

# Regeneracija koenzima NAD(P)+ u reakcijama oksidacije katalizirane oksidoreduktazama

---

Škarica, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:149:503738>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-27**



Repository / Repozitorij:

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



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

**Antonia Škarica**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

**Antonia Škarica**

REGENERACIJA KOENZIMA NAD(P)<sup>+</sup> U REAKCIJAMA OKSIDACIJE  
KATALIZIRANE OKSIDOREDUKTAZAMA

**DIPLOMSKI RAD**

Mentor: prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
2. izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar
3. doc. dr. sc. Anita Šalić

Zagreb, rujan 2023.

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na prihvaćanju mentorstva, savjetima tijekom izrade diplomskog rada, kao i asistentu Emeriku Leakoviću, mag. appl. chem., na stručnoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada.*

*Hvala svim prijateljima koji su bili uz mene tijekom cjelokupnog školovanja te mi učinili studentske dane lijepima.*

*Za kraj, najveću zahvalu dugujem svojoj obitelji, posebice roditeljima i sestri, koji su mi omogućili biti tu gdje jesam. Hvala im na nesebičnoj ljubavi, podršci i vjeri u moj uspjeh.*

## SAŽETAK

Industrijski procesi temeljeni na biokatalizi korištenjem enzima ili cijelih stanica smatraju se ekološki prihvatljivom tehnologijom. Oksidoreduktaze su jedna od najvećih skupina enzima (25 % svih enzima) i imaju veliku industrijsku i znanstvenu važnost. Glavna prepreka njihovoj široj primjeni je činjenica da ovi enzimi zahtijevaju kofaktore koji se troše tijekom reakcije, pri čemu je potrebno pronaći odgovarajući način za njihovu regeneraciju. Koenzimi  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  služe kao oksidansi koji se reduciraju u  $\text{NAD(P)H}$  dok se supstrat oksidira u ciljni produkt.

U ovom radu provedeno je istraživanje potencijalne upotrebe enzima  $\text{NAD(P)H}$  oksidaze (NOX) za regeneraciju koenzima u reakcijama oksidacije. Budući da je upotrijebljeni enzim aktivan u reakcijama oksidacije koenzima  $\text{NADH}$  i  $\text{NADPH}$ , provedene su reakcije oksidacije supstrata etanola i 2-propanola s dva različita enzima i određen je ukupni broj obrtaja koenzima u svakoj reakciji. Izmjerena je kinetika svih enzima te je uspostavljen i validiran procesni model u kotlastom bioreaktoru. Rezultati pokazuju da se NOX može uspješno primjeniti za regeneraciju koenzima, pri čemu je enzim učinkovitiji prilikom regeneracije  $\text{NADP}^+$

**Ključne riječi:** biokataliza; regeneracija koenzima;  $\text{NAD(P)H}$ ; oksidoreduktaza; oksidacija; kinetika; matematičko modeliranje

## **ABSTRACT**

Industrial processes based on biocatalysis using enzymes or whole cells are considered environmentally friendly technology. Oxidoreductases are one of the largest classes of enzymes (25 % of all enzymes) and have far-reaching industrial and scientific importance. The main obstacle to their wider application is the fact that these enzymes require cofactors that are consumed during the reaction and it is necessary to find a suitable way for their regeneration. The coenzymes  $\text{NAD}^+$  and  $\text{NADP}^+$  serve as oxidants that are reduced to  $\text{NAD(P)H}$  while the substrate is oxidized to the target product.

This study investigated the potential use of regenerating coenzymes in oxidation reactions using the enzyme  $\text{NAD(P)H}$  oxidase (NOX). Ethanol and 2-propanol oxidation processes were carried out with two enzymes, and the total turnover number of coenzymes in each reaction was calculated. The kinetics of all enzymes were measured and a process model was established and validated in a batch bioreactor. The findings indicate that the application of NOX for the regeneration of coenzymes is feasible, with  $\text{NADP}^+$  showing significantly better results.

**Key words:** biocatalysis; coenzyme regeneration;  $\text{NAD(P)H}$ ; oxidoreductase; oxidation; kinetics; mathematical modelling

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. Biokemijsko inženjerstvo i biokataliza</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. Zelena kemija i biokataliza .....	4
2.1.2. Primjena biokatalize u sintetskoj kemiji .....	5
<b>2.2. Enzimi</b> .....	<b>7</b>
2.2.1. Sinteza enzima .....	8
2.2.2. Struktura enzima .....	9
2.2.3. Specifičnost enzima .....	12
2.2.4. Podjela enzima .....	14
2.2.5. Oksidoreduktaze.....	14
2.2.5.1. Alkohol dehidrogenaze .....	15
2.2.5.2. NAD(P)H oksidaza .....	17
<b>2.3. Katalitička aktivnost enzima</b> .....	<b>18</b>
2.3.1. Mehanizam enzimatske aktivnosti .....	18
2.3.2. Kofaktori .....	20
2.3.3. Koenzim NAD(P) <sup>+</sup> .....	21
<b>2.4. Regeneracija koenzima</b> .....	<b>23</b>
2.4.1. Enzimatska regeneracija koenzima NAD(P) <sup>+</sup> .....	24
<b>2.5. Modeliranje bioprocesa</b> .....	<b>24</b>
2.5.1. Kinetika enzimatskih reakcija.....	26
2.5.2. Kinetika dvosupstratnih reakcija.....	28
2.5.3. Inaktivacija i inhibicija enzima .....	29
2.5.4. Reaktorski model kotlastog reaktora.....	31
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1. Aparatura</b> .....	<b>33</b>
3.1.1. Analitička vaga .....	33
3.1.2. Aparatura za određivanje udjela kisika u reaktoru.....	33

3.1.3. Centrifuga .....	34
3.1.4. Homogenizator.....	35
3.1.5. Kotlasti bioreaktor.....	35
3.1.6. pH- metar .....	36
3.1.7. Plinski kromatograf.....	36
3.1.8. UV- Vis spektrofotometar.....	37
<b>3. 2. Analitičke metode.....</b>	<b>38</b>
3.2.1. Određivanje aktivnosti i stabilnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH <i>Sc</i> , ADH <i>Lb</i> ) i NAD(P)H oksidaze (NOX) spektrofotometrijskom metodom.....	38
3.2.2. Određivanje koncentracije supstrata i produkta primjenom plinske kromatografije .....	39
<b>3.3. Karakterizacija enzima ADH i NOX .....</b>	<b>40</b>
3.3.1. Određivanje kinetike enzima .....	40
3.3.1.1. Kinetika enzima ADH <i>Sc</i> u reakciji oksidacije etanola .....	40
3.3.1.2. Kinetika ADH <i>Sc</i> u reakciji redukcije acetaldehida.....	41
3.3.1.3. Kinetika enzima ADH <i>Lb</i> u reakciji oksidacije 2-propanola .....	42
3.3.1.4. Kinetika enzima ADH <i>Lb</i> u reakciji redukcije acetona .....	43
3.3.1.5. Kinetika enzima NOX u reakciji oksidacije NADH .....	44
3.3.1.6. Kinetika enzima NOX u reakciji oksidacije NADPH.....	45
3.3.1.7. Utjecaj kisika na kinetiku enzima NOX u reakcijama oksidacije NADH i NADPH... 46	
3.3.2. Provedba procesa oksidacije katalizirane oksidoreduktazama u reaktoru .....	48
<b>3.4. Matematički model regeneracije koenzima NAD(P)<sup>+</sup> .....</b>	<b>49</b>
3.4.1. Kinetički model.....	49
3.4.2. Reaktorski model .....	51
<b>3.5. Obrada rezultata.....</b>	<b>52</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Određivanje aktivnosti i operacijske stabilnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) i NAD(P)H oksidaze (NOX) .....</b>	<b>53</b>
4.1.1. Određivanje kinetike alkohol dehidrogenaze (ADH).....	53
4.1.1.1. Kinetika enzima ADH <i>Sc</i> u reakciji oksidacije etanola .....	53
4.1.1.2. Kinetika enzima ADH <i>Sc</i> u reakciji redukcije acetaldehida .....	56
4.1.1.3. Usporedba kinetike ADH <i>Sc</i> u reakcijama oksidacije etanola i reakcije redukcije acetaldehida.....	58



4.1.1.4. Kinetika enzima ADH <i>Lb</i> u reakciji oksidacije 2-propanola .....	58
4.1.1.5. Kinetika enzima ADH <i>Lb</i> u reakciji redukcije acetona.....	61
4.1.1.6. Usporedba kinetike ADH <i>Lb</i> u reakcijama oksidacije 2-propanola i reakcije redukcije acetona .....	63
4.1.2. Određivanje kinetike enzima NAD(P)H-oksidade (NOX).....	63
4.1.2.1. Kinetika enzima NOX u reakciji oksidacije NADH .....	63
4.1.2.2. Kinetika enzima NOX u reakciji oksidacije NADPH .....	66
4.1.2.3. Usporedba kinetike enzima NOX u reakcijama oksidacije NADH i NADPH .....	68
<b>4.2. Provođenje procesa oksidacije katalizirane oksidoreduktazama u kotlastom reaktoru... 69</b>	
4.2.1. Reakcija oksidacije etanola katalizirana enzimom ADH <i>Sc</i> uz regeneraciju koenzima NAD <sup>+</sup> .....	69
4.2.2. Reakcija oksidacije 2-propanola katalizirana enzimom ADH <i>Lb</i> uz regeneraciju koenzima NADP <sup>+</sup> .....	71
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>74</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>76</b>
<b>7. PRILOZI.....</b>	<b>87</b>
<b>8. POPIS SIMBOLA I KRATICA.....</b>	<b>119</b>

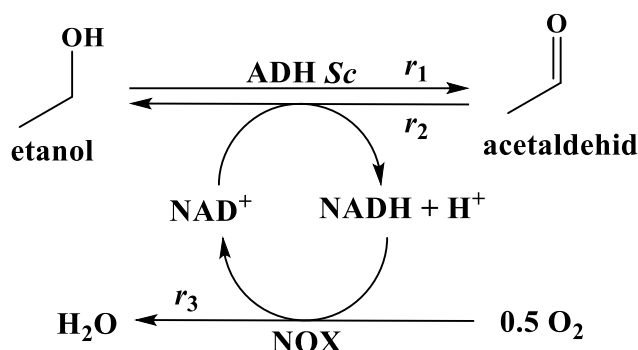
## 1. UVOD

Sredinom osamnaestog stoljeća, s prvom industrijskom revolucijom, čovjek je počeo koristiti prirodne resurse na dotad drugačiji način. Uz napredak načina proizvodnje, razvile su se brojne industrije [1], među kojima je i kemijska industrija [2]. Razvoj industrija pratilo je neodrživo korištenje prirodnih resursa te onečišćenje okoliša [1], što je dovelo do pitanja vezanih uz održivost takvog načina opskrbe i potrebe za zelenijim procesima [2] koji koriste kemikalije koje nisu štetne ni za čovjeka ni za okoliš [1]. Opis zelenijih procesa su P. Anastas i J. Warner devedesetih godina prošlog stoljeća saželi u dvanaest načela *zelene kemije* koji su uvelike promijenili svijest ljudi te [1, 3] čija je primjena postala jedan od najvećih izazova u mnogobrojnim industrijskim procesima [2]. Budući da se više od 90 % industrijskih procesa temelji na katalizi [4], upravo se katalizi pridaje važnost u razvijanju održive kemije koja će biti ekonomična i okolišno prihvatljiva s mogućom primjenom u znanosti i industriji [5]. Stoga, shodno načelu ekonomije atoma, bilo je očigledno da će se trebati pronaći novi katalizatori s većom konverzijom i selektivnošću, kako bi se u velikoj mjeri smanjilo nastajanje nusproizvoda te povećala čistoća produkta [3].

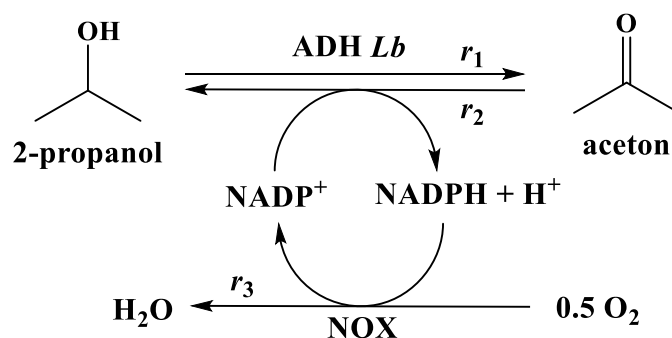
Zbog primjene načela *zelene kemije*, biokataliza se pokazala održivom i zelenom tehnologijom. Katalizator, enzim, proizvodi se iz obnovljivih izvora te je biorazgradiv, netoksičan i bezopasan, a enzimatske reakcije se uglavnom provode u vodi, pri atmosferskom tlaku i sobnoj temperaturi, što čini reakcije ekonomičnijima i održivijima [6]. Danas je poznato nekoliko tisuća enzima, podijeljenih u šest skupina [7], od kojih su jedna od najvećih skupina enzima oksidoreduktaze, koje čine čak 25 % ukupnih enzima te koje, zbog velike specifičnosti i enantioselektivnosti, imaju značajnu primjenu u biotehnologiji [8], farmaceutskoj i kemijskoj industriji [9].

U reakcijama koje kataliziraju oksidoreduktaze uvijek je potreban koenzim, pri čemu čak 80 % oksidoreduktaza zahtijeva NAD(H) kao koenzim te 10 % NADP(H). Sustav NAD(P)<sup>+</sup>/NAD(P)H je široko prihvaćen zbog jednostavnosti mehanizma reakcija u kojima sudjeluju, no, zbog vrlo visoke cijene koenzima ukoliko bi se koristio u stehiometrijskim količinama, potrebno je pronaći metodu regeneracije koja će omogućiti višestruku upotrebu koenzima i samim time utjecati na ekonomičnost reakcije [8]. Budući da su kofaktori skupi, ekonomičnost reakcija u kojima su nužni može se poboljšati ako je ukupan broj obrtaja koenzima (engl. *Total Turnover Number*, TTN) velik, što se ostvaruje *in situ* regeneracijom kofaktora [10].

Budući da biokatalitički proces započinje identificiranjem ciljne reakcije, otkrivanjem prikladnog katalizatora, karakterizacijom, inženjerstvom – dizajniranjem procesa te modeliranjem procesa, što smanjuje onečišćenje i troškove čineći procese *zelenijim* i održivijim [11], pri čemu je dokazano da je vrlo važan enzimski sustav za industrijsku primjenu primjena oksidoreduktaza u regeneraciji koenzima [12], u okviru ovog rada provedena je reakcija oksidacije etanola katalizirane enzimom alkohol dehidrogenazom uz regeneraciju koenzima  $\text{NAD}^+$  enzimom  $\text{NADH}$  oksidazom (NOX), prikazana na slici 1, te reakcija oksidacije 2-propanola katalizirane alkohol dehidrogenazom uz regeneraciju koenzima  $\text{NADP}^+$  enzimom  $\text{NADPH}$  oksidazom (NOX), prikazana na slici 2. Ispitana je kinetika svih reakcija u prikazanim reakcijskim sustavima, te je postavljen procesni model koji je validiran u kotlastom reaktoru.



**Slika 1.** Reakcijska shema oksidacije etanola uz alkohol dehidrogenazu iz *Saccharomyces cerevisiae* s regeneracijom koenzima  $\text{NAD}^+$  uz NOX



**Slika 2.** Reakcijska shema oksidacije 2-propanola uz alkohol dehidrogenazu iz *Lactobacillus brevis* s regeneracijom koenzima  $\text{NADP}^+$  uz NOX

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Biokemijsko inženjerstvo i biokataliza

Riječ *bio* (grč. *bios* – život) kao prefiks upućuje da novonastali pojam ima odgovarajuću vezu sa životom pa bioinženjerstvo kao takvo predstavlja pojam primjene inženjerskih znanja u raznim područjima života [13]. Prema Međunarodnoj zajednici za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC) [14] bioinženjerstvo se može podijeliti u biokemijsko, biomedicinsko, ekološko te prehrambeno inženjerstvo [13].

Biokemijsko inženjerstvo se razvilo iz kemijskog inženjerstva te prema definiciji „obuhvaća vođenje bioloških procesa uz primjenu tehničkih postupaka u industrijskom mjerilu povezujući kemijsko inženjerstvo s biologijom“. Budući da se biokemijsko inženjerstvo bavi procesima koje kataliziraju enzimi, to jest biljne, životinjske ili mikrobne stanice koje ih proizvode, ono se koristi i u ostalim područjima bioinženjerstva, posebice u ekološkom i prehrambenom inženjerstvu [13]. U znanstvenoj zajednici prihvaćena je podjela biokemijskog inženjerstva na mnogo polja, a neka od njih su; biokataliza, tkivno, proteinsko, metaboličko, bioreaktorsko te ekološko inženjerstvo [15].

Biokataliza je proces u kojem se pomoću biokatalizatora; enzima, enzimskih kompleksa, cijelih stanica ili staničnih organela, transformiraju ili proizvode određeni produkti, pri čemu se reakcija odvija u bioreaktoru, s dodanim supstratima, pod određenim reakcijskim uvjetima [16]. Stoga, enzimi su biološki katalizatori, tj. biokatalizatori [17], koji ubrzavaju kemijske procese u živim organizmima [18] na način da snižavaju energiju aktivacije (*E<sub>a</sub>*) kemijskih reakcija [19], ubrzavajući je za  $10^3$  do  $10^{17}$  puta u odnosu na nekataliziranu reakciju [20], a da pri tome ne mijenjaju ravnotežu kemijske reakcije [19].

U odnosu na kemijsku katalizu, enzimska biokataliza pokazuje brojne prednosti. Prvenstveno, slijedi većinu načela *zelene kemije*, a da pri tome ostvaruje visoku aktivnost, specifičnost, selektivnost ne stvarajući ni nusprodukte [2], niti popratne reakcije, kao niti otpadnu biomasu [13]. Nadalje, enzimske reakcije se odvijaju u blagim reakcijskim uvjetima, pri čemu se dosta enzimatski kataliziranih reakcija odvija u vodi, koja se smatra *najzelenijim* otapalom [21].

No, enzimska biokataliza pokazuje određene neke nedostatke, kao što su, primjerice, ograničena stabilnost enzima, cijena enzima i ograničeno recikliranje kofaktora [13].

Zbog svih prethodno navedenih prednosti enzimatskih reakcija, enzimi se primjenjuju u mnogobrojnim industrijama, poput mliječne, pekarske, pivske, kožarske, farmaceutske, tekstilne industrije, u proizvodnji životinjske hrane, papira, polimera, deterdženata, kozmetike [22], pri čemu valja istaknuti da se najveća uloga biokatalizatora ostvaruje u farmaceutskoj industriji, gdje svojstva regioselektivnosti i stereoselektivnosti omogućuju provedbu zahtjevnih sinteza [23].

### **2.1.1. Zelena kemija i biokataliza**

Svijest i zabrinutost vezana uz otpad koji nastaje u kemijskoj industriji pojavila se sredinom osamdesetih godina prošlog stoljeća kada je, ujedno, ukazana potreba za „čišćom“ kemijom koja će proizvoditi manje otpada te će, ujedno, biti učinkovitija [6]. Godine 1990. P. Anastas i J. Warner osmislili su dvanaest načela *zelene kemije* [3] koja, u osnovi, kroz smanjivanje upotrebe tvari štetnih za ljudsko zdravlje i okoliš imaju cilj poboljšati kemijske procese i produkte [1].

Prema definiciji Agencije za zaštitu okoliša Sjedinjenih Američkih Država (engl. *United States Environmental Protection Agency*, EPA), *zelena kemija* podrazumijeva osmišljavanje kemijskih proizvoda i procesa koji smanjuju ili uklanjaju upotrebu opasnih tvari, primjenjujući se tijekom cijelog životnog ciklusa kemijskog proizvoda, uključujući osmišljavanje, proizvodnju, upotrebu te, u konačnici, odlaganje [24].

*Zelena kemija* pokriva mnoga područja kao što su zelena kataliza, zelena sinteza, uporaba zelenih otapala, provođenje ekološki prihvatljivih procesa, uporaba razgradivih sirovina te težnja za što većom učinkovitošću procesa [25]. Budući da je 90 % svih kemijskih procesa katalitički te da se 60 % svih produkata u kemijskoj industriji dobiva u katalitičkim procesima [26] te da je, prema podacima Agencije za zaštitu okoliša Sjedinjenih Američkih Država, 56 % ukupnog otpada povezanog s proizvodnjom 2021. godine dolazio iz sektora kemijske proizvodnje [27], jasno je da je jedan od značajnijih trendova istraživanja *zelenog* programa područje katalitičkih i biokatalitičkih reakcija [4]. Anastas i sur. katalizu smatraju temeljem *zelene kemije*, pridavajući joj ključnu ulogu u sprječavanju onečišćenja [5].

Kao što je prethodno navedeno, biokatalitički procesi su ekonomičniji, ekološki prihvatljiviji te samim time održiviji, pri čemu slijede načela *zelene kemije*, kao što je prikazano u tablici 1 (četvrto i deseto načelo nisu relevantni jer se odnose na produkt, a ne na samo osmišljavanje procesa) [6].

**Tablica 1.** Odnos načela zelene kemije i biokatalize [6, 28]

	<b>Načelo zelene kemije</b>	<b>Biokataliza</b>
<b>1</b>	Sprečavanje nastanka otpada je bolje od njegovog naknadnog obrađivanja i uništavanja.	Značajno je reduciran nastanak otpada.
<b>2</b>	Ekonomija atoma podrazumijeva uključivanje ulaznih sirovina u najvećoj mogućoj mjeri u konačni proizvod.	Ekonomija atoma i koraka je ostvarenija.
<b>3</b>	Kad god je moguće, sintetski procesi trebaju biti osmišljeni na način da se u njima ne koriste tvari koje su toksične za ljude i za okoliš, kao i da ti procesi ne proizvode opasne tvari.	Mala toksičnost.
<b>4</b>	Osmišljavanje kemijskih produkata podrazumijeva očuvanje djelotvornosti te smanjivanje toksičnosti.	Nije relevantno.
<b>5</b>	Gdje god je moguće, treba se izbjeći upotreba pomoćnih kemijskih tvari ili se one trebaju zamijeniti neškodljivima.	Reakcije se većinski provode u vodi.
<b>6</b>	Energetska učinkovitost podrazumijeva provođenje sintetskih procesa pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku (pri blagim uvjetima).	Energetska učinkovitost je ostvarena primjermom procesa pri blagim uvjetima.
<b>7</b>	Gdje god je prihvatljivo, potrebno je koristiti obnovljive sirovine.	Enzimi se mogu obnoviti.
<b>8</b>	Potrebno je izbjegavati nepotrebna proširenja procesa.	Biokatalitički procesi izbjegavaju proširenja procesa.
<b>9</b>	Katalitički reagensi trebaju biti selektivni te samim time prihvatljiviji od reagenasa u stehiometrijskim količinama.	Katalizatori su enzimi.
<b>10</b>	Kemijski produkti, nakon prestanka djelovanja, trebaju imati mogućnost pretvorbe u produkte koji su neškodljivi za okoliš.	Nije relevantno.
<b>11</b>	Praćenje kemijskog, proizvodnog procesa raznim analitičkim metodama treba spriječiti nastanak opasnih tvari.	Primjenjivo u biokatalitičkim procesima.
<b>12</b>	Potrebno je smanjiti upotrebu tvari koje mogu uzrokovati štetu.	Procesi se provode u blagim i sigurnim uvjetima.

### 2.1.2. Primjena biokatalize u sintetskoj kemiji

Kemijska sinteza podrazumijeva pripremu složenih spojeva, produkata, definirane strukture od jednostavnih tvari, reaktanata, u jednoj ili više kemijskih reakcija. Razlikuju se

laboratorijske i industrijske sinteze koje su temelj organske kemijske industrije [29] te kao takve stvaraju toksičan otpad te onečišćuju okoliš [1]. Točnije, štetan organski otpad nastaje u tzv. „prljavim reakcijama“ u različitim industrijama koje koriste toksične reaktante i otapala koja stvaraju toksične nusprodukte. Smanjivanje, tj. uklanjanje opasnih tvari iz procesa sinteze, proizvodnje te primjene nastalih produkata započinje s 1990. godinom s nastankom pokreta *zelena kemija* [28].

Prema Fasciotti i sur. glavne karakteristike *zelene* organske sinteze su [1, 28]:

- 1) primjena ekonomije atoma
- 2) izravna pretvorba C-H veza u C-C veze
- 3) potreba za osmišljavanjem procesa u kojima nema zaštićivanja funkcionalnih skupina jer se na taj način smanjuju koraci u sintezi
- 4) u samo jednom procesu kaskadne reakcije trebaju uključivati niz koraka za sintezu proizvoda
- 5) korištenje biokatalizatora
- 6) korištenje manje toksičnih otapala poput vode, ionskih kapljevinama ili superkritičnog CO<sub>2</sub>

Biokatalizatori olakšavaju sintezu složenih organskih molekula kemoselektivnim, regioselektivnim i stereoselektivnim reakcijama u kojima se stvaraju ili kidaju kemijske veze [30]. Budući da su aktivna mjesta enzima kiralna, enzimi se koriste kao katalizatori u reakcijama koje često stvaraju enantiomerne čiste međuprodukte i produkte. Obzirom da se enzimi već stotinu godina koriste u organskim sintezama [31], sintetski kapacitet enzima već je prilagođen industrijskoj proizvodnji finih kemikalija, robe i farmaceutika, pri čemu visoka selektivnost i specifičnost doprinosi upotrebi enzima u sintetskoj kemiji, stavljajući naglasak na njihovu regioselektivnost [30].

Regioselektivnost enzima, bez potrebe za zaštitnim funkcionalnim skupinama, glavna je prednost biokatalize jer se njome smanjuje broj sintetskih puteva koje su nužne pri klasičnim sintezama, a samim time i vrijeme reakcije, što čini proces ekonomičnijim [4, 32].

Stereoselektivnost ima važnu ulogu pri upotrebi enzima u farmaceutskoj industriji gdje se osigurava dobivanje jednog stereoizomera, a ne racemata [32], što je vrlo važno jer u mnogim primjerima racemata u kojima jedan enantiomer pokazuje željeni učinak, drugi može biti štetan. Osim dobivanja jednog, željenog, enantiomera u većoj količini, prednost je i

ekonomičnost takvog procesa koji ne zahtijeva izdvajanje produkta koji je onečišćen neželjenim enantiomerom [3]. Također, prednost stereoselektivnih biokatalitičkih reakcija u odnosu na kemijske reakcije je i u većinskom provođenju reakcija pri blagim uvjetima te u vodenom mediju, uz uporabu malih količina metala i soli [4].

Kemoselektivnost biokatalizatora podrazumijeva sposobnost enzima da mogu djelovati na jednu vrstu funkcionalne skupine u prisutnosti drugih osjetljivih funkcionalnih skupina [33].

Shodno navedenom, potreba za ekonomski isplativim metodama industrijske sinteze čistih enantiomernih kiralnih lijekova dovela je do široke primjene biokatalizatora u industriji [6]. No, iako se biokatalizatori sve više primjenjuju u industrijskoj sintetskoj kemiji [4] posebice hidrolaze i ketoreduktaze, njihov puni potencijal tek treba biti otkriven [30]. Prema Li i sur. od četiri tisuće poznatih enzima, dvjestotinjak enzima se primjenjuje komercijalno, dok se samo dvadesetak enzima proizvodi industrijski [34].

## **2.2. Enzimi**

Enzimi su biološki polimeri [35] koji kataliziraju gotovo sve biokemijske reakcije koje su nužne za održavanje životnih procesa [36]. Mogu se dobiti iz prirodnih izvora, kao što su mikroorganizami, biljke i životinje [1].

Po kemijskoj strukturi globularni su proteini čija veličina varira ovisno o broju aminokiselinskih ostataka, pri čemu aminokiseline mogu biti raspoređene kao jedan ili više polipeptidnih lanaca savijenih u specifičnu trodimenzionalnu strukturu, uključujući malu površinu, aktivno mjesto, gdje se supstrat veže, što enzym čini vrlo specifičnim [17]. Shodno navedenom, svojstva enzima ovise o redosljedu aminokiselina u molekuli te o njihovoj prostornoj strukturi [37]. Kako je navedeno, gotovo svi enzimi su proteini, uz određene iznimke kao što je molekula ribonukleinske kiseline, RNK [19], čiji ribozimi imaju katalitičku sposobnost te sudjeluju u ekspresiji gena [17].

Proteini se mogu nalaziti unutar stanice, u citosolu i jezgri te izvan stanice, na površini stanice i izvanstaničnom mediju. Određeni proteini pokazuju dvojni lokalizaciju, nalazeći se i u jezgri i izvan stanice. Proteini koji su namijenjeni izlučivanju iz stanice ili ekspresiji na površini stanice uglavnom prolaze endomembranski put na temelju kaskade signala koja ih usmjerava u endoplazmatski retikulum. Za razliku od njih, proteini koji su namijenjeni ulasku u staničnu jezgru posjeduju signal za lokalizaciju jezgre [38]. Stoga, u primjeni se razlikuju



egzogeni i endogeni enzimi, koji se potom dijele na oksidoreduktaze, hidrolaze, liaze, izomeraze, ligaze te transferaze [39].

U ulozi biokatalizatora mogu biti cijele stanice ili izolirani enzimi. Cijele stanice se koriste kada je teško izdvojiti ciljani enzim, kada je u reakciji potrebno više enzima, uz veliki nedostatak nemogućnosti kontroliranja metaboličkih procesa. Izolirani enzimi su koncentriraniji, učinkovitiji zahtijevajući jednostavniju aparaturu i jednostavnije pročišćavanje produkta. Enzimi se pročišćavaju prema fizikalnim i kemijskim svojstvima [11], pri čemu se proteini mogu pročistiti na temelju veličine, naboja, topljivosti te afiniteta vezanja. Neke od metoda pročišćavanja su iseljavanje, elektroforeza u gelu i dvodimenzionalna elektroforeza, dijaliza, gel-filtracijska, afinitetna, ionsko-izmjenjivačka kromatografija te izoelektrično taloženje [19].

Obzirom na proteinsku strukturu, enzimi su vrlo osjetljivi na promjene u mediju u kojem se nalaze [36]. Stabilnost enzima ovisi o mnogo faktora; temperaturi, pH, primjenjivanom otapalu, oksidativnom stresu, postojanosti kofaktora ili metalnih iona te prisutnosti surfaktanta [40]. Stoga, samim time će i brzina enzimatski kataliziranih reakcija uvelike ovisiti o temperaturi i koncentraciji vodikovih iona [35].

### **2.2.1. Sinteza enzima**

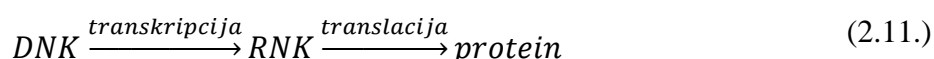
Sinteza proteina je složen proces koji je određen genima, pri čemu ključnu ulogu imaju deoksiribonukleinska kiselina (DNK) i ribonukleinska kiselina (RNK) [41]. DNK i RNK su linearni polimeri, makromolekule, koji se sastoje od velikog broja nukleotida, monomernih jedinica, pri čemu se svaki nukleotid sastoji od šećera, jedne od četiriju nukleinskih baza te fosfata. Nukleotidi su nukleozidi povezani esterskom vezom s jednom ili više fosfatnih skupina, dok je nukleozid jedinica koja se sastoji od nukleinske baze vezane na šećer. U strukturi navedenih linearnih polimera šećeri su povezani fosfatima te daju strukturnu ulogu, dok redosljed nukleinskih baza duž lanca nukleinske kiseline nosi genetičku informaciju [19].

Molekula DNK sastoji se od dviju komplementarnih niti nukleinskih kiselina čineći konformaciju dvostruke uzvojnice [19, 42]. Nalazi se u staničnoj jezgri. Građevni šećer je 2-deoksiriboza. Genetska poruka deoksiribionukleinske kiseline sadržana je u redosljedu nukleozidnih baza, tj. genetskoj šifri koju čine [42] adenin, gvanin, timin i citozin [41]. Adenin i gvanin čine derivate purina, dok citozin i timin čine derivate pirimidina [19]. Slijed triju baza čine troslovnu šifru, kodon, koja određuje aminokiselinu koja će sintetizirati protein [19, 42].

Četiri baze mogu se pojaviti u šezdeset i četiri tripletne kombinacije ( $4^3=64$ ), koje određuju dvadeset standardnih aminokiselina [42]. Iako geni (DNK) određuju strukturu proteina koje će određena stanica proizvesti, DNK nije izravno uključena u sintezu proteina [19] jer se veći dio sinteze proteina događa u ribosomima u staničnoj citoplazmi [42].

Lanac DNK se prvenstveno kopira u molekule glasničke RNK (mRNK, engl. *messenger RNA*), koja [19] odlazi na ribosom u citoplazmi gdje prenosi poruku tRNK (*t*-RNK, engl. *transfer RNA*) na način da se sparuje s njezinim antikodonom, tj. komplementarnim slijedom baza [42]. Sinteza RNK na DNK naziva se transkripcijom te je katalizirana enzimom *RNK-polimerazom* [19]. Između aminokiselina i tRNK- nosača nastaju peptidne veze [42], redoslijedom kojeg određuje mRNK [19], pri čemu se tRNK nosači odvajaju privlačeći druge aminokiseline za idući korak [42]. Nakon što se redoslijed lanca prepíše (transkribira), slijedi prevođenje (translacija) te dolazi do sinteze proteina na temelju upute koje daju mRNK [19].

Energiju za vezanje aminokiselina i tRNK daje adenozin trifosfat, ATP [41]. Stoga, u normalnim stanicama, tijek genetičke informacije je [19]:



Molekule RNK jednolančane su molekule s ribonukleotidom kao građevnom jedinicom, koji se sastoji od riboze, fosfata te jedne od baza – adenina, citozina, gvanina te uracila [43], koji je derivat pirimidina. [19]

Razlikuju se tri osnovna tipa RNK u živim stanicama; tRNK, mRNK koje su prethodno navedene te ribosomska rRNK, koja čini oko osamdeset posto sveukupne stanične RNK [43].

U strukturama DNK i RNK uočavaju se tri razlike. Prvenstveno, molekula RNK se pojavljuje kao polinukleotid s jednom niti, što ju čini mnogo manjom od molekule DNK. Nadalje, šećerna jedinica, pentoza, u RNK je riboza, a ne 2-deoksiriboza kao kod DNK. Naposljetku, umjesto timina u DNK, jedna od četiriju glavnih baza u RNK je uracil, koji se sparuje s adeninom [19, 42].

### 2.2.2. Struktura enzima

Proteini su linearni polimeri koji su izgrađeni od aminokiselina, monomera, međusobno vezanih kovalentnim vezama [19] čineći polipeptidni lanac [44]. Kovalentna veza koja povezuje monomerne jedinice aminokiselina naziva se peptidnom vezom [44], pri čemu

peptidna veza (-CONH), tj. amidna veza, nastaje vezanjem  $\alpha$ -amino-skupine (-NH<sub>2</sub>) jedne aminokiseline s  $\alpha$ -karboksilnom skupinom druge aminokiseline (-COOH) [19, 45].

Shodno navedenom, primarnu strukturu proteina čine aminokiseline koje su povezane peptidnim vezama čineći polipeptidne lance [19]. Postoji dvadeset aminokiselina – glicin, alanin, valin, lizin, arginin, histidin, leucin, metionin, izoleucin, serin, treonin, cistein, aspartat, glutamat, prolin, asparagin, glutamin, fenilalanin, tirozin te triptofan. Svaka  $\alpha$ -aminokiselina u strukturi posjeduje vodikov atom, amino-skupinu, karboksilnu skupinu, R specifičnu skupinu (bočni ogranak) koje su povezane na središnji ugljikov atom,  $\alpha$ -ugljik, čineći  $\alpha$ -aminokiseline kiralnim molekulama. Kiralne molekule mogu postojati kao L-izomeri i D-izomeri. [19, 44, 46].

Proteini su građeni samo od L-aminokiselina, koji kod većine aminokiselina ima apsolutnu konfiguraciju *S*. Slijed aminokiselina koje su povezane peptidnim vezama i čine polipeptidni lanac, koji se sastoji od glavnog lanca – pravilno ponavljano dijela, te od varijabilnog dijela, kojeg čine bočni ogranaci [19]. Svi peptidi s manje od dvadeset aminokiselina nazivaju se oligopeptidima (ili samo peptidima), dok se veliki peptidi, polipeptidi, nazivaju proteinima, pri čemu slijed aminokiselina određuju geni [19, 45].

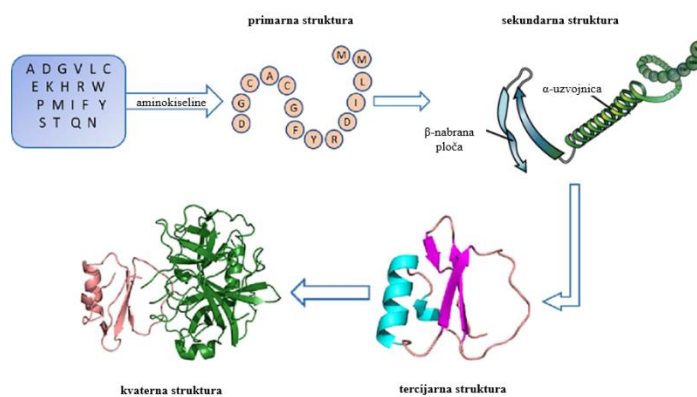
Budući da postoje različite skupine koje tvore polipeptid te da one mogu na različite načine međudjelovati intermolekulski i intramolekulski (sterička odbijanja, solvatacija, Van der Waalove privlačne sile), sekundarna i tercijarna struktura proteina podrazumijeva trodimenzijsku usmjerenost polimerne molekule [42]. U prirodi, većina proteina ima tercijarnu strukturu [47].

Sekundarna struktura podrazumijeva slaganje polipeptidnih lanaca u pravilne strukture, kao što su alfa-uzvojnica ( $\alpha$ -heliks), beta-list (beta-nabrani list,  $\beta$ -ploča), koje čine periodične strukture te u okrete ( $\beta$ -okreti) i omega ( $\Omega$ )- omče, koje nisu periodične.  $\alpha$ -uzvojnice,  $\beta$ -listovi i okreti nastaju zbog djelovanja vodikovih veza između skupina C=O i NH dviju bliskih aminokiselina u linearnoj strukturi, pri čemu nastaju sklopljeni segmenti. Točnije,  $\alpha$ -uzvojnici stabiliziraju vodikove veze između CO-skupine svake aminokiseline s NH-skupinom aminokiseline koja je četvrta po redu, stvarajući vodikov most između njih, pri čemu sve CO i NH skupine glavnog lanca sudjeluju u stvaranju vodikovih veza, dok aminokiseline koje se nalaze na krajevima uzvojnice ne sudjeluju u tvorbi vodikovih veza. Smjer uzvojnice može biti u smjeru kazaljke na satu (desni), koji je povoljniji zbog manjih steričkih smetnji između bočnih ogranaka i glavnog lanca, ili obrnutom od njega (lijevi). Sve otkrivene  $\alpha$ -uzvojnice u

proteinima imaju smjer kazaljke na satu. Iako udio  $\alpha$ -uzvojnice u proteinima može biti i do 100 % [19] ne mogu je izgraditi sve aminokiseline [42]. Druga konformacija u proteinima je  $\beta$ -ploča, koja je građena od dva ili više polipeptidnih lanaca, čije dijelove nazivamo  $\beta$ -nitima. Za razliku od štapičaste  $\alpha$ -uzvojnice,  $\beta$ -nit je skoro u potpunosti izdužena te, prilikom povezivanja više niti vodikovim vezama, nastaje  $\beta$ -ploča [19] u kojem peptidni lanac poprima cikcak-raspored [42]. Susjedne  $\beta$ -niti u  $\beta$ -pločama mogu teći u istome smjeru, tvoreći paralelni raspored (paralelna  $\beta$ -ploča), ili u suprotnom smjeru, tvoreći antiparalelni raspored (antiparalelna  $\beta$ -ploča). Paralelna struktura podrazumijeva vezanje vodikovom vezom NH-skupine svake aminokiseline s CO-skupinom pojedine aminokiseline u susjednoj niti, dok joj je CO-skupina vezana na NH-skupinu aminokiseline koja je druga po redu. Antiparalelnu strukturu karakteriziraju vodikove veze koje nastaju između NH- i CO- skupine svake aminokiseline s CO, tj. s NH-skupinom aminokiseline u susjednoj niti.  $\beta$ -okret (povratni okret, „ukosnica“) u mnogim slučajevima nastane kada CO-skupina  $i$  aminokiseline je vezana s NH-skupinom  $i+3$  aminokiseline vodikovim mostom, pri čemu dolazi do stabilizacije nagle promjene smjera određenog polipeptidnog lanca, što je uzrok kompaktnosti većine proteina dajući im globularni oblik. Uz  $\beta$ -okrete,  $\Omega$ -omče, koje nemaju pravilnu periodičnu strukturu, nalaze na samoj površini proteina, pri čemu sudjeluju u međudjelovanju proteina s drugim molekulama [19].

Raspored elemenata sekundarne strukture te interakcije bočnog lanca aminokiselina određuju trodimenzionalnu strukturu savijenog proteina te, samim time, i tercijarnu strukturu [48]. Stoga, pod tercijarnom strukturom podrazumijevamo cjelokupni prostorni oblik polipeptidnog lanca [19]. Mnoge  $\alpha$ -uzvojnice i  $\beta$ -niti su amfipatske, s hidrofobnim licem usmjerenim prema unutrašnjosti proteina te polarnijim licem usmjerenim prema otopini, dok neki proteini imaju obrnutu raspodjelu [19].

Kvaterni struktura podrazumijeva raspored mnogolančanih proteinskih kompleksa [42], podjedinica, kao i prirodu interakcija koje uzrokuju njihov prostorni razmještaj [19]. Shematski prikaz nastajanja strukture proteina prikazan je na slici 3.



**Slika 3.** Shematski prikaz nastajanja strukture proteina (prema Wajid i sur.) [49]

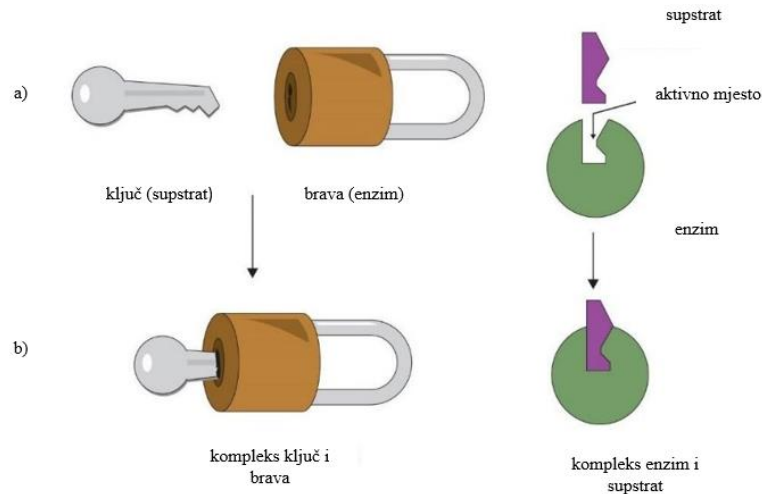
### 2.2.3. Specifičnost enzima

Izrazito važno svojstvo enzima je njihova specifičnost koja, za razliku od djelomično selektivnih kemijskih katalizatora, može biti potpuna prema supstratima. Stoga, specifičnost enzima može biti prema vrsti kemijske reakcije, vezama na kojima dolazi do reakcije, obzirom na produkte koji nastaju u reakciji [36] te čak i stereospecifična, katalizirajući reakcije samo jednog stereoizomernog oblika nekog spoja, što je od izrazite važnosti u sintezi lijekova i antibiotika. Upravo izrazita specifičnost enzima omogućuje živim stanicama istodobno neovisno odvijanje mnogobrojnih kemijskih procesa [35].

Aktivno mjesto enzima je mjesto gdje se vežu enzim i supstrat, tj. to je udubina na površini enzima na kojem se nalaze pobočni ogranci aminokiselina za koje se veže supstrat. U aktivno mjesto enzima specifično se vežu molekule supstrata prilikom čega dolazi do nekovalentnih interakcija te stvaranja kompleksa enzim-supstrat [36]. Osim udubina, aktivno mjesto enzima može biti u obliku pukotina, šupljina, rupa, džepova (engl. *pockets*), a budući da aktivno mjesto enzima ima jaki afinitet za supstrat, nastanak kompleksa enzim-supstrat ostvaruje se elektrostatičkim, hidrofobnim interakcijama te vodikovim vezama što zahtijeva vrlo malo energije [36, 50]. Aktivno mjesto se sastoji od mjesta vezanja i katalitičkog mjesta enzima, pri čemu samo neke aminokiseline u aktivnom mjestu enzima sudjeluju u stvaranju kompleksa enzim-supstrat, dok druge aminokiseline sudjeluju samo u katalitičkom procesu [36].

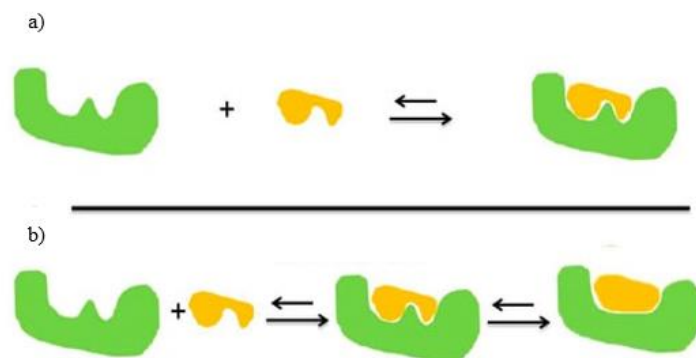
Specifičnost enzima prvi put je opisao E. Fischer krajem devetnaestog stoljeća [51] predlažući model „ključa i brave“ (engl. *the lock and key*), shematski prikazan na slici 4. Model

„ključa i brave“ opisuje enzimatsku aktivnost na način da aktivno mjesto nevezanog enzima je komplementarne geometrije kao supstrat, pri čemu supstrat pristaje u aktivno mjesto [19, 50] na specifičan način nalik ključu koji pristaje u samo jednu bravu [52].



**Slika 4.** Shematski prikaz mehanizma ključ-brava (prema Raval i sur.) [52]

Budući da enzimi imaju fleksibilne strukture te da se oblik aktivnog mjesta mijenja zbog interakcija sa supstratom, pojavila se potreba za drugim modelom koji će opisati ovakav mehanizam vezanja [50]. Drugi model kojim se opisuje specifično djelovanje enzima je predložio D. E. Koshland sredinom dvadesetog stoljeća te ga je nazvao „induciranim pristajanjem“ (engl. *induced fit model*) [19, 50]. Navedeni model opisuje prilagođavanje supstrata aktivnom mjestu enzima [36]. Razlika između modela „ključa i brave“ te modela „induciranog pristajanja“ shematski je prikazana na slici 5.



**Slika 5.** Razlika modela „ključ i brava“ (a) i modela induciranog pristajanja (b) (prema Chen i sur.) [53]

#### 2.2.4. Podjela enzima

Enzimi se međusobno razlikuju po strukturi i djelovanju, pri čemu većina enzima dobiva naziv po vrsti kemijske reakcije koju ubrzava, uz popratni sufiks „aza“ [37]. Razlikuju se šest glavnih skupina enzima; oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze te ligaze, kako je prikazano u tablici 2 [19].

**Tablica 2.** Pregled osnovnih skupina enzima i tipovi kemijskih reakcija koje kataliziraju [19, 20]

Skupina	Tip reakcije
Oksidoreduktaze	Oksidacija- redukcija
Transferaze	Prijenos acilnih, amino, glikozilnih ili fosforilnih skupina
Hidrolaze	Hidroliza – prijenos skupine na vodu
Liaze	Dodatak ili gubitak skupina uz nastanak dvostruke veze
Izomeraze	Izomerizacija - prijenos skupina unutar molekule; racemaze, epimeraze, intramolekularne oksidoreduktaze; intramolekularne transferaze
Ligaze	Spajanje dvaju supstrata uz utrošak ATP, kondenzacijske reakcije

#### 2.2.5. Oksidoreduktaze

Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije koje se zbivaju u samoj stanici [11], pri čemu dolazi do prijenosa atoma vodika iz supstrata kisiku ili kofaktoru ili dolazi do adicije vodika na supstrat [36]. Oksidoreduktaze omogućuju smanjenje sintetskih puteva do ciljanog produkta, prilikom čega dolazi do provedbe visoko selektivnih procesa, počevši od jednostavnih oksidacija alkohola do stereoselektivnih halogeniranja zasićenih C-H veza u blagim uvjetima, što čini procese okolišno prihvatljivima [54].

Prema Blank i sur. (2010) pojednostavljena podjela oksidoreduktaza obuhvaća četiri glavna razreda: dehidrogenaze, oksidaze, oksidogenaze te peroksidaze. Dehidrogenaze kataliziraju povratne reakcije pa se primjenjuju u biokatalitičkim reakcijama oksidacije i

redukcije. Za razliku od njih, oksidaze, oksigenaze te peroksidaze jedino kataliziraju reakcije oksidacije koje su nepovratne [55].

Uobičajeno, za rad oksidoreduktaza potreban je redoks kofaktor, poput NAD(P)H ili NAD(P)<sup>+</sup>, koji funkcioniraju kao elektron-donori ili u prihvatanju kosupstrata. Iznimka od navedenog su peroksidaze, koje reduciraju vodikov peroksid do vode te oksidaze koje reduciraju molekulu kisika (O<sub>2</sub>) do vodikovog peroksida ili vode [11, 55].

Oksidoreduktaze se upotrebljavaju u mnogobrojnim procesima značajnih za kemijsku i farmaceutsku industriju, poput upotrebe u kataliziranju nastanka kiralnih produkata s visokim iskorištenjem reakcije (do 100 %), provođenju oksidacije aldehida, alkohola, kiselina, aromatskih spojeva, Baeyer-Villigerovim reakcijama oksidacije, oksifunkcionalizaciji C=C te C-N veza, selektivnom uvođenju kisika (O<sub>2</sub>) u C-H veze, kao i u redukciji aldehida, ketona, C=C i C=N veza, što ih čini, uz hidrolaze, najprimjenjivijim enzimima u industriji [55].

### 2.2.5.1. Alkohol dehidrogenaze

Alkohol dehidrogenaze (ADH, ponekad i karbonilne reduktaze, KRED) pripadaju oksidoreduktazama koje kataliziraju prijenos elektrona između reducensa, elektron-donora, do oksidansa, elektron-akceptora [56, 57].

Ovisno o vrsti u kojoj se nalaze, u njihovom nastanku sudjelovat će različit broj gena (*Adh*). Alkohol dehidrogenaze se nalaze u citosolu stanice, pri čemu mogu reverzibilno oksidirati primarne i sekundarne alkohole u odgovarajuće aldehide, tj. ketone [58]. Za svoj rad zahtijevaju prisustvo koenzima nikotin adenin dinukleotida (NAD<sup>+</sup>) ili nikotin adenin dinukleotid fosfata (NADP<sup>+</sup>) [59].

Prema Gaona-López i sur. razlikuju se tri skupine alkohol-dehidrogenaza. Prvu skupinu alkohol dehidrogenaza ovisnih o cinku, srednjelančanih, otkrili su F. Batelli i L. Stern prije stotinjak godina kada su dobili prvu topljivu alkohol dehidrogenazu iz konjske jetre. Istraživanja koja su uslijedila pokazala su da navedeni enzim, kako bi bio aktivan, zahtijeva prisustvo kozimaza (engl. *co-zy-mase*) ili NAD<sup>+</sup>. Godine 1937. E. Negelein i H. J. Wulff izolirali su i kristalizirali alkohol dehidrogenazu iz pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), te je godine 1948. uslijedila izolacija navedenog enzima iz konjske jetre, pri čemu je nekoliko godina poslije ustanovljeno da je cink funkcionalna komponenta alkohol dehidrogenaze u kvascu i konjskoj jetri [60]. Srednjelančane ADH (E.C. 1.1.1.1.) sadrže 327-378 aminokiselina u lancu te su uglavnom ovisne o cinku [61]. Kako bi provele oksidaciju



primarnih i sekundarnih alkohola do pripadajućih aldehida, tj. ketona, koriste kofaktor NADH ili NADPH kako bi se ostvario prijenos vodikovog atoma [55], pri čemu se popratno reducira  $\text{NAD}^+$  ili  $\text{NADP}^+$  [62]. Srednjelančane alkohol dehidrogenaze su metaloenzimi cinka, sadržavajući dva tetraedatski koordinirana iona cinka po podjedinici – jednim katalitičkim koji se nalazi na aktivnom mjestu, stupajući u reakciju s tri proteinska liganda i molekulom vode, te drugim, strukturnim, koji utječe na interakcije podjedinica sa četiri proteinska liganda [63]. Većina alkohol dehidrogenaza koje su ovisne o cinku provode redoks reakcije specifičnim kemoselektivnim, regioselektivnim i stereoselektivnim putevima te se koriste u mnogobrojnim povratnim redoks reakcijama [55]. Iako njihova primjena ima određene nedostatke, kao što je dobivanje spojeva niske optičke čistoće, cijele stanice iz pekarskog kvasca se skoro čitavo stoljeće koriste u organskim reakcijama te u sustavima regeneracije koenzima zbog netoksičnosti, ekonomičnosti te jednostavnosti primjene, pri čemu je najšira primjena pekarskog kvasca u reakcijama asimetrične redukcije ketona [64].

Drugu skupinu alkohol dehidrogenaza čine kratkolančane alkohol dehidrogenaze, koje su prvi put 1968. godine W. Sofer i H. Ursprung izolirali iz vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) [60]. Njima pripada i alkohol dehidrogenaza izolirana iz *Lactobacillus brevis* [65], koja je R-specifična, stabilna te katalizira enantiomernu redukciju prokiralnih ketona do odgovarajućih sekundarnih alkohola, uz NADP(H) kao kofaktor [66].

Treću skupinu 1981. godine otkrio je C. Wills sa suradnicima pronalazeći dvije različite aminokiseline kod *Zymomonas mobilis* koje je R. K. Scopes opisao kao željezom aktiviranim alkohol dehidrogenazama (FeADH). Zasad nisu mnogo proučavane [60].

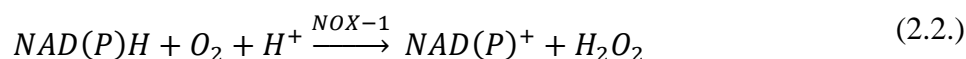
Istraživanjima koja su uslijedila, ustanovljeno je da su alkohol dehidrogenaze prisutne u prokariotima, nižim i višim eukariotima, tj. biljkama i životinjama, kao i u sisavcima - mišu, konju, čovjeku [61, 67], te da su odgovorne za provedbu bioloških oksidacija, kao i sintezu etanola i drugih alkohola u brojnim organizmima, pri čemu količine i vrsta alkohol dehidrogenaza ovisi o fiziološkim uvjetima te tipu tkiva ili organa [67].

Alkohol dehidrogenaze se desetljećima upotrebljavaju u industriji za proizvodnju kiralnih komponenata pri blagim uvjetima [68], što ih čini komercijalnim biokatalizatorima [69]. Budući da se rijetki katalizatori mogu primjenjivati za oksidacijske i redukcijske reakcije, pri čemu alkohol dehidrogenaze s visokom selektivnošću mogu katalizirati oksidaciju alkohola i redukciju karbonilnih spojeva, proteklih desetljeća uvelike se istražuje primjena alkohol dehidrogenaza u organskoj sintezi [57]. Stoga, alkohol dehidrogenaze se široko

primjenjuju u proizvodnji finih kemikalija, aktivnih farmaceutskih tvari (engl. *active pharmaceutical ingredients*, API) [56], optički aktivnih tvari, agrokemikalija, parfema, biosenzora, biogoriva te brojnih drugih [59]. Smatra se da će se uskoro primjenjivati za proizvodnju komercijalnih kemikalija i da će postati nezamjenjiv katalizator za sve putove kemijske sinteze [57].

### 2.2.5.2. NAD(P)H oksidaza

NAD(P)H oksidaze (NOX) su flavin adenin dinukleotid (FAD) ovisne oksidaze [70] koje kataliziraju oksidaciju NAD(P)H na način da istodobno reduciraju molekularni kisik do molekule vode (H<sub>2</sub>O), NOX-2, ili vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), NOX-1 [70, 71]. Budući da za svoje djelovanje trebaju samo unutarstanični kisik te NAD(P)H kao kosupstrate [72] imaju brojne primjene u biotehnologiji [71]. Jednadžba 2.2. prikazuje dvoelektronske redukciju molekularnog kisika (O<sub>2</sub>) s NOX-1 enzimom, dok je četveroelektronska redukcija s NOX-2 enzimom prikazana jednadžbom 2.3. [70, 73]



NADH oksidaze pripadaju flavoproteinskim disulfidnim reduktazama koje kataliziraju reakcije redukcije supstrata koje su ovisne o pridin-nukleotidu. Ovisno o supstratu te nastajućim produktima, imaju različite fiziološke uloge u mnogobrojnim organizmima. Razlikuju se dvije vrste: NOX-1 koje stvaraju vodikov peroksid te NOX-2 koje stvaraju vodu, pri čemu imaju važnu ulogu u održavanju ravnoteže NAD<sup>+</sup>/NADH te u zaštiti pojedinog organizma od oksidativnog stresa [74]. Budući da vodikov peroksid može imati negativan utjecaj na glavnu reakciju, NOX-2 su prikladnije za enzimatske reakcije [73]. NADH oksidaze mogu se pronaći u *Enterococcus (Streptococcus) faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Clostridium aminovalericum* [75], *Archaeoglobus fulgidus*, *Borrelia burgdorferi* te u brojnim drugim organizmima [73], pri čemu se NADH-oksidaze koje stvaraju vodu pronaći u bakterijama poput *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus Pyogenes* [71].

NADPH oksidaze su enzimi smješteni u unutarstaničnim organelima [76] te su glavni izvor reaktivnih vrsta kisika (ROS) u eukariotskim stanicama [77]. Prvotno su opisane u fagocitima sisavaca gdje je otkriveno da uništavaju bakterije koristeći NADPH i molekularni

kisik kao supstrate. Danas se zna da sisavci imaju sedam vrsta NADPH oksidaza, NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4, NOX-5, Duox-1 te Duox-2 koje se razlikuju po specifičnom djelovanju te raspodjeli u tkivima, imajući glavnu ulogu u staničnoj diferencijaciji, starenju te apoptozi [78].

Budući da vodikov peroksid i voda nisu značajni produkti u reakcijama, NAD(P)H oksidaze se koriste u regeneraciji kofaktora [72].

### **2.3. Katalitička aktivnost enzima**

Prema definiciji, „katalizator je tvar koja utječe na brzinu i (ili) smjer kemijske reakcije, ali se ne troši u samom procesu, odnosno reakciji“ [79]. Stoga, katalizator:

- 1) može ubrzati ili usporiti, inhibirati, kemijsku reakciju
- 2) u složenim reakcijama utječe na selektivnost ubrzavajući samo neke reakcije od više mogućih
- 3) za vrijeme reakcije se ne troši se u značajnijoj količini
- 4) ne može mijenjati ravnotežu povratnih (reverzibilnih) reakcija, no može ubrzati postizanje ravnoteže
- 5) unutar reakcijskog mehanizma mora reagirati s reaktantima barem u jednoj reakciji
- 6) mijenja reakcijski mehanizam, pri čemu se snižava energija aktivacije ( $E_a$ ) te se reakcija ubrzava [79]

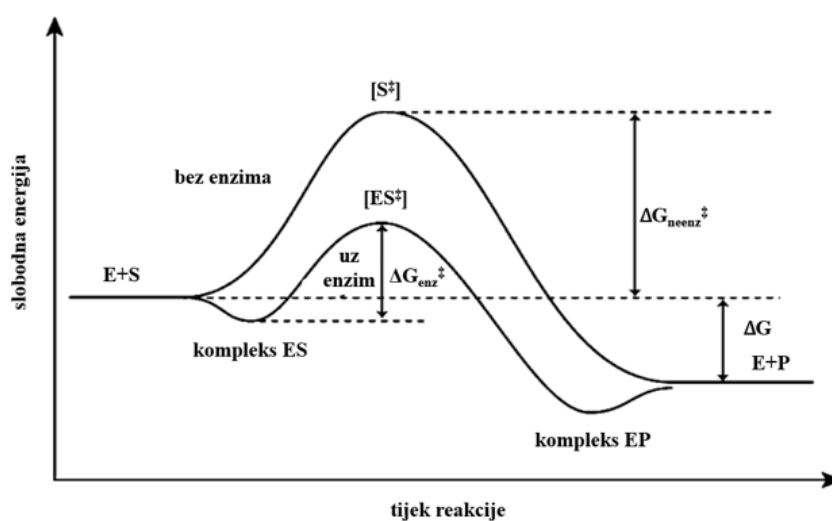
Za enzime kao katalizatore vrijede ista pravila kao za kemijske katalizatore. Oni ubrzavaju samo one reakcije koje su termodinamički moguće, na način da smanjuju količinu energije potrebnu za nastajanje kompleksa, aktiviranog ili prijelaznog stanja [36] jer se enzim čvršće veže na međuprodukt u prijelaznom stanju, nego što se veže za supstrate ili produkte [35]. Također, ne mijenjaju se za vrijeme reakcije pa je moguća njihova ponovna upotreba. Ne mijenjaju ni ravnotežu niti usmjerenost reakcije. Međutim, u odnosu na kemijske katalizatore djelotvorniji su i specifičniji [36].

#### **2.3.1. Mehanizam enzimatske aktivnosti**

Enzimi kao katalizatori u živim sustavima, kataliziraju reakcije stabilizirajući prijelazno stanje, ne mijenjajući ravnotežu kemijske reakcije niti zakone termodinamike. Enzimatska kataliza započinje vezanjem supstrata za enzim, pri čemu se, ukoliko se uspostavi

veliki broj interakcija između supstrata i enzima, oslobađa energija vezanja koja povećava katalitičku učinkovitost i uspostavlja supstratnu specifičnost [19].

Godine 1948. L. Pauling iznio je tezu kako smatra da su enzimi molekule koje su komplementarne strukture s aktiviranim kompleksima reakcija koje kataliziraju. Njegova teza je prihvaćena te se danas koristi za opisivanje enzimatskih reakcija [80]. Prema njegovoj teoriji, enzim (E) i supstrat (S) tvore kompleks (ES) mehanizmom „ključa i brave“. Na taj se način aktivira supstrat te dolazi do nastanka prijelaznog stanja (engl. *transition state*)  $[ES^\ddagger]$  [7], privremene, najmanje stabilne te najrjeđe zastupljene molekulske strukture koja nije supstrat, niti produkt te koja posjeduje najvišu slobodnu energiju. Gibbsova slobodna energija aktivacije ( $\Delta G^\ddagger$ ), tj. energija aktivacije, definira se kao razlika slobodne energije prijelaznog stanja i supstrata [19]. Enzimatski katalizirana reakcija zbog stabilizacijskog djelovanja enzima ima znatno manju energiju aktivacije ( $\Delta G_{enz}^\ddagger$ ) od neenzimatske reakcije ( $\Delta G_{neenz}^\ddagger$ ), čiji se reakcijski put odvija bez enzima, preko prijelaznog stanja  $[S^\ddagger]$  [7]. Dakle, enzimi ubrzavaju reakciju snižujući energiju aktivacije ( $\Delta G^\ddagger$ ), pri čemu više molekula ima potrebnu energiju da dosegnu prijelazno stanje [19]. Na slici 6 prikazan je mehanizam biokatalize.



**Slika 6.** Mehanizam enzimatske katalize (prema Shoda i sur. [7])

Kako bi znatno ubrzali kemijske reakcije, enzimi koriste različite kombinacije četiri opća mehanizma [35], nazvanim još i katalitičkim strategijama [19]:

- 1) Kataliza približavanjem

Prema kinetičkoj teoriji, kako bi dvije molekule reagirale potrebno je da se dvije molekule približe na udaljenost koja je pogodna za stvaranje veze, ili da se „sudare“. Što je veća koncentracija molekula, to će se češće sudarati te će brzina reakcije biti veća [35].

## 2) Kiselinsko - bazna kataliza

Razlikuje se opća i specifična kiselinsko-bazna kataliza. Opća kiselinska te opća bazna kataliza podrazumijeva reakcije čija brzina ovisi o svim prisutnim kiselinama ili bazama, dok se specifično kiselinska, tj. bazna kiselina odnosi samo na protone ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ) ili  $\text{OH}^-$  ione. Odnosno, brzina reakcije ovisit će o promjeni koncentracije protona, ali neće ovisiti o proton donorima ili proton akceptorima koji se nalaze u otopini ili u aktivnom mjestu [35].

## 3) Kataliza naprežanjem

Kataliza naprežanjem podrazumijeva enzimatsko kataliziranje reakcija kidanja kovalentne veze, litičkih reakcija, pri čemu se veže supstrat u konformaciji koja je nepovoljnija za kidajuću vezu. Izazvano naprežanje uzrokuje savijanje ili istežanje ciljne veze slabeći ju te ju čineći podložnijom kidanju [35].

## 4) Kovalentna kataliza

Kovalentna kataliza podrazumijeva stvaranje kovalentne veze između supstrata, jednog ili više njih, i enzima, pri čemu modificirani enzim postaje reaktant stvarajući novi reakcijski put s nižom energijom aktivacije. Modifikacija enzima je privremena te se enzim nakon reakcije vraća u početno stanje gdje ima samo katalitičku ulogu [35].

### 2.3.2. Kofaktori

Kofaktori su male molekule o kojima ovisi katalitička aktivnost mnogobrojnih enzima. Mogu se podijeliti na dvije skupine; na metale te na male organske molekule, koenzime. Enzim se, bez kofaktora, naziva apoenzimom imajući samo proteinsku komponentu, dok se potpuni enzim naziva holoenzimom jer uz apoenzim sadržava neproteinsku komponentu, prostetičku skupinu ili koenzim [19, 36].

Prostetička skupina je kompleks koji čine male molekule koje se čvrstim i stabilnim kovalentim ili nekovalentim vezama ugrađuju u strukturu proteina [35, 36]. Najčešće prostetičke skupine su metali, često su kompleksirani, poput hema, pri čemu se trećina enzima koja sadrži čvrsto vezane ione metala naziva metaloenzimima. Metali, osim što mogu sudjelovati u redoks reakcijama, mogu učiniti enzime boljim elektrofilima ili nukleofilima,

moгу olakšati stvaranje kovalentnih veza s intermedijerima reakcije, kao i prilagodbu ili vezanje supstrata [35].

Andreini i sur. su, istrađujući bazu „Metal-MACiE”, zaključili da su magneziji, cink, željezo najprisutniji u enzimima, pri čemu magneziji prednjači zbog uloge koje ima u supstratima koji sadrže fosfat, uključujući ATP, DNK, RNK. Po učestalosti slijede ih mangan, molibden, kobalt, nikal te bakar. Oksidoreduktaze najčešće koriste metale kao redoks centre, posebice željezo, dok su često i vezani na organske kofaktore, koenzime, kao što je primjerice hem na željezo te B<sub>12</sub> za kobalt [81]. Za razliku od njih, kod koenzima neproteinske se komponente i apoenzim vežu nekovalentnom vezom imajući ulogu obnovljivih prijenosnika jer prenose supstrate s mjesta nastanka na mjesto njihove potrošnje, pri čemu se nakon reakcije vraćaju u početni oblik [35, 36]. Iako djeluju kao kosupstrati, slabo vezani koenzimi se od uobičajenih supstrata razlikuju po izvoru te po tome što mnogi enzimi upotrebljavaju iste koenzime, pri čemu provode katalitičku reakciju sličnim mehanizmom [19].

Koenzimi su, stoga, biološki aktivni oblici hidrofilnih vitamina [82] te su kao i mnoge prostetičke skupine u vodi topljivi derivati vitamina. Mnogi koenzimi, prostetičke skupine te kofaktori derivati su vitamina B [35, 36].

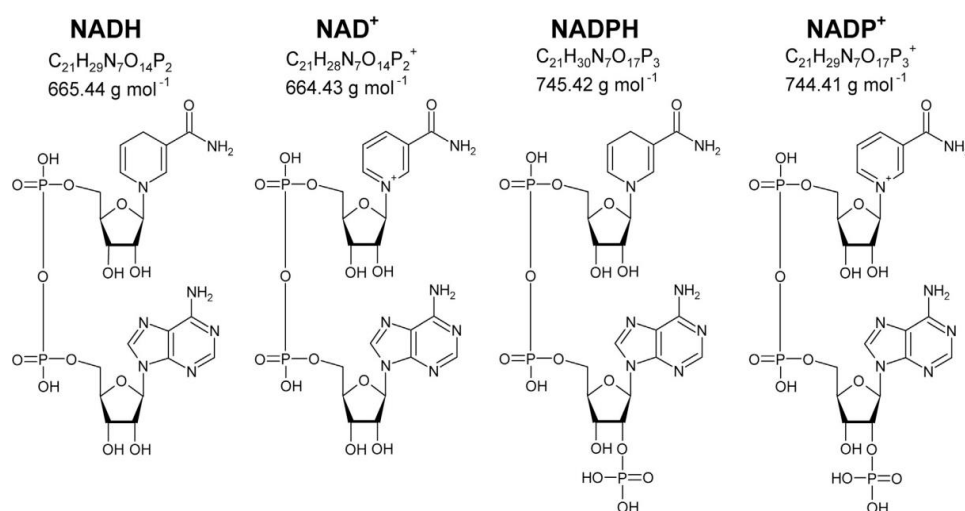
### **2.3.3. Koenzim NAD(P)<sup>+</sup>**

NAD(H) te NADP(H) pripadaju piridinskim nukleotidima koji u brojnim anaboličkim i kataboličkim reakcijama posreduju u prijenosu elektrona [83] sudjelujući u brojnim biološkim procesima, kao što su metabolizam energije, ekspresija gena, mitohondrijski te imunološki procesi, stvaranje oksidativnog stresa, antioksidativno djelovanje, održavanje homeostaze kalcija, starenju te u staničnoj apoptozi [84]. U stanici nalaze se u citosolu i u mitohondrijima, pri čemu je u fiziološkim uvjetima u citosolu koncentracija NAD<sup>+</sup> veća od NADH, dok je koncentracija NADPH puno veća od NADP<sup>+</sup> [84]. Oksidirani oblici piridinskih nukleotida su NAD(P)<sup>+</sup>, dok su reducirani oblici NAD(P)H [85].

Piridinski nukleotidi prepoznaju se po derivatu piridina – nikotinamidu. Stoga, nikotinamid adenin dinukleotid se sastoji od dva nukleotida, nikotinamida te adenina, povezanih glikozidnom vezom s dvjema ribozama [83]. Za razliku od NADH, NADPH sadrži fosfat koji je esterski vezan na 2'-hidroksilnu skupinu adenzinskog dijela molekule, pri čemu fosforilna skupina dirigira enzimima treba li elektrone visokog potencijala upotrijebiti u anaboličkim ili kataboličkim reakcijama [19]. NAD<sup>+</sup> je, kao i FAD, prenositelj energije, derivat

adenozin-trifosfata (ATP), energijom bogate molekule koja u trifosfatnoj jedinici sadržava dvije fosfoanhidridne veze, visokoenergijske veze koje pri hidrolizi oslobađaju puno energije. Reaktivni dio  $\text{NAD}^+$  je nikotinamidni prsten koji je sintetiziran iz vitamina niacina. Pri oksidaciji supstrata  $\text{NAD}^+$  prima dva elektrona i vodikov ion te nastaje reducirani oblik, NADH. Dok se NADH najviše upotrebljava za stvaranje ATP, NADPH se uglavnom upotrebljava za redukcijske biosinteze. NADH, NADPH i  $\text{FADH}_2$  bez katalizatora sporo reagiraju s kisikom, što je od velike važnosti za obavljanje njihove biološke funkcije [19].

Razlike u strukturama NADH,  $\text{NAD}^+$ , NAD(P)H i  $\text{NADP}^+$  su prikazane na slici 7.



**Slika 7.** Razlike u strukturama NADH,  $\text{NAD}^+$ , NAD(P)H i  $\text{NADP}^+$  [9]

Obzirom da se unutarstanična ravnoteža između NAD(H) i NADP(H) regulira dodavanjem ili uklanjanjem fosfata skupine pomoću NAD(H) kinaze, tj. NADP(H) fosfataze, biosinteza  $\text{NAD}^+$  je ključna za metabolizam  $\text{NADP}^+$ . Dva glavna puta biosinteze  $\text{NAD}^+$  su *de novo* i *salvage* put [86].

U ljudskom organizmu  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  nastaju iz vitamina nikotinamida [35] (niacina, vitamin B<sub>3</sub>) [19] te su značajni koenzimi mnogih dehidrogenaza, pri čemu se koenzimi mogu obnoviti u reakcijama s odgovarajućim elektron-akceptorom te se mogu povratnim reakcijama disocijacijom odvojiti od apoenzima. Dehidrogenaze koje vežu  $\text{NAD}^+$  kataliziraju redoks reakcije oksidacijskih metaboličkih puteva, kao što su mitohondrijski respiracijski lanac, glikoliza, ciklus limunske kiseline dok dehidrogenaze koje vežu  $\text{NADP}^+$  uglavnom kataliziraju reakcije redukcijских sinteza, kao što su redukcijske biosinteze masnih kiselina, sinteze steroida te metabolički put pentoza-fosfata [35].

Kofaktor NAD(P)H je nositelj energije u enzimatskim redoks reakcijama koje su primjenjivane za sintezu vrijednih kemikalija i farmaceutika [87]. NAD(H) se koristi u biotehnologiji, farmakologiji, biosenzorima, u terapiji kod određenih bolesti, kao što su Alzheimerova, Parkinsonova bolest, u sintezi spojeva visokih dodatnih vrijednosti kao što su prehrambeni aditivi, lijekovi, parfemi, insekticidi i pesticidi, u nastanku kiralnih komponenti, u industrijski važnim sintezama gdje konvencionalna kataliza nije pogodna [88].

Nadalje, mnogi prirodni produkti od industrijske važnosti su kompleksni sekundarni metaboliti za čiju proizvodnju trebaju enzimi ovisni o NADPH. NADPH se koristi u pripravi medicinskih tvari [86], poput biosinteze flavonoidnih polifenola (+) – katehina i leukoantocijanidina, koji služe kao prekursori mnogih biološki aktivnih flavonoida [89], (esencijalnih) aminokiselina, biorazgradivoj plastici, kao i u molekulama koje se koriste u biogorivima [86].

Budući da je kofaktor NAD(P)H vrlo skup da se koristi u stehiometrijskim količinama u industrijskim procesima te obzirom na njihovu široku primjenu, potrebno je pronaći učinkovit i ekonomičan način regeneracije [87].

## 2.4. Regeneracija koenzima

Budući da koenzimi, za razliku od enzima, prolaze kroz kemijske reakcije sa supstratima tijekom procesa katalize i pretvaraju se u odgovarajuće reducirane ili oksidirane oblike, preskupi su da bi se koristili u stehiometrijskim količinama za sintezu velikih razmjera bez regeneracije [8].

Obzirom na mehanizam regeneracije, razlikuju se četiri metode regeneracije koenzima: enzimatska, kemijska, fotokemijska te elektrokemijska. Budući da svaka od navedenih metoda ima određene prednosti i mane, za industrijsku primjenu važan je ukupan broj obrtaja koenzima (eng. *Total Turnover Number*, TTN) [8], definiranog kao omjer molova proizvedenog produkta i molova koenzima korištenog u reakciji [90], tj. kao broj molova dobivenog produkta nastalog utroškom jednog mola koenzima tijekom cijele reakcije [8]. Ukoliko je TTN veći od tisuću, proces se može smatrati ekonomičnim [9]. Osim smanjenja troškova stereoslektivnih enzimatskih transformacija, regeneracija kofaktora može potaknuti termodinamički nepovoljne reakcije usmjeravajući ih u smjeru obrnutom od ravnoteže [91].

Enzimatska regeneracija koenzima ima određene prednosti u odnosu na druge metode. Ekološki je prihvatljiva, odlikuje se visokom selektivnošću, velikim TTN te kombinacijom



sinteze ciljanog produkta s *in situ* procesima regeneracije. Također, ima i nedostatke kao što je zahtjevna izolacija produkta, nestabilnost enzima te visoka cijena enzima [8]. No, unatoč manama, jedina je primjenjivana metoda regeneracije kofaktora u industriji [9].

#### **2.4.1. Enzimatska regeneracija koenzima NAD(P)<sup>+</sup>**

Budući da su nikotinamid adenin dinukleotidi NAD(P)H vrlo skupi (cijena NADH je 2 600 \$/mol te NADPH 70 000 \$/mol), zadnjih četrdesetak godina istražuju se načini kako bi na učinkovit i ekonomičan način regenerirali. Razvili su se biokatalitički, fotokatalitički, kemijski, elektrokemijski, homogenokatalitički te heterokatalitički pristupi [87].

Kao što je prethodno navedeno, alkohol dehidrogenaze oksidiraju alkohole do ketona koristeći kofaktor NAD(P)<sup>+</sup> koji se regenerira *in situ* koristeći kosupstrat, pri čemu se NAD(P)H oksidaza može upotrijebiti za kataliziranje ponovne oksidacije kofaktora pomoću kisika [92, 93]. Regeneracija kofaktora NADPH i NADH može se ostvariti koristeći cijele stanice ili izolirane enzime [94].

Budući da je oksidacija alkohola s NAD(P)<sup>+</sup> termodinamički manje povoljna od obrnute reakcije, ukazuje se potreba za učinkovitim regeneriranjem kofaktora kako bi se reakcija odvila željenom smjeru. Spajanjem ADH s enzimom NOX, koji može oksidirati reducirani kofaktor NAD(P)H pomoću kisika, ravnoteža se usmjerava k ubrzavanju (kataliziranju) oksidacije alkohola. To jest, spajanje dvaju enzima djeluje poput alkoholne oksidaze; alkoholni supstrat se pretvara na račun kisika, pri čemu se proizvodi vodikov peroksid, a regeneracija NAD(P)<sup>+</sup> se osigurava dodatkom viška „žrtvenog“ ketonskog supstrata, kao što je, primjerice, aceton, koji se lako reducira s ADH [91].

Dokazano je da NOX može vrlo uspješno regenerirati koenzime NAD(P)<sup>+</sup> u mnogobrojnim enzimatskim reakcijama koje imaju industrijsku primjenu [71].

## **2.5. Modeliranje bioprocasa**

Modeliranje bioprocasa podrazumijeva razvijanje i validiranje matematičkih prikaza određenog bioprocasa. Rezultirajući modeli, koji mogu imati oblik algebarskih, običnih ili parcijalnih diferencijalnih jednadžbi, ili njihovih kombinacija, mogu se dobiti na temelju mehanizma reakcije, podataka o njoj ili kombinacijom navedenih. Provodi se kako bi se razumio i kontrolirao proces, kako bi se procijenilo stanje procesa [95], provela kinetička, procesna analiza te dizajnirao proces [96].

Prema Sin i sur. modeli biokatalitičkih reakcija se mogu podijeliti na četiri vrste [96]:

- 1) katalizatorski modeli, koji opisuju katalizator na molekularnoj razini kako bi predvidio selektivnost reakcije;
- 2) reakcijski modeli, koji uključuju kinetičke modele mehanizma reakcije osnovane na upisanim vrijednostima koncentracije, temperature, pH;
- 3) rektorski modeli, koji uključuju kinetičke modele promatrane reakcije, uključujući hidrodinamičke uvjete i bilance tvari;
- 4) procesni modeli, koji služe za analizu cjelokupnog procesa, kao što su modeli enzimske reakcije, granulacije, kristalizacije.

Proces modeliranja se sastoji od pet koraka. Prvenstveno, treba se definirati svrha željenog modela; je li proces izvediv, hoće li se primjenivati u dizajniranju procesa ili njegovoj analizi. Nadalje, potrebno je unijeti reakcijski mehanizam i druge relevantne procesne jedinice, poput prijenosa mase. Ovaj korak određuje opseg i smjer eksperimentalnog istraživanja. Nakon prikupljanja eksperimentalnih podataka kako bi se odredio mehanizam reakcije, treći korak podrazumijeva definiranje strukture modela, što obuhvaća reakcijsku kinetiku, kao i neke druge karakteristike procesa, kao što je model reaktora, prijenos mase, vrsta miješanja... U četvrtom koraku procjenjuju se parametri modela za eksperimentalne podatke, pri čemu procjena parametara treba biti nadopunjena validacijom modela, kako bi se utvrdila pouzdanost modela. Peti, posljednji korak, sastoji se od korištenja modela za svrhu koju je napravljen, primjerice, za simulaciju pri drugim uvjetima [96].

Biotransformacije su procesi u kojima enzimi kataliziraju reakcije pretvorbe reaktanta, čiste supstance, u slične produkte. Modeliranje i simulacija biotransformacija ima velik potencijal u pronalasku optimalnih reakcijskih uvjeta [97] kako bi se postiglo maksimalno iskorištenje reakcije [98], u osmišljavanju i unaprjeđenju procesa, nadgledanju reakcije, procjeni troškova te usporedbi sličnih procesa. Stoga, shodno svemu navedenom, optimizacija procesa utječe na ekonomičnost i ekološku prihvatljivost reakcije [97].

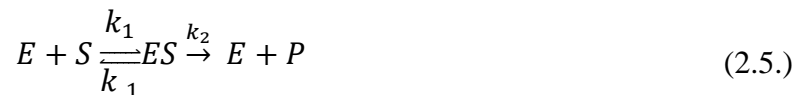
Matematičko modeliranje enzimskih reakcija se koristi unazad tridesetak godina, a Sin i sur. navode kako će biti izuzetno važno u budućnosti [96].

### 2.5.1. Kinetika enzimatskih reakcija

Biokemija se značajno razvijala tijekom devetnaestog stoljeća, pri čemu se prekretnica ove znanosti dogodila 1913. godine kada su L. Michaelis i M. Menten predložili model u kojem dovode u vezu brzinu enzimatske reakcije i koncentraciju supstrata [19, 99]. Prema njihovoj zamisli, nezaobilazno međustanje u katalizi je specifičan kompleks ES, kako je prikazano u reakciji [19]:



Odnosno, enzim, E, se uz konstantu brzine  $k_1$  povezuje sa supstratom, S, u kompleks ES, pri čemu kompleks ES može disocirati na E i S uz  $k_{-1}$  ili može dati produkt, P, uz  $k_2$ . Uz konstantu brzine  $k_{-2}$  iz E i P ponovo može nastati kompleks ES. Pojednostavljeno, promatrajući brzinu na početku reakcije ( $r_0$ ), kada je koncentracija produkta zanemariva, pri čemu nema povratne reakcije ( $k_{-2}c_P \approx 0$ ), vrijedi izraz:



Za određivanje brzine na početku reakcije za svaku koncentraciju supstrata, prije nego što se nakupi P, vrijedi:

$$r_0 = k_2 c_{ES} \quad (2.6.)$$

Budući da  $c_{ES}$  nije poznata veličina, G. Briggs i J. Haldane su 1924. g. pretpostavili da postoji ustaljeno stanje u kojem koncentracije međuprodukta (kompleksa ES) ostaju nepromijenjene, dok se koncentracije reaktanta i produkta mijenjaju, pri čemu se ustaljeno stanje postigne kad su brzine nastanka kompleksa i njegove razgradnje jednake, kao što je prikazano u izrazu:

$$k_1 c_E c_S = (k_{-1} + k_2) c_{ES} \quad (2.7.)$$

Odnosno, preuređenjem jednadžbe, dobiva se:

$$\frac{c_E c_S}{c_{ES}} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.8.)$$

Uz uvođenje Michaelisove konstante,  $K_m$ , jednadžba (2.8.) poprima oblik [19]:

$$K_m = \frac{c_E c_S}{c_{ES}} \quad (2.9.)$$

Odnosno [19];

$$c_{ES} = \frac{c_E c_S}{K_m} \quad (2.10.)$$

Michaelisova konstanta, stoga, predstavlja afinitet enzima prema supstratu. Što je veći afinitet, to je manja vrijednost konstante [99].

Budući da je enzim prisutan u mnogo manjoj koncentraciji od supstrata, koncentracija slobodnog supstrata  $c_S$  je približno jednaka ukupnoj koncentraciji supstrata. Stoga, koncentracija slobodnog enzima,  $c_E$ , jednaka je cjelokupnoj koncentraciji enzima,  $c_{ET}$  umanjenu za koncentraciju  $c_{ES}$ :

$$c_E = c_{ET} - c_{ES} \quad (2.11.)$$

Sređivanjem prethodnog izraza te uvrštavanjem u početni izraz, dobiva se:

$$r_0 = k_2 c_{ET} \frac{c_S}{c_S + K_m} \quad (2.12.)$$

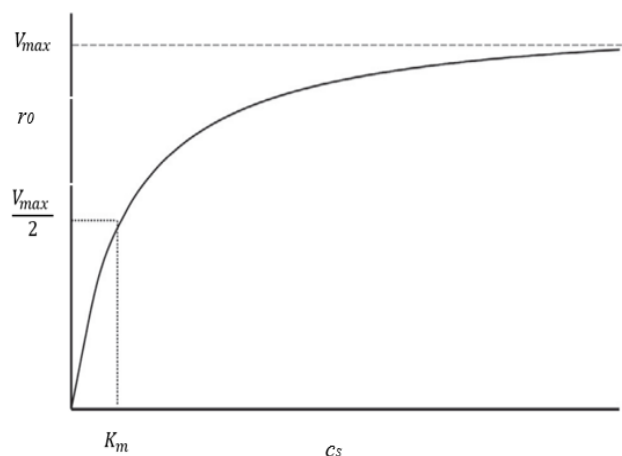
Maksimalna brzina reakcije,  $V_m$ , postiže se kada je  $c_{ET} = c_{ES}$ , tj. kad su sva katalitička mjesta na enzimu zasićena supstratom:

$$V_{max} = k_2 c_{ET} \quad (2.13.)$$

Uvrštavanjem prethodne dvije jednadžbe dobiva se Michaelis-Mentenična jednadžba;

$$r_0 = V_{max} \frac{c_S}{c_S + K_m} \quad (2.14.)$$

Kada je  $K_m = c_S$ , tada je  $r_0 = V_m/2$ , što dovodi do značenja Michaelisove konstante. Michaelisova konstanta je jednaka koncentraciji supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne brzine. Na slici 8 može se vidjeti da se brzina reakcije  $r_0$  se, s povećanjem koncentracije supstrata  $c_S$ , asimptotski približava maksimalnoj brzini [19].



**Slika 8.** Kinetika Michaelis-Menten (prema Talens-Perales i sur. [99])

### 2.5.2. Kinetika dvosupstratnih reakcija

Mnoge biokemijske reakcije uključuju više od jednog supstrata. Kod dvosupstratnih enzimskih sustava, enzimi uspostavljaju interakcije s dva supstrata kako bi dali jedan ili više produkata [100]. Iako su kompleksnije od jednostupstratnih [101], za njih vrijede ista pravila kao i za jednosupstratne reakcije [35].

Za proučavanje reakcijske kinetike primjenom kinetike Michaelis-Menten na dvosupstratne enzimatske reakcije, koncentracija jednog supstrata se održava stalnom, dok se druga varira, i obrnuto. Dvosupstratne reakcije se mogu podijeliti na sekvencijalne reakcije i reakcije dvostruke razmjene [101].

U sekvencijalnoj reakciji oba supstrata se vežu na enzim što dovodi do nastanka prijelaznog stanja koji vodi nastanku produkta [101]. Razlikuju se slučajni, pravilni sekvencijalni mehanizam i Theorell-Chance mehanizam. Dok u slučajnom mehanizmu bilo koji supstrat se prvi može vezati za enzim te se, samim time, može nastati bilo koji produkt, u pravilnom sekvencijalnom mehanizmu supstrati i produkti slijede određeni redoslijed [102]. U Theorell-Chance mehanizmu svaki korak u reakciji je brz, osim oslobađanja sekundarnog produkta, pri čemu postoji obvezan redoslijed vezivanja supstrata te oslobađanja produkta, bez nakupljanja ternarnih kompleksa, čije su koncentracije jednake nuli [101].

Reakcije dvostruke razmjene, ping-pong reakcije, odvijaju se na način da se jedan ili više produkata otpuštaju prije nego što su se na enzim vezali svi supstrati, pri čemu postoji supstituiran enzimski međuprodukt, u kojem je enzim privremeno modificiran. Supstrati

udaraju u enzim te se odbijaju od njega, kao što se stolnoteniska loptica odvija od stola [19]. Dakle, skupina koja se prenosi se najprije sa supstrata premjesti na enzim te nastane produkt i modificiran oblik enzima. U drugom pomaku, prijenosom skupine s modificiranog oblika enzima na drugi supstrat nastaje produkt novi produkt i obnovljeni enzim [35].

Jedna od vrsta dvosupstratnih enzimatskih reakcija su „Bi-Bi” reakcije [103] s dva supstrata te dva produkta [104]. Slučajna „Bi-Bi“ reakcija je karakteristična za neke dehidrogenaze, uređena je karakteristična mnogim oksidoreduktazama koje su ovisne o NAD(P)H, a ping-pong reakcije su karakteristične za aminotransferaze i serinske proteaze [35].

Budući da je većina enzimatskih reakcija dvosupstratna, pri čemu je drugi supstrat koenzim, prikaz Michelis-Mentenična kinetika za dvosupstratnu reakciju prikazana je jednadžbom 2.15. te jednadžbom brzine reakcije 2.16. [105]:



$$r_s = \frac{V_m c_{s1} c_{s2}}{(K_m^{s1} + c_{s1})(K_m^{s2} + c_{s2})} \quad (2.16.)$$

### 2.5.3. Inaktivacija i inhibicija enzima

Struktura proteina se može promijeniti u uvjetima koji su drugačiji od onih u stanici. Denaturacija proteina podrazumijeva gubitak trodimenzijske strukture koja uzrokuje gubitak njegove funkcije, pri čemu često dolazi do taloženja proteina i njihove agregacije. Do denaturacije mnogih proteina dolazi uslijed djelovanja raznih faktora, kao što je toplina, tj. nagla promjena temperature, što utječe na slabe interakcije u proteinu, prvenstveno na vodikove veze. Nadalje, denaturacija proteina može biti uzrokovana ekstremnim pH vrijednostima; mijenjajući ukupni naboj proteina, određenim otopljenim tvarima, kao i organskim otapalima koja se mogu miješati jer ometaju hidrofobne interakcije koje čine jezgru globularnih proteina stabilnom. Gubitak strukture u jednom dijelu proteina rezultira destabilizacijom drugih dijelova [106].

Stoga, inaktivacija enzima definira se kao kemijski proces koji uključuje nekoliko pojava, kao što je agregacija, denaturacija, disocijacija na podjedinice, koje se događaju istovremeno tijekom inaktivacije pojedinog enzima [107]. Iako mehanizmi enzimatske aktivnosti u kemijskoj kinetici pretpostavljaju da je enzim stabilan te da je aktivan tijekom cijele reakcije, u *in vitro* uvjetima navedeno nije primjenjivo jer se aktivnost enzima smanjuje

prilikom prethodno navedenih pojava. Može se mjeriti kinetičkim parametrima, kao što su  $V_m$  i  $K_m$ , no, biokemičari su skloni prikazom grafičkim metodama. Dobro poznavanje enzimske inaktivacije je vrlo važno za predviđanje ponašanja enzima u kemijskoj, farmaceutskoj te prehrambenoj industriji [108].

Inhibicija enzimske aktivnosti najvažniji je kontrolni mehanizam u biološkim sustavima, pri čemu se aktivnost mnogih enzima može inhibirati vezanjem iona i malih molekula. Razlikuje se povratna (reverzibilna) i nepovratna (ireverzibilna) inhibicija. Dok povratnu inhibiciju karakterizira brza disocijacija kompleksa enzim-inhibitor, nepovratnu inhibiciju karakterizira spora disocijacija nepovratnog inhibitora s ciljnog enzima jer je za njega vezan čvrsto kovalentno ili nekovalentno [19]. Razlikuju se tri vrste povratnih inhibitora; kompetitivni, akompetitivni te nekompetitivni, koji uključuju i miješane inhibitore [109].

Uobičajeni tip povratne inhibicije [106] je kompetitivna inhibicija, u kojoj enzim može vezati ili inhibitor, tvoreći kompleks EI, ili supstrat, tvoreći kompleks ES, no nikada ne može tvoriti kompleks ESI [19]. Mnogi kompetitivni inhibitori su strukturno jednaki supstratu [106] te se vežu na aktivno mjesto enzima, sprječavajući vezanje supstrata na isto aktivno mjesto. Na taj način kompetitivni inhibitor smanjuje broj molekula enzima koje vežu supstrat te samim time smanjuje brzinu katalitičke reakcije. Kompetitivna inhibicija se može ublažiti povećanjem koncentracije supstrata pri bilo kojoj koncentraciji inhibitora [19].

Akompetitivna inhibicija podrazumijeva vezanje inhibitora samo na kompleks enzim-supstrat, pri čemu vezno mjesto nastaje tek nakon što je došlo do interakcije enzima sa supstratom. Ova vrsta inhibicije ne može se nadvladati ako se poveća koncentracija supstrata [19].

Nekompetitivna inhibicija podrazumijeva vezanje inhibitora i supstrata na različitim veznim mjestima, pri čemu nekompetitivni inhibitor smanjuje obrtni broj enzima, no ne smanjuje broj molekula enzima koje mogu vezati supstrat [19]. Dakle, jednostavni nekompetitivski inhibitori ne utječu na  $K_m$ , ali snizuju  $V_m$  [35]. Niti ova vrsta inhibicije ne može se nadvladati ako se poveća koncentracija supstrata [19].

Miješana inhibicija nastaje ukoliko pojedini inhibitor istodobno smanjuje obrtni broj enzima sprječavajući vezanje supstrata [19].

U tablici 3 prikazane su jednadžbe brzina kemijske reakcije kod inhibicija, pri čemu  $K_i$  označava konstantu inhibicije. Najmanja vrijednost konstante inhibicije upućuje na najveću inhibiciju [73].

**Tablica 3.** Prikaz vrsta inhibicije te odgovarajućih brzina reakcija koju inhibiraju [110]

Vrsta inhibicije	Brzina reakcije
<b>Kompetitivna inhibicija</b>	$r_s = \frac{V_m c_s}{K_m^s \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s}$
<b>Akompetitivna</b>	$r_s = \frac{V_m c_s}{K_m^s + c_s \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)}$
<b>Nekompetitivna</b>	$r_s = \frac{V_m c_s}{(K_m^s + c_s) \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)}$

#### 2.5.4. Reaktorski model kotlastog reaktora

Kotlasti reaktori su reaktori u kojima se toplinske i kemijske promjene događaju samo obzirom na vrijeme, pri čemu su unutar reaktora te veličine u svakom dijelu iste. Uglavnom su valjkaste posude sa zaobljenim dnom uz odgovarajuće uređaje za prijenos topline i miješanje, većinom postavljene okomito. Upotrebljavaju se za reakcije u kapljevitom sustavu te u heterogenom sustavu kapljevina-krutina u kojem je mali promjer čestica ( $< 0,1$  mm). Odabire se pri proizvodnji manjih količina produkata [79], kao i u znanstvenim laboratorijama zbog jednostavnosti i ekonomičnosti [111].

Uobičajeno, pretpostavke za reakcije u kotlastom reaktoru približno idealno miješanje, što osigurava izotermnost. Stoga, opći oblik bilance tvari poprima izraz [79]:

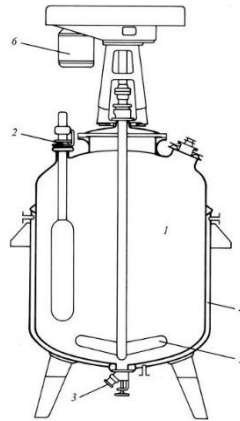
$$\frac{dn_A}{dt} = -Vr_A(T, n_i) \quad (2.17.)$$

Sređujući izraz te uz konstantni volumen, brzina reakcije je [79]:

$$r_A = -\frac{dc_A}{dt} \quad (2.18.)$$

Shematski prikaz kotlastog reaktora prikazan je na slici 9.





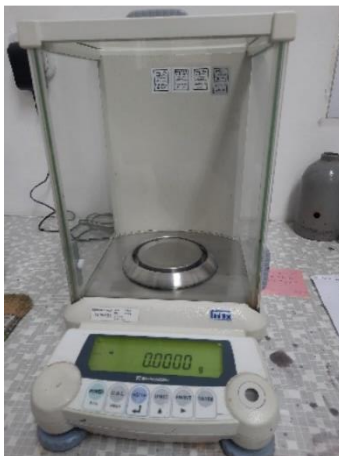
**Slika 9.** Kotlasti reaktor (1 – procesni prostor, 2 – ulaz reakcijske smjese, 3 – izlaz produkta, 4 – grijajući plašt, 5 – miješalo, 6 – motor) [112]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Aparatura

##### 3.1.1. Analitička vaga

Na analitičkoj vagi *Shimadzu*, prikazanoj na slici 10 vagane su mase svih tvari u čvrstom agregatnom stanju koje su bile potrebne za provođenje eksperimentalnog dijela rada.



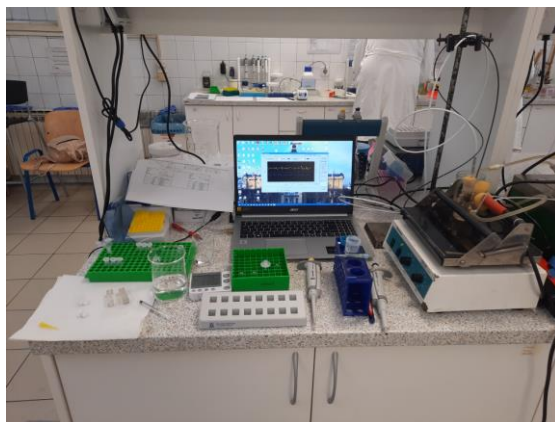
*Slika 10.* Analitička vaga *Shimadzu*

##### 3.1.2. Aparatura za određivanje udjela kisika u reaktoru

Kako bi se odredila kinetika potrošnje kisika u reakciji oksidacije NAD(P)H, odnosno u povratnoj reakciji regeneracije koenzima NAD(P)<sup>+</sup>, korišten je optički uređaj za mjerenje volumnog udjela kisika (engl. *optical oxygen meter*) *FireStingO<sub>2</sub>*, koji je spojen na računalo. Korišten je računalni program *Profix*. Na optičkom uređaju spojen je senzor za kisik *Robust Oxygen Miniprobe XB6-534-213*. Potrebna aparatura prikazana za obavljanje ovog dijela eksperimenta prikazana je na slikama 11 i 12.



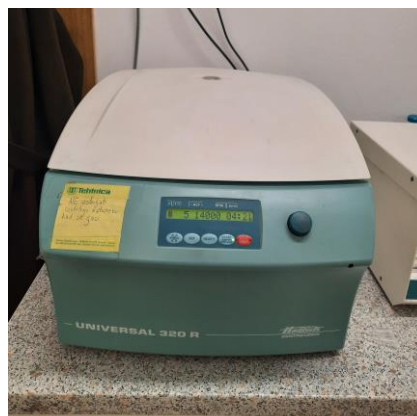
*Slika 11.* Aparatura za određivanje vrijednosti volumnog koeficijenta otapanja kisika



*Slika 12.* Aparatura za određivanje volumnog udjela kisika u reaktoru

### 3.1.3. Centrifuga

Kako bi se razdvojila organska i vodena faza, uzorke je prije određivanja stabilnosti enzima bilo potrebno podvrgnuti centrifugi prikazanoj na slici 13 pri 4°C, 14 000 okretaja u minuti te u trajanju od 15 minuta.



*Slika 13.* Centrifuga Hettich Universal 320R

### 3.1.4. Homogenizator

Nakon pripreme uzoraka te neposredno pred analizu, svi uzorci u tekućem agregatnom stanju homogenizirani na homogenizatoru *MS2 Minishaker IKA*, prikazanom na slici 14.



*Slika 14.* Homogenizator *MS2 Minishaker IKA*

### 3.1.5. Kotlasti bioreaktor

Provođenje reakcija odvijalo se u kotlastom bioreaktoru smještenom na magnetskoj miješalici u trajanju 24 h. Magnetska miješalica osiguravala je homogenost reakcijske smjese, iz koje su se, u određenim vremenskim intervalima, uzimali uzorci te se centrifugirali kako bi uzorak bio spreman za analizu aktivnosti enzima i koncentracije komponenata reakcijske smjese. Na slici 15 prikazana je potrebna aparatura.



*Slika 15.* Aparatura za provođenje reakcije

### 3.1.6. pH- metar

Kako je navedeno u teorijskom dijelu rada, enzimi su osjetljivi na pH vrijednost. Stoga, kako bi se pripremio fosfatni pufer, KPI, pH vrijednosti 8, korišten je pH metar *Handylab Ph11* proizvođača *SCHOTT* koji je prikazan na slici 16. Također, navedeni pH metar je upotrijebljen za mjerenje vodljivosti reakcijske smjese prije dodatka enzima.



*Slika 16.* pH metar *Handylab Ph11*.

### 3.1.7. Plinski kromatograf

Pod pojmom kromatografija podrazumijeva se odvajanje, tj. separacija smjese raspodjelom komponenti između stacionarne i mobilne faze. Ukoliko je mobilna faza plin, riječ je o plinskoj kromatografiji. Uređaj za plinsku kromatografiju uključuje; mobilnu fazu, tj. plin nosioc, regulator protoka, injektor, kolonu, detektor i sustav za prikupljanje podataka; uobičajeno integrator ili računalo. Plin nosioc je uobičajeno inertni plin vrlo visoke čistoće, koji kontinuirano “gura” komponente iz uzorka kroz kolonu kako bi se mogli odvojiti i eluirati nakon izlaza iz kolone, pri tome ne reagirajući s komponentama u uzorku niti sa stacionarnom fazu. Nakon kolone, plin nosioc i uzorak prolaze kroz detektor koji mjeri količinu uzorka te stvara izlazni električni signal, pri čemu se stvara kromatogram [113]. U ovom radu uzorci su analizirani na uređaju *GC-2014*, *Shimadzu* prikazanom na slici 17.



*Slika 17. Plinski kromatograf GC-2014, Shimadzu*

### 3.1.8. UV- Vis spektrofotometar

Sve tvari selektivno upijaju pojedine vrste zračenja, pri čemu atomi ili molekule mogu apsorbirati fotone određenih valnih duljina koje odgovaraju pojedinom energetsom prijelazu elektrona u elektronskom omotaču. Stoga, svaki atom i svaka molekula posjeduju karakterističan apsorpcijski spektar, tj. karakteristične valne duljine na kojima dolazi do apsorpcije zračenja [114].

Ultraljubičasto-vidljiva (UV-Vis) spektrometrija je kvantitativna i kvantitativna [115] analitička tehnika koja se temelji na apsorpciji UV svjetlosti (180-390 nm) ili vidljive svjetlosti (390-780 nm) određenih kemijskih vrsta u proučavanoj otopini. Navedene svjetlosti, koje su dijelom elektromagnetskog spektra, daju energiju koja uzrokuje elektronske prijelaze [116]. UV-Vis spektroskopija je najčešće primjenjivana analitička metoda u kliničkim i kemijskim laboratorijima diljem svijeta [115], sa širokom upotrebom u proučavanju reakcijske kinetike u katalizi, posebice u heterogenoj i homogenoj katalizi, kao i optičkih svojstava [117].

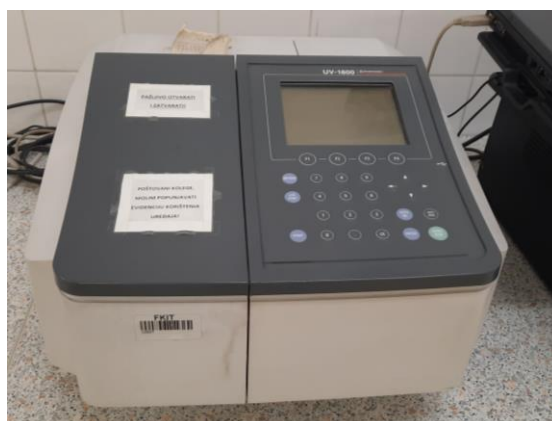
Odnos između apsorpcije i koncentracije prikazan je Bouguer-Lambert-Beerovim zakonom;

$$A = \varepsilon * c * b = \frac{I_0}{I} \quad (3.1.)$$

pri čemu  $A$  prikazuje apsorbanciju proučavane otopine,  $\varepsilon$  označava molarni apsorpcijski koeficijent ( $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ),  $b$  duljinu puta zračenja kroz apsorbirajući medij (cm), tj. širinu kivete,  $c$  koncentraciju ( $\text{mol L}^{-1}$ ) [116],  $I_0$  intenzitet upadne svjetlosti,  $I$  intenzitet svjetlosti nakon prolaska kroz uzorak [118]. Najvažniji dijelovi instrumenta u apsorpcijskoj

spektrofotometriji su: izvor svjetlosti, monokromator, kivete i držači za kivete te detektor, tj. uređaj za mjerenje inteziteta propuštene svjetlosti [115]. Kao izvor zračenja vidljive svjetlosti najčešće se koristi volframova nit, dok se za UV zračenje koristi deuterijska lampa. Kivete su najčešće duljine 1 cm te mogu biti staklene, plastične – za vidljivu svjetlost te kvarcne - za UV svjetlost [116].

Za određivanje kinetike, stabilnosti i aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze i NAD(P)H-oksidge koristi se UV-Vis spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*, prikazan na slici 18.



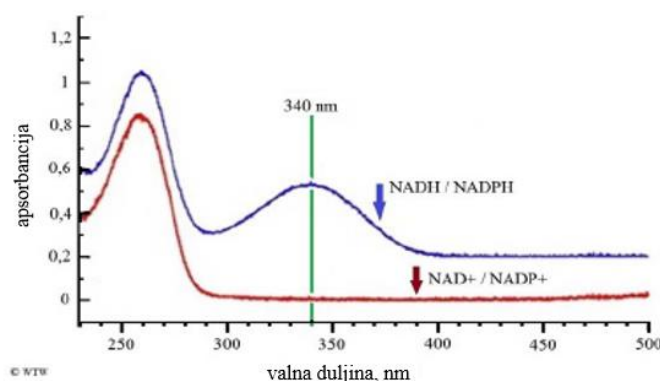
*Slika 18.* UV-Vis spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*

## **3. 2. Analitičke metode**

### **3.2.1. Određivanje aktivnosti i stabilnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH *Sc*, ADH *Lb*) i NAD(P)H oksidge (NOX) spektrofotometrijskom metodom**

Budući da se dehidrogenaze ovisne o NAD(P)<sup>+</sup> analiziraju spektrometrijski, pri čemu ili supstrat ili produkt apsorbira svjetlost, moguće je odrediti količinu prisutnog enzima. Reducirani koenzimi NAD(P)H apsorbiraju svjetlost valne duljine 340 nm, dok njihovi oksidirani oblici NAD(P)<sup>+</sup> ne apsorbiraju svjetlost navedene valne duljine. Redukcijom NAD(P)<sup>+</sup> apsorbancija pri 340 nm proporcionalno raste kao što raste brzina nastajanja i koncentracija proizvedenog NAD(P)H. Obrnuto, kod dehidrogenaza koje kataliziraju oksidaciju NAD(P)H primjećuje se pad apsorbancije pri 340 nm. Stoga, brzina promjene apsorbancije pri 340 nm proporcionalna je količini prisutnog enzima [35]. Slijed reakcije se može odrediti na način da se prati sposobnost apsorpcije svjetla određenog uzorka u jedinici vremena nakon što se dodao enzim [19]. Shematski prikaz apsorpcijskog spektra NAD(P)<sup>+</sup> i

njihovih oksidiranih oblika NAD(P)H prikazan je na slici 19. Navedena analiza, poznata pod pojmom *optički test*, bila je preteča mjerenja aktivnosti brojnih enzima [119].



**Slika 19.** Apsorpcijski spektar oksidiranih oblika NAD<sup>+</sup>/NADP<sup>+</sup> te njihovih reduciranih oblika NADH/NADPH [120]

Mjerenjem apsorbancije dobivene su dinamičke promjene apsorbancije iz kojih je izračunata volumna aktivnost ispitivanog enzima ( $A_V$ , U mL<sup>-1</sup>) prema jednadžbi:

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

gdje su  $V_r$  ukupni volumen uzorka u kiveti (mL),  $\epsilon_{340}$  molarni apsorpcijski koeficijent pri valnoj duljini 340 nm (cm<sup>2</sup> μmol<sup>-1</sup>),  $d$  širina kivete (1 cm),  $V_E$  volumen dodanog uzorka koji sadrži enzim (mL), te  $\Delta ABS/\Delta t$  promjena apsorbancije u vremenu (min<sup>-1</sup>, koja ujedno predstavlja nagib pravca [121]. Međunarodna jedinica za volumnu aktivnost je U, a definira se kao količina enzima koja razgradi 1 μmol supstrata u jednoj minuti. Stoga, volumna enzimatska aktivnost se izražava u jedinicama U volumen<sup>-1</sup>, a specifična enzimatska aktivnost kao U (masa proteina)<sup>-1</sup> [122]. Jednadžba 3.3. prikazuje specifičnu aktivnost enzima:

$$A_s = \frac{A_v}{\gamma_E} \quad (3.3.)$$

gdje  $\gamma_E$  predstavlja masenu koncentraciju enzima u kiveti [mg mL<sup>-1</sup>] [105].

### 3.2.2. Određivanje koncentracije supstrata i produkta primjenom plinske kromatografije

Za potrebe određivanja koncentracija acetona, 2-propanola, etanola i acetaldehida u reakcijskoj smjesi korišten je plinski kromatograf GC- 2014, Shimadzu, s plameno-ionizacijskim detektorom, s helijem kao plinom nosiocem, na polarnoj koloni ZB-WAX (l = 30 m; ID = 0,53 mm; d<sub>f</sub> = 1 μm) pri sljedećim uvjetima [123]:



- injektor:  $T = 240\text{ }^{\circ}\text{C}$

linearna brzina = 30 cm/s

- kolona:  $T_0 = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1 min)

$dT/dt = 15\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 200\text{ }^{\circ}\text{C}$  (1.5 min)

- detektor:  $T = 240\text{ }^{\circ}\text{C}$

Uzorci iz reakcija su prije mjerenja profiltrirani kroz filter (Sartorius, veličina 5H/N) kako bi došlo do odvajanja enzima. Vrijeme zadržavanja (retencijsko vrijeme) acetona je bilo 1,163 min, 2-propanola 1,637 min, a etanola 1,686 min, dok se za acetaldehid koji je hlapljiv već na sobnoj temperaturi nije moglo odrediti retencijsko vrijeme. Baždarni pravci prikazani su u prilogu 1.

### 3.3. Karakterizacija enzima ADH i NOX

#### 3.3.1. Određivanje kinetike enzima

##### 3.3.1.1. Kinetika enzima ADH *Sc* u reakciji oksidacije etanola

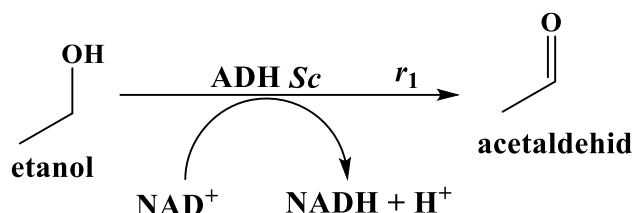
U reakciji oksidacije etanola, prikazanoj na slici 20, korišten je ADH iz *Saccharomyces cerevisiae*, iste masene koncentracije ( $\gamma_{\text{ADH } Sc} = 0,05\text{ mg mL}^{-1}$ ) u svim provedenim mjerenjima. Ispitivanja su provedena na sobnoj temperaturi,  $T=25^{\circ}\text{C}$ . Ukupni volumen uzoraka za sva mjerenja iznosio je 1 mL (volumen kvarcne kivete) te je sadržavao fosfatni pufer ( $C_{\text{fosfatni pufer}}=0,1\text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ), ADH *Sc* i ostale komponente kako slijedi.

Prilikom variranja supstrata etanola, vrijeme mjerenja iznosilo je 200 sekundi, u trinaest pripremljenih uzoraka koncentracija etanola je varirala od  $c_{\text{etanol}} = 0,17\text{ mM} - 1350,26\text{ mM}$ , pri čemu je koncentracija  $\text{NAD}^+$  bila stalna  $c_{\text{NAD}^+} = 2,40\text{ mM}$ .

Nadalje, u istoj reakciji oksidacije etanola varirala se koncentracija supstrata  $\text{NAD}^+$ , koja je u deset uzoraka poprimala vrijednosti  $c_{\text{NAD}^+} = 0,012 - 9,60\text{ mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s. Koncentracija etanola bila je stalna,  $c_{\text{etanol}} = 85,46\text{ mM}$ .

Potom se ispitivala inhibicija produktom NADH. Koncentracija  $\text{NAD}^+$  bila je stalna,  $c_{\text{NAD}^+} = 2,40\text{ mM}$ , kao i koncentracija etanola,  $c_{\text{etanol}} = 85,46\text{ mM}$ , dok se koncentracija NADH mijenjala, kroz devet uzoraka poprimajući vrijednosti  $c_{\text{NADH}} = 0,00 - 0,204\text{ mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s.

Također, ispitivala se inhibicija drugim produktom, acetaldehidom. Koncentracija  $\text{NAD}^+$  bila je stalna,  $c_{\text{NAD}^+} = 2,40 \text{ mM}$ , kao i koncentracija etanola,  $c_{\text{etanol}} = 85,46 \text{ mM}$ , dok se koncentracija acetaldehida mijenjala, kroz devet uzoraka  $c_{\text{acetaldehid}} = 0,00 - 44,27 \text{ mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s.



**Slika 20.** Shematski prikaz reakcije oksidacije etanola

### 3.3.1.2. Kinetika ADH Sc u reakciji redukcije acetaldehida

U reakciji redukcije acetaldehida korišten je ADH iz *Saccharomyces cerevisiae*, iste masene koncentracije ( $\gamma_{\text{ADH Sc}} = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ) u svim provedenim mjerenjima. Ispitivanja su provedena na sobnoj temperaturi,  $T = 25^\circ\text{C}$ . Ukupni volumen uzoraka za sva mjerenja iznosio je 1 mL (volumen kvarcne kivete) te je sadržavao fosfatni pufer ( $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 8$ ), ADH Sc i ostale komponente kako slijedi.

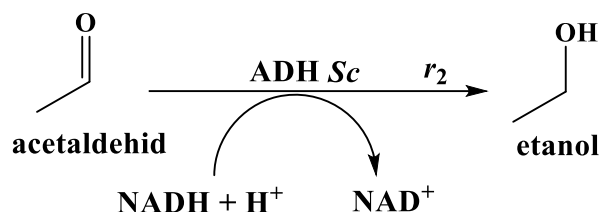
Prilikom variranja supstrata acetaldehida, vrijeme mjerenja iznosilo je 500 sekundi, u petnaest pripremljenih uzoraka koncentracija acetaldehida je poprimala vrijednosti  $c_{\text{acetaldehid}} = 0,018 \text{ mM} - 974,04 \text{ mM}$ , pri čemu je koncentracija  $\text{NAD}^+$  bila stalna  $c_{\text{NADH}} = 0,18 \text{ mM}$ .

Nadalje, varirala se koncentracija supstrata NADH, koja je u deset uzoraka poprimala vrijednosti  $c_{\text{NADH}} = 0,0012 - 0,21 \text{ mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s. Koncentracija acetaldehida bila je stalna,  $c_{\text{acetaldehid}} = 61,985 \text{ mM}$ .

Potom se ispitivala inhibicija produktom  $\text{NAD}^+$ . Koncentracija NADH bila je stalna,  $c_{\text{NADH}} = 0,18 \text{ mM}$ , kao i koncentracija acetaldehida,  $c_{\text{acetaldehid}} = 61,985 \text{ mM}$ , dok se koncentracija  $\text{NAD}^+$  mijenjala, kroz devet uzoraka  $c_{\text{NAD}^+} = 0,00 - 9,00 \text{ mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s.

Također, ispitivala se inhibicija drugim produktom, etanolom. Koncentracija NADH bila je stalna,  $c_{\text{NADH}} = 0,18 \text{ mM}$ , kao i koncentracija acetaldehida,  $c_{\text{acetaldehid}} = 61,985 \text{ mM}$ , dok se koncentracija etanola mijenjala kroz deset uzoraka  $c_{\text{etanol}} = 0 - 1375,90 \text{ mM}$ . Trajanje

spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s. Shema provedene reakcije prikazana je na slici 21.



**Slika 21.** Shematski prikaz reakcije redukcije acetaldehida

### 3.3.1.3. Kinetika enzima ADH *Lb* u reakciji oksidacije 2-propanola

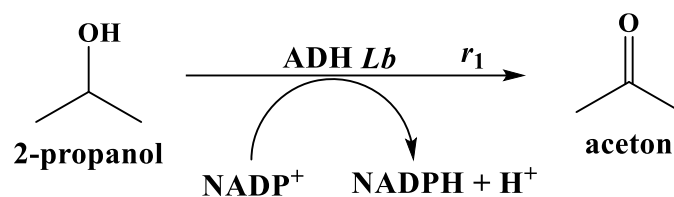
U reakciji oksidacije 2-propanola korištena je alkohol dehidrogenaza iz *Lactobacillus brevis* (ADH *Lb*), iste masene koncentracije u svim provedenim ispitivanjima ( $\gamma_{\text{ADH } Lb} = 1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Ispitivanja su provedena na sobnoj temperaturi,  $T=25^\circ\text{C}$ . Ukupni volumen uzoraka za sva mjerenja iznosio je 1 mL (volumen kvarcne kivete) te je sadržavao fosfatni pufer ( $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ), ADH *Lb* i ostale komponente kako slijedi.

Prilikom variranja supstrata 2-propanola, vrijeme mjerenja iznosilo je 200 sekundi, u petnaest pripremljenih uzoraka koncentracija 2-propanola je poprimala vrijednosti od  $c_{2\text{-propanol}} = 0,01 \text{ mM} - 1249,23 \text{ mM}$ , pri čemu je koncentracija  $\text{NADP}^+$  bila stalna  $c_{\text{NADP}^+} = 1,00 \text{ mM}$ .

Nadalje, varirala se koncentracija supstrata  $\text{NADP}^+$ , koja je u petnaest uzoraka poprimala vrijednosti  $c_{\text{NADP}^+} = 0,0005 - 5,00 \text{ mM}$ . Koncentracija 2-propanola bila je stalna,  $c_{2\text{-propanol}} = 32,53 \text{ mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 200 s.

Potom se ispitivala inhibicija produktom NADPH. Koncentracija  $\text{NADP}^+$  bila je stalna,  $c_{\text{NADP}^+} = 0,25 \text{ mM}$ , kao i koncentracija 2-propanola,  $c_{2\text{-propanol}} = 32,53 \text{ mM}$ , dok se koncentracija NADPH mijenjala, kroz devet uzoraka  $c_{\text{NADPH}} = 0,00 - 0,216 \text{ mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s.

Također, ispitivala se inhibicija drugim produktom, acetonom. Koncentracija  $\text{NADP}^+$  bila je stalna,  $c_{\text{NADP}^+} = 0,25 \text{ mM}$ , kao i koncentracija 2-propanola,  $c_{2\text{-propanol}} = 32,53 \text{ mM}$ , dok se koncentracija acetona mijenjala, kroz deset uzoraka  $c_{\text{acetom}} = 0,00 - 636,70 \text{ mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s. Shema reakcije prikazana je na slici 22.



*Slika 22.* Shematski prikaz reakcije oksidacije 2-propanola

### 3.3.1.4. Kinetika enzima ADH *Lb* u reakciji redukcije acetona

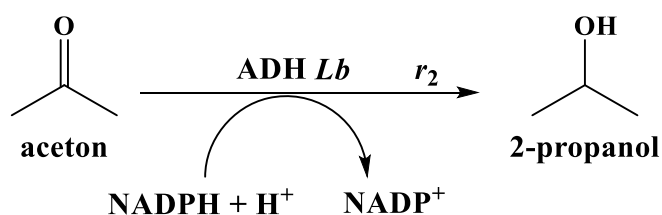
U reakciji redukcije acetona korišten je korištena je alkohol dehidrogenaza iz *Lactobacillus brevis*, također iste masene koncentracije u svim provedenim ispitivanjima ( $\gamma_{ADH\ Lb} = 1,00\ \text{mg mL}^{-1}$ ). Ispitivanja su provedena na sobnoj temperaturi,  $T=25^\circ\text{C}$ . Ukupni volumen uzoraka za sva mjerenja iznosio je 1 mL (volumen kvarcne kivete) te je sadržavao fosfatni pufer ( $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1\ \text{M}$ ,  $\text{pH}=8$ ), ADH *Lb* i ostale komponente kako slijedi.

Prilikom variranja supstrata acetona, vrijeme mjerenja iznosilo je 200 sekundi, u jedanaest pripremljenih uzoraka koncentracija acetona je poprimala vrijednosti od  $c_{\text{acetone}} = 1,36\ \text{mM} - 2723,83\ \text{mM}$ , pri čemu je koncentracija NADPH bila stalna,  $c_{\text{NADPH}} = 0,15\ \text{mM}$ .

Nadalje, varirala se koncentracija supstrata NADPH, koja je u deset uzoraka poprimala vrijednosti  $c_{\text{NADPH}} = 0,0006 - 0,216\ \text{mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s. Koncentracija acetona bila je stalna,  $c_{\text{acetone}} = 136,19\ \text{mM}$ .

Potom se ispitivala inhibicija produktom  $\text{NADP}^+$ . Koncentracija NADPH bila je stalna,  $c_{\text{NADPH}} = 0,15\ \text{mM}$ , kao i koncentracija acetona,  $c_{\text{acetone}} = 136,19\ \text{mM}$ , dok se koncentracija  $\text{NADP}^+$  mijenjala, kroz devet uzoraka  $c_{\text{NADP}^+} = 0,00 - 12,50\ \text{mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s.

Također, ispitivala se inhibicija drugim produktom, 2-propanolom. Koncentracija NADPH bila je stalna,  $c_{\text{NADPH}} = 0,15\ \text{mM}$ , kao i koncentracija acetona,  $c_{\text{acetone}} = 136,19\ \text{mM}$ , dok se koncentracija 2-propanola mijenjala kroz deset uzoraka  $c_{\text{2-propanol}} = 0 - 1138,62\ \text{mM}$ . Trajanje spektrofotometrijskog ispitivanja bilo je 500 s. Shematski prikaz reakcije prikazan je na slici 23.



**Slika 23.** Shematski prikaz reakcije redukcije acetona

### 3.3.1.5. Kinetika enzima NOX u reakciji oksidacije NADH

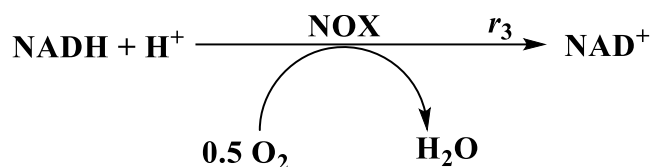
Budući da je  $\text{NAD}^+$  produkt oksidacije NADH, on može djelovati inhibicijski na NOX [73]. Stoga, kinetika enzima NOX ispitala se u reakciji oksidacije NADH prikazanoj na slici 24. Za ispitivanje kinetike enzima NOX s NADH, korišten je NOX 001 masene koncentracije ( $\gamma_{\text{NOX}} = 20 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Ispitivanja su provedena na sobnoj temperaturi,  $T = 25^\circ\text{C}$ . Ukupni volumen uzoraka za sva mjerenja iznosio je 1 mL (volumen kvarcne kivete) te je sadržavao fosfatni pufer ( $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 8$ ), NOX i ostale komponente kako slijedi. Trajanje spektrofotometrijskih ispitivanja bila su 100-300 s.

Prvenstveno, dok je koncentracija NOX bila stalna, mijenjana je koncentracija NADH koja je kod devet pripremljenih uzoraka poprimala vrijednosti  $c_{\text{NADH}} = 0,002 - 0,20 \text{ mM}$ .

Potom se ispitala inhibicija  $\text{NAD}^+$  na način da su se koncentracija NOX i NADH održavale konstantnom ( $c_{\text{NADH}} = 0,17 \text{ mM}$ ), dok se koncentracija  $\text{NAD}^+$  mijenjala  $c_{\text{NAD}^+} = 0,00 - 6,75 \text{ mM}$  kroz šest uzoraka. Ukupni volumen uzorka i duljina ispitivanja ista je kao u prethodnom eksperimentu.

Provedena je reakcija u kojoj se ispitala inhibicija etanolom, pri čemu su se koncentracije NOX ( $\gamma_{\text{NOX}} = 20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i NADH održavale konstantnom  $c_{\text{NADH}} = 0,17 \text{ mM}$ , dok se koncentracija etanola kroz osam provedenih mjerenja mijenjala  $c_{\text{etanol}} = 0,00 - 1663,04 \text{ mM}$ .

Ispitivanje inhibicije acetaldehidom provedeno je na način da su se koncentracije NOX ( $\gamma_{\text{NOX}} = 20 \text{ mg mL}^{-1}$ ) te NADH održavale konstantnom  $c_{\text{NADH}} = 0,17 \text{ mM}$ , dok se koncentracija acetaldehida mijenjala od  $c_{\text{acetaldehid}} = 0,00 - 1723,17 \text{ mM}$ .



*Slika 24.* Shematski prikaz reakcije oksidacije NADH

### 3.3.1.6. Kinetika enzima NOX u reakciji oksidacije NADPH

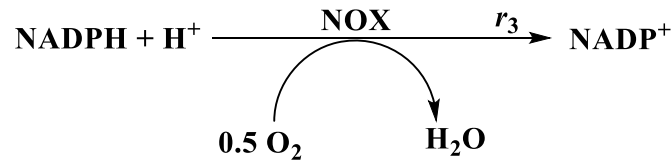
Za ispitivanje kinetike enzima NOX u reakciji oksidacije NADPH prikazanoj na slici 25 korišten je NOX 001 masene koncentracije ( $\gamma_{\text{NOX}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Ukupni volumen uzoraka za sva mjerenja iznosio je 1 mL (volumen kvarcne kivete) te je sadržavao fosfatni pufer ( $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 8$ ), NOX i ostale komponente kako slijedi. Trajanje spektrofotometrijskih ispitivanja bilo je 100-300 s.

Prvenstveno, dok je koncentracija NOX bila stalna, mijenjana je koncentracija NADPH koja je kod devet pripremljenih uzoraka poprimala vrijednosti  $c_{\text{NADPH}} = 0,002 - 0,210 \text{ mM}$ .

Nadalje, ispitivala se inhibicija  $\text{NADP}^+$  na način da su se koncentracija NOX ( $\gamma_{\text{NOX}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i NADPH održavale konstantnom  $c_{\text{NADPH}} = 0,10 \text{ mM}$ , dok se koncentracija  $\text{NADP}^+$  mijenjala  $c_{\text{NADP}^+} = 0,00 - 10,00$  kroz sedam uzoraka.

Provedena je reakcija u kojoj se ispitivala inhibicija 2-propanolom, pri čemu su se koncentracije NOX ( $\gamma_{\text{NOX}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i NADPH održavale konstantnom  $c_{\text{NADPH}} = 0,10 \text{ mM}$ , dok se koncentracija 2-propanola kroz osam provedenih mjerenja mijenjala poprimajući vrijednosti  $c_{2\text{-propanol}} = 0,00 - 1275,26 \text{ mM}$ .

Ispitivanje inhibicije acetonom provedeno je na način da su se koncentracije NOX ( $\gamma_{\text{NOX}} = 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) te NADPH održavale konstantnom ( $c_{\text{NADPH}} = 0,10 \text{ mM}$ ), dok se koncentracija acetona mijenjala kroz deset mjerenja poprimajući vrijednosti  $c_{\text{acetone}} = 0,00 - 1361,92 \text{ mM}$ . Ukupni volumen uzorka i duljina ispitivanja ista je kao u prethodna tri eksperimenta.



*Slika 25.* Shematski prikaz reakcije oksidacije NADPH

### 3.3.1.7. Utjecaj kisika na kinetiku enzima NOX u reakcijama oksidacije NADH i NADPH

Kako je prethodno navedeno, NOX može vrlo uspješno regenerirati koenzime NAD(P)<sup>+</sup> u mnogobrojnim enzimatskim reakcijama. Budući da NAD(P)<sup>+</sup> zahtijevaju molekularni kisik kao supstrat u regeneraciji koenzima, provelo se ispitivanje utjecaja koncentracije kisika na kinetiku enzima NOX.

Budući da topljivost kisika ovisi nekoliko faktora; o temperaturi, pri čemu se topljivost kisika smanjuje pri višim temperaturama, o tlaku, pri čemu se topljivost povećava s povećanjem tlaka, o koncentraciji elektrolita, pri čemu se topljivost smanjuje kako raste koncentracija elektrolita [124], prilikom ispitivanja utjecaja kisika na kinetiku NOX uzimaju se u obzir međufazni prijenos kisika (plin - kapljevina) i topljivost kisika.

Prijenos tvari iz plina do površine kapljevine opisuje teorija o graničnom sloju, koja iznosi da se koncentracija tvari koja se prenosi iz određenog fluida do površine druge faze najviše mijenja u samoj blizini te površine, dok je koncentracija jednolika unutar mase fluida [79]. Uz pretpostavku da se trenutačno postiže fazna ravnoteža te da nema kemijske reakcije, brzina absorpcije reaktanta A prikazana je jednadžbom:

$$N_A = k_L a (c_A^* - c_A) \quad (3.4.)$$

gdje su  $N_A$  molni fluks tvari A [79],  $k_L a$  ukupni volumni koeficijent prijenosa plina iz plinske u kapljevitu fazu [105],  $c_A^*$  ravnotežna koncentracija na granici faza te  $c_A$  koncentracija reaktanta A u kapljevini [79].

Postupak određivanja koncentracije kisika na reakcije oksidacije NADH i NADPH provodi se variranjem koncentracije otopljenog kisika u reakcijskoj smjesi, slijedeći nekoliko koraka [105]:

1. Potrebno je odrediti najveću topljivost kisika u ovisnosti o tlaku okoline i temperaturi, kao i vodljivost otopine. U prilogu 2 se nalazi tablica koja prikazuje topljivost kisika pri sobnoj temperaturi i atmosferskom tlaku. Očitane vrijednosti je potrebno pomnožiti s korekcijskim faktorom vezanog uz vodljivost kapljevine. Specifična vodljivost pufera u kojem se provodi reakcija,  $G$ , mjeri se s pH metrom *Handylab Ph11* proizvođača SCHOTT. Potom je potrebno iz tablice u prilogu 3 očitati korekcijski faktor koji se množi s vrijednosti topljivosti kisika, pri čemu se dobije stvarna vrijednost topljivosti kisika u reakcijskoj smjesi [105, 125].

2. Kako bi se kalibrirao optički senzor koji služi za određivanje udjela otopljenog kisika u reakcijskoj otopini, najprije se reakcijska otopina bez dodanog enzima aerira petnaest minuta te se uroni u senzor, pri čemu se na računalo može iščitati da je udio kisika zaista 100 % [105].

3. Kako bi se procijenila vrijednost volumnog koeficijenta otapanja kisika,  $k_{La}$ , u reakcijsku otopinu, bez dodatnog enzima, upuhuje se dušik, pri čemu se istiskuje sav kisik koji se nalazi u otopini. Kada se na računalo očitava udio kisika od 0 %, potrebno je prekinuti upuhivanje dušika te se prati porast udjela kisika. Na ovaj način se prati otapanje kisika u zraku koji se nalazi iznad reakcijske smjese [105].

4. Nadalje, provodi se variranje koncentracije kisika u reaktoru na način da se ciljane koncentracije kisika postiže upuhivanjem dušika u reakcijsku otopinu do određene razine. Senzor je uronjen u otopinu, pri čemu se na računalo se prati udio otopljenog kisika. Kada se postigao željeni udio kisika, u reaktor se dodaje otopljeni enzim te dolazi do potrošnje kisika [105].

5. Sve dobivene vrijednosti se množe s topljivosti kisika, pomnoženima s korekcijskim faktorom [105].

6. Specifična aktivnost enzima se računa iz [105]:

$$A_s = \frac{-\frac{dc_{O_2}}{dt} + k_L a (c_{O_2}^* + c_{O_2})}{Y_{NOX}} \quad (3.5.)$$

Variranje kisika provedeno je kotlastom bioreaktoru volumena 5 mL. Pri čemu se iz tabeliranih vrijednosti vodljivosti i korekcijskog faktora za kisik, kroz devet mjerenja ispitao utjecaj kisika na oksidaciju NADH. Reaktor je sadržavao fosfatni pufer ( $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1$  M, pH=8) te NOX i NADH. Koncentracija NOX-a poprimala je vrijednosti  $c_{\text{NOX}}=0,20$  i  $0,40$  mM,



dok se koncentracija NADH održavala stalnom  $c_{\text{NADH}} = 0,17 \text{ mM}$ . Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi,  $T = 25^\circ\text{C}$ .

Na isti način se provelo ispitivanje utjecaja kisika na oksidaciju NADPH. Reaktor je sadržavao fosfatni pufer ( $c_{\text{fosfatni pufer}} = 0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH} = 8$ ) te NOX i NADPH. Koncentracije NOX-a i koncentracije NADPH održavale su se konstantnima, vrijednosti  $c_{\text{NOX}} = 0,10 \text{ mM}$  te  $c_{\text{NADPH}} = 0,10 \text{ mM}$ . Mjerenja su provedena pri sobnoj temperaturi,  $T = 25^\circ\text{C}$ .

### 3.3.2. Provedba procesa oksidacije katalizirane oksidoreduktazama u reaktoru

U ovom radu ispitivale su se reakcije oksidacije etanola i 2-propanola te povratne reakcije redukcije acetaldehida i acetona, uz primjenu koenzima  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$ .

Procesi su se provodili u 0,1 M fosfatnom puferu pH 8 pri sobnoj temperaturi ( $T = 25^\circ\text{C}$ ). Pri ispitivanju operacijske stabilnosti etanola kotlasti reaktor volumena 5 mL je sadržavao fosfatni pufer,  $V_{\text{fosfatni pufer}} = 1729,50 \mu\text{L}$ , etanol ( $c_{\text{etanol}} = 70 \text{ mM}$ ),  $\text{NAD}^+$  ( $c_{\text{NAD}^+} = 1,8 \text{ mM}$ ), alkohol dehidrogenazu ( $\gamma_{\text{ADH } Sc} = 1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), NOX ( $\gamma_{\text{NOX}} = 6 \text{ mg mL}^{-1}$ ) te je sadržavao magnetsku miješalicu s 320 okretaja u minuti, pri čemu su u pravilnim vremenskim intervalima uzimana po dva uzorka; jedan za plinsku kromatografiju, a drugi za test operacijske stabilnosti. Na isti način ispitivala se operacijska stabilnosti ADH *Lb* i NOX, pri čemu je u reaktor sadržavao fosfatni pufer,  $V_{\text{fosfatni pufer}} = 1223,1 \mu\text{L}$ , 2-propanol ( $c_{2\text{-propanol}} = 70,00 \text{ mM}$ ),  $\text{NADP}^+$  ( $c_{\text{NADP}^+} = 0,50 \text{ mM}$ ), alkohol dehidrogenazu ( $\gamma_{\text{ADH } Lb} = 8,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ), NOX ( $\gamma_{\text{NOX}} = 12,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ) i magnetsku miješalicu.

Koncentracije kisika očitavane su pomoću kisikove elektrode koja je bila spojena na računalo korištenjem programa *Pyro Oxygen Logger*. Uzorak za analizu na plinskom kromatografu imao je ukupno razrjeđenje 400x i volumen 200  $\mu\text{L}$ . Iz dobivenih kromatograma očitane koncentracije reaktanta, etanola i 2-propanola, i produkta, acetaldehida i acetona, u određenom vremenu reakcije, tj. u vremenu uzrokovanja. Uzorak je bilo potrebno uzeti u nultoj minuti te nadalje u drugoj, petoj, petnaestoj, tridesetj, šezdesetj pa nakon 120, 180, 240, 1440 minuta. Posljednji uzorak pripremljen je dva puta.

Uzorak za ispitivanje operacijske stabilnosti ADH *Sc* sadržavao je 855  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 50  $\mu\text{L}$   $\text{NAD}^+$  ( $c_{\text{NAD}^+} = 0,60 \text{ mM}$ ), 90  $\mu\text{L}$  etanola ( $c_{\text{etanol}} = 76,91 \text{ mM}$ ) te 5  $\mu\text{L}$  enzima, pri čemu su se u trajanju od 24 h periodično uzimali uzorci iz kotlastog reaktora. Uzorak za ispitivanje operacijske stabilnosti NOX sadržavao je 780  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 20  $\mu\text{L}$  NADH ( $c_{\text{NADH}} = 0,10 \text{ mM}$ ) te 150  $\mu\text{L}$  enzima.

Uzorak za ispitivanje operacijske stabilnosti ADH *Lb* sadržavao je 900  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 45  $\mu\text{L}$  NADPH ( $c_{\text{NADPH}}=0,10 \text{ mM}$ ), 45  $\mu\text{L}$  acetona ( $c_{\text{acetona}}= 30,64 \text{ mM}$ ) te 10  $\mu\text{L}$  enzima. Uzorak za ispitivanje operacijske stabilnosti NOX sadržavao je 945  $\mu\text{L}$  fosfatnog pufera, 45  $\mu\text{L}$  NADPH ( $c_{\text{NADH}}=0,10 \text{ mM}$ ) te 10  $\mu\text{L}$  enzima ( $\gamma_{\text{NOX}} = 0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Enzim za navedena ispitivanja uzet je na način da se 25  $\mu\text{L}$  uzorka iz reaktora stavilo na filter za centrifugu nakon čega se dodalo 100  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode. Tako pripremljen uzorak stavljen je na centrifugu pri  $T=4 \text{ }^\circ\text{C}$ , u trajanju 15 minuta te s brojem okretaja u minuti 14 000. Nakon provedene centrifuge, bilo je potrebno dodati još 100  $\mu\text{L}$  ultra čiste vode te pomiješati sadržaj i staviti ga u epicu koja je označena brojem uzorka. Navedeni postupak potrebno je još jednom ponoviti kako bi ukupni volumen u epici za ispitivanje operacijske stabilnosti iznosio 200  $\mu\text{L}$ .

Iz tako pripremljenog uzorka 5  $\mu\text{L}$  se dodalo u pripremljenu kivetu za praćenje aktivnosti ADH *Sc*, a 150  $\mu\text{L}$  za prethodno pripremljenu kivetu za praćenje stabilnosti NOX, dok se 10  $\mu\text{L}$  se dodalo u pripremljenu kivetu za praćenje aktivnosti ADH *Lb*, a 10  $\mu\text{L}$  za prethodno pripremljenu kivetu za praćenje stabilnosti NOX, koje su potom analizirane na UV-Vis spektrofotometru pri  $\lambda=340 \text{ nm}$  u trajanju od 180 s. Uzorak je bilo potrebno uzeti u nultoj minuti, nakon 1 h, 2 h, 3 h te 24 h. Posljednji uzorci pripremljeni su dva puta. Ukupan broj obrtaja enzima izračunat je prema jednadžbi 3.6.

$$TTN = \frac{n_p}{n_{\text{kofaktor}}} \quad (3.6.)$$

gdje je  $n_p$  množina sintetiziranog produkta, a  $n_{\text{kofaktor}}$ , tj. množina utrošenog kofaktora [64].

### 3.4. Matematički model regeneracije koenzima NAD(P)<sup>+</sup>

#### 3.4.1. Kinetički model

Prema trendu eksperimentalnih podataka dobivenih mjerenjem ovisnosti specifične aktivnosti enzima o koncentraciji reaktanata i produkata reakcije, predloženi su kinetički modeli za provedene reakcije. Oksidacija etanola, prikazana jednadžbom 3.7., opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničnom kinetikom, koja uključuje kompetitivnu inhibiciju produktima, acetaldehidom i NADH.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot \gamma_{\text{ADH Sc}} \cdot A_{\text{ADH Sc}} \cdot c_{\text{etanol}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left( K_m^{\text{etanol}} \left( 1 + \frac{c_{\text{acetaldehid}}}{K_{i1}^{\text{acetaldehid}}} \right) + c_{\text{etanol}} \right) \cdot \left( c_{\text{NAD}^+} + K_m^{\text{NAD}^+} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i^{\text{NADH}}} \right) \right)} \quad (3.7.)$$

Redukcija acetaldehida, prikazana jednađbom 3.8., opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničnom kinetikom, koja uključuje kompetitivnu inhibiciju produktima, etanolom i NAD<sup>+</sup>.

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot \gamma_{ADH Sc} \cdot A_{ADH Sc} \cdot c_{acetaldehyd} \cdot c_{NADH}}{\left( K_m^{acetaldehyd} \left( 1 + \frac{c_{etanol}}{K_{i2}^{etanol}} \right) + c_{acetaldehyd} \right) \cdot \left( c_{NADH} + K_{m2}^{NADH} \cdot \left( 1 + \frac{c_{NAD^+}}{K_{i2}^{NAD^+}} \right) \right)} \quad (3.8.)$$

Oksidacija 2-propanola, prikazana jednađbom 3.9., opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničnom kinetikom, koja uključuje kompetitivnu inhibiciju produktima, acetonom i NADPH.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot \gamma_{ADH Lb} \cdot A_{ADH Lb} \cdot c_{2-propanol} \cdot c_{NADP^+}}{\left( K_m^{2-propanol} \left( 1 + \frac{c_{aceton}}{K_{i1}^{aceton}} \right) + c_{2-propanol} \right) \cdot \left( c_{NADP^+} + K_m^{NADP^+} \cdot \left( 1 + \frac{c_{NADPH}}{K_{i1}^{NADPH}} \right) \right)} \quad (3.9.)$$

Redukcija acetona, prikazana jednađbom 3.11., opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničnom kinetikom, koja uključuje kompetitivnu inhibiciju produktima, 2-propanolom i NADP<sup>+</sup>.

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot \gamma_{ADH Lb} \cdot A_{ADH Lb} \cdot c_{aceton} \cdot c_{NADPH}}{\left( K_m^{aceton} \left( 1 + \frac{c_{2-propanol}}{K_{i2}^{2-propanol}} \right) + c_{aceton} \right) \cdot \left( c_{NADPH} + K_{m2}^{NADPH} \cdot \left( 1 + \frac{c_{NADP^+}}{K_{i2}^{NADP^+}} \right) \right)} \quad (3.10.)$$

Regeneracija koenzima NADH prikazana jednađbom 3.9., opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničnom kinetikom, koja uključuje kompetitivnu inhibiciju produktima, NAD<sup>+</sup>, etanolom te acetaldehidom.

$$r_3 = \frac{V_{m2} \cdot \gamma_{NOX} \cdot A_{NOX} \cdot c_{NADH} \cdot c_{O_2}}{\left( K_m^{NADH} \left( 1 + \frac{c_{NAD^+}}{K_{i3}^{NAD^+}} + \frac{c_{etanol}}{K_{i3}^{etanol}} + \frac{c_{acetaldehyd}}{K_{i3}^{acetaldehyd}} \right) + c_{NAD^+} \right) \cdot (c_{O_2} + K_m^{O_2})} \quad (3.11.)$$

Regeneracija koenzima NADPH prikazana jednađbom 3.12., opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničnom kinetikom, koja uključuje kompetitivnu inhibiciju produktima, NADP<sup>+</sup>, 2-propanolom te acetonom.

$$r_3 = \frac{V_{m2} \cdot \gamma_{NOX} \cdot A_{NOX} \cdot c_{NADPH} \cdot c_{O_2}}{\left( K_m^{NADPH} \left( 1 + \frac{c_{NADP^+}}{K_{i3}^{NADP^+}} + \frac{c_{2-propanol}}{K_{i3}^{2-propanol}} + \frac{c_{aceton}}{K_{i3}^{aceton}} \right) + c_{NADP^+} \right) \cdot (c_{O_2} + K_m^{O_2})} \quad (3.12.)$$

### 3.4.2. Reaktorski model

Osim kinetičkih jednadžbi, definirane su i bilancne jednadžbe za svaku komponentu u kotlastom bioreaktoru. Stoga, reaktorski modeli koji su korišteni za opis provedenih reakcija u kotlastom bioreaktoru sastoje se od bilancnih jednadžbi za etanol (3.13.), acetaldehid (3.14.),  $\text{NAD}^+$  (3.15.),  $\text{NADH}$  (3.16.), kisik ( $\text{O}_2$ ) (3.17.), u prvom ispitanom sustavu te od bilančnih jednadžbi za 2-propanol (3.18.), aceton (3.19.),  $\text{NADP}^+$  (3.20.),  $\text{NADPH}$  (3.21.) te kisik (3.22.) u drugom ispitanom sustavu, pri čemu se u obzir uzimala promjena koncentracije jedne od navedenih komponenti u vremenu.

$$\frac{dc_{\text{etanol}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (3.13.)$$

$$\frac{dc_{\text{acetaldehid}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (3.14.)$$

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = -r_1 + r_2 + r_3 \quad (3.15.)$$

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 \quad (3.16.)$$

$$\frac{dc_{\text{O}_2}}{dt} = k_{\text{LA}} (c_{\text{O}_2}^* - c_{\text{O}_2}) - 0.5 \cdot r_3 \quad (3.17.)$$

$$\frac{dc_{2\text{-propanol}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (3.18.)$$

$$\frac{dc_{\text{aceton}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (3.19.)$$

$$\frac{dc_{\text{NADP}^+}}{dt} = -r_1 + r_2 + r_3 \quad (3.20.)$$

$$\frac{dc_{\text{NADPH}}}{dt} = r_1 - r_2 - r_3 \quad (3.21.)$$

$$\frac{dc_{\text{O}_2}}{dt} = k_{\text{LA}} (c_{\text{O}_2}^* - c_{\text{O}_2}) - 0.5 \cdot r_3 \quad (3.22.)$$

Stabilnost enzima ADH (3.23.) i NOX (3.24.) u reaktoru je opisana kinetikom drugog reda, pri čemu je inaktivacijska konstanta procijenjena iz dobivenih eksperimentalnih podataka.

$$\frac{dA_{\text{ADH}}}{dt} = -k_d^{\text{ADH}} \cdot A_{\text{ADH}}^2 \quad (3.23.)$$

$$\frac{dA_{\text{NOX}}}{dt} = -k_d^{\text{NOX}} \cdot A_{\text{NOX}}^2 \quad (3.24.)$$

### 3.5. Obrada rezultata

Dobiveni eksperimentalni rezultati su obrađeni u računalnom programu *Scientist*. Procijenjeni su kinetički parametri matematičkog modela, kao što je maksimalna brzina reakcija, Michaelis-Mentenična konstanta te konstanta inaktivacije. Navedeni parametri su upotrijebljeni za predviđanje promjena koncentracija supstrata i produkta u kotlastom reaktoru, u određenom vremenu. Grafovi su se crtali u programu *Sigmaplot*.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako je navedeno, oksidoreduktaze su jedna od najvećih skupina enzima koji imaju široku industrijsku primjenu. Glavna prepreka njihovoj široj primjeni je činjenica da za svoju aktivnost zahtijevaju prisutnost koenzima  $\text{NAD(P)}^+$ , pri čemu je, zbog vrlo visoke cijene navedenih koenzima, nužno pronaći učinkovit način njihove regeneracije koji će biti primjenjiv i u znanosti i u industriji.

Budući da koenzimi  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  služe kao oksidansi koji se reduciraju u  $\text{NADH}$  i  $\text{NADPH}$ , pri čemu supstrat oksidira u ciljni produkt, u ovom radu ispitala se potencijalna primjena enzima  $\text{NAD(P)H}$  oksidaze za regeneraciju koenzima u dvjema reakcijama oksidacije. Provedene su reakcije oksidacije etanola i 2-propanola, kao i reakcije redukcije acetona i acetaldehida, s enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Saccharomyces cerevisiae* (*ADH Sc*) i *Lactobacillus brevis* (*ADH Lb*). Određen je ukupni broj obrtaja koenzima u svakoj reakciji te je razvijen i validiran procesni model u kotlastom bioreaktoru.

U ovom poglavlju dani su rezultati ispitivanja provedenih reakcija.

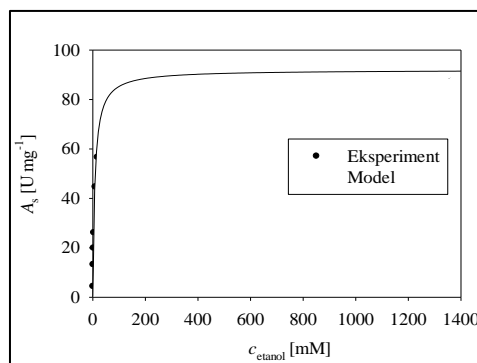
### 4.1. Određivanje aktivnosti i operacijske stabilnosti enzima alkohol dehidrogenaze (ADH) i $\text{NAD(P)H}$ oksidaze (NOX)

#### 4.1.1. Određivanje kinetike alkohol dehidrogenaze (ADH)

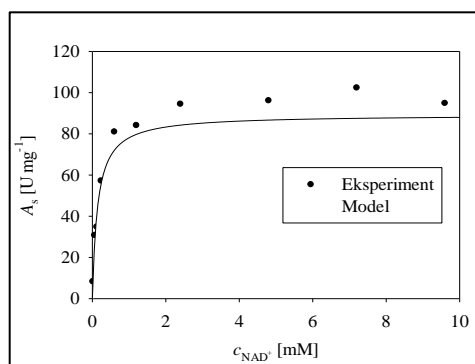
##### 4.1.1.1. Kinetika enzima *ADH Sc* u reakciji oksidacije etanola

U reakciji oksidacije etanola supstrati su etanol i koenzim  $\text{NAD}^+$ , a produkti reakcije acetaldehid i  $\text{NADH}$ . Kinetika enzima alkohol dehidrogenaze (*ADH Sc*) u reakciji prikazana je kao ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji supstrata, etanola i  $\text{NAD}^+$ , prikazana na slikama 26 i 27, te produkata,  $\text{NADH}$  i acetaldehida, prikazana na slikama 28 i 29. Iako se može uočiti odstupanje modela od eksperimentalnih podataka, vidljiv je trend sukladan Michaelis-Menteničnoj kinetici. Budući da je vidljivo da porastom koncentracije produkata dolazi do pada specifične aktivnosti enzima, može se zaključiti da  $\text{NADH}$  i acetaldehid i djeluju inhibicijski. Kinetika reakcije oksidacije etanola katalizirane alkohol dehidrogenazom opisana je Michaelis-Menteničinom dvosupstratnom kinetikom s uključenom inhibicijom produktima.

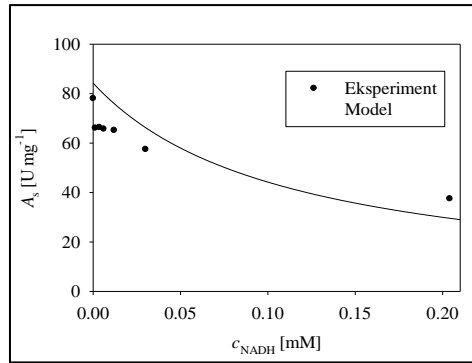
Vrijednosti Michaelis-Mentenčinih konstanti i vrijednosti parametara modela procijenjeni su nelinearnom regresijom iz eksperimentalnih podataka te su prikazane u tablici 4, pri čemu  $V_m$  označuje maksimalnu brzinu reakcije,  $K_m$  vrijednosti Michaelis-Mentenčinih konstanti za etanol i  $\text{NAD}^+$  ( $K_m^{\text{etanol}}$ ,  $K_m^{\text{NAD}^+}$ ) te konstante inhibicije za  $\text{NADH}$  i acetaldehid ( $K_i^{\text{NADH}}$  i  $K_i^{\text{acetaldehid}}$ ). Na temelju procijenjenih kinetičkih parametara, prikazanih u tablici 4, razvijen je kinetički model oksidacije etanola, na način opisan u prethodnom poglavlju. Program u *Scientist*-u prikazan je u prilogu 4.



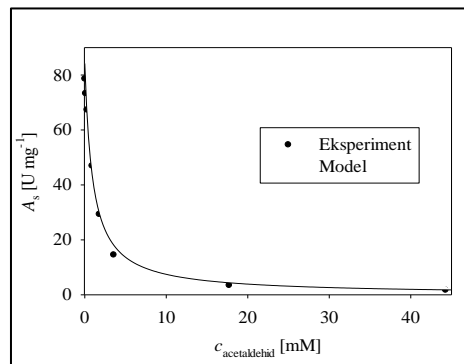
**Slika 26.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH  $S_c$  o koncentraciji etanola u reakciji oksidacije etanola ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } S_c}=0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=2,40 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{etanol}}=0,17\text{-}1350,26 \text{ mM}$ )



**Slika 27.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH  $S_c$  o koncentraciji  $\text{NAD}^+$  u reakciji oksidacije etanola ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{etanol}}=85,46 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH } S_c}=0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=0,012\text{--}9,60 \text{ mM}$ )



**Slika 28.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH Sc o koncentraciji NADH u reakciji oksidacije etanola ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{etanol}}=85,46 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH Sc}}=0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=2,40 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADH}}=0,00 - 0,204 \text{ mM}$ )



**Slika 29.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH Sc o koncentraciji acetaldehida u reakciji oksidacije etanola ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{etanol}}=85,46 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH Sc}}=0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=2,4 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{acetaldehyd}}=0,00 - 44,27 \text{ mM}$ )

**Tablica 4.** Procijenjeni kinetički parametri za ADH Sc u reakciji oksidacije etanola

Parametar	Vrijednost
$V_m [\text{U mg}^{-1}]$	$97,463 \pm 3,115$
$K_m^{\text{etanol}} [\text{mM}]$	$7,850 \pm 1,535$
$K_m^{\text{NAD}^+} [\text{mM}]$	$0,143 \pm 0,030$
$K_i^{\text{NADH}} [\text{mM}]$	$0,006 \pm 0,002$
$K_i^{\text{acetaldehyd}} [\text{mM}]$	$0,082 \pm 0,007$

Prema vrijednostima parametara prikazanih u tablici 4, uočava se da enzim ADH Sc u reakciji oksidacije etanola ima veći afinitet prema  $\text{NAD}^+$  zbog niže vrijednosti



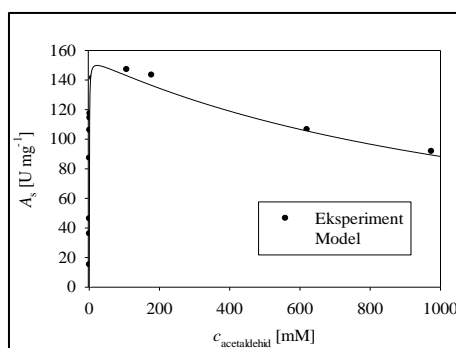
Michaelis-Menteničine konstante. Niža vrijednost konstante inhibicije ukazuje da je enzim u ovoj reakciji značajno inhibiran s NADH.

#### 4.1.1.2. Kinetika enzima ADH Sc u reakciji redukcije acetaldehida

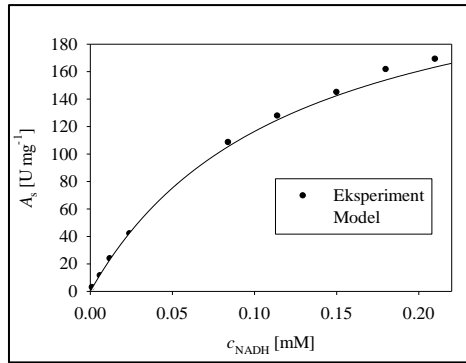
U reakciji redukcije acetaldehida supstrati su acetaldehid i NADH, a produkti reakcije etanol i koenzim  $\text{NAD}^+$ . Kinetika enzima alkohol dehidrogenaze (ADH Sc) u reakciji prikazana je kao ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji supstrata, acetaldehida (slika 30) i NADH (slika 31), te je utjecaj produkata,  $\text{NAD}^+$  i etanola, na brzinu reakcije, prikazan na slikama 32 i 33. Iako je vidljivo određeno odstupanje eksperimentalnih podataka od modela, posebice na slikama 32 i 33, iz trenda dobivenih eksperimentalnih podataka vidljiv je trend sukladan Michaelis-Menteničinoj kinetici. Budući da je iz slika 32 i 33 vidljivo da porastom koncentracije  $\text{NAD}^+$  i etanola dolazi do pada specifične aktivnosti enzima, uočava se inhibicijski učinak produkata koji je uzet u obzir prilikom opisivanja kinetike reakcije redukcije acetaldehida. Osim inhibicije produktima, na slici 30 uočava se inhibicijski učinak supstrata acetaldehida na ovu reakciju.

Nadalje, vrijednosti Michaelis-Menteničnih konstanti i vrijednosti parametara modela procijenjeni su nelinearnom regresijom iz eksperimentalnih podataka te su prikazane u tablici 5, pri čemu  $V_m$  označuje maksimalnu brzinu reakcije,  $K_m$  vrijednosti Michaelis-Mentenične konstante za acetaldehid i NADH ( $K_m^{\text{acetaldehid}}$ ,  $K_m^{\text{NADH}}$ ) te konstante inhibicije supstratom, acetaldehidom, ( $K_{is}^{\text{acetaldehid}}$ ) te konstante inhibicije za etanol i  $\text{NAD}^+$  ( $K_i^{\text{etanol}}$ ,  $K_i^{\text{NAD}^+}$ ).

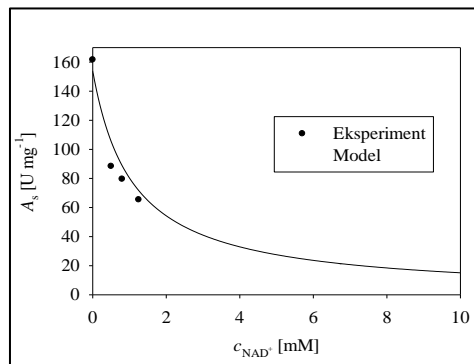
Na temelju procijenjenih kinetičkih parametara, prikazanih u tablici 5, razvijen je kinetički model redukcije acetaldehida, na način opisan u prethodnom poglavlju te je prikazan u prilogu 5.



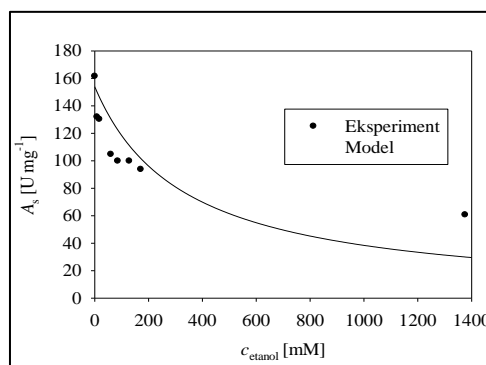
**Slika 30.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH Sc o koncentraciji acetaldehida u reakciji redukcije acetaldehida ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH Sc}}=0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADH}}=0,18 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{acetaldehid}}=0,018 - 974,04 \text{ mM}$ )



**Slika 31.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH  $S_c$  o koncentraciji NADH u reakciji redukcije acetaldehida ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } S_c}=0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{acetaldehid}}=61,985 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADH}}=0,0012 - 0,21 \text{ mM}$ )



**Slika 32.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH  $S_c$  o koncentraciji  $\text{NAD}^+$  u reakciji redukcije acetaldehida ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{acetaldehid}}=61,985 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH } S_c}=0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADH}}=0,18 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=0,00 - 9,0 \text{ mM}$ )



**Slika 33.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH  $S_c$  o koncentraciji etanola u reakciji redukcije acetaldehida ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{acetaldehid}}=61,985 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH } S_c}=0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=0,18 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{etanol}}=0,00 - 1375,90 \text{ mM}$ )

**Tablica 5.** Procijenjeni kinetički parametri za ADH *Sc* u reakciji redukcije acetaldehida

Parametar	Vrijednost
$V_m$ [U mg <sup>-1</sup> ]	258,945 ± 17,745
$K_m^{\text{acetaldehid}}$ [mM]	0,370 ± 0,034
$K_m^{\text{NADH}}$ [mM]	0,121 ± 0,019
$K_{is}^{\text{acetaldehid}}$ [mM]	1328,845 ± 153,712
$K_i^{\text{NAD}^+}$ [mM]	0,438 ± 0,134
$K_i^{\text{etanol}}$ [mM]	1,978 ± 0,495

Prema procijenjenim vrijednostima konstante  $K_m$  za acetaldehid i NADH, prikazanim u tablici 5, vidljivo je da je afinitet enzima ADH uvelike veći prema NADH, od onog prema acetaldehida. Iako postoji određena inhibicija supstratom,  $K_{is}^{\text{acetaldehid}}$  poprima velike vrijednosti, što upućuje na činjenicu da inhibicija nije značajna. Iz najmanje vrijednost inhibicijske konstante vidljive kod  $\text{NAD}^+$ , uočava se značajno inhibicijsko djelovanje na enzim.

#### 4.1.1.3. Usporedba kinetike ADH *Sc* u reakcijama oksidacije etanola i reakcije redukcije acetaldehida

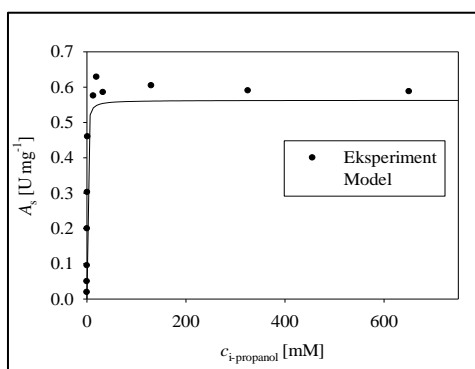
Usporedbom tablica 4 i 5, vidljivo je da je maksimalna brzina reakcije,  $V_m$ , tj. maksimalna aktivnost alkohol dehidrogenaze u redukciji acetaldehida mnogo veća nego u reakciji oksidacije etanola, što upućuje na činjenicu da je reakcija redukcije acetaldehida brža od reakcije oksidacije etanola. Nadalje, procijenjene vrijednosti  $K_m$  pokazuju da je enzim ADH *Sc* specifičniji u reakciji redukcije acetaldehida.

#### 4.1.1.4. Kinetika enzima ADH *Lb* u reakciji oksidacije 2-propanola

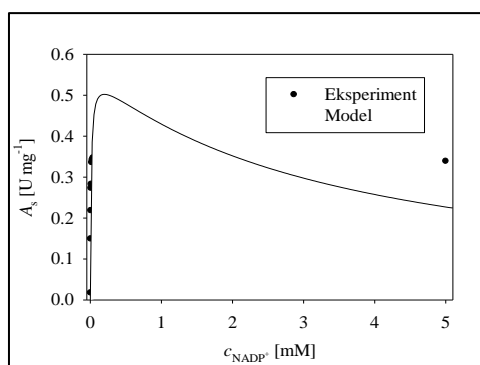
U reakciji oksidacije 2-propanola supstrati su 2-propanol i koenzim  $\text{NADP}^+$ , a produkti reakcije su aceton i NADPH. Kinetika alkohol dehidrogenaze (ADH *Lb*) prikazana je kao ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji supstrata, 2-propanola (slika 34), i  $\text{NADP}^+$  (slika 35), te je utjecaj produkata, NADPH i acetona, na brzinu reakcije, prikazan na slikama 36 i 37. Iako se može uočiti odstupanje modela od eksperimentalnih podataka, vidljiv je trend sukladan Michaelis-Menteničnoj kinetici. Kinetika reakcije oksidacije 2-propanola katalizirane alkohol dehidrogenazom (ADH *Lb*) opisana je dvosupstratnom Michaelis-

Menteničnom kinetikom s uključenom inhibicijom produktima. Iz slike 35 može se uočiti inhibicija supstratom  $\text{NADP}^+$ .

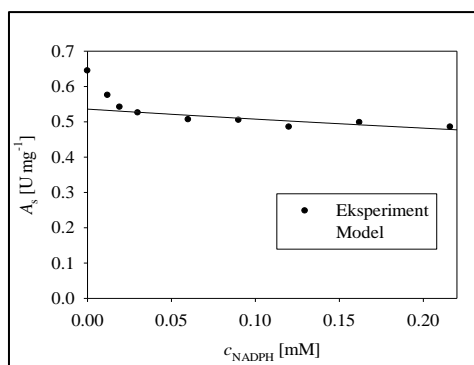
Vrijednosti Michaelis-Menteničnih konstanti i vrijednosti parametara modela procijenjeni su nelinearnom regresijom iz eksperimentalnih podataka te su prikazane u tablici 6, pri čemu  $V_m$  označuje maksimalnu brzinu reakcije,  $K_m$  vrijednosti Michaelis-Mentenične konstante za 2-propanol i  $\text{NADP}^+$  ( $K_m^{2\text{-propanol}}$ ,  $K_m^{\text{NADP}^+}$ ) te konstanta inhibicije supstratom,  $\text{NADP}^+$ , ( $K_{is}^{\text{NADP}^+}$ ) te konstante inhibicije za NADPH i aceton ( $K_i^{\text{NADPH}}$ ,  $K_i^{\text{aceton}}$ ). Program u *Scientist*-u prikazan je u prilogu 6.



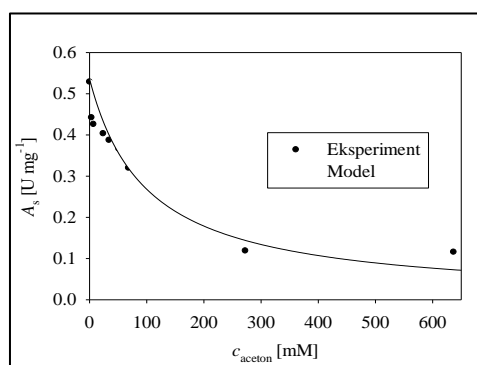
**Slika 34.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH *Lb* o koncentraciji 2-propanola u reakciji oksidacije 2-propanola ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb} = 1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 1,0 \text{ mM}$ ,  $c_{2\text{-propanol}}=0,01 - 1249,23 \text{ mM}$ )



**Slika 35.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH *Lb* o koncentraciji  $\text{NADP}^+$  u reakciji oksidacije 2-propanola ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb} = 1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{2\text{-propanol}} = 32,53 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+} = 0,0005 - 5,00 \text{ mM}$ )



**Slika 36.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH *Lb* o koncentraciji NADPH u reakciji oksidacije 2-propanola ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb}=1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{2\text{-propanol}}=32,53 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+}=0,25 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}}=0,00\text{-}0,216 \text{ mM}$ )



**Slika 37.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH *Lb* o koncentraciji acetona u reakciji oksidacije 2-propanola ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb}=1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{2\text{-propanol}}=32,53 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+}=0,25 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{acetone}}=0 - 636,70 \text{ mM}$ )

**Tablica 6.** Procijenjeni kinetički parametri za ADH *Lb* u reakciji oksidacije 2-propanola

Parametar	Vrijednost
$V_m$ [ $\text{U mg}^{-1}$ ]	$0,569 \pm 0,021$
$K_m^{2\text{-propanol}}$ [mM]	$0,515 \pm 0,122$
$K_m^{\text{NADP}^+}$ [mM]	$0,011 \pm 0,002$
$K_{is}^{\text{NADP}^+}$ [mM]	$3,413 \pm 0,928$
$K_i^{\text{NADPH}}$ [mM]	$0,078 \pm 0,042$
$K_i^{\text{acetone}}$ [mM]	$1,562 \pm 0,239$

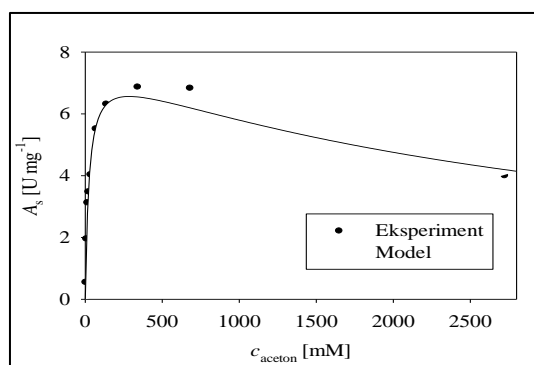
Prema procijenjenim vrijednostima konstante  $K_m$  za 2-propanol i NADPH, prikazanim u tablici 6, vidljivo je da je afinitet enzima prema  $\text{NADP}^+$  veći od onog prema 2-propanolu, pri

čemu je, ujedno, prisutna značajnija inhibicija enzima prema NADPH. Također, uočena je inhibicija supstratom  $\text{NADP}^+$ , no nije značajna. Slika 35 prikazuje inhibiciju supstratom,  $\text{NADP}^+$ , pri čemu je vidljivo da se najveća specifična aktivnost enzima,  $A_s$ , ostvaruje pri koncentracijama  $\text{NADP}^+$  nižim od 0,25 mM.

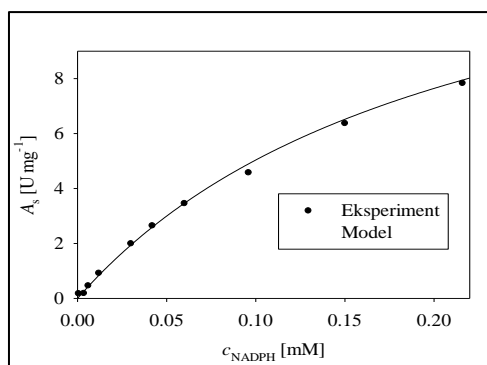
#### 4.1.1.5. Kinetika enzima ADH *Lb* u reakciji redukcije acetona

U reakciji redukcije acetona supstrati su aceton i NADPH, a produkti su 2-propanol i koenzim  $\text{NADP}^+$ . Kinetika alkohol dehidrogenaze (ADH *Lb*) prikazana je kao ovisnost specifične enzimске aktivnosti o koncentraciji supstrata, acetona (slika 38) i NADPH (slika 39), te produkata  $\text{NADP}^+$  i 2-propanola, prikazanim na slikama 40 i 41. Iz trenda dobivenih eksperimentalnih podataka može se zaključiti da se radi o Michaelis-Menteničnoj kinetici. Kinetika reakcije redukcije acetona katalizirane alkohol dehidrogenazom (ADH *Lb*) opisana je dvosupstratnom Michaelis- Menteničinom kinetikom s uključenom inhibicijom produktima. Iz slike 38 vidljivo je da u reakciji postoji inhibicija supstratom, acetonom.

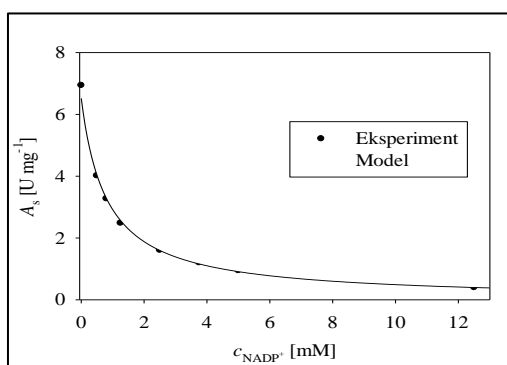
Vrijednosti Michaelis-Menteničnih konstanti i vrijednosti parametara modela procijenjeni su nelinearnom regresijom iz eksperimentalnih podataka te su prikazane u tablici 7, pri čemu  $V_m$  označuje maksimalnu brzinu reakcije,  $K_m$  vrijednosti Michaelis-Mentenične konstante za 2-propanol i  $\text{NADP}^+$  ( $K_m^{2\text{-propanol}}$ ,  $K_m^{\text{NADP}^+}$ ), konstantu inhibicije supstratom acetonom ( $K_i^{\text{aceton}}$ ) te konstante inhibicije za NADPH i aceton ( $K_i^{\text{NADPH}}$ ,  $K_i^{\text{aceton}}$ ). Program u *Scientist*-u prikazan je u prilogu 7.



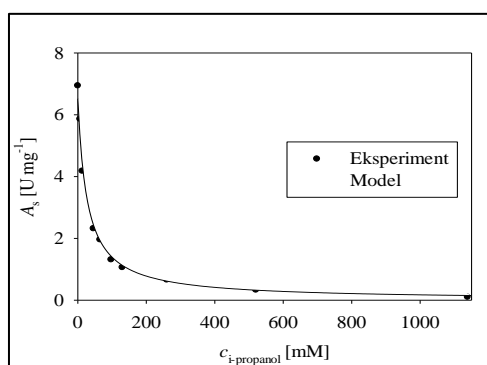
**Slika 38.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH *Lb* o koncentraciji acetona u reakciji redukcije acetona ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni puffer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb}=1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADPH}}=0,15 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{aceton}}=1,36 - 2723,83 \text{ mM}$ )



**Slika 39.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH *Lb* o koncentraciji NADPH u reakciji redukcije acetona ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb}= 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{aceton}}=136,19 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}}= 0,0006 - 0,216 \text{ mM}$  )



**Slika 40.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH *Lb* o koncentraciji  $\text{NADP}^+$  u reakciji redukcije acetona ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb}= 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{aceton}}=136, 19 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}}= 0,15 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+}=0,00-12,50 \text{ mM}$  )



**Slika 41.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima ADH *Lb* o koncentraciji 2-propanola u reakciji redukcije acetona ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb}= 1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{aceton}}=136,19 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADPH}}= 0,15 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{2-propanol}}=0,00 - 1138,62 \text{ mM}$ )

**Tablica 7.** Procijenjeni kinetički parametri za ADH *Lb* u reakciji redukcije acetona

Parametar	Vrijednost
$V_m$ [U mg <sup>-1</sup> ]	18,672 ± 2,067
$K_m^{\text{aceton}}$ [mM]	24,490 ± 2,558
$K_m^{\text{NADPH}}$ [mM]	0,214 ± 0,038
$K_{is}^{\text{aceton}}$ [mM]	3302,29 ± 436,193
$K_i^{\text{NADP}^+}$ [mM]	0,477 ± 0,023
$K_i^{\text{2-propanol}}$ [mM]	4,137 ± 0,350

Prema procijenjenim vrijednostima konstante  $K_m$  za acetone i NADPH, prikazanim u tablici 7, vidljivo je da je afinitet enzima ADH *Lb* uvelike veći prema NADPH, te da prema NADP<sup>+</sup> pokazuje značajniju inhibiciju od one prema 2-propanolu.

#### 4.1.1.6. Usporedba kinetike ADH *Lb* u reakcijama oksidacije 2-propanola i reakcije redukcije acetona

Uspoređujući rezultate u tablici 6 i tablici 7 vidljivo je da je maksimalna brzina reakcije redukcije acetona znatno veća od one oksidacije 2-propanola te da obe reakcije pokazuju inhibiciju supstratom, pri čemu je konstanta inhibicije acetonom u reakciji redukcije acetona vrlo mala.

#### 4.1.2. Određivanje kinetike enzima NAD(P)H-oksidade (NOX)

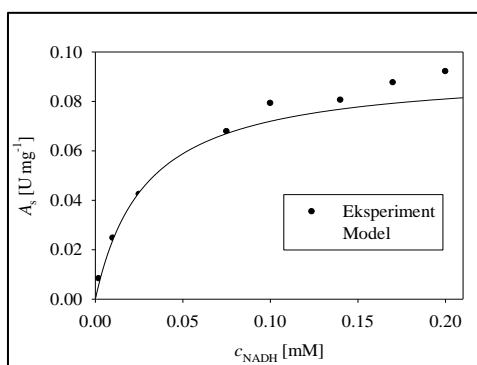
##### 4.1.2.1. Kinetika enzima NOX u reakciji oksidacije NADH

Kinetika enzima NOX ispitana je u reakcijama oksidacije NADH, varirajući koncentraciju NADH i kisika, prikazano na slikama 42 i 43. Također je ispitan i utjecaj produkta NAD<sup>+</sup> (slika 44), te utjecaj komponenti reakcijske smjese prilikom oksidacije etanola (etanol- slika 45, acetaldehid – slika 46) na reakcijsku brzinu. Iako je vidljivo odstupanje eksperimentalnih podataka od modela, vidljiv je trend Michaelis-Mentenične kinetike. Program u *Scientist*-u za simulaciju navedene reakcije prikazan je u prilogu 8. Iz priloga 9 i 10 vidljivi su programi u kojima su izračunati ukupni volumni koeficijent prijenosa kisika,  $k_{La}$ , te kinetika kisika u ovoj reakciji, kao i grafički prikaz usporedbe eksperimentalnih podataka i modela za  $k_{La}$ . Vodljivost iznosi 1300 μS cm<sup>-1</sup>, tlak 750 mmHg, temperatura 25°C, dok se iz priloga 2 i 3 očitava topljivost kisika 8,1 mg L<sup>-1</sup> i korekcijski faktor 0,958, pri čemu se

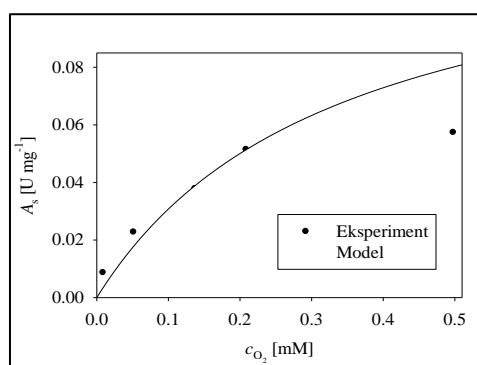


množenjem prethodne dvije vrijednosti izračunala korigirana topljivost kisika koja iznosi 7,7598 mg L<sup>-1</sup>.

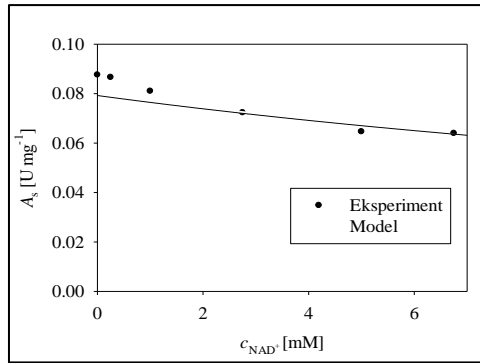
Stoga, u ispitivanoj reakciji oksidacije NADH za ispitivanje kinetike enzima NOX vrijednosti Michaelis-Menteničnih konstanti i vrijednosti parametara modela procijenjeni su nelinearnom regresijom iz eksperimentalnih podataka te su prikazane u tablici 8, pri čemu  $V_m$  označuje maksimalnu brzinu reakcije,  $K_m$  vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante za NADH i O<sub>2</sub> ( $K_m^{NADH}$ ,  $K_m^{O_2}$ ) te konstante inhibicije NAD<sup>+</sup>, etanol i acetaldehid ( $K_i^{NAD^+}$ ,  $K_i^{etanol}$ ,  $K_i^{acetaldehid}$ ).



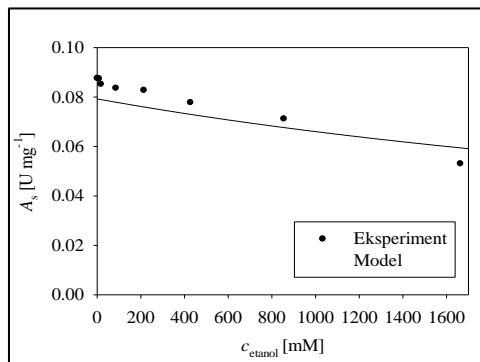
**Slika 42.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima NOX u reakciji oksidacije NADH u ovisnosti o koncentraciji NADH ( $T=25^{\circ}C$ ,  $c_{fosfatni\ pufer}=0,1\ M$ ,  $pH=8$ ,  $\gamma_{NOX}=20,00\ mg\ mL^{-1}$ ,  $c_{NADH}=0,002-0,20\ mM$ )



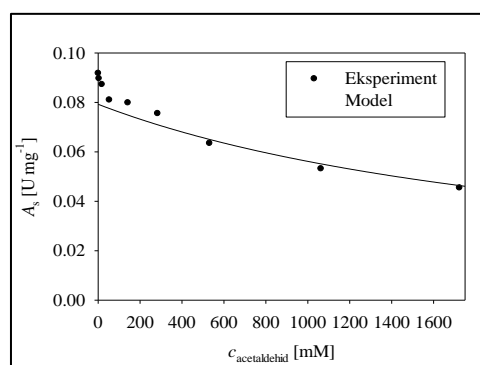
**Slika 43.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima NOX u reakciji oksidacije NADH u ovisnosti o koncentraciji kisika ( $T=25^{\circ}C$ ,  $c_{fosfatni\ pufer}=0,1\ M$ ,  $pH=8$ ,  $c_{NADH}=0,17\ mM$ ,  $c_{NOX}=0,20\ mM$  ili  $c_{NOX}=0,40\ mM$ ,  $c_{O_2}=0,009 - 0,51\ mM$ )



**Slika 44.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima NOX u reakciji oksidacije NADH u ovisnosti o koncentraciji  $\text{NAD}^+$  ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=20,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADH}}=0,17 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=0,00 - 6,75 \text{ mM}$ )



**Slika 45.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima NOX u reakciji oksidacije NADH u ovisnosti o koncentraciji etanola ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=20,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADH}}=0,17 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{etanol}}=0,00-1663,04 \text{ mM}$ )



**Slika 46.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima NOX u reakciji oksidacije NADH u ovisnosti o koncentraciji acetaldehida ( $T=25^\circ\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=20,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADH}}=0,17 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{acetaldehid}}=0,00 - 1723,17 \text{ mM}$ )

**Tablica 8.** Procijenjeni kinetički parametri za oksidaciju NADH kataliziranu enzimom NOX

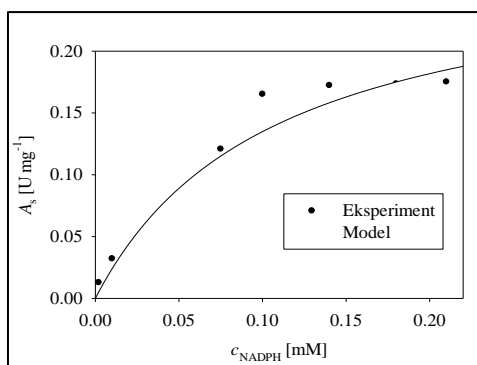
Parametar	Vrijednost
$V_m$ [U mg <sup>-1</sup> ]	0,157 ± 0,031
$K_m^{\text{NADH}}$ [mM]	0,029 ± 0,009
$K_m^{\text{O}_2}$ [mM]	0,336 ± 0,132
$K_i^{\text{NAD}^+}$ [mM]	3,967 ± 1,281
$K_i^{\text{etanol}}$ [mM]	720,20 ± 261,68
$K_i^{\text{acetaldehid}}$ [mM]	350,89 ± 85,645

Iz dobivenih kinetičkih parametara prikazanim na tablici 8 uočava se da je afinitet enzima NOX prema kisiku značajan. Vrijednosti Michaelis-Menteničnih konstanti inhibicije za etanol i acetaldehid su vrlo velike te nisu značajne, dok je značajnija inhibicija NAD<sup>+</sup>.

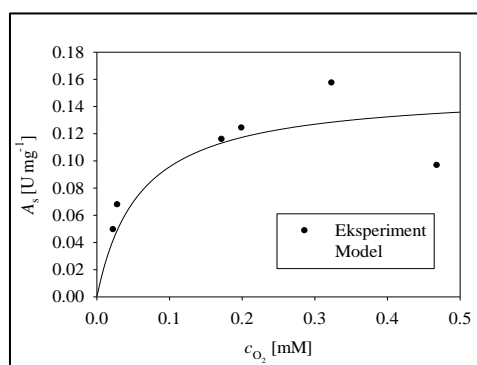
#### 4.1.2.2. Kinetika enzima NOX u reakciji oksidacije NADPH

Kinetika enzima NOX ispitana je u reakcijama oksidacije NADPH, varirajući koncentraciju NADPH i kisika, prikazano na slikama 47 i 48. Također, prikazan je utjecaj reakcijske smjese prilikom oksidacije 2-propanola (2-propanol – slika 49, aceton - slika 50). Provedenim eksperimentom u kojem se ispitivala inhibicija NADP<sup>+</sup> dokazano je da ne postoji inhibicija NADP<sup>+</sup>.

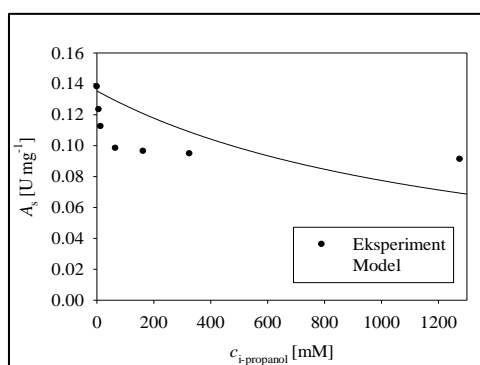
U ispitivanoj reakciji oksidacije NADPH za ispitivanje kinetike enzima NOX vrijednosti Michaelis-Menteničnih konstanti i vrijednosti parametara modela procijenjeni su nelinearnom regresijom iz eksperimentalnih podataka te su prikazane u tablici 9, pri čemu  $V_m$  označuje maksimalnu brzinu reakcije,  $K_m$  vrijednosti Michaelis-Mentenične konstante za NADPH i O<sub>2</sub> ( $K_m^{\text{NADPH}}$ ,  $K_m^{\text{O}_2}$ ) te konstante inhibicije NADP<sup>+</sup>, 2-propanol i aceton ( $K_{is}^{\text{NADP}^+}$ ,  $K_i^{2\text{-propanol}}$ ,  $K_i^{\text{aceton}}$ ). Program u *Scientist*-u za simulaciju reakcije oksidacije NADPH prikazan je u prilogu 11, dok je u prilogu 12 prikazan program za određivanje kinetike kisika u provedenoj reakciji. U prilogu 9 prikazan je program i grafički prikaz usporedbe modela i eksperimentalnih podataka za  $k_{La}$ .



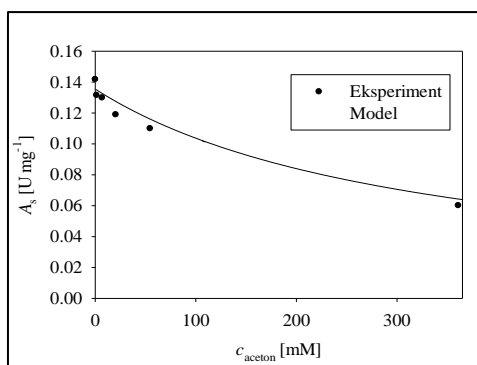
**Slika 47.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima NOX u reakciji oksidacije NADPH u ovisnosti o koncentraciji NADPH ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}= 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADPH}}=0,002-0,210 \text{ mM}$ )



**Slika 48.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima NOX u reakciji oksidacije NADPH u ovisnosti o koncentraciji kisika ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{NADPH}}=0,10 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}= 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{O}_2}=0,022 - 0,468 \text{ mM}$ )



**Slika 49.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima NOX u reakciji oksidacije NADPH u ovisnosti o koncentraciji 2-propanola ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}= 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADPH}}=0,10 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{2-propanol}}=0,00-1275,26 \text{ mM}$ )



**Slika 50.** Ovisnost specifične aktivnosti enzima NOX u reakciji oksidacije NADPH u ovisnosti o koncentraciji acetona ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADPH}}=0,10 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{acetone}}=0,00 - 1361,92 \text{ mM}$ )

**Tablica 9.** Procijenjeni kinetički parametri za oksidaciju NADPH kataliziranu enzimom NOX

Parametar	Vrijednost
$V_m \text{ [U mg}^{-1}\text{]}$	$0,314 \pm 0,061$
$K_m^{\text{NADPH}} \text{ [mM]}$	$0,107 \pm 0,044$
$K_m^{\text{O}_2} \text{ [mM]}$	$0,059 \pm 0,022$
$K_i^{\text{NADP}^+} \text{ [mM]}$	-
$K_i^{2\text{-propanol}} \text{ [mM]}$	$689,108 \pm 266,907$
$K_i^{\text{acetone}} \text{ [mM]}$	$168,33 \pm 18,564$

Iz dobivenih podataka prikazanim na tablici 9 uočava se značajan afinitet enzima NOX prema kisiku, pri čemu inhibicije produktima nisu značajne.

#### 4.1.2.3. Usporedba kinetike enzima NOX u reakcijama oksidacije NADH i NADPH

Uspoređujući podatke u tablicama 8 i 9, iz vrijednosti maksimalne brzine reakcije, uočava se da je reakcija oksidacije NADPH s enzimom NOX brža od reakcije oksidacije NADH. Nadalje, iz vrijednosti konstanti inhibicije vidljivo je da postoji određena inhibicija enzima s  $\text{NAD}^+$  u reakciji oksidacije NADH, dok inhibicija s  $\text{NADP}^+$  nije mjerljiva. Obe reakcije pokazuju nisku vrijednost Michaelis-Menteničnih konstanti za kisik, pri čemu se može zaključiti da ovim reakcijama koncentracija kisika nije ograničavajući faktor u postizanju najveće enzimatske aktivnosti, što ide u prilog činjenici da nije potrebna učestala aeracija reakcijske smjese za postizanje dobre aktivnosti kako bi se enzim stabilizirao, kao što je slučaj kod mnogobrojnih oksidaza [73].

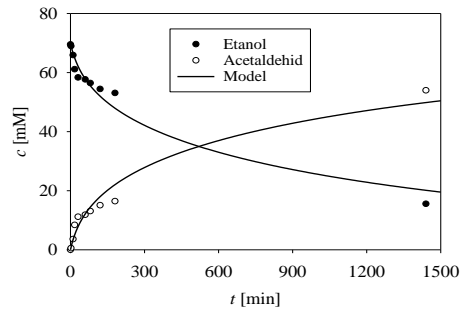
## 4.2. Provođenje procesa oksidacije katalizirane oksidoreduktazama u kotlastom reaktoru

### 4.2.1. Reakcija oksidacije etanola katalizirana enzimom ADH *Sc* uz regeneraciju koenzima NAD<sup>+</sup>

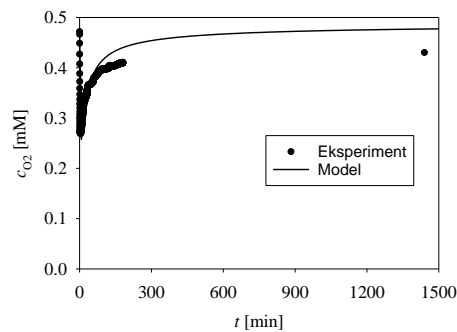
Reakcije oksidacije etanola katalizirane enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Saccharomyces cerevisiae* uz regeneraciju koenzima NAD<sup>+</sup> za kotlasti reaktor provedene su u kotlastom reaktoru, pri čemu se tijekom 24 h pratila koncentracija etanola, acetaldehida i kisika, te stabilnost enzima. Na slici 51 prikazana je usporedba eksperimentalnih podataka i simulacija pomoću modela prikazanog u poglavlju 3.4. U prilogu 13 prikazan je program u *Scientist*-u koji je korišten u određivanju operacijske stabilnosti enzima, dok je u prilogu 14 prikazan program iz kojeg su se izračunale inaktivacijske konstante enzima ADH *Sc* i NOX.

Iz slike 52 vidljiv je porast koncentracije kisika tijekom reakcije. Iz slika 53 i 54 uočava se da dolazi do inaktivacije enzima ADH *Sc* i NOX, pri čemu je nakon 1440 minuta aktivnost ADH *Sc* opala na 20 % početne aktivnosti, a NOX na 60 % početne aktivnosti. Inaktivacijske konstante ( $k_d$ ) prikazane su u tablici 10. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je predloženi matematički model dobro opisao proces.

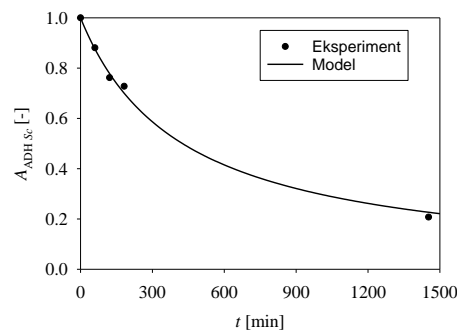
Konverzija etanola na 24 h provedenog procesa iznosi 77,45 %. Razlog nepostizanja potpune konverzije je inaktivacija enzima ADH *Sc* koja je značajno usporila tijek reakcije. Također, u sustavu oksidacije etanola povratna reakcija je prema procijenjenim kinetičkim parametrima prikazanim u tablicama 4 i 5 značajno brža, a regeneracija koenzima NAD<sup>+</sup> uz korišteni enzim nije dovoljno brza da bi mogla efikasno pomaknuti ravnotežu u stranu nastajanja produkta.



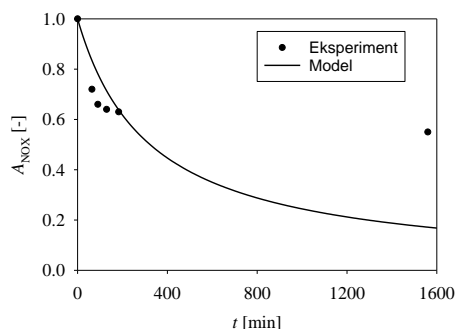
**Slika 51.** Usporedba eksperimentalnih podataka i simulacije modela za promjenu koncentracije supstrata (etanola) i produkta (acetaldehida) u reakciji oksidacije etanola katalizirane enzimom ADH Sc u kotlastom reaktoru uz regeneraciju koenzima NAD<sup>+</sup> enzimom NOX ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{etanol}}=70,00 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH Sc}}=1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=1,80 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=6,00 \text{ mg mL}^{-1}$ )



**Slika 52.** Koncentracija kisika u reakciji oksidacije etanola prikazana kao funkcija vremena ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{etanol}}=70,00 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH Sc}}=1,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=1,80 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=6,00 \text{ mg mL}^{-1}$ )



**Slika 53.** Određivanje operativne stabilnosti enzima ADH Sc u reakciji oksidacije etanola kao funkcija vremena ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{NAD}^+}=0,60 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{EtOH}}=76,91 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH Sc}}=6,25 \cdot 10^{-4} \text{ mg mL}^{-1}$ )



**Slika 54.** Određivanje operativne stabilnosti enzima NOX u reakciji oksidacije etanola kao funkcija vremena ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=0,1125 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADH}}=0,10 \text{ mM}$ )

**Tablica 10.** Inaktivacijske konstante za enzime ADH *Sc* i NOX

Enzim	$k_d$ [ $\text{min}^{-1}$ ]
ADH <i>Sc</i>	$0,002 \pm 0001$
NOX	$0,006 \pm 0,002$

Ukupni broj obrtaja enzima iznosi:

$$TTN = \frac{n_{\text{acetaldehyd}}}{n_{\text{NAD}^+}} = \frac{c_{\text{acetaldehyd}} \cdot V_{\text{ukupni}}}{c_{\text{NAD}^+} \cdot V_{\text{ukupni}}} = \frac{c_{\text{acetaldehyd}}}{c_{\text{NAD}^+}} = \frac{53,99 \text{ mM}}{1,8 \text{ mM}} = 29,99 \quad (3.25.)$$

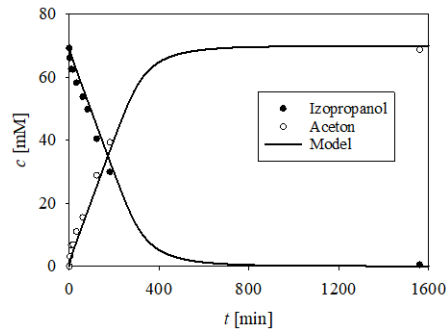
#### 4.2.2. Reakcija oksidacije 2-propanola katalizirana enzimom ADH *Lb* uz regeneraciju koenzima $\text{NADP}^+$

Reakcije oksidacije 2-propanola katalizirane enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis* uz regeneraciju koenzima  $\text{NADP}^+$  za kotlasti reaktor provedene su u kotlastom reaktoru, pri čemu se tijekom 24 h pratila koncentracija 2-propanola, acetona, kisika te stabilnost enzima. Na slici 55 prikazana je usporedba eksperimentalnih podataka i simulacija pomoću modela prikazanog u poglavlju 3.4. U prilogu 15 prikazan je program u *Scientist*-u koji je korišten u određivanju operacijske stabilnosti enzima, dok je u prilogu 16 prikazan program iz kojeg su se izračunale inaktivacijske konstante enzima ADH *Lb* i NOX.

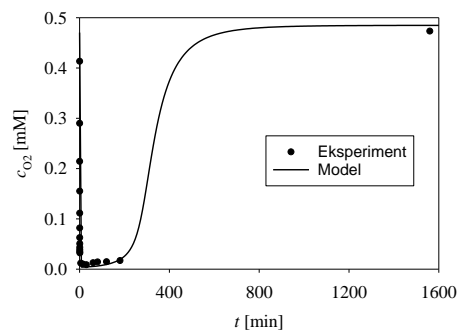
Na slici 56 prikazana je promjena koncentracije kisika u vremenu. Iz slika 57 i 58 uočava se da dolazi do inaktivacije enzima ADH *Lb* i NOX, pri čemu je nakon 1560 minuta



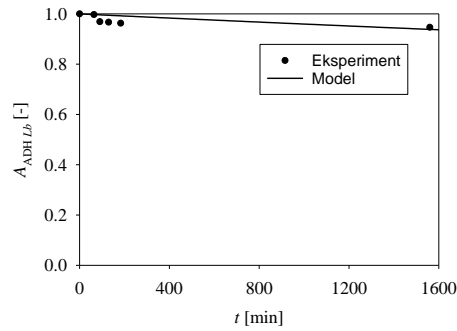
aktivnost ADH *Lb* u potpunosti opala na 95 % početne aktivnosti, a NOX na 55 % početne aktivnosti. Inaktivacijske konstante ( $k_d$ ) prikazane su u tablici 11. Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je predloženi matematički model dobro opisao proces. Konverzija 2-propanola nakon provedenog procesa iznosi 99,30 %, što je značajno.



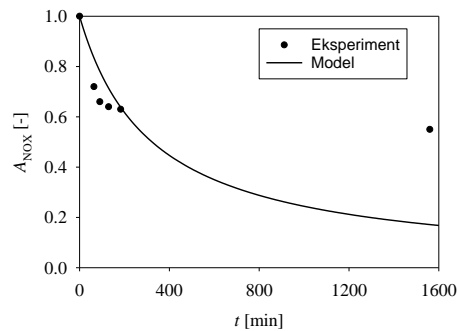
**Slika 55.** Usporedba eksperimentalnih podataka i simulacije modela za promjenu koncentracije supstrata (2-propanola) i produkta (acetona) u reakciji oksidacije 2-propanola katalizirane enzimom ADH *Lb* u kotlastom reaktoru uz regeneraciju koenzima enzimom NOX ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{2\text{-propanol}}=70,00 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+}=0,50 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb}=8,00 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=12,00 \text{ mg mL}^{-1}$ )



**Slika 56.** Koncentracija kisika u reakciji oksidacije 2-propanola prikazana kao funkcija vremena ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{etanol}}=70,00 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NADP}^+}=0,50 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb}=8,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=12,00 \text{ mg mL}^{-1}$ )



**Slika 57.** Aktivnost enzima ADH *Lb* u reakciji oksidacije 2-propanola prikazana kao funkcija vremena ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{ADH } Lb}=6,67 \cdot 10^{-3} \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADPH}}=0,10 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{aceton}}=30,64 \text{ mM}$ )



**Slika 58.** Aktivnost enzima NOX reakciji oksidacije 2-propanola prikazana kao funkcija vremena ( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $\gamma_{\text{NOX}}=0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NADPH}}=0,10 \text{ mM}$ )

**Tablica 11.** Inaktivacijske konstante za enzime ADH *Lb* i NOX

Enzim	$k_d [\text{min}^{-1}]$
ADH <i>Lb</i>	$4,204 \cdot 10^{-5}$
NOX	0,0031

Ukupni broj obrtaja enzima iznosi:

$$TTN = \frac{n_{\text{aceton}}}{n_{\text{NADP}^+}} = \frac{c_{\text{aceton}} \cdot V_{\text{ukupni}}}{c_{\text{NADP}^+} \cdot V_{\text{ukupni}}} = \frac{c_{\text{aceton}}}{c_{\text{NAD}^+}} = \frac{68,81}{0,50} = 137,62 \quad (3.26.)$$

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu uspješno je provedeno istraživanje potencijalne upotrebe enzima NAD(P)H oksidaze (NOX) za regeneraciju koenzima  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADP}^+$  u reakcijama oksidacije etanola i 2-propanola kataliziranim enzimom alkohol dehidrogenazom iz dvaju izvora (ADH iz *Saccharomyces cerevisiae* i ADH iz *Lactobacillus brevis*). Određen je ukupni broj obrtaja (TTN) koenzima u svakoj reakciji, izmjerena je kinetika svih upotrijebljenih enzima te je uspostavljen i validiran procesni model u kotlastom bioreaktoru. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. U reakciji oksidacije etanola uočena je značajna kompetitivna inhibicija enzima alkohol dehidrogenaze (ADH *Sc*) produktom NADH.

2. U reakciji redukcije acetaldehida uočena je kompetitivna inhibicija enzima ADH *Sc* supstratom, acetaldehidom, te inhibicije produktima  $\text{NAD}^+$  i etanolom. U odnosu na reakciju oksidacije etanola, reakcija redukcije acetaldehida mnogo je brža.

3. U reakciji oksidacije 2-propanola uočena je inhibicija enzima alkohol dehidrogenaze (ADH *Lb*) supstratom  $\text{NADP}^+$  te produktima NADPH i acetonom. Reakcija je vrlo spora.

4. U reakciji redukcije acetona uočena je kompetitivna inhibicija enzima ADH *Lb* supstratom, acetonom, te produktima  $\text{NADP}^+$  i 2-propanolom. U odnosu na prethodnu, ova reakcija se pokazala bržom.

5. U reakciji oksidacije NADH uočena je kompetitivna inhibicija enzima NOX supstratom  $\text{NAD}^+$  te produktima etanolom i acetaldehidom. Uočen je značajan porast koncentracije kisika u reakciji.

6. U reakciji oksidacije NADPH uočena je inhibicija produktom 2-propanolom te produktom acetonom. Također, uočen je značajan porast koncentracije kisika.

7. Prilikom određivanja operativne stabilnosti enzima ADH *Sc* i NOX u sustavu oksidacije etanola ostvarena je konverzija etanola 77,45 %, pri čemu je razlog nepostizanja potpune konverzije inaktivacija enzima ADH *Sc* koja je značajno usporila tijek reakcije. Također, u sustavu oksidacije etanola povratna reakcija je, prema procijenjenim kinetičkim parametrima, značajno brža. Regeneracija koenzima  $\text{NAD}^+$  uz korišteni enzim nije dovoljno brza da bi mogla efikasno pomaknuti ravnotežu u stranu nastajanja produkta. Broj obrtaja koenzima  $\text{NAD}^+$  u provedenoj reakciji iznosi 29,99.

8. Prilikom određivanja operativne stabilnosti enzima ADH *Lb* i NOX u sustavu oksidacije 2-propanola ostvarena je konverzija 2-propanola 99,30 %. Ukupni broj obrtaja koenzima NADP<sup>+</sup> je 137,62. Stoga, u reakciji oksidacije 2-propanola u odnosu na reakciju oksidacije etanola ostvarena je znatno bolja konverzija supstrata te regeneracija koenzima.

Ovim radom je pokazano da se enzim NAD(P)H oksidaza može uspješno primijeniti za regeneraciju koenzima NAD<sup>+</sup> i NADP<sup>+</sup>, s tim da je regeneracija NADP<sup>+</sup> uspješnija. No, na temelju izračunatih TTN vrijednosti može se zaključiti da se oba provedena procesa moraju dodatno optimirati kako bi TTN zadovoljio industrijske zahtjeve (> 1000).

## 6. LITERATURA

- [1] M. Fasciotti, Perspectives for the use of biotechnology in green chemistry applied to biopolymers, fuels and organic synthesis: from concepts to a critical point of view, *Sustain. Chem. Pharm.* 6 (2017) 82–89.
- [2] E. P. Cicolatti, M. C. Cerqueira Pinto, R. O. Henriques, J. C. C. da Silva Pinto, A. M. de Castro, D. M. G. Freire, E. A. Manoel, u R. S. Singh, R. R. Singhanian, A. Pandey, C. Larroche (ur.), *Biomass, Biofuels and Biochemicals: Advances in Enzyme Technology*, 1. izdanje Elsevier, Amsterdam, 2019, str. 137–151.
- [3] G. Iaquaniello, A. Cicci, How green chemistry will change chemical engineering, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 179 (2020) 21-34
- [4] M. Jukić, S. Đaković, Ž. Filipović-Kovačević, V. Kovač, J. Vorkapić-Furač, Dominantni trendovi „zelene” kemije, *Kem. Ind.* 54 (5) (2005) 255–272
- [5] P. T. Anastas, L. B. Bartlett, M. M. Kirchoff, T. C. Williamson, The role of catalysis in the design, development, and implementation of green chemistry, *Catal. Today* 55 (2000) 11-22
- [6] R. A. Sheldon, J. M. Woodey, Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chem. Rev.* 118 (2018) 801-838
- [7] S. Shoda, H. Uyama, J. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi; Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis, *Chem Rev* 116 (4) (2016) 2307-2413
- [8] H. Wu, C. Tian, X. Song, C. Liu, D. Yang, Z. Jiang, Methods for the regeneration of nicotianmide coenzymes, *Green Chem.* 15 (2013) 1773-1789
- [9] X. Wang, T. Saba, , H. P. H. Yiu, R. F. Howe, J. A. Anderson, J. Shi, Cofactor NAD(P)H Regeneration Inspired by Heterogeneous Pathways, *Chem* 2 (2017) 621–654
- [10] H. Zhao, W. A. van der Donk, Regeneration of cofactors for use in biocatalysis, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (6) (2003) 583–589
- [11] P. E. V. Paul, V. Sangeetha, R. G. Deepika, Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms, u V. Buddolla (ur.), *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry*, London, Academic Press, 2019, str. 107-125.
- [12] Z. Findrik, Đ. Vasić-Rački, Overview on Reactions with Multi-enzyme Systems, *Chem. Biochem. Eng. Q.* 23 (4) (2009) 545–553

- [13] V. Marić, B. Šantek, Biokemijsko inženjerstvo, Golden marketing- Tehnička knjiga, Zagreb, 2009, str. 13, 14, 27, 28
- [14] <https://proleksis.lzmk.hr/28405/> (pristup 27. 3. 2023.)
- [15] M. Mowbray, T. Savage, C. Wu, Z. Song,, B. Anye Cho, E. A. Del Rio-Chanona, D. Zhang, Machine learning for biochemical engineering: A review, *Biochem. Eng. J.* 172 (2021) 108054
- [16] A. Stryjewska, K. Kiepusa, T. Librowski, S. Lochyński, Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part III. Biocatalysis, metabolic engineering and molecular modelling, *Pharmacol. Rep.* 65 (2013) 1102-1111
- [17] P. K. Robinson, Enzymes: principles and biotechnological applications, *Essays Biochem.* 59(2015)1-41 [18] enzimi. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=18053>>. (pristup 27. 3. 2023.)
- [19] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, Biokemija, 6. izdanje (englesko), 1. izdanje (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb, 2013., str. 25, 27, 34, 35, 36, 40, 41, 42, 43, 44, 47, 48, 49, 67, 68, 69, 70,71, 72, 73, 74, 107, 108, 109, 120, 205-237, 241, 242, 412, 413, 415, 420, 421, 422, 423
- [20] R. Roskoski Jr., Principles of Enzymes, u Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier, Amsterdam, 2015, str. 1- 4.
- [21] P. D. de María, Green solvents and biocatalysis: A bigger picture, *EFB Bioeconomy J.* 3 (2023) 100056
- [22] R. Singh, M. Kumar, A. Mittal, P. K. Mehta, Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, *3 Biotech* 6 (2) (2016) 174
- [23] D. J. Pollard, J. M. Woodley, Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *Trends Biotechnol.* 25 (2) (2007) 66-73
- [24]<https://www.epa.gov/greenchemistry/basics-green-chemistry#definition> (pristup 30.3.2023.)

- [25] B. Mallesham, D. Raikwar, D. Shee, The role of catalysis in green synthesis of chemicals for sustainable future, u C. Mustansar Hussain, P. Sudarsanam (ur.), *Advanced Functional Solid Catalysts for Biomass Valorization*, Elsevier, Amsterdam, 2020, str. 1-37.
- [26] S. Zrnčević, *Kataliza i katalizatori*, 1. izdanje, HINUS, Zagreb, 2005, str. 4
- [27] <https://www.epa.gov/trinationalanalysis/waste-managed-chemical-and-industry#:~:text=From%202012%20to%202021%3A,-The%20eight%20sectors&text=The%20chemical%20manufacturing%20sector%20accounted,increased%20to%2056%25%20in%202021>. (pristup 24.6.2023. )
- [28] M. Jukić, S. Đaković, Ž. Filipović-Kovač, J. Vorkapić-Furač, „Zelena“ kemija otvara put čistim ekološki prihvatljivim kemijskim procesima, *Kem. Ind.* 53 (5) (2004) 217-224
- [29] sinteza. *Hrvatska enciklopedija*, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=56172> (pristup 30. 3. 2023)
- [30] B. M. Nestl, S. C. Hammer, B. A. Nebel, B. Hauer, New Generation of Biocatalysts for Organic Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53 (2014) 3070-3095
- [31] S. C. Hammer, A. M. Knight, F. H. Arnold, Design and evolution of enzymes for non-natural chemistry, *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.* 7 (2017) 23–30
- [32] J. P. Rasor, E. Voss, Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry, *Appl. Catal. A- Gen* 221 (2001) 145-158
- [33] W. A. Loughlin, Biotransformations in organic synthesis, *Bioresour. Technol.* 74 (2000) 49-62
- [34] S. Li, X. Yang, S. Yang, M. Zhu, X. Wang, Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering, *Computational prospecting on Enzymes: application, marketing and engineering*, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2 (3) (2012) 2001-0370
- [35] R. K. Murray, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell, P. A. Weil,, Harperova ilustrirana biokemija, Dvadeset osmo izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2011, str. 51, 52, 53, 54, 57, 58, 64, 65, 66, 71, 72, 73, 99
- [36] M. Mintas, S. Raić-Malić, *Medicinska kemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2019, str. 74, 75, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 85

- [37] S. Prentis, *Biotehnologija Nova industrijska revolucija*, 1. izdanje, Školska knjiga, Zagreb, 1991, str. 12, 47
- [38] E. J. Arnoys, J. L. Wang, Dual localization: Proteins in extracellular and intracellular compartments, *Acta Histochem.* 109 (2) (2007) 89-110
- [39] J. F. Gomes Motta, B. C. Bastos de Freitas, A. F. de Almeida, G. A. de Souza Martins, S. V. Borges, Use of enzymes in the food industry: a review, *Food Sci. Technol, Campinas.* 43 (2023)
- [40] V. G. H. Eijssink, S. Gåseidnes, T. V. Borchert, B. van den Burg, Directed evolution of enzyme stability. *Biomol Eng.* 22 (1-3) (2005) 21-30
- [41] B. Štraus, *Medicinska biokemija*, Jugoslavenska medicinska naklada-Zagreb, JUMENA ZAGREB, Zagreb, 1988, str. 231, 395, 397, 398
- [42] S. H. Pine, *Organska kemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1994., str. 840, 843, 845, 852, 853, 855
- [43] nukleinske kiseline. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=44390>>. (pristup 28.5.2023.)
- [44] R. Davies, U. Ghosh-Dastidar, J. Knisley, W. Samyono, Toward Revealing Protein Function: Identifying Biologically Relevant Clusters With Graph Spectral Methods, u R. Robeva, M. Macauley (ur.), *Algebraic and Combinatorial Computational Biology*, Academic Press, London, 2019, str. 375-409.
- [45] peptidi. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=47511>>. (pristup 30. 4. 2023.)
- [46] F. Jafarpor, T. Biancalani, N. Goldenfeld, Noise-induced symmetry breaking far from equilibrium and the emergence of biological homochirality, *Phys. Rev. E* 95 (2017) 032407
- [47] B. Huang, L. Kong, C. Wang, F. Ju, Q. Zhang, J. Zhu, T. Gong, H. Zhang, C. Yu, W. M. Zheng, D. Bu, Protein Structure Prediction: Challenges, Advances, and the Shift of Research Paradigms, *Genomics, Proteomics Bioinf.* (2023)
- [48] R. A. Copeland, *Enzymes A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, 2. izdanje, Wiley-VCH, New York, 2000, str. 62



- [49] A. Wajid Arshad, Investigating Machine Learning Based Prediction of Protein Interactions, Doktorska disertacija, Pakistan Institute of Engineering and Applied Sciences Nilore, Islamabad, Pakistan 2019.
- [50] A. K. Roy Choudhury, Introduction to enzymes, u R. Nayak (ur.), Sustainable Technologies for Fashion and Textiles, Woodhead Publishing, Elsevier, Duxford, 2020, str. 75-90.
- [51] P. Kokkonen, D. Bednar, G. Pinto, Z. Prokop, Z., J. Damborsky, Engineering enzyme access tunnels, *Biotechnol Adv.* 37 (6) (2019) 107386
- [52] K. Raval, T. Ganatra, Basics, types and applications of molecular docking: A review, *IP Int J Compr Adv Pharmacol* 7 (1) (2022) 12-16
- [53] G. Chen, A. Jackson Seukep, M. Guo, Recent Advances in Molecular Docking for the Research and Discovery of Potential Marine Drugs, *Mar Drugs.* 18 (11) (2020) 545
- [54] J. Dong, E. Fernández-Fueyo, F. Hollmann, C. E. Paul, M. Pesic, S. Schmidt, Y. Wang, S. Younes, W. Zhang, Biocatalytic oxidation reactions- a Chemist's perspective, *Angew. Chem. Int. Ed.* 57 (2018) 9238
- [55] L. M. Blank, B. E. Ebert, K. Buehler, B. Bühler, Redox Biocatalysis and Metabolism: Molecular Mechanisms and Metabolic Network Analysis, *Antioxid Redox Signal.* 13(3)(2010) 349–394
- [56] J. An, Y. Nie, Y. Xu, Structural insights into alcohol dehydrogenases catalyzing asymmetric reductions, *Crit Rev Biotechnol.* 39 (3) (2019) 366-379
- [57] A. S. de Miranda, C. D. F. Milagre, F. Hollmann, Alcohol Dehydrogenases as Catalysts in Organic Synthesis, *Front. Catal.* 2 (2022)
- [58] G. Szalai, G. Duester, R. Friedman, H. Jia, S. Lia, B. A. Roe, M. R. Felder, Organization of six functional mouse alcohol dehydrogenase genes on two overlapping bacterial artificial chromosomes, *Eur. J. Biochem.* 269 (1) (2002) 224-232
- [59] M. Guzmán-Rodríguez, L. Santos, ENZYMATIC REDUCTION BY ALCOHOL DEHYDROGENASE TA1316 FROM *Thermoplasma acidophilum*, *Rev. Mex. Ing. Quim.* 16 (1) (2017) 33-39

- [60] C. Gaona- López, A. Julián-Sánchez, H. Riveros-Rosas, Diversity and Evolutionary Analysis of Iron-Containing (Type-III) Alcohol Dehydrogenases in Eukaryotes, *PLoS One*. 28 11 (11) (2016) e0166851
- [61] S. Baskar Raj, S. Ramaswamy, B. V. Plapp, Yeast Alcohol Dehydrogenase Structure and Catalysis, *Biochemistry* 53 (36) (2014) 5791–5803
- [62] O. de Smidt, J. C. du Preez, J. Albertyn, The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae* : a comprehensive review, *FEMS Yeast Res.* 8 (7) (2008) 967–978
- [63] D. S. Auld, T. Bergman, The role of zinc for alcohol dehydrogenase structure and function, *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (2008) 3961 – 3970
- [64] R. Wichmann, D. Vasić-Rački, Cofactor Regeneration at the Lab Scale, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* 92 (2005) 225-60
- [65] C. Rodríguez, W. Borzęcka, J. H. Sattler, W. Kroutil, I. Lavandera, V. Gotor, Steric vs. electronic effects in the *Lactobacillus brevis* ADH-catalyzed bioreduction of ketones, *Org. Biomol. Chem.* 12 (2014) 673-681
- [66] R. Machielsen, L. L. Looger, J. Raedts, S. Dijkhuizen, W. Hummel, H. G. Hennemann, T. Daussmann, J. van der Oost, Cofactor engineering of *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase by computational design, *Eng. Life Sci.* 9 (1) (2009) 38–44
- [67] J. A. Pateman, C. H. Doy, J. E. Olsen, U. Norris, E. H. Creaser M. Hynes, Regulation of Alcohol Dehydrogenase (ADH) and Aldehyde Dehydrogenase (ALDDH) in *Aspergillus nidulans*, *Proc. R. Soc. London, Ser. B. London* 217 (1208) (1983) 243-264
- [68] G. de Gonzalo, C. E. Paul, Recent trends in synthetic enzymatic cascades promoted by alcohol dehydrogenases, *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.* 32 (2021) 100548
- [69] K. S. Madden, P. M. T. Todd, K. Urata, A. J. Russell, K. A. Vincent, H. A. Reeve, A pharmacophore-based approach to demonstrating the scope of alcohol dehydrogenases, *Bioorg Med Chem.* 83 (2023) 117255
- [70] G. Rehn, A. Toftgaard Pedersen, J. M. Woodley, Application of NAD(P)H oxidase for cofactor regeneration in dehydrogenase catalyzed oxidations, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 134 (2016) 331-339

- [71] H. Gao, J. Li, D. Sivakumar, T. S. Kim, S. K. S. Patel, V. C. Kalia, I. W. Kim, Y. W. Zhang, J. K. Lee, NADH oxidase from *Lactobacillus reuteri*: A versatile enzyme for oxidized cofactor regeneration, *Int J Biol Macromol* 123 (2019) 629-636
- [72] J. T. Park, J. I. Hirano, V. Thangavel, B. R. Riebel, A. S. Bommarius, NAD(P)H oxidase V from *Lactobacillus plantarum* (NoxV) displays enhanced operational stability even in absence of reducing agents, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 71 (2011) 159–165
- [73] M. Sudar, Z. Findrik, M. Vuković Domanovac, Đ. Vasić-Rački, Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactococcus lactis*, *Biochem. Eng. J.* 88 (2014) 12-18
- [74] M. Yan, W. Yin, X. Fang, J. Guo, H. Shi, Characteristics of a water-forming NADH oxidase from *Methanobrevibacter smithii*, an archaeon in the human gut, *Biosci Rep.* 36 (6) (2016) e00410
- [75] C. Nowak, B. Beer, A. Pick, T. Roth, P. Lommès, V. Sieber, A water-forming NADH oxidase from *Lactobacillus pentosus* suitable for the regeneration of synthetic biomimetic cofactors, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 957
- [76] Y. Tang, J. Long, J. Liu, Hyperglycemia-Associated Oxidative Stress Induces Autophagy: Involvement of the ROS-ERK/JNK-p53 Pathway, u M. A. Hayat (ur.) *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*, 1. izdanje, Academic Press, Elsevier, Amsterdam, 2014, str. 105-115.
- [77] A. Vermont, I. Petit-Härtlein, S. M. E. Smith, F. Fieschi, NADPH Oxidases (NOX): An Overview from Discovery, Molecular Mechanisms to Physiology and Pathology, *Antioxidants (Basel)* 10 (6) (2021) 890
- [78] F. Magnani, S. Nenci, E. M. Fananas, M. Ceccon, E. Romero, M. W. Fraaije, A. Mattevi, Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114 (26) (2017) 6764-6769
- [79] Z. Gomzi, *Kemijski reaktori*, 2. izdanje, HINUS, Zagreb, 2009, str. 20, 21, 167, 210, 228, 229, 345, 348, 349
- [80] F. A. Menger, An alternative view of enzyme catalysis, *Pure Appl. Chem.* 77 (11) (2005) 1873–1886

- [81] C. Andreini, I. Bertini, G. Cavallaro, G. L. Holliday, J. M. Thornton, Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles, *J Biol Inorg Chem* 13 (2008) 1205–1218
- [82] R. Singh, A. Mozzarelli, Cofactor chemogenomics, *Methods Mol Biol.* 575 (2009 ) 93-122.
- [83] S. Oka, C. Hsu, J. Sadoshima, Regulation of cell survival and death by pyridine nucleotides, *Circ Res.* 111 (5) (2012) 611-627
- [84] W. Ying, NAD<sup>+</sup>/NADH and NADP<sup>+</sup>/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences, *Antioxid Redox Signal* 10 (2) (2008) 179-206
- [85] M. Nakamura, A. Bhatnagar, J. Sadoshima, Overview of pyridine nucleotides review series, *Circ Res.* 111 (5) (2012) 604-610
- [86] S. K. Spaans, R. A. Weusthuis, J. van der Oost, S. W. M. Kengen, NADPH-generating systems in bacteria and archaea, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 742
- [87] T. Saba, J. W. H. Burnett, J. Li, X. Wang, J. A. Anderson, P. N. Kechagiopoulos, X. Wang, Assessing the environmental performance of NADH regeneration methods: A cleaner process using recyclable Pt/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and hydrogen, *Catal. Today* 339 (2020) 281-288
- [88] I. Ali, A. Gill, S. Omanovic, Direct electrochemical regeneration of the enzymatic cofactor 1,4-NADH employing nano-patterned glassy carbon/Pt and glassy carbon/Ni electrodes, *Chem. Eng. J.* 188 (2012) 173-180
- [89] J. A. Chemler, Z. L. Fowler, K. P. McHugh, M. A. G. Koffas, Improving NADPH availability for natural product biosynthesis in *Escherichia coli* by metabolic engineering, *Metab Eng.* 12 (2010) 96–104
- [90] T. A. Rogers, A. S. Bommarius, Utilizing Simple Biochemical Measurements to Predict Lifetime Output of Biocatalysts in Continuous Isothermal Processes, *Chem Eng Sci* 65 (6) (2010) 2118-2124
- [91] F. S. Aalbers, M. W. Fraaije, Design of Artificial Alcohol Oxidases: Alcohol Dehydrogenase–NADPH Oxidase Fusions for Continuous Oxidations, *ChemBioChem* 20 (1) (2018) 51-56

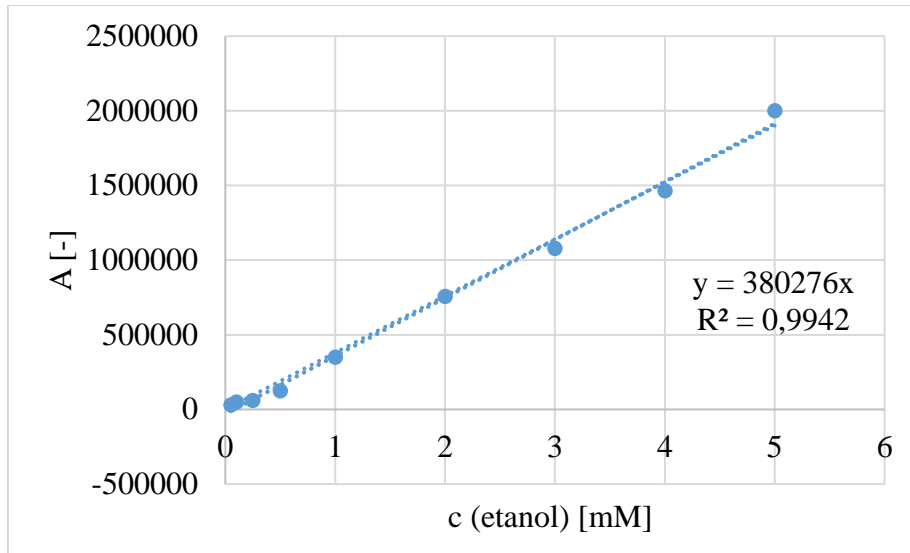
- [92] A. Weckbecker, H. Gröger, W. Hummel, Regeneration of nicotinamide coenzymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds, *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 120 (2010) 195-242
- [93] R. A. Sheldon, Catalytic Oxidations in a Bio-Based Economy, *Front. Chem.* 8 (2020) 132
- [94] M. Eckstein, T. Daußmann, U. Kragl, Recent Developments in NAD(P)H Regeneration for Enzymatic Reductions in One- and Two-Phase Systems, *Biocatal. Biotransform.* 22 (2) (2004) 89-96
- [95] Y. Luo, V. Kurian, B. A. Ogunnaike, Bioprocess systems analysis, modeling, estimation, and control, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 33 (2021) 100705
- [96] G. Sin, J. M. Woodley, K. V. Gernaey, Application of Modeling and Simulation Tools for the Evaluation of Biocatalytic Processes: A Future Perspective, *Biotechnol. Prog.* 25 (6) (2009) 1529-1538
- [97] A. Vrsalović Presečki, Z. Findrik, B. Zelić, Modeling of the Biotransformation Processes, *Chem. Biochem. Eng. Q* 20 (3) (2006) 227-241
- [98] D. Solle, T. Scheper, B. Hitzmann, R. Faurie, J. Breccia, Modelling of an Industrial Biotransformation Process for Tryptophan Production, *IFAC Proceedings Volumes* 37 (3) (2004) 189-193
- [99] D. Talens-Perales, J. Marín-Navarro, J. Polaina, Enzymes: Functions and Characteristics, u B. Caballero, P. M. Finglas, F. Toldrá (ur.), *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press, Oxford, 2016, str. 532-538.
- [100] L. Stefanidis, K. V. Scinto, M. I. Strada, B. J. Alper, Bisubstrate Kinetics of Glutathione S-Transferase: A Colorimetric Experiment for the Introductory Biochemistry Laboratory, *J. Chem. Educ.* 95 (1) (2017) 146-151
- [101] G. D. Yadav, D. B. Magadum, Kinetic Modelling of Enzyme Catalyzed Biotransformation Involving Activations and Inhibitions, u M. Sentruk (ur.), *Enzyme Inhibitors and Activators*, IntechOpen, Rijeka, 2017, str. 73-124.
- [102] N. N. Ulusu, Evolution of Enzyme Kinetic Mechanisms, *J Mol Evol* 80 (5-6) (2015) 251–257

- [103] A. J. J. Straathof, Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 11 (2001) 991–998
- [104] V. Leskovac, S. Trivić, D. Peričin, J. Kandrač, Deriving the rate equations for product inhibition patterns in bisubstrate enzyme reactions, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 21 (6) (2006) 617–634
- [105] E. Leaković, Optimiranje reakcijskih uvjeta enzimatski katalizirane oksidacije  $\alpha$ -kloroaldehida, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2018. g.
- [106] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6. izdanje, W. H. Freeman and company, New York, 2013, str. 143, 144, 207
- [107] M. Polakovič, P. Vrabel, V. Bálež, Approaches for improved identification of mechanisms of enzyme inactivation, u, A. Ballesteros, F. J. Plou, J. L. Iborra, P. J. Halling (ur.), *Stability and Stabilization of Biocatalysts*, 15. izdanje, Elsevier, 1998, str. 77-82
- [108] S. Schnell, S. M. Hanson, A test for measuring the effects of enzyme inactivation, *Biophys Chem.* 125 (2-3) (2007) 269-274
- [109] R. Roskoski, Modulation of Enzyme Activity, u S. J. Enna, D. B. Bylund, *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, Elsevier, Amsterdam, 2008, str. 1-11.
- [110] M. Došen, Matematički model kaskadne reakcije, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.
- [111] B. Charleux, M. Cunningham, J. R. Leiza, Vinyl Polymerization in Heterogeneous Systems, u K. Matyjaszewski, M. Möller (ur.), *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, 3. izdanje, Elsevier Science, 2012, str. 463 – 499.
- [112] kemijski reaktor. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021 <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=31166>>. (pristup 13. 8. 2023.)
- [113] T. Feng, M. Sun, S. Song, H. Zhuang, L. Yao, Gas chromatography for food quality evaluation, u J. Zhong, X. Wang (ur.), *Evaluation Technologies for Food Quality*, Woodhead Publishing, Elsevier, Duxford, 2019, str. 219-265.
- [114] apsorpcija. *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. <<http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=3445>>. (pristup 1. 7. 2023.)

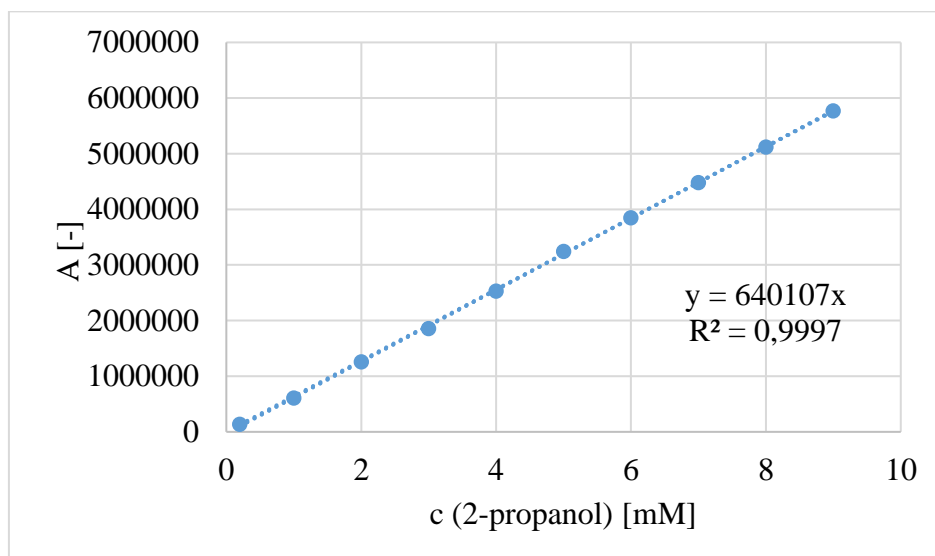
- [115] M. Mihoci, Spektrofotometrijsko određivanje boje, Osvrti, Kem. Ind. 64 (11-12) (2015) 681-694
- [116] P. J. Worsfold, Spectrophotometry Overview u: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (ur.), Encyclopedia of Analytical Science, 2. izdanje, Elsevier, Oxford, 2005, str. 318-321.
- [117] C. A. Mesa, E. Pastor, L. Francàs, UV–Vis operando spectroelectrochemistry for (photo)electrocatalysis: Principles and guidelines, Curr. Opin. Electrochem. 35 (2022) 101098
- [118] W. Mäntele, E. Deniz, UV-VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 173 (2017) 965-968
- [119] A. M. Otto, Warburg effect(s)—a biographical sketch of Otto Warburg and his impacts on tumor metabolism, Cancer Metab 4 (5) (2016)
- [120] <https://www.xylemanalytics.com/en/company/blog/blog/2021/06/photometric-determination-of-d-glucose> (pristup 2.7. 2023.)
- [121] J. Pilaš, Proizvodnja lakaze uzgojem *Trametes versicolor* na otpadu industrije pulpe i papira, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- [122] H. Bisswanfer, Enzyme assays, Perspectives in Science 1 (2014) 41-55
- [123] M. H. Yang, Y. M. Choong, A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C<sub>2</sub>–C<sub>12</sub>) volatile organic acids in foods, Food Chem. 75 (1) (2001) 101-108
- [124] W. Xing, G. Yin, Q. Lv, Y. Hu, C. Liu, J. Zhang, Oxygen Solubility, Diffusion Coefficient, and Solution Viscosity, u: W. Xing, G. Yin, J. Zhang, Rotating Electrode Methods and Oxygen Reduction Electrocatalysts, Amsterdam, Elsevier, 2014, str. 1-31.
- [125] F. D. Wilde, D. B. Radtke: Handbooks for Water-Resources Investigations: Fields Measurements; U.S. Geological Survey TWRI Book 9 (1998) 27-38

## 7. PRILOZI

### Prilog 1. Baždarni pravci za određivanje koncentracije supstrata i produkta

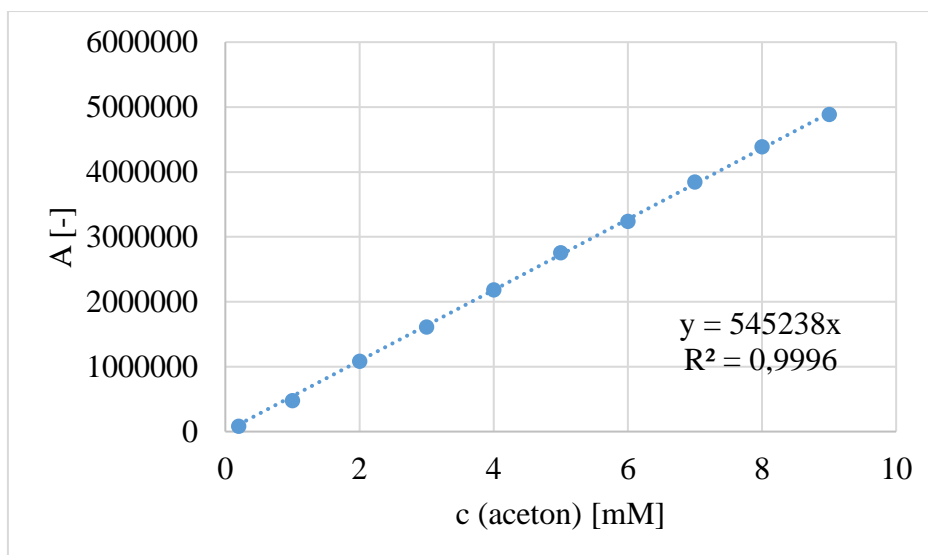


Slika 59. Baždarni pravac za određivanje koncentracije etanola



Slika 60. Baždarni pravac za određivanje koncentracije 2-propanola





**Slika 61.** Baždarni pravac za određivanje koncentracije acetona

**Prilog 2.** Topljivost kisika u vodi pri različitim tlakovima i temperaturama [125]

Temp °C	Atmospheric pressure, in millimeters of mercury																			
	795	790	785	780	775	770	765	760	755	750	745	740	735	730	725	720	715	710	705	700
15.0	10.5	10.5	10.4	10.3	10.3	10.2	10.1	10.1	10.0	9.9	9.9	9.8	9.7	9.7	9.6	9.5	9.5	9.4	9.3	9.3
15.5	10.4	10.4	10.3	10.2	10.2	10.1	10.0	10.0	9.9	9.8	9.8	9.7	9.6	9.6	9.5	9.4	9.4	9.3	9.2	9.2
16.0	10.3	10.2	10.2	10.1	10.0	10.0	9.9	9.8	9.8	9.7	9.7	9.6	9.5	9.5	9.4	9.3	9.3	9.2	9.1	9.1
16.5	10.2	10.1	10.1	10.0	9.9	9.9	9.8	9.7	9.7	9.6	9.5	9.5	9.4	9.4	9.3	9.2	9.2	9.1	9.0	9.0
17.0	10.1	10.0	10.0	9.9	9.8	9.8	9.7	9.6	9.6	9.5	9.4	9.4	9.3	9.3	9.2	9.1	9.1	9.0	8.9	8.9
17.5	10.0	9.9	9.9	9.8	9.7	9.7	9.6	9.5	9.5	9.4	9.3	9.3	9.2	9.2	9.1	9.0	9.0	8.9	8.8	8.8
18.0	9.9	9.8	9.8	9.7	9.6	9.6	9.5	9.4	9.4	9.3	9.2	9.2	9.1	9.1	9.0	8.9	8.9	8.8	8.7	8.7
18.5	9.8	9.7	9.7	9.6	9.5	9.5	9.4	9.3	9.3	9.2	9.2	9.1	9.0	9.0	8.9	8.8	8.8	8.7	8.7	8.6
19.0	9.7	9.6	9.6	9.5	9.4	9.4	9.3	9.3	9.2	9.1	9.1	9.0	8.9	8.9	8.8	8.8	8.7	8.6	8.6	8.5
19.5	9.6	9.5	9.5	9.4	9.3	9.3	9.2	9.2	9.1	9.0	9.0	8.9	8.9	8.8	8.7	8.7	8.6	8.5	8.5	8.4
20.0	9.5	9.4	9.4	9.3	9.3	9.2	9.1	9.1	9.0	8.9	8.9	8.8	8.8	8.7	8.6	8.6	8.5	8.5	8.4	8.3
20.5	9.4	9.3	9.3	9.2	9.2	9.1	9.0	9.0	8.9	8.9	8.8	8.7	8.7	8.6	8.6	8.5	8.4	8.4	8.3	8.3
21.0	9.3	9.2	9.2	9.1	9.1	9.0	8.9	8.9	8.8	8.8	8.7	8.6	8.6	8.5	8.5	8.4	8.4	8.3	8.2	8.2
21.5	9.2	9.2	9.1	9.0	9.0	8.9	8.9	8.8	8.7	8.7	8.6	8.6	8.5	8.4	8.4	8.3	8.3	8.2	8.1	8.1
22.0	9.1	9.1	9.0	9.0	8.9	8.8	8.8	8.7	8.7	8.6	8.5	8.5	8.4	8.4	8.3	8.2	8.2	8.1	8.1	8.0
22.5	9.0	9.0	8.9	8.9	8.8	8.8	8.7	8.6	8.6	8.5	8.5	8.4	8.3	8.3	8.2	8.2	8.1	8.0	8.0	7.9
23.0	9.0	8.9	8.8	8.8	8.7	8.7	8.6	8.6	8.5	8.4	8.4	8.3	8.3	8.2	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9
23.5	8.9	8.8	8.8	8.7	8.6	8.6	8.5	8.5	8.4	8.4	8.3	8.2	8.2	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.8	7.8
24.0	8.8	8.7	8.7	8.6	8.6	8.5	8.4	8.4	8.3	8.3	8.2	8.2	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.8	7.7
24.5	8.7	8.7	8.6	8.5	8.5	8.4	8.4	8.3	8.3	8.2	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.7	7.7	7.6
25.0	8.6	8.6	8.5	8.5	8.4	8.3	8.3	8.2	8.2	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.8	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6
25.5	8.5	8.5	8.4	8.4	8.3	8.3	8.2	8.2	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5
26.0	8.5	8.4	8.4	8.3	8.3	8.2	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.8	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4
26.5	8.4	8.3	8.3	8.2	8.2	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.8	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4
27.0	8.3	8.3	8.2	8.2	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.3	7.3
27.5	8.2	8.2	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.8	7.7	7.7	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2
28.0	8.2	8.1	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2
28.5	8.1	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.1	7.1
29.0	8.0	8.0	7.9	7.9	7.8	7.8	7.7	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0
29.5	8.0	7.9	7.9	7.8	7.8	7.7	7.6	7.6	7.5	7.5	7.4	7.4	7.3	7.3	7.2	7.2	7.1	7.1	7.0	7.0

**Prilog 3.** Korekcijski faktori temeljeni na vodljivosti za otopljeni kisik u kapljevine [125]

Temp °C	Conductivity, in microsiemens per centimeter at 25 degrees Celsius																
	17000	18000	19000	20000	21000	22000	23000	24000	25000	26000	27000	28000	29000	30000	31000	32000	33000
0.0	0.934	0.930	0.926	0.922	0.918	0.914	0.910	0.905	0.901	0.897	0.893	0.889	0.885	0.881	0.877	0.873	0.869
1.0	0.934	0.930	0.926	0.922	0.918	0.914	0.910	0.906	0.902	0.898	0.894	0.890	0.886	0.882	0.878	0.874	0.870
2.0	0.935	0.931	0.927	0.923	0.919	0.915	0.911	0.907	0.903	0.899	0.895	0.891	0.887	0.883	0.879	0.875	0.871
3.0	0.935	0.931	0.927	0.923	0.919	0.915	0.911	0.907	0.903	0.899	0.895	0.891	0.887	0.883	0.879	0.875	0.871
4.0	0.935	0.932	0.928	0.924	0.920	0.916	0.912	0.908	0.904	0.900	0.896	0.892	0.888	0.884	0.880	0.876	0.872
5.0	0.936	0.932	0.928	0.924	0.920	0.917	0.913	0.909	0.905	0.901	0.897	0.893	0.889	0.885	0.881	0.877	0.873
6.0	0.936	0.933	0.929	0.925	0.921	0.917	0.913	0.909	0.905	0.902	0.898	0.894	0.890	0.886	0.882	0.878	0.874
7.0	0.937	0.933	0.929	0.925	0.922	0.918	0.914	0.910	0.906	0.902	0.898	0.894	0.891	0.887	0.883	0.879	0.875
8.0	0.937	0.933	0.930	0.926	0.922	0.918	0.914	0.911	0.907	0.903	0.899	0.895	0.891	0.887	0.884	0.880	0.876
9.0	0.938	0.934	0.930	0.926	0.923	0.919	0.915	0.911	0.907	0.904	0.900	0.896	0.892	0.888	0.884	0.880	0.877
10.0	0.938	0.934	0.931	0.927	0.923	0.919	0.916	0.912	0.908	0.904	0.900	0.897	0.893	0.889	0.885	0.881	0.877
11.0	0.939	0.935	0.931	0.927	0.924	0.920	0.916	0.912	0.909	0.905	0.901	0.897	0.894	0.890	0.886	0.882	0.878
12.0	0.939	0.935	0.932	0.928	0.924	0.920	0.917	0.913	0.909	0.906	0.902	0.898	0.894	0.890	0.887	0.883	0.879
13.0	0.939	0.936	0.932	0.928	0.925	0.921	0.917	0.914	0.910	0.906	0.902	0.899	0.895	0.891	0.887	0.884	0.880
14.0	0.940	0.936	0.933	0.929	0.925	0.922	0.918	0.914	0.911	0.907	0.903	0.899	0.896	0.892	0.888	0.884	0.881
15.0	0.940	0.937	0.933	0.929	0.926	0.922	0.918	0.915	0.911	0.907	0.904	0.900	0.896	0.893	0.889	0.885	0.882
16.0	0.941	0.937	0.934	0.930	0.926	0.923	0.919	0.915	0.912	0.908	0.904	0.901	0.897	0.893	0.890	0.886	0.882
17.0	0.941	0.938	0.934	0.930	0.927	0.923	0.920	0.916	0.912	0.909	0.905	0.901	0.898	0.894	0.891	0.887	0.883
18.0	0.942	0.938	0.934	0.931	0.927	0.924	0.920	0.917	0.913	0.909	0.906	0.902	0.899	0.895	0.891	0.888	0.884
19.0	0.942	0.938	0.935	0.931	0.928	0.924	0.921	0.917	0.914	0.910	0.906	0.903	0.899	0.896	0.892	0.888	0.885
20.0	0.942	0.939	0.935	0.932	0.928	0.925	0.921	0.918	0.914	0.911	0.907	0.903	0.900	0.896	0.893	0.889	0.886
21.0	0.943	0.939	0.936	0.932	0.929	0.925	0.922	0.918	0.915	0.911	0.908	0.904	0.901	0.897	0.893	0.890	0.886
22.0	0.943	0.940	0.936	0.933	0.929	0.926	0.922	0.919	0.915	0.912	0.908	0.905	0.901	0.898	0.894	0.891	0.887
23.0	0.944	0.940	0.937	0.933	0.930	0.926	0.923	0.919	0.916	0.912	0.909	0.905	0.902	0.898	0.895	0.891	0.888
24.0	0.944	0.941	0.937	0.934	0.930	0.927	0.923	0.920	0.917	0.913	0.910	0.906	0.903	0.899	0.896	0.892	0.889
25.0	0.944	0.941	0.938	0.934	0.931	0.927	0.924	0.921	0.917	0.914	0.910	0.907	0.903	0.900	0.896	0.893	0.889
26.0	0.945	0.941	0.938	0.935	0.931	0.928	0.925	0.921	0.918	0.914	0.911	0.907	0.904	0.901	0.897	0.894	0.890
27.0	0.945	0.942	0.938	0.935	0.932	0.928	0.925	0.922	0.918	0.915	0.911	0.908	0.905	0.901	0.898	0.894	0.891
28.0	0.946	0.942	0.939	0.936	0.932	0.929	0.926	0.922	0.919	0.915	0.912	0.909	0.905	0.902	0.898	0.895	0.892
29.0	0.946	0.943	0.939	0.936	0.933	0.929	0.926	0.923	0.919	0.916	0.913	0.909	0.906	0.903	0.899	0.896	0.892

**Prilog 4.** Program u *Scientist*-u korišten za određivanje kinetičkih parametara u reakciji oksidacije etanola katalizirane s ADH *Sc*

1) Program za određivanje maksimalne brzine reakcije i Michaelis-Menteničine konstante

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r1, r2

Params: Vm, KmNAD, KmE

$r1 = Vm * c * cE / ((KmNAD + c) * (KmE + cE))$

$r2 = Vm * c * cNAD / ((KmNAD + cNAD) * (KmE + c))$

cE=85.4593010635989

cNAD=2.4

Vm=100

KmNAD=0.01

KmE=1

2) Program za određivanje konstante inhibicije produktom NADH

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNAD, KmE, KiNADH

$r = Vm * cNAD * cE / ((KmNAD * (1 + c/KiNADH) + cNAD) * (KmE + cE))$

cNAD=2.4

cE=85.4593010635989

Vm=97.4634790

KmNAD=0.143175648

KmE=7.85012564

KiNADH=0.1

3) Program za određivanje konstante inhibicije produktom acetaldehidom

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNAD, KmE, KiAA

$r = Vm * cNAD * cE / ((KmNAD + cNAD) * (KmE * (1 + c/KiAA) + cE))$

cNAD=2.4

cE=85.4593010635989

Vm=97.4634790

KmNAD=0.143175648

KmE=7.85012564

KiAA=0.1

**Prilog 5.** Program u *Scientist*-u korišten za određivanje kinetičkih parametara u reakciji redukcije acetaldehida katalizirane s ADH Sc

a) Program za određivanje maksimalne brzine reakcije, Michaelis-Menteničine konstante te konstante inhibicije supstratom acetaldehidom

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: c
```

```
DepVars: r1, r2
```

```
Params: Vm, KmNADH, KmAA, KsAA
```

```
r1=Vm*c*cAA/((KmNADH+c)*(KmAA+cAA))
```

```
r2=Vm*c*cNADH/((KmNADH+cNADH)*(KmAA+c+((c^2)/KsAA)))
```

```
cAA=61.98456
```

```
cNADH=0.18
```

```
Vm=180
```

```
KmNADH=0.08
```

```
KmAA=10
```

```
KsAA=1
```

b) Program za određivanje konstante inhibicije produktom NAD<sup>+</sup>

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: c
```

```
DepVars: r
```

```
Params: Vm, KmNADH, KmAA, KiNAD
```

```
r=Vm*cAA*cNADH/((KmNADH*(1+c/KiNAD)+cNADH)*(KmAA+cAA))
```

```
cAA=61.95456
```

```
cNADH=0.18
```

$V_m=258.945321$

$K_m\text{NADH}=0.120972964$

$K_m\text{AA}=0.370434321$

$K_i\text{NAD}=0.1$

c) Program za određivanje konstante inhibicije produktom etanolom

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params:  $V_m$ ,  $K_m\text{NADH}$ ,  $K_m\text{AA}$ ,  $K_i\text{E}$

$r=V_m*c_{\text{AA}}*c_{\text{NADH}}/((K_m\text{NADH}+c_{\text{NADH}})*(K_m\text{AA}*(1+(c/K_i\text{E}))+c_{\text{AA}}))$

$c_{\text{AA}}=61.95456$

$c_{\text{NADH}}=0.18$

$V_m=258.945321$

$K_m\text{NADH}=0.120972964$

$K_m\text{AA}=0.370434321$

$K_i\text{E}=0.1$

**Prilog 6.** Program u *Scientist*-u korišten za određivanje kinetičkih parametara u reakciji oksidacije 2-propanola katalizirane s ADH *Lb*

a) Program za određivanje maksimalne brzine reakcije, Michaelis-Menteničine konstante te konstante inhibicije supstratom NADP<sup>+</sup>

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r1, r2

Params: Vm, KmNADP, KmPROP, KsNADP

$r1 = Vm * c * cPROP / ((KmNADP + c + (c^2) / KsNADP) * (KmPROP + cPROP))$

$r2 = Vm * c * cNADP / ((KmNADP + cNADP) * (KmPROP + c))$

cPROP=32.5320299500832

cNADP=1

Vm=0.5

KmNADP=0.01

KmPROP=1

KsNADP=1

b) Program za određivanje konstante inhibicije produktom NADPH

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNADP, KmPROP, KiNADPH

$r = Vm * cNADP * cPROP / ((KmNADP * (1 + c / KiNADPH) + cNADP) * (KmPROP + cPROP))$

cNADP=0.25

cPROP=32.53

$V_m=0.569123404$

$K_mNADP=0.0113619781$

$K_mPROP=0.515339113$

$K_iNADPH=0.1$

c) Program za određivanje konstante inhibicije produktom acetonom

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params:  $V_m$ ,  $K_mNADP$ ,  $K_mPROP$ ,  $K_iAC$

$r=V_m*cNADP*cPROP/((K_mNADP+cNADP)*(K_mPROP*(1+c/K_iAC)+cPROP))$

$cNADP=0.25$

$cPROP=32.53$

$V_m=0.569123404$

$K_mNADP=0.0113619781$

$K_mPROP=0.515339113$

$K_iAC=0.1$



**Prilog 7.** Program u *Scientist*-u korišten za određivanje kinetičkih parametara u reakciji redukcije acetona katalizirane s ADH *Lb*

a) Program za određivanje maksimalne brzine reakcije, Michaelis-Menteničine konstante te konstante inhibicije supstratom acetonom

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: c
```

```
DepVars: r1, r2
```

```
Params: Vm, KmNADPH, KmAC, KsAC
```

```
r1=Vm*c*cAC/((KmNADPH+c)*(KmAC+cAC))
```

```
r2=Vm*c*cNADPH/((KmNADPH+cNADPH)*(KmAC+c+((c^2)/KsAC)))
```

```
cAC=136.1914601
```

```
cNADPH=0.15
```

```
Vm=8
```

```
KmNADPH=0.08
```

```
KmAC=10
```

```
KsAC=1
```

b) Program za određivanje konstante inhibicije produktom NADP<sup>+</sup>

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: c
```

```
DepVars: r
```

```
Params: Vm, KmNADPH,KmAC,KiNADP
```

```
r=Vm*cAC*cNADPH/((KmNADPH*(1+c/KiNADP)+cNADPH)*(KmAC+cAC))
```

```
cAC=136.1914601
```

```
cNADPH=0.15
```

$V_m=18.6722815$

$K_m\text{NADPH}=0.214080175$

$K_m\text{AC}=24.4902558$

$K_i\text{NADP}=0.1$

c) Program za određivanje konstante inhibicije produktom 2-propanolom

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params:  $V_m$ ,  $K_m\text{NADPH}$ ,  $K_m\text{AC}$ ,  $K_i\text{PROP}$

$r=V_m*c\text{AC}*c\text{NADPH}/((K_m\text{NADPH}+c\text{NADPH})*(K_m\text{AC}*(1+(c/K_i\text{PROP}))+c\text{AC}))$

$c\text{AC}=136.1914601$

$c\text{NADPH}=0.15$

$V_m=18.6722815$

$K_m\text{NADPH}=0.214080175$

$K_m\text{AC}=24.4902558$

$K_i\text{PROP}=0.1$

**Prilog 8.** Program u *Scientist*-u korišten za određivanje kinetičkih parametara u reakciji oksidacije NADH s enzimom NOX

a) Program za određivanje maksimalne brzine reakcije i Michaelis-Menteničine konstante

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r1, r2

Params: Vm, KmNADH, KmO

$r1 = Vm * c * cO / ((KmNADH + c) * (KmO + cO))$

$r2 = Vm * c * cNADH / ((KmNADH + cNADH) * (KmO + c))$

cO=0.4849875

cNADH=0.17

Vm=0.08

KmNADH=0.05

KmO=0.15

b) Program za određivanje konstante inhibicije produktom NAD<sup>+</sup>

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNADH, KmO, KiNAD

$r = Vm * cNADH * cO / ((KmNADH * (1 + c/KiNAD) + cNADH) * (KmO + cO))$

cO=0.4849875

cNADH=0.17

Vm=0.156689904

KmNADH=0.0286692894

KmO=0.335713354

KiNAD=0.1

c) Program za određivanje konstante inhibicije etanolom

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNADH, KmO, KiE

$r = Vm * cNADH * cO / ((KmNADH * (1 + c/KiE) + cNADH) * (KmO + cO))$

cO=0.4849875

cNADH=0.17

Vm=0.156689904

KmNADH=0.0286692894

KmO=0.335713354

KiE=0.1

d) Program za određivanje konstante inhibicije acetaldehidom

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNADH, KmO, KiAA

$r = Vm * cNADH * cO / ((KmNADH * (1 + c/KiAA) + cNADH) * (KmO + cO))$

cO=0.4849875

cNADH=0.17

$V_m=0.156689904$

$K_m\text{NADH}=0.02866$

92894

$K_m\text{O}=0.335713354$

$K_i\text{AA}=0.1$

**Prilog 9.** Program u *Scientist*-u za određivanje  $k_{La}$

a) Program za određivanje  $k_{La}$  u reakciji oksidacije NADH

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: T

DepVars: co2

Params: kla

co2'=kla\*(co2z-co2)

co2z=0.4925

kla=0.01

t=0

co2=0.00037965791475

b) Program za određivanje  $k_{La}$  u reakciji oksidacije NADPH

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: T

DepVars: co2

Params: kla

co2'=kla\*(co2z-co2)

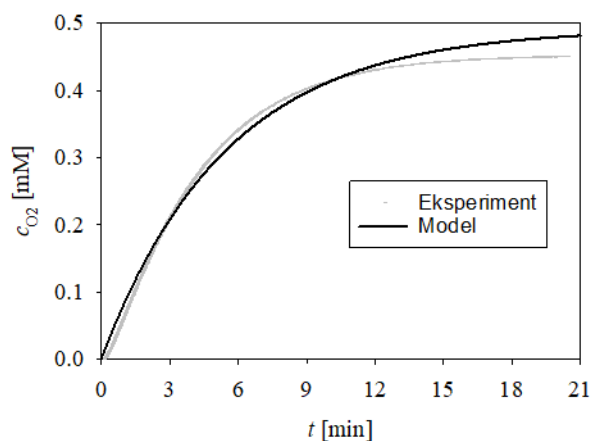
co2z=0.4925

kla=0.01

t=0

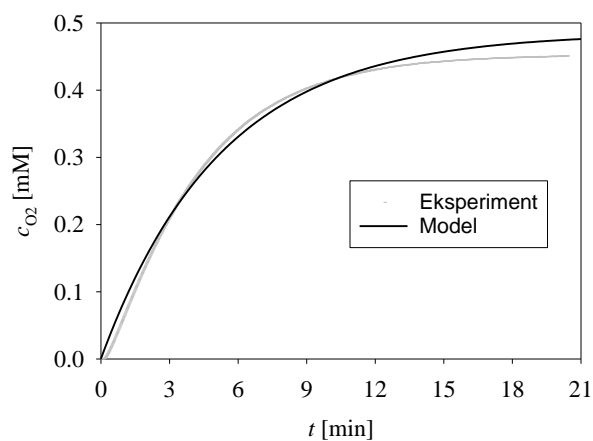
co2=0.00037965791475

b) Usporedba eksperimentalnih podataka i modela prilikom određivanja  $k_{LA}$



**Slika 62.** Određivanje  $k_{LA}$  u reakciji oksidacije NADH

( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{NADH}}=0,17 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NOX}}=0,20$  ili  $c_{\text{NOX}}=0,40 \text{ mM}$ ,  
 $c_{\text{O}_2}=0,009 - 0,51 \text{ mM}$ )



**Slika 63.** Određivanje  $k_{LA}$  u reakciji oksidacije NADPH

( $T=25^{\circ}\text{C}$ ,  $c_{\text{fosfatni pufer}}=0,1 \text{ M}$ ,  $\text{pH}=8$ ,  $c_{\text{NADPH}}=0,10 \text{ mM}$ ,  
 $\gamma_{\text{NOX}}= 10 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{O}_2}=0,022 - 0,468 \text{ mM}$ )

**Prilog 10.** Program u *Scientist*-u za određivanje početne brzine potrošnje kisika u reakciji oksidacije NADH katalizirane NOX-om

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: c
```

```
Params: n,kla
```

```
c'=-n+kla*(0.4849875-c)
```

```
t=0
```

```
c=0.0085255952625
```

```
kla=0.00570031882
```

```
n=0.008
```

```
***
```

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: c
```

```
Params: n,kla
```

```
c'=-n+kla*(0.4849875-c)
```

```
t=0.15
```

```
c=0.49754867625
```

```
kla=0.00570031882
```

```
n=0.01
```

```
***
```

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: c
```

```
Params: n,kla
```

```
c'=-n+kla*(0.4849875-c)
```

```
t=0
```

```
c=0.40772899125
```

```
kla=0.00570031882
```

```
n=0.01
```



\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$c' = -n + kla * (0.4849875 - c)$

t=0.9833333333333333

c=0.208355479875

kla=0.00570031882

n=0.01

\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$c' = -n + kla * (0.4849875 - c)$

t=0

c=0.13697016975

kla=0.00570031882

n=0.01

\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$c' = -n + kla * (0.4849875 - c)$

t=0.8833333333333333

c=0.095692883625

kla=0.00570031882

n=0.01

\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$$c' = -n + kla * (0.4849875 - c)$$

$$t = 0.9$$

$$c = 0.051190430625$$

$$kla = 0.00570031882$$

$$n = 0.01$$

\*\*\*

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$$c' = -n + kla * (0.4849875 - c)$$

$$t = 0$$

$$c = 0.2849592555$$

$$kla = 0.00570031882$$

$$n = 0.01$$

\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$$c' = -n + kla * (0.4849875 - c)$$

$$t = 0.2666666666666667$$

$$c = 0.196841876625$$

$$kla = 0.00570031882$$

$$n = 0.01$$

\*\*\*

**Tablica 12.** Početna brzina potrošnje kisika ( $n$ ) u reakciji oksidacije NADH s enzimom NOX

<b>Parametar</b>	<b>Vrijednost</b>
$k_{1a}$	$0,0057 \pm 6,9823 \cdot 10^{-5}$
	$0,0035 \pm 2,1767 \cdot 10^{-6}$
$n$	$0,0115 \pm 0,0002$
	$0,0137 \pm 0,0021$
	$0,0206 \pm 0,0002$
	$0,0152 \pm 0,0004$
	$0,0105 \pm 0,0002$
	$0,0094 \pm 8,6203 \cdot 10^{-5}$
	$0,0149 \pm 0,0014$
	$0,0113 \pm 6,5365 \cdot 10^{-5}$

**Prilog 11.** Program u *Scientist*-u korišten za određivanje kinetičkih parametara u reakciji oksidacije NADPH s enzimom NOX

a) Program za određivanje maksimalne brzine reakcije i Michaelis-Menteničine konstante

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r1, r2

Params: Vm, KmNADPH, KmO

$r1 = Vm * c * cO / ((KmNADPH + c) * (KmO + cO))$

$r2 = Vm * c * cNADPH / ((KmNADPH + cNADPH) * (KmO + c))$

cO=0.468027

cNADPH=0.1

Vm=0.08

KmNADPH=0.05

KmO=0.15

b) Program za određivanje konstante inhibicije 2-propanolom

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNADPH, KmO, KiPROP

$r = Vm * cNADPH * cO / ((KmNADPH * (1 + c/KiPROP) + cNADPH) * (KmO + cO))$

cO=0.484988

cNADPH=0.1

Vm=0.313663879

KmNADPH=0.106541350

KmO=0.0587644982

KiPROP=6.01000914

c) Program za određivanje konstante inhibicije acetonom

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, KmNADPH, KmO, KiAC

$r = V_m * c_{NADPH} * c_O / ((K_m_{NADPH} * (1 + (c / K_iAC))) + c_{NADPH}) * (K_mO + c_O)$

cO=0.484988

cNADPH=0.1

Vm=0.313663879

KmNADPH=0.106541350

KmO=0.0587644982

KiAC=6.01000914

**Prilog 12.** Program u *Scientist*-u za određivanje početne brzine potrošnje kisika u reakciji oksidacije NADPH katalizirane NOX-om

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: c
```

```
Params: n,kla
```

```
c'=-n+kla*(0.484988-c)
```

```
t=0.5
```

```
c=0.028248581925
```

```
kla=0.00522235700
```

```
n=0.003
```

```
***
```

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: c
```

```
Params: n,kla
```

```
c'=-n+kla*(0.484988-c)
```

```
t=0.5
```

```
c=0.323200519875
```

```
kla=0.00522235700
```

```
n=0.003
```

```
***
```

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: c
```

```
Params: n,kla
```

```
c'=-n+kla*(0.484988-c)
```

```
t=0.1833333333333333
```

```
c=0.468027487125
```

```
kla=0.00522235700
```

n=0.01

\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$c' = -n + kla * (0.484988 - c)$

t=0.6

c=0.1992910635

kla=0.00522235700

n=0.01

\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$c' = -n + kla * (0.484988 - c)$

t=0

c=0.084635168625

kla=0.00522235700

n=0.01

\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$$c' = -n + kla * (0.484988 - c)$$

$$t = 0$$

$$c = 0.13803714225$$

$$kla = 0.00522235700$$

$$n = 0.003$$

\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$$c' = -n + kla * (0.484988 - c)$$

$$t = 0.01666666666666667$$

$$c = 0.171918369$$

$$kla = 0.00522235700$$

$$n = 0.003$$

\*\*\*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: c

Params: n,kla

$$c' = -n + kla * (0.484988 - c)$$

$$t = 0.1$$

$$c = 0.28351399275$$

$$kla = 0.00522235700$$

$$n = 0.003$$

\*\*\*



**Tablica 13.** Početna brzina potrošnje kisika ( $n$ ) u reakciji oksidacije NADPH s enzimom NOX

<b>Parametar</b>	<b>Vrijednost</b>
$k_{1a}$	$0,0052 \pm 3,0569 \cdot 10^{-5}$
	$0,0068 \pm 7,5444 \cdot 10^{-5}$
$n$	$0,0157 \pm 0,0005$
	$0,0097 \pm 0,0002$
	$0,0124 \pm 0,0002$
	$0,0072 \pm 0,0002$
	$0,0079 \pm 0,0003$
	$0,0116 \pm 0,0003$
	$0,0050 \pm 0,0001$

**Prilog 13.** Program korišten za simulaciju reakcije oksidacije etanola katalizirane s ADH Sc uz regeneraciju koenzima s NOX-om

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: cE,cAAC,co,cNAD,cNADH

Params: Vm1,KmNAD,KmE,KiAAC,Vm2,KmNADH,KmAAC,KiE,KiNAD,KisAAC,Vm3,  
KmNADH3,KmO,KiNAD3,KiE3,KiAAC3,kla

$r1 = Vm1 * ADH * cNAD * cE / ((KmNAD * (1 + cNADH / KiNADH) + cNAD) * (KmE * (1 + cAAC / KiAAC) + cE))$

$r2 = Vm2 * ADH * cNADH * cAAC / ((KmNADH * (1 + cNAD / KiNAD) + cNADH) * (KmAAC * (1 + cE / KiE) + cAAC + ((cAAC^2) / KisAAC)))$

$r3 = Vm3 * NOX * cNADH * cO / ((KmNADH3 * (1 + cE / KiE3 + cAAC / KiAAC3 + cNAD / KiNAD3) + cNADH) * (KmO + cO))$

Vm1=97.463

KmNAD=0.143

KmE=7.850

KiAAC=0.0816

KiNADH=0.00622

Vm2=251.472687

KmNADH=0.107769244

KmAAC=0.388722366

KiE=2.25624504

KiNAD=0.436722050

KisAAC=1325.28611

Vm3=0.157

KmNADH3=0.0287

$$K_{mO}=0.336$$

$$K_{iE3}=720.2$$

$$K_{iAAC3}=350.89$$

$$K_{iNAD3}=3.967$$

$$k_{la}=0.182799989$$

$$c_{oz}=0.4849875$$

$$c_E=70$$

$$c_{NAD}=1.8$$

$$c_O=0.4705348725$$

$$c_{AAC}=0$$

$$c_{NADH}=0$$

$$ADH=1$$

$$NOX=6$$

$$t=0$$

$$c_E'=-r_1+r_2$$

$$c_{AAC}'=r_1-r_2$$

$$c_O'=k_{la}*(c_{oz}-c_O)-r_3/2$$

$$c_{NAD}'=-r_1+r_2+r_3$$

$$c_{NADH}'=r_1-r_2-r_3$$

**Prilog 14.** Program u *Scientist*-u za određivanje inaktivacijske konstante enzima ADH *Sc* i NOX u reakciji oksidacije etanola katalizirane s ADH *Sc* uz regeneraciju koenzima s NOX-om

a) inaktivacija ADH *Sc*

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: A
```

```
Params: kd
```

```
A'=-kd*A^2
```

```
kd=0.01
```

```
t=0
```

```
A=1
```

b) inaktivacija NOX

```
// MicroMath Scientist Model File
```

```
IndVars: t
```

```
DepVars: A
```

```
Params: kd
```

```
A'=-kd*A^2
```

```
kd=0.01
```

```
t=0
```

```
A=1
```

**Prilog 15.** Program u *Scientist*-u korišten za simulaciju reakcije oksidacije 2-propanola katalizirane s ADH *Lb* uz regeneraciju koenzima s NOX-om

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: cPROP,cAC,co,cNADP,cNADPH

Params: Vm1,KmNADP,KmPROP,KiAC,Vm2,KmNADPH,KmAC,KiPROP,KiNADP,Vm3,  
KmNADPH3,KmO,KiNADP3,KiPROP3,KiAC3,kla,KsNADP,KsAC

$r1 = Vm1 * KRED * A1 * cNADP * cPROP / ((KmNADP * (1 + cNADPH / KiNADPH) + cNADP + ((cNADP^2) / KsNADP)) * (KmPROP * (1 + cAC / KiAC) + cPROP))$

$r2 = Vm2 * KRED * A1 * cNADPH * cAC / ((KmNADPH * (1 + cNADP / KiNADP) + cNADPH) * (KmAC * (1 + cPROP / KiPROP) + cAC + ((cAC^2) / KsAC)))$

$r3 = Vm3 * NOX * A2 * cNADPH * cO / ((KmNADPH3 * (1 + cPROP / KiPROP3 + cAC / KiAC3) + cNADPH) * (KmO + cO))$

Vm1=0.545676195

KmNADP=0.0102763183

KmPROP=0.415105972

KiAC=1.48452045

KiNADPH=0.244185310

KsNADP=13.8871748

Vm2=19.1497951

KmNADPH=0.210846245

KmAC=26.0883935

KiPROP=4.32327549

KiNADP=0.486475867

KsAc=2928.16245

Vm3=0.313663879

$K_{mNADPH3}=0.106541350$

$K_{mO}=0.0587644982$

$K_{iPROP3}=689.107507$

$K_{iAC3}=168.326652$

$k_{la}=0.190788845$

$coz=0.4849875$

$kd1=4.20390975E-5$

$kd2=0.00309612970$

$c_{PROP}=70$

$c_{NADP}=0.5$

$c_O=0.4705348725$

$c_{AC}=0$

$c_{NADPH}=0$

$K_{RED}=8$

$NOX=12$

$A1=1$

$A2=1$

$t=0$

$c_{PROP}'=-r1+r2$

$c_{AC}'=r1-r2$

$co' = k_{la} * (coz - co) - r3/2$

$c_{NADP}' = -r1 + r2 + r3$

$c_{NADPH}' = r1 - r2 - r3$

$A1' = -kd1 * A1^2$

$$A' = -kd^2 * A^2$$

**Prilog 16.** Program u *Scientist*-u za određivanje inaktivacijske konstante enzima ADH *Lb* i NOX u reakciji oksidacije 2-propanola katalizirane s ADH *Lb* uz regeneraciju koenzima s NOX-om

a) inaktivacija ADH *Lb*

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: A

Params: kd

$A' = -kd * A^2$

kd=0.01

t=0

A=1

b) inaktivacija NOX

// MicroMath Scientist Model File

IndVars: t

DepVars: A

Params: kd

$A' = -kd * A^2$

kd=0.01

t=0

A=1

## 8. POPIS SIMBOLA I KRATICA

### SIMBOLI

$A$ [-]	relativna aktivnost enzima
$A_s$ [U mg <sup>-1</sup> ]	specifična aktivnost enzima
$A_v$ [U mL <sup>-1</sup> ]	volumna aktivnost enzima
$b$ [cm]	duljina puta zračenja
$c$ [mol L <sup>-1</sup> ]	množinska koncentracija
°C	stupanj Celzijus
$c$ [mol L <sup>-1</sup> ]	množinska koncentracija
$d$ [cm]	širina kvarcne kivete
$E_a$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	energija aktivacije
[ES <sup>‡</sup> ]	prijelazno stanje enzim-supstrat
ESI	kompleks enzim-supstrat-inhibitor
$\varepsilon$ [L mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]	molarni apsorpcijski koeficijent
$\gamma$ [mg mL <sup>-1</sup> ]	masena koncentracija
G	specifična vodljivost
$\Delta G^\ddagger$ [kJ, kcal]	Gibbsova slobodna energija aktivacije
$\Delta G_{enz}^\ddagger$ [kJ, kcal]	Gibbsova slobona energija enzimatske reakcije
$\Delta G_{neenz}^\ddagger$ [kJ, kcal]	Gibbsova slobona energija neenzimatske reakcije
$I_0$ [-]	intenzitet upadne svjetlosti
$I$ [-]	intenzitet svjetlosti nakon prolaska kroz uzorak
$\lambda$ [nm]	valna duljina zračenja
$k$ [min <sup>-1</sup> ]	konstanta brzine reakcije
$k_{-1}(k_{-2})$ [min <sup>-1</sup> ]	konstanta brzine reakcije povratne reakcije
$k_d$ [min <sup>-1</sup> ]	konstanta inaktivacije enzima
$K_i$ [mM]	konstanta inhibicije
$K_m$ [mM]	Michaelis-Mentenična konstanta
$n$ [mol]	množina tvari
$N_A$ [mol m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> ]	brzina prijenosa (fluks) tvari A
$pH$	negativni logaritam koncentracije vodikovih iona u otopini
$r_0$ [U mg <sup>-1</sup> ]	početna brzina reakcije
$r_A$ [mol m <sup>-3</sup> s <sup>-1</sup> ]	brzina reakcije obzirom na tvar A



$[S^\ddagger]$	prijelazno stanje supstrata
$t$ [min]	vrijeme
$T$ [°C]	temperatura
$V$ [mL, L]	volumen
$V_m$ [U mg <sup>-1</sup> ]	maksimalna brzina reakcije

## KRATICE

ABS	apsorbancija
ADH	alkohol dehidrogenaza
ATP	adenozin trifosfat
DNK	deoksiribonukleinska kiselina
E	enzim
ES	kompleks enzim-supstrat
FAD, FADH <sub>2</sub>	flavin adenin dinukleotid
KRED	karbonilna reduktaza, ketoreduktaza
ADH <i>Lb</i>	alkohol dehidrogenaza iz <i>Lactobacillus brevis</i>
mRNK	glasnička RNK
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid (oksidirani oblik)
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid (reducirani oblik)
NADP <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (oksidirani oblik)
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (reducirani oblik)
NOX - NADH-oksidaza	nikotinamid adenin dinukleotid oksidaza
NOX - NADPH- oksidaza	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat oksidaza
P	produkt
RNK	ribonukleinska kiselina
S	supstrat
ADH <i>Sc</i>	alkohol dehidrogenaza iz <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TTN	engl. <i>total turnover number</i> , ukupan broj obrtaja
tRNK	transfer RNK
UV	ultraljubičasto zračenje
UV-Vis	ultraljubičasto-vidljiva svjetlost