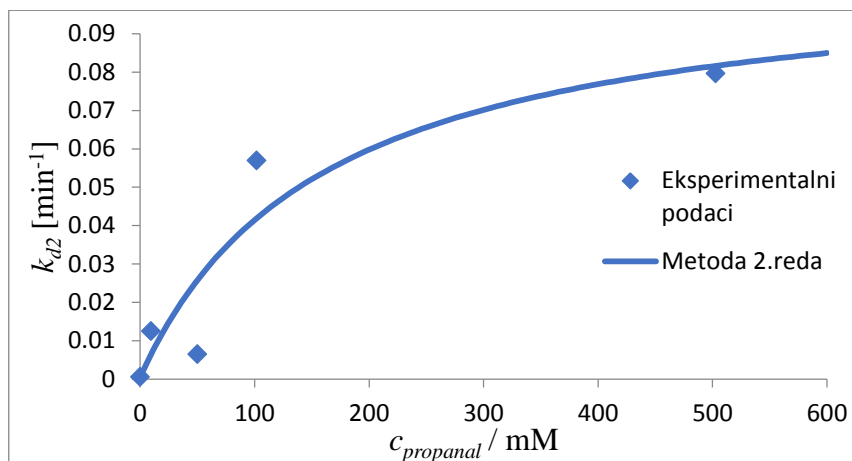
Tablica 5.2. Parametri modela deaktivacije 1. i 2. reda, programski paket *Scientist*

$c_{propanal} / \text{mM}$	k_{d1} / min^{-1}	k_{d2} / min^{-1}	R_1^2	R_2^2
0	0,0005±0,0005	0,0005 ±0,0005	0.9897	0.9898
9,6	0,0092±0.0016	0,0124 ±0.0029	0.9737	0.9690
50,8	0,0045±0.0021	0,0065 ±0.0032	0.9493	0.9562
101,7	0,0381±0.0084	0,0569 ±0.0084	0.9452	0.9754
503,0	0,04618±0.0102	0,0796 ±0.0220	0.9395	0.9210
203,3	0,0136±0.0027	0,0229± 0.0055	0.9807	0.9948

Oba modela dobro opisuju pad aktivnosti enzima, no zbog manjih odstupanja rezultata dobivenih pomoću modela i od eksperimentalnih podataka, zaključeno je da je model drugog reda bolji za opisivanje deaktivacije enzima KRED.

Ovisnost konstante deaktivacije modela drugog reda, k_{d2} , o koncentraciji propanala prikazana je na slici 5.10. Vidljiva je hiperbolična ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji supstrata te je ista opisana jednadžbom 5.1.

$$k_d = \frac{a * c_{propanal}}{b + c_{propanal}} + d \quad (5.1)$$



Slika 5.10 Ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji propanala

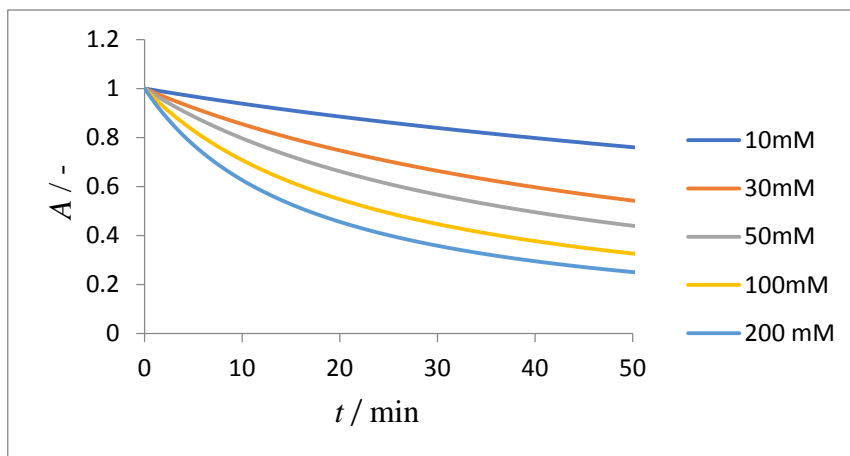
Vrijednosti parametara jednadžbe 5.1. dani su u tablici 5.3.

Tablica 5.3 Vrijednosti parametara jednadžbe 5.1.

Parametar	Vrijednost
$a [\text{min}^{-1}]$	0,107
$b [\text{mmol dm}^{-3}]$	161,59
$d [\text{min}^{-1}]$	0,00051

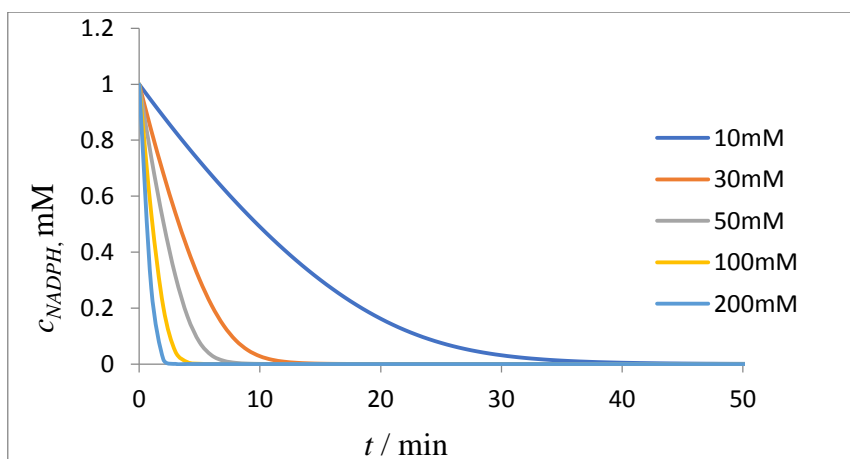
5.3.Simulacija reakcije redukcije propanala

Simulacija reakcije redukcije propanala ketoreduktazom provedena je u programskom paketu *Scientist*, na temelju matematičkog modela (Prilog 1.) i parametra koji su procijenjeni na temelju eksperimentalnih podataka (Tablica 5.1).



Slika 5.11. Prikaz pada aktivnosti enzima tokom vremena za uzorke s različitim početnim koncentracijama propanala ($c_{\text{NADPH}} = 1 \text{ mM}$; $\gamma_{\text{KRED}} = 10 \text{ mg cm}^{-3}$)

Na slici 5.11. vidi se pad u aktivnosti ketoreduktaze u svim uzorcima, pritom svaki ima različitu vrijednost koncentracije propanala. Ipak, kod uzorka s najmanjom koncentracijom supstrata propanala pad u aktivnosti je najblaže izražen dok se najveća razlika u aktivnosti tokom vremena (50 min) vidi u uzorku sa $c_{\text{propanal}} = 200 \text{ mM}$.



Slika 5.12. Prikaz pada koncentracije NADPH u ovisnosti o vremenu tijekom reakcije redukcije za različite koncentracije propanala u uzorku ($c_{\text{NADPH}} = 1 \text{ mM}$; $\gamma_{\text{KRED}} = 10 \text{ mg cm}^{-3}$)

3)

Ako usporedimo koliko je vremenski potrebno da se sav NADPH konvertira u svoj oksidirani oblik, odnosno NADP^+ može se zaključiti da je pri većim početnih koncentracijama propanala, to vrijeme najkraće (u slučaju sa slike 5.12. , najkraće vrijeme je za $c_{\text{propanal}} = 200\text{mM}$). Obzirom da je oksidacija NADPH relativno brza pri koncentracijama propanala većim od 50 mM može se zaključiti da se ispitana reakcija može uspješno primijeniti za regeneraciju koenzima NADP^+ .

6. ZAKLJUČAK

Kinetika redukcije propanala ketoreduktazom opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom. Provedbom eksperimentalnih mjerenja ustanovljeno je da dolazi do inhibicije produktima, NADP^+ i propanolom, stoga je njihova inhibicija uključena u kinetički model.

U povratnoj reakciji, oksidacije propanola, enzim ketoreduktaza nije pokazivao aktivnost stoga daljnja mjerenja nisu provedena.

Pad aktivnosti enzima opisan je modelom kinetike 2. reda te je pokazano kako konstanta deaktivacije raste s većom koncentracijom propanala.

Na temelju grafičkog prikaza konverzije NADPH u vremenu, može se zaključiti da se reakcija redukcije propanala ketoreduktazom može koristiti u procesu regeneracije koenzima NADP^+ .

7.LITERATURA

1. Bommarius A. S., Riebel B. R., Biocatalysis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Germany (2004) 19-34.
2. Dunn I. J., Heinzle E., Ingham J., Pfenosil J. E., Biological Reaction Engineering, WILEY-VCH GmbH & Co. KgaA, Weinheim, Njemačka (2003.)
3. Findrik Blažević Z., Bioreakcijska tehnika 1, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2012).
4. Findrik Blažević, Z., Bioreaktori, interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017).
5. Hummel W., Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments, Trends in Biotechnology 17 (1999) 487-491.
6. Ilanes, A., Enzyme Biocatalysis: principles and applications, Springer, Njemačka (2008) 4-18.
7. Kosar V., Reaktori i bioreaktori (nastavni tekstovi), Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017). 10-12.
8. Karlson P., Introduction to modern biochemistry, Academic Press (1963)
9. Wang X., Saba T., Yiu H.P. H., Howe F.R., Anderson James A., Shi J., Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways, Chem 2 (2017.) 621-654.
10. Wu H., Tian C., Song X., Liu C., Yang D., Jiang Z., Methods for the regeneration of nicotinamide coenzymes, Green Chemistry 15 (2013) 1773-1789.

8. PRILOZI

PRILOG 1.

```
//Kotlasti reaktor,simulacija reakcije redukcije
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: T
DepVars: CPAL,NADH,cpol,NAD,A
Params: Vm,km1,km2,KiNAD,Kipol,c,b,d
r=Vm*cpal*NADH*ce*A/((km1*(1+cpol/Kipol)+cpal)*(NADH+km2*(1+NAD/KiNAD)))
kd=C+B*cpal/(D+cpal)
cpal'=-r
NADH'=-r
cpol'=r
NAD'=r
A'=-kd*A*A
Vm=0.351589761996696948
km1=554.992305468781979
km2=0.057722066935866789
KiNAD=0.337995131
Kipol=112.569181
C=0.000508717
B=0.107181417
D=161.5899811
t=0
cpal=30
NADH=1
NAD=0
cpol=0
ce=10
A=1
***
```

9 SIMBOLI I SKRAĆENICE

Grčki simboli:

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

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

λ – valna duljina [nm]

Δ - promjena

Simboli:

A_s – specifična aktivnost biokatalizatora [U mg^{-1}]

A_v – aktivnost biokatalizatora po volumenu [U ml^{-1}]

b – duljina puta elektromagnetskog zračenja kroz uzorak [cm]

c – koncentracija [mmol dm^{-3}]

c_s – koncentracija supstrata [mmol dm^{-3}]

d – promjer kvarcne kivete [cm]

E_a – energija aktivacije

k – konstanta brzine reakcije [min^{-1}]

k_d – konstanta inaktivacije biokatalizatora [min^{-1}]

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

K_m – Michaelis–Menteničina konstanta [mmol dm^{-3}]

pH – negativni logaritam koncentracije H^+ iona u otopini

r – brzina reakcije (brzina reakcije) [$\text{mmol dm}^{-3} \text{mol}^{-1}$]

R^2 – koeficijent determinacije [-]

T – temperatura [$^{\circ}\text{C}$]

t – vrijeme [min]

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

V – volumen [cm^3]

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

V_r – ukupni volumen u kvarcnoj kiveti [cm^3]

Skraćenice:

E – enzim

ES – enzim-supstrat kompleks

NAD⁺ - nikotinamid-adenin-dinukleotid

NADH – reducirani oblik NAD⁺

NADP⁺ - nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat

NADPH – reducirani oblik NADP⁺

P – produkt

S – supstrat

UV-VIS – ultraljubičasti-vidljivi spektar elektromagnetskog zračenja

ŽIVOTOPIS

Vanda Pakšec [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje stekla je u Osnovnoj školi Josipa Račića u Zagrebu. Srednju školu upisuje u Klasičnoj gimnaziji nakon koje obrazovanje nastavlja na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Ekoinženjerstvo.