

# Sinteza statina imobiliziranim enzimom u kontinuiranim reaktorima

---

**Batur, Martina**

**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:149:097730>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-03-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



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

**Martina Batur**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, rujan 2023.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Martina Batur**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 15. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Doc. dr. sc. Anita Šalić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić, Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog  
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 20. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Martina Batur

**SINTEZA STATINA IMOBILIZIRANIM ENZIMOM U  
KONTINUIRANIM REAKTORIMA**

Mentor: prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko

doc. dr. sc. Anita Šalić

Zagreb, rujan 2023.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki na strpljenju, pomoći, stručnim savjetima i sugestijama prilikom izrade ovog diplomskog rada.*

*Hvala asistentu mag. ing. oecoing. Dinu Skendroviću na pruženoj pomoći u laboratoriju tijekom izrade eksperimentalnog dijela.*

*Zahvalu upućujem i doc. dr. sc. Aniti Šalić na pomoći s reaktorima i mag. ing. oecoing. Ivanu Karlu Cingesaru za printanje reaktora.*

*Posebno zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i bratu na velikoj podršci i poticaju te razumijevanju tijekom cijelog mog studiranja. Moj uspjeh je i njihov uspjeh!*

*Također, hvala mojoj teti za sva ohrabrenja i razgovore. Od srca hvala i baki, koja je uvijek vjerovala u mene.*

*Hvala cijeloj obitelji, rodbini i prijateljima na podršci. Hvala mojim kolegama, a prije svega prijateljima koje sam upoznala tijekom studiranja i koji su učinili studentske dane ljepšima.*

## SAŽETAK

Statini su farmaceutici koji se koriste za snižavanje kolesterola u krvi i u prevenciji kardiovaskularnih bolesti. Enzim 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA) je jedini poznati enzim koji sudjeluje u visokoselektivnoj reakciji aldolne adicije pri čemu nastaje laktol, važan prekursor za proizvodnju bočnog lanca statina. DERA katalizira reakciju sinteze (3R, 5R)-6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (laktola) dvostrukom aldolnom adicijom acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA). Cilj ovog diplomskog rada bio je provesti sintezu statina imobiliziranim enzimom DERA u različitim tipovima kontinuiranih reaktora volumena 300 i 600  $\mu\text{L}$  te serijski spojenim reaktorima ( $2 \times 300 \mu\text{L}$ ), odnosno ispitati utjecaj različitih volumena i protoka na nastanak međuprodukta, 4-kloro-3-hidroksibutanala (4 C-Cl) i produkta, 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (6 C-Cl) . Reakcija u reaktorima se provodila pri protocima; 2, 5 i 7  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Usporedbom procesnih pokazatelja u reaktorima, kao najbolji parametri uspješnosti dobiveni su:  $X_{\text{CAA,max}} = 99,98 \%$  i  $X_{\text{CAA,max}} = 96,93 \%$  u eksperimentima E2-1 ( $V = 600 \mu\text{L}$ ,  $q = 2 \mu\text{L}/\text{min}$ ) i E3-1 ( $V = 2 \times 300 \mu\text{L}$ ,  $q = 2 \mu\text{L}/\text{min}$ ) pri većem vremenu zadržavanja (87,0 min) dok je najveća produktivnost procesa u iznosu 1,99 mM/min postignuta u eksperimentu E1-3 ( $V = 300 \mu\text{L}$ ,  $q = 7 \mu\text{L}/\text{min}$ ) pri vremenu zadržavanja od 12,4 min.

**Ključne riječi:** statini, 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza, DERA, aldolna adicija, imobilizacija, kontinuirani reaktori

## ABSTRACT

Statins are pharmaceuticals used to lower cholesterol in the blood and to prevent cardiovascular diseases. Enzyme 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase (DERA) is the only known enzyme that participates in the highly selective aldol addition reaction in which lactol, an important precursor for statin side chain production, is formed. DERA catalyzes the synthesis reaction of (3R, 5R)-6-chloro-3,5-dihydroxyhexanal (lactol) by double aldol addition of acetaldehyde (AA) and chloroacetaldehyde (CAA). The aim of this work was to carry out the synthesis of statins with an immobilized enzyme DERA in different types of continuous reactors with volumes of 300 and 600  $\mu\text{L}$  and in series connected reactors ( $2 \times 300 \mu\text{L}$ ), i.e. examine the influence of different volumes and flow rates on formation of the intermediate product, 4-chloro-3-hydroxybutanal (4 C-Cl) and the product, 6-chloro-3,5-dihydroxyhexanal (6 C-Cl). The reaction in the reactors was carried out at flow rates; 2, 5 and 7  $\mu\text{L}/\text{min}$ . By comparing the process indicators in the reactors, as the best performance parameters were obtained:  $X_{\text{CAA,max}} = 99.98 \%$  and  $X_{\text{CAA,max}} = 96.93 \%$  in experiments E2-1 ( $V = 600 \mu\text{L}$ ,  $q = 2 \mu\text{L}/\text{min}$ ) and E3 -1 ( $V = 2 \times 300 \mu\text{L}$ ,  $q = 2 \mu\text{L}/\text{min}$ ) at a longer retention time (87.0 min), while the highest productivity of the process in the amount of 1.99 mM/min was achieved in experiment E1-3 ( $V = 300 \mu\text{L}$ ,  $q = 7 \mu\text{L}/\text{min}$ ) at a retention time of 12.4 min.

**Key words:** statins, 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase, DERA, aldol addition, immobilization, continuous reactors

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. Enzimi .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. <i>Struktura enzima .....</i>	2
2.1.2. <i>Imenovanje i podjela enzima .....</i>	4
2.1.3. <i>Mehanizam djelovanja enzima.....</i>	5
2.1.4. <i>Kinetika enzimski kataliziranih reakcija .....</i>	7
2.1.5. <i>Specifična stabilnost enzima .....</i>	9
2.1.6. <i>Primjena enzima.....</i>	11
2.1.7. <i>Prednosti i nedostaci enzima .....</i>	11
<b>2.2. Aldolaze .....</b>	<b>12</b>
2.2.1. <i>DERA .....</i>	13
<b>2.3. Statini .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4. Imobilizacija enzima .....</b>	<b>15</b>
2.4.1. <i>Metode imobilizacije .....</i>	16
2.4.1.1. <i>Kovalentna imobilizacija .....</i>	17
2.4.2. <i>Vrste nosioca za kovalentnu imobilizaciju .....</i>	17
2.4.2.1. <i>Mezoporozna silika.....</i>	18
<b>2.5. Biokataliza u kontinuiranim sustavima.....</b>	<b>19</b>
2.5.1. <i>Prednosti .....</i>	20
2.5.2. <i>Upotreba.....</i>	21
2.5.3. <i>Tipovi reaktora .....</i>	21
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. Aparatura.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. Sinteza MCF mezoporozne silike.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3. Funkcionalizacija i aktivacija nosioca i imobilizacija enzima.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4. Određivanje skladišne stabilnosti.....</b>	<b>30</b>
<b>3.5. Provedba reakcije u različitim tipovima reaktora .....</b>	<b>30</b>
<b>3.6. Analitičke metode.....</b>	<b>31</b>
3.6.1. <i>Određivanje koncentracije enzima metodom po Bradfordu.....</i>	31
3.6.2. <i>Određivanje aktivnosti enzima DERA.....</i>	32



3.6.3. <i>Određivanje koncentracije reaktanata i produkata reakcije pomoću HPLC uređaja</i> .....	32
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>33</b>
4.1. <b>Sinteza i karakterizacija mezoporozne silike</b> .....	<b>33</b>
4.1.1. <i>BET analiza</i> .....	33
4.1.2. <i>SEM karakterizacija</i> .....	34
4.2. <b>Skladišna stabilnost imobiliziranog enzima</b> .....	<b>34</b>
4.3. <b>Provedba procesa u reaktoru</b> .....	<b>35</b>
4.3.1. <i>Kontinuirani reaktor <math>V=300 \mu\text{L}</math></i> .....	36
4.3.2. <i>Kontinuirani reaktor <math>V=600 \mu\text{L}</math></i> .....	40
4.3.3. <i>Kontinuirani reaktor <math>V=2 \times 300 \mu\text{L}</math></i> .....	42
4.3.4. <i>Usporedba procesnih pokazatelja u različitim tipovima kontinuiranih reaktora</i> ..	46
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>49</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>50</b>
<b>7. PRILOZI</b> .....	<b>53</b>
<b>8. POPIS SIMBOLA I KRATICA</b> .....	<b>55</b>
<b>9. ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>57</b>

## 1. UVOD

U današnje vrijeme, povećanim unosom masti i napuštanjem tradicionalne „mediteranske prehrane“, naše prehrambene navike postaju sve nezdravije. Zbog toga se predviđa da će hiperkolesterolemija i dislipidemija postati tipične bolesti zapadnog društva, a statini postupno sve prisutniji u našim životima, kao važan dio globalnog farmaceutskog tržišta. Ova činjenica navodi nas na predviđanje stalno rastućeg tržišta za ovu vrstu lijekova. Za pripremu statina potrebni su novi i održiviji protokoli; zamjena kemijskih procesa biokataliziranim procesima sigurno će pomoći u postizanju održivosti zbog dobro poznatih zelenih značajki biokatalize – provedba sintetskih procesa pri blagim reakcijskim uvjetima, veća učinkovitost i selektivnost katalizatora; korištenje vode kao reakcijskog medija i ekološka prihvatljivost. Stoga također predviđamo sve veći porast upotrebe biokatalize za pripremu statina, uglavnom promicanih poboljšanjem učinkovitosti biokatalizatora. [1]

Posljednjih nekoliko desetljeća, upotreba enzima kao biokatalizatora u organskoj sintezi porasla je do nezabilježenih razina. Više od 80% komercijalne razine enzima povezano je s njihovom primjenom kao procesnih katalizatora. [2]

Enzimi, široko prisutni u biljkama, životinjama i mikroorganizmima, su proteini koji kataliziraju biokemijske i kemijske reakcije. Prednosti enzima su visoka katalitička aktivnost, selektivnost i specifičnost. Osim toga, mogu raditi pri blagim uvjetima pH, temperaturi i tlaku. Međutim, enzimi se ne mogu lako oporaviti i ponovno upotrijebiti nakon prvotnog korištenja, što nije ekonomski isplativo. Ovaj nedostatak može se prevladati metodama imobilizacije, koje omogućuju lak oporavak enzima i na taj način smanjuju troškove procesa. Osim toga, nakon imobilizacije obično dolazi do poboljšanja skladišne stabilnosti, pH i toplinske otpornosti. Na temelju ovih prednosti imobilizirani enzimi široko se primjenjuju u raznim područjima kao što su farmaceutska industrija, prehrambena industrija, pročišćavanje otpadnih voda, tekstilna industrija itd. Do sada su najčešće korištene tehnike imobilizacije fizička adsorpcija, uklapanje, kovalentno vezanje i umrežavanje. Osim tehnika imobilizacije, tu su i nosioci, koji su od vitalne važnosti za imobilizaciju enzima. [3]

U ovom radu provedena je reakcija sinteze prekursora statina u različitim tipovima kontinuiranih reaktora. Kao katalizator je korišten enzim DERA imobiliziran na mezoporoznu siliku kovalentim vezanjem.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Enzimi

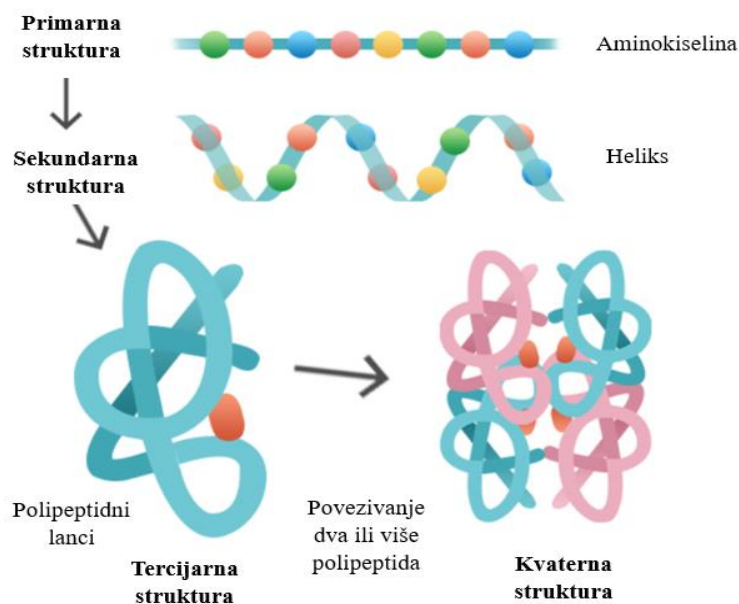
Enzimi su biološki organski spojevi koji kataliziraju kemijske reakcije u živom organizmu i na taj način održavaju uravnoteženi sustav. Kao i ostali katalizatori, snižavaju energiju aktivacije i iz reakcije izlaze nepromijenjeni, a ono što ih izdvaja od ostalih katalizatora je visoka učinkovitost i selektivnost te iznimna specifičnost prema vrsti reakcije koju kataliziraju i prema vrsti supstrata. O velikoj učinkovitosti govori činjenica da mogu ubrzati reakcije za  $10^6$  do  $10^{12}$  puta. [4]

Naziv enzim prvi put se javlja krajem 19. stoljeća i veže se uz pokuse fermentacije (pretvorba šećera u alkohol uz primjenu kvasca bez prisustva kisika). Njemački fiziolog W. Kühne je upotrijebio izraz enzim (grč. *en zyme* – u kvascu) za opisivanje procesa fermentacije, odnosno da bi definirao katalitički aktivne tvari, koje su dugo godina bile poznate kao fermenti (lat. *fermentum* – kvasac). [4]

#### 2.1.1. Struktura enzima

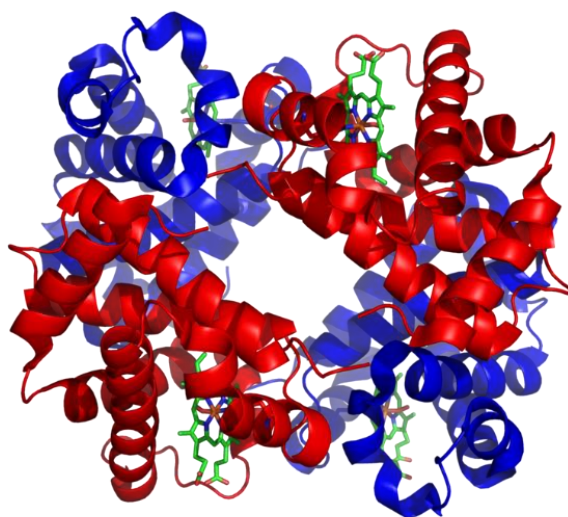
Primarna struktura proteina sastoji se od aminokiselina u različitim omjerima koje se spajaju kemijskim vezama u genetski određenom slijedu (primarna struktura), a povezivanjem aminokiselina nastaju peptidni lanci. Ako promijenimo samo jednu aminokiselinu u lancu, to dovodi do gubitka funkcije samoga proteina ili do mutacije gena. Sekundarna struktura nastaje savijanjem peptidnih lanaca u spirale pri čemu dolazi do formiranja vodikovih veza između amidnih i karbonilnih skupina. Dva najčešća tipa sekundarnih struktura su  $\alpha$ -uzvojnica i  $\beta$ -nabrana ploča. Tercijarna struktura nastaje daljnjim povezivanjem sekundarnih struktura u veće funkcionalne podjedinice polipeptida, dok kvaterna struktura nastaje povezivanjem dvaju ili više peptidnih lanaca disulfidnim mostovima u još veće strukture. [4]

Na **Slici 1.** prikazane su četiri razine strukture proteina.



**Slika 1.** Četiri razine strukture proteina. [5]

Enzimi su, prema prostornoj građi većinom globularni proteini. [6] Globularni proteini imaju vrlo zaobljenu ili sfernu trodimenzionalnu konformaciju i izgledaju složenije i nepravilnije. [7] Primjer takvog proteina je hemoglobin, koji sudjeluje u prijenosu kisika kroz krv, a čija je struktura prikazana na **Slici 2**. Struktura nekih enzima može sadržavati i neproteinski dio, koji je potreban za održavanje njihove katalitičke aktivnosti. [7]



**Slika 2.** Tercijarna struktura hemoglobina. [8]

### 2.1.2. Imenovanje i podjela enzima

Prilikom katalize određene vrste reakcije, enzim reagira sa samo jednom vrstom tvari, koja se naziva supstrat. Zbog ove specifičnosti, imenovanje enzima obično se zasniva na tome, da se na ime supstrata kojega modificiraju dodaje sufiks -aza (pr. ureaza, amilaza). Međutim, postoje i iznimke, čiji je nastavak -in (pr. tripsin, pepsin, motripsin). [4]

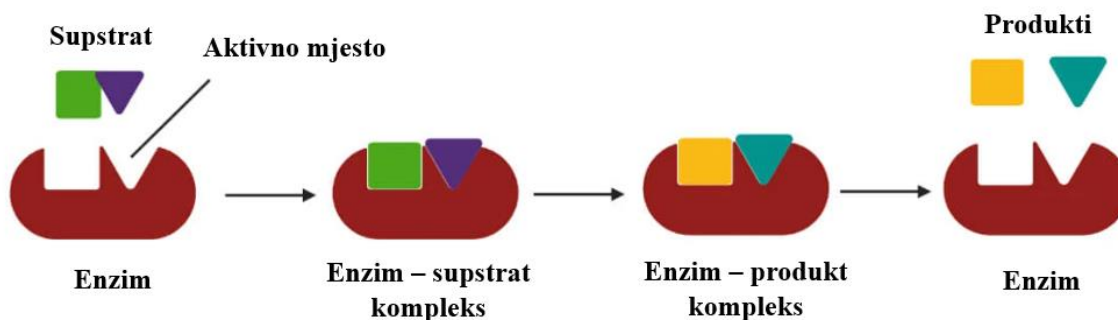
Isto tako, prije naziva enzima može doći riječ koja definira supstrat, izvor enzima, oblik regulacije ili mehanizam djelovanja. Da bi se izbjegle sve nejasnoće, Međunarodna unija biokemičara (engl. *International Union of Biochemist*, IUB) je razvila jedinstven sustav imenovanja enzima tako da svaki ima unikatan naziv i broj klasifikacije koji utvrđuje tip katalizirane reakcije i odgovarajući supstrat. [4]

Prema tipu reakcije koju kataliziraju, enzimi se dijele u šest skupina:

1. oksidoreduktaze (kataliziraju reakcije koje uključuju prijenos elektrona – oksidacija i redukcija),
2. transferaze (kataliziraju prijenos funkcionalne skupine s jedne tvari na drugu),
3. hidrolaze (kataliziraju cijepanje kemijske veze vezanjem vode na supstrat) ,
4. liaze (kataliziraju cijepanje kemijske veze eliminacijom funkcionalnih skupina uz nastanak dvostruke veze ili adicijom funkcionalnih skupina na dvostruku vezu),
5. izomeraze (kataliziraju prijenos funkcionalne skupine unutar molekule uz formiranje izomera)
- i 6. ligaze (kataliziraju spajanje dvije molekule uz istovremenu hidrolizu adenozin-trifosfata, ATP) [4]

### 2.1.3. Mehanizam djelovanja enzima

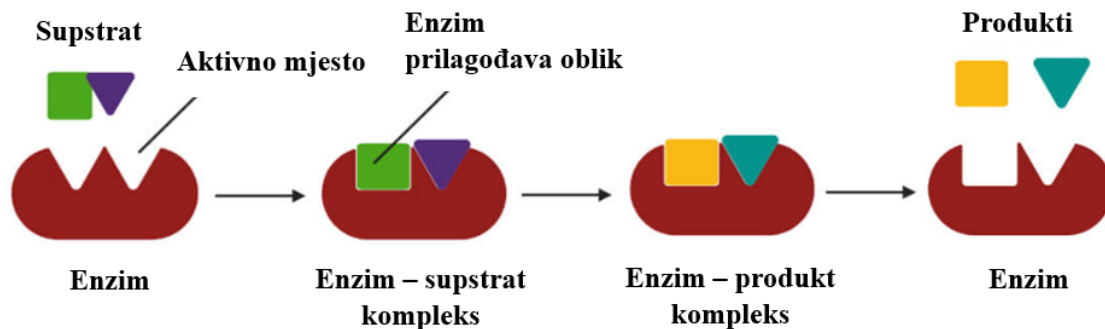
Njemački znanstvenik E. Fischer je 1894. godine pretpostavio model djelovanja enzima po principu „ključ – brava“ (**Slika 3.**).



**Slika 3.** Shematski prikaz djelovanja enzima po modelu „ključ – brava“. [9]

Prema ovom modelu, enzimi pokazuju visoku specifičnost prema supstratu te se aktivno mjesto enzima i supstrat uklapaju jedno u drugo tako da svaki sadrži unaprijed određene komplementarne geometrijske oblike i veličine. [9]. Aktivno mjesto enzima je pukotina na površini enzima uzrokovana načinom savijanja proteina u svoju tercijarnu strukturu. Katalitičko mjesto i mjesto vezanja supstrata čine aktivno mjesto enzima, u koje mogu inkorporirati samo molekule odgovarajućeg oblika i veličine. [6]. Ova specifičnost je ekvivalentna modelu „ključa i brave“, gdje je supstrat ključ, a enzim brava. Vezanjem supstrata na aktivno mjesto enzima, nastaje kompleks enzim – supstrat. Zatim enzim katalizira kemijsku reakciju te nastaje kompleks enzim – produkt. U zadnjem koraku oslobađa se jedan ili više produkata, a enzim se ponovno može upotrijebiti u drugoj reakciji. [9].

Međutim, ovaj model ne objašnjava stabilizaciju kompleksa enzim – supstrat u prijelaznom stanju. Isto tako, ne opisuje mogućnost promjene konformacije aktivnog mjesta nakon vezivanja supstrata niti uvjete vezivanja više supstrata na enzim. D. Koshland objasnio je ove nedostatke 1958. godine razvojem modela inducirane prilagodbe enzima (**Slika 4.**), prema kojemu dolazi do konformacijskih promjena vezanjem supstrata na aktivno mjesto enzima. [4]



**Slika 4.** Shematski prikaz djelovanja enzima prema modelu inducirane prilagodbe. [9]

Na početku enzim i supstrat nisu kompatibilni pa aktivno mjesto enzima prolazi kroz konformacijske promjene sve dok se supstrat potpuno ne veže za enzim. Tada se uspostavlja konačni oblik i enzim počinje djelovati kao katalizator, snižavajući energiju aktivacije i povećavajući ukupnu brzinu reakcije. [9]

Da bi se kataliza kemijskih reakcija što brže odvila, enzimi koriste četiri različita mehanizama djelovanja: kataliza približavanjem, kiselinsko-bazna kataliza, kataliza naprežanjem i kovalentna kataliza. [4]

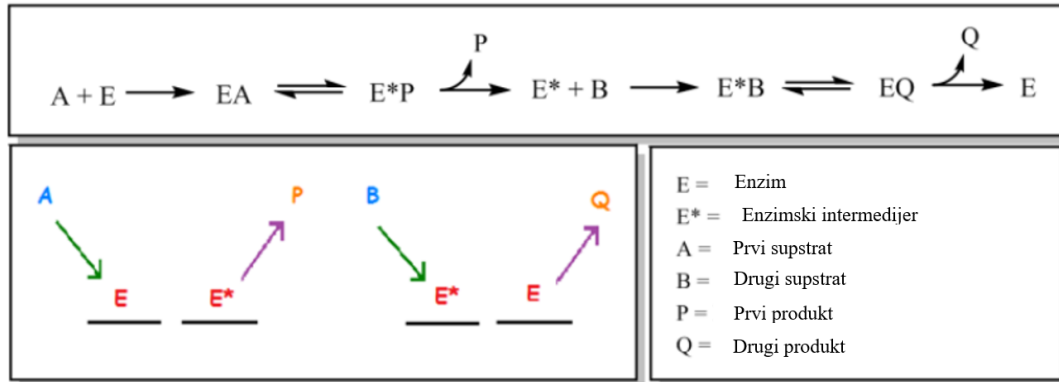
Kataliza približavanjem temelji se na načelu da molekule moraju doći na što manju udaljenost da bi međusobno reagirale, odnosno da bi došlo do stvaranja kemijske veze. Pri tome, većoj brzini reakcije pogoduje veća koncentracija i veći broj sudara. U trenutku kada se molekule supstrata vežu na aktivno mjesto enzima, stvara se područje u kojem je koncentracija supstrata visoka i reakcija se ubrzava za najmanje tisuću puta. [4]

Kiselinsko – bazna kataliza podrazumijeva da ionizirajuće funkcionalne skupine na bočnim lancima aminokiselina i prostetičkih skupina doprinose katalizi djelujući kao kiseline ili baze. [4]

Kataliza naprežanjem objašnjava da enzimi koji kataliziraju reakcije cijepanja kovalentnih veza, često vežu supstrat u nešto nepovoljnijoj konformaciji, što odgovara konformaciji prijelaznog stanja. Uzrokovano naprežanje dalje izaziva istežanje ili savijanje određene veze, koja tada postaje krhkija i sklonnija kidanju. L. Pauling je prvi predložio stabilizaciju prijelaznog kompleksa. [4]

Kovalentna kataliza podrazumijeva nastajanje kovalentne veze između enzima i jednog ili više supstrata. Uvodi novi reakcijski put u kojem je energija aktivacije niža i samim time reakcija brža. Nakon provedene reakcije enzim se vraća u svoje prvobitno stanje

nepromijenjen. Često se ovaj proces provodi putem „ping – pong“ mehanizma, u kojem se nakon vezivanja prvog supstrata njegov produkt otpusti, a zatim se veže drugi supstrat (**Slika 5.**). [4]

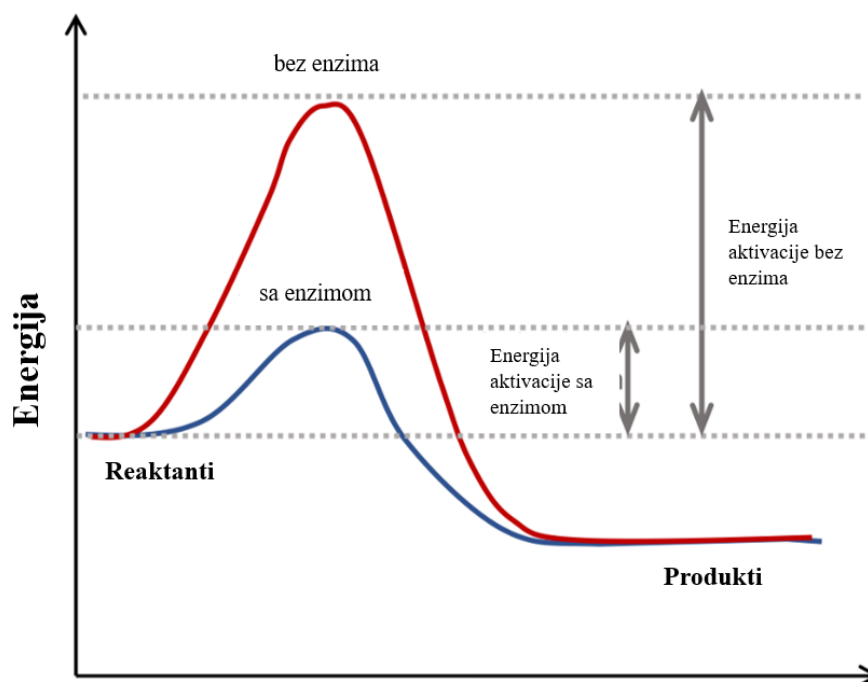


**Slika 5.** Prikaz „ping – pong“ mehanizma. [10]

#### 2.1.4. Kinetika enzimski kataliziranih reakcija

Enzimi su biološki katalizatori, koji ubrzavaju kemijske reakcije sniženjem energije aktivacije ( $E_a$ ). Enzimski katalizirane reakcije su  $10^6$  do  $10^{12}$  puta brže od nekataliziranih i oko  $10^3$  puta brže od kataliziranih kemijskih reakcija. [4] Na **Slici 6.** je prikazan graf enzimski katalizirane reakcije i reakcije bez prisutnosti enzima, iz kojega se može vidjeti značajno smanjenje energije aktivacije sa enzimom.

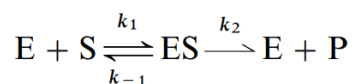




**Slika 6.** Graf kemijske reakcije sa i bez prisutnosti enzima kao katalizatora. [11]

Prema teoriji sudara, porastom kinetičke energije dolazi do većeg broja sudara između molekula reaktanata, koji su potrebni za nastanak novih produkata. Faktori koji utječu na brzinu enzimske reakcije su: temperatura, pH, koncentracija enzima, koncentracija supstrata, prisutnost inhibitora ili aktivatora. [2]

Brown je 1902. godine objasnio da se enzimski katalizirane reakcije sa jednim supstratom najbolje mogu opisati prema shemi na **Slici 7.**, gdje je E – enzim, S – supstrat, ES – kompleks enzim-supstrat, P – produkt, a  $k_1$ ,  $k_{-1}$  i  $k_2$  – konstante brzine reakcije u određenom koraku. Prema ovoj shemi, brzina reakcije je proporcionalna koncentraciji kompleksa enzim – supstrat, [ES].



**Slika 7.** Shema enzimski katalizirane reakcije sa jednim supstratom. [12]

Iako je Brownov model dao korisno kvalitativno objašnjenje enzimske reakcije, bilo je potrebno postaviti i matematički mehanizam. Prvi doprinos dao je Henri 1903. godine, a zatim Michaelis i Menten 1913. godine. Henri – Michaelis – Mentenina jednadžba pretpostavlja da

se uspostavlja brza ravnoteža između reaktanata (E i S) i kompleksa ES, uz sporu konverziju kompleksa ES natrag u slobodne enzime i produkte. Ovaj model također pretpostavlja da je  $k_2 \ll k_{-1}$ .

Michaelis – Mentenina jednačba prikazuje odnos između početne brzine reakcije,  $v_i$  i koncentracije supstrata, [S] :  $v_i = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$ . Michaelisova konstanta,  $K_m$  je koncentracija supstrata pri kojoj je  $v_i$  jednak polovini maksimalne brzine ( $V_{max}/2$ ) koja se postiže pri određenoj koncentraciji enzima[4]

1. Ako je  $[S] \ll K_m$ , izraz  $K_m + [S]$  je približno jednak  $K_m$ , pa proizlazi da je:

$$v_i = \frac{V_{max}[S]}{K_m}.$$

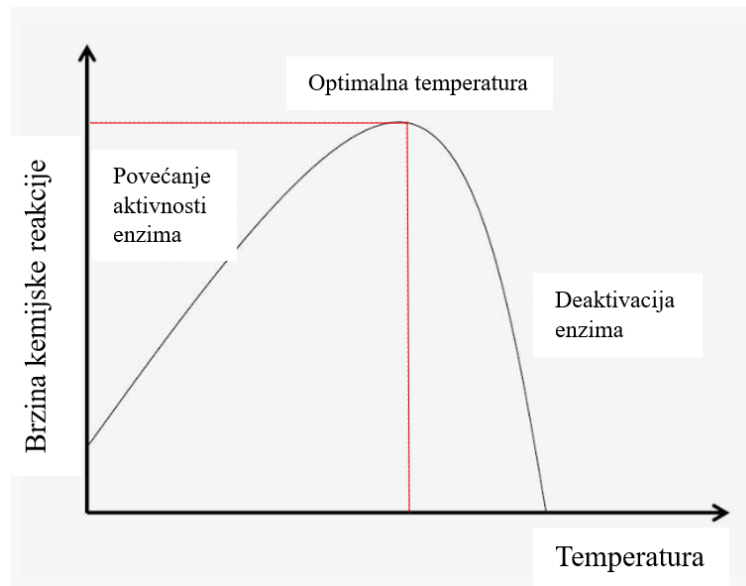
2. Ako je  $[S] \gg K_m$ , izraz  $K_m + [S]$  je približno jednak [S], pa proizlazi da je:

$v_i = \frac{V_{max}[S]}{[S]} = V_{max}$ . Dakle, brzina reakcije je maksimalna i na nju ne utječe porast koncentracije supstrata.

3. Ako je  $[S] = K_m$ , slijedi da je:  $v_i = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{V_{max}[S]}{2[S]} = \frac{V_{max}}{2}$ .

### 2.1.5. Specifična stabilnost enzima

Najznačajniji faktor koji utječe na brzinu enzimske reakcije, a osim toga i na aktivnost i stabilnost enzima je temperatura. Povećanjem temperature raste broj sudara između enzima i supstrata, tj. dolazi do povećanja brzine reakcije, ali i brzine deaktivacije enzima (**Slika 8.**). Porast temperature od 10 °C može povećati aktivnost većine enzima za 50 – 100 %. [2]



**Slika 8.** Utjecaj temperature na brzinu enzimske reakcije. [13]

Međutim, kada dođe do denaturacije, enzim gubi svoju aktivnost i funkcionalnost. [13] Pri umjerenim temperaturama (obično do 30 °C) i u kratkim vremenskim periodima, stopa inaktivacije je beznačajna dok pri višim temperaturama koncentracija aktivnog enzima opada i stopa inaktivacije postaje izraženija. Pri temperaturama višim od 60 – 70 °C za mezofilne enzime, inaktivacija je tako brza da je početne brzine reakcije teško odrediti, a u ekstremnim slučajevima, kada se ne može izmjeriti jer ne traje dovoljno dugo, smatra se nulom. [2]

Svaki enzim ima temperaturni raspon pri kojem je postignuta maksimalna brzina reakcije, tj. optimalna temperatura. Raspon enzimske aktivnosti određen je temperaturom na kojoj se enzim počinje aktivirati i temperaturom na kojoj se počinje denaturirati. [13]

Isto tako, enzim je osjetljiv na visoke koncentracije supstrata i međuprodukta. Porastom koncentracije supstrata aktivnost enzima raste do određenog trenutka, kada dolazi do zasićenja, tj. nema više aktivnih mjesta. U slučaju da dođe do inhibicije, smanjenjem koncentracije supstrata enzim će se ponovno aktivirati, a ukoliko dođe do deaktivacije, enzim više ne može biti vraćen u prvobitno stanje. [14]

### 2.1.6. Primjena enzima

Enzimski katalizirane reakcije temelj su održavanja pravilnog metabolizma svih živih organizama. Osim toga, predstavljaju veliku priliku za industriju, izvođenjem učinkovitih i ekonomičnih konverzija u biokatalitičkim procesima. [15]

Nalaze široku primjenu u prehrambenoj industriji, poljoprivredi, industriji papira i u tekstilnoj industriji. U **Tablici 1.** prikazan je utjecaj enzimske tehnologije na industriju.

**Tablica 1.** Utjecaj enzimske tehnologije na industriju. [15]

Industrija	Primjena enzima	Utjecaj
<b>Poljoprivreda</b>	Dodatak stočnoj hrani	Pozitivan utjecaj na okoliš, zdravlje životinja
	Proizvodnja heterolognih enzima	Proizvodnja lakaze i tripsina u biljkama
<b>Kemijska industrija</b>	Biokatalizatori	Pregled preparativnih biotransformacija
	Polimeri	Sinteza polimera <i>in vitro</i> enzimskom katalizom
<b>Materijali</b>	Novi enzimi za deterdžente	Povećana konkurencija i niže cijene
	Papir, tekstil, obrada kože Biočelik (svila)	Novi enzimi od ekstremofila Heterologni izraz paukove svile
<b>Prehrambena industrija</b>	Enzimi koji se koriste u pripremi hrane	Primjena novih enzima u hrani
	Nutraceutika	Povećan sadržaj karotena u rajčici
<b>Farmaceutska industrija</b>	Kiralni spojevi	Enantioselektivni biokatalizatori
	Glikoproteinski inženjering	<i>In vitro</i> glikolizacija proteina

Istovremeno, brzim razvojem tehnologije potiče se primjena enzima u kemijskoj i farmaceutskoj industriji, u svrhu očuvanja zdravlja, energije, sirovina i okoliša. [15]

### 2.1.7. Prednosti i nedostaci enzima

U **Tablici 2.** navedene su prednosti i nedostaci enzima kao biokatalizatora u odnosu na kemijske katalizatore.

Dakle, prednosti enzima u odnosu na kemijske katalizatore su: visoka selektivnost (stereo- i regioselektivnost), niska temperatura potrebna za odvijanje reakcije, niska potrošnja energije, aktivni su pri pH 2-12, tijekom reakcije nastaje manje nusprodukata, netoksični su,

moгу se ponovno upotrijebiti nakon reakcije, neki enzimi su biorazgradljivi te se mogu proizvesti u neograničenim količinama.

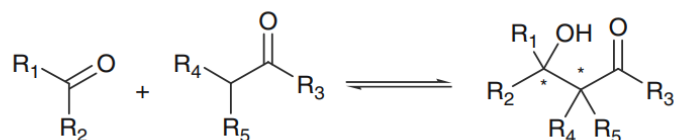
S druge strane, nestabilni su pri visokim temperaturama, pri ekstremnim vrijednostima pH i u agresivnim otapalima. Mogu biti inhibirani određenim metalnim ionima ili hidrolizirani peptidazama. Neki enzimi imaju visoku cijenu ili zahtjevaju skupe koenzime. Osim toga, enzimi su potencijalni alergeni kada se udahnu ili progutaju. [16]

**Tablica 2.** Prednosti i nedostaci enzima u odnosu na kemijske katalizatore. [16]

Prednosti	Nedostaci
Stereo- i regioselektivni	Nestabilni pri visokim temperaturama
Potrebna niska temperatura (0 - 110°C)	Nestabilni pri ekstremnim vrijednostima pH
Niska potrošnja energije	Nestabilni u agresivnim otapalima
Aktivni pri pH 2-12	Inhibicija određenim metalnim ionima
Manje nusprodukata	Hidroliza peptidazama
Netoksični	Visoka cijena određenih enzima
Mogućnost ponovne upotrebe (imobilizirani)	Zahtjev za skupim koenzimima
Mogućnost biorazgradnje	Potencijalni alergeni
Mogućnost proizvodnje u neograničenim količinama	

## 2.2. Aldolaze

Aldolaze su specifična skupina liaza (aldehid-liaze), koje kataliziraju reverzibilnu stereoselektivnu adiciju donorskog spoja (nukleofila) na akceptorski spoj (elektrofil). [2] Imaju mogućnost stvaranja C-C veza i do dva nova stereogena centra, što osigurava organskim kemičarima razvoj prirodnih i novih polihidroksilnih spojeva. Sudjeluju u brojnim procesima biosinteze ugljikohidrata, keto kiselina i nekih aminokiselina. [17] Općenita shema reakcije katalizirane aldolazama prikazana je na **Slici 9**.



**Slika 9.** Općenita shema reakcije katalizirane aldolazama. [2]

Aldolaze se, prema mehanizmu reakcije, dijele u dvije skupine:

**Skupina I:** aldolaze koje aktiviraju svoje donorske supstrate stvaranjem međuprodukta Schiffove baze sa striktno očuvanim aktivnim mjestom lizina.

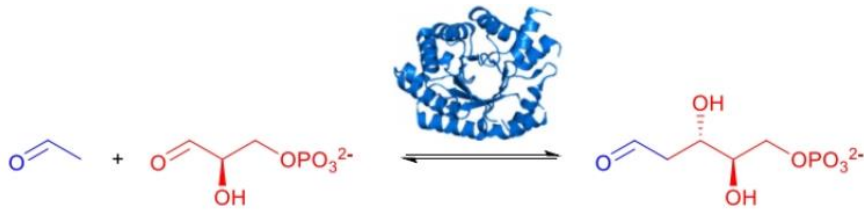
**Skupina II:** metalni kofaktor je vezan na enzimskom aktivnom mjestu histidinskim ostacima. Ovaj vezani metalni ion, obično  $Zn^{2+}$ , djeluje kao Lewisova kiselina koja aktivira supstrat vezanog donora. [17]

Druga podjela zasniva se na svojstvu aldolaza da vežu svoje odgovarajuće donorske supstrate s visokom specifičnošću. Općenito neće prihvatiti druge donore, čak i ako su njihove strukture slične prirodnom donoru. Prema tome, slijedi podjela na:

- a) Acetaldehid (DERA)
- b) Dihidroksiaceton fosfat
- c) Piruvat i fosfoenolpiruvat
- d) Glicin [2]

### 2.2.1. DERA

Skupina aldolaza ovisnih o acetaldehidu sadrži samo jednog člana, a to je: 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA), koja djeluje prema mehanizmu aldolaza skupine I. 1952. godine Rocker je objavio da stanični ekstrakti *E. Coli* kataliziraju reverzibilnu aldolnu reakciju između gliceraldehid-3-fosfata i acetaldehida dajući produkt: 2-deoksiriboza-5-fosfat (**Slika 10.**). [17, 18]



**Slika 10.** In vivo reakcija katalizirana enzimom DERA. [18]

Tijekom godina, DERA je otkrivena u velikom broju biljnih i životinjskih tkiva. Kod ljudi je najizraženija u plućima i stanicama jetre, a djeluje na stres odgađanjem ili minimiziranjem oštećenja u ovim stanicama. [18]

Posebnost ovog enzima je da prihvaća širok raspon supstrata kao akceptore u reakcijama aldolne kondenzacije. Također, DERA je prva aldolaza koja prihvaća i aldehide i ketone kao donore. Međutim, postoji ograničenje na veličinu donora jer preferira manje aldehide. To je u skladu sa skupinom aldolaza kojima pripada jer i one pokazuju isto svojstvo. Ključni problem je zapravo visoka kemijska reaktivnost acetaldehida koja je štetna za proteine, posebno za enzim DERA. [18]

Najvažnija primjena DERA-kataliziranih aldolnih reakcija je proizvodnja inhibitora HMG-CoA reduktaze, koji se zovu statini. Osim za proizvodnju statina, nema izvješća o drugim komercijalnim procesima primjene enzima DERA. Glavni razlog je u činjenici da u prisutnosti acetaldehida dolazi do deaktivacije enzima. Osim toga, tu su i ograničenje katalizatora na donore i vrijeme reakcije potrebno za proizvodnju određene količine produkta. [18]

U budućnosti je potrebno postići visoke aktivnosti i dosege reakcije uz niske stope deaktivacije i vrijeme reakcije, a vrijednost industrijske proizvodnje može se povećati korištenjem računalnog dizajna, procesima imobilizacije, proteinskim inženjeringom i racionalnim dizajnom reaktora. [18]

### 2.3. Statini

Statini su važni lijekovi za snižavanje kolesterola te je njihovo otkriće dovelo do značajnog napretka u primarnoj i sekundarnoj prevenciji koronarne bolesti srca. Najviše se

koriste za liječenje hiperkolesterolemije. Smanjuju razinu LDL-a (engl. *Low-density lipoprotein*) više nego drugi lijekovi za snižavanje kolesterola i snižavaju razinu triglicerida kod pacijenata s hipertrigliceridemijom. Osim toga, imaju još mnogo drugih korisnih djelovanja. Dokazano je da sprječavaju rast tumorskih stanica, a mogu se koristiti i u prevenciji Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. [19, 20]

Trenutno je dostupno nekoliko statina: prirodni statini (lovastatin i pravastatin), polusintetski (simvastatin) i sintetski (atorvastatin i fluvastatin). Prirodni statini su dobiveni fermentacijom te imaju sličnu kemijsku strukturu. Zajednički im je glavni poliketidni dio, hidroksi-heksahidro naftalenski prstenasti sustav, za koji su vezani različiti bočni lanci na C8 i C6. Strukture sintetskih statina nisu slične i prilično se razlikuju od prirodnih statina. Dobivaju se u obliku hidroksi kiseline. [20]

Statini se općenito sastoje od kiralnog diolnog bočnog lanca, spojenog na ciklički fragment. Enzim DERA pruža jednostavan put sinteze koristeći akiralne supstrate poput acetaldehida. To je zapravo jedini poznati enzim koji sudjeluje u visoko selektivnoj reakciji aldolne kondenzacije pri čemu nastaje laktol sa dva kiralna centra konačnog bočnog lanca statina s izvrsnom stereočistoćom i visokim prinosom. Dakle, laktol je prekursor za proizvodnju bočnog lanca, koji čini važan dio strukture statina. Zbog povećane komercijalne potražnje statina i potrebe za jednostavnijom pripremom, sve se više potiče učinkovitija i ekološki prihvatljivija priprema derivata bočnog lanca. Također, sintetski zahtjevna kiralna diolna struktura bočnog lanca i zahtjevi farmaceutske industrije za visokom (stereo)kemijskom čistoćom usmjerili su istraživanja s čiste kemijske sinteze na pristupe temeljene na enzimima, za koje je poznato da imaju visoku stereoselektivnost. [21]

#### **2.4. Imobilizacija enzima**

Zbog svojih izvrsnih svojstava (aktivnost, selektivnost, specifičnost), enzimi imaju veliki potencijal za primjenu kao industrijski katalizatori. Međutim, nisu svi enzimi pogodni za tu svrhu pa je većinom potrebno modificirati neka njihova svojstva. [2]

Imobilizacija je značajna za ponovnu upotrebu enzima kako bi njihova primjena u industrijskim procesima bila ekonomična, u slučaju da im je cijena visoka. Sa industrijskog gledišta, ova tehnika osigurava jednostavnost i isplativost, a za dugotrajnu ponovnu upotrebu



potrebno je pripremiti stabilne derivate koji imaju dobra funkcionalna svojstva (aktivnost, selektivnost). [2]

Nakon provedene imobilizacije pretpostavlja se da će se enzimi moći koristiti u agresivnoj sredini, kao što su organska otapala i ekstremne vrijednosti pH i temperature uz poboljšanu katalitičku aktivnost i mogućnost ponovne upotrebe. [22]

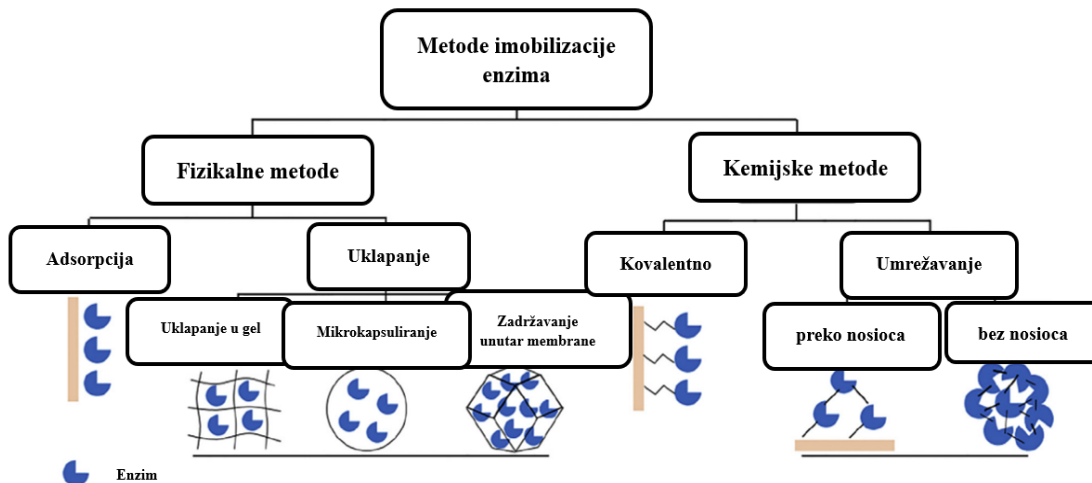
U **Tablici 3.** su navedene prednosti i nedostaci imobilizacije enzima.

**Tablica 3.** Prednosti i nedostaci imobilizacije enzima. [16]

Prednosti	Nedostaci
Ponovna upotreba enzima – ekonomičnost	Troškovi nosioca i imobilizacije
Stabilizacija enzima	Ograničenja u prijenosu mase
Lako izdvajanje produkta i oporavak	Problemi sa kofaktorima i regeneracijom
Kontinuirani proces: -olakšana kontrola procesa -kratko vrijeme zadržavanja -optimizacija prinosa proizvoda	Problemi sa višeenzimskim sustavima Promjene u svojstvima (selektivnost, aktivnost)

#### 2.4.1. Metode imobilizacije

Metode imobilizacije enzima (**Slika 11.**) dijelimo na one koje uključuju kemijsko vezanje enzima na inertni nosioc (kovalentno ili nekovalentno) ili bez nosioca (umrežavanje) te one u kojima su molekule enzima prostorno ograničene obično kroz dvofunkcionalni reagens (uklapanje u strukturu gela, mikrokapsuliranje, zadržavanje unutar membrane). [2]



**Slika 11.** Metode imobilizacije enzima. [3]

#### 2.4.1.1. *Kovalentna imobilizacija*

Kovalentna imobilizacija moguća je samo za enzime budući da enzimi sadrže funkcionalne skupine koje se mogu lako kovalentno vezati na nosioc. Površina nosioca može se modificirati kako bi se prilagodila dobro kontroliranom i preciznom vezanju sa specifičnim enzimima. [23] Kovalentna veza se uspostavlja između funkcionalnih grupa na aktiviranom nosiocu i funkcionalnih grupa u aminokiselinskim ostacima enzima kao što su: -OH, -SH, -NH<sub>2</sub> i -COOH. [2] Površinska modifikacija pruža mogućnosti korištenja širokog raspona nosioca kao što su filmovi, nanočestice, membrane, kapsule i kompozitni materijali. primjenama imobilizacije. [23]

Kovalentno vezanje enzima na nosioc uključuje tri koraka: 1. funkcionalizacija površine nosioca (amino ili karboksilnim funkcionalnim skupinama), 2. aktivacija površine nosioca glutaraldehydom ili karbodiimidom / sukcinimidom i 3. vezanje enzima na nosioc. [24]

#### 2.4.2. *Vrste nosioca za kovalentnu imobilizaciju*

Glavni izazov je dizajnirati funkcionalne biokompatibilne materijale i međufazne strukture koji omogućuju stabilno vezanje enzima održavajući njihovu aktivnost i funkcionalnost što bliže njihovom prirodnom stanju. Da bi se povećala učinkovitost enzimske imobilizacije i biokatalitičkih procesa, poželjno je razviti materijale koji imaju veliku

specifičnu površinu, hidrofilni karakter, visoku poroznost, povećanu stabilnost prema promjenama u mikrookolini te veliku mehaničku čvrstoću. U idealnom slučaju, metoda imobilizacije bi trebala osigurati enzimsku stabilnost na duži period, spriječiti ispiranje enzima, omogućiti ponovnu upotrebu te slobodnu difuziju supstrata i reakcijskih produkata. [24]

Kao nosioci za kovalentnu imobilizaciju koriste se različiti organski i anorganski materijali. Poželjna svojstva koja bi nosioc trebao imati su: veliki omjer površine i volumena, veliki kapacitet vezanja proteina, kompatibilnost i netopljivost u reakcijskom mediju, velika mehanička i kemijska stabilnost, mogućnost ponovne upotrebe te konformacijska fleksibilnost. [2]

Razvojem nanotehnologije, nanomaterijali su se počeli široko koristiti u medicini te farmaceutskoj i kemijskoj industriji. S obzirom na elemente od kojih su građeni, nanomaterijale možemo podijeliti na ugljične (ugljične nanocijevi, grafen i njegovi derivati) i metalne (metali, metalni oksidi i hidroksidi). Ostala podjela uključuje materijale na bazi silicijevog dioksida, kitozana i celuloze, minerale gline i mezoporne materijale (npr. silika). [22] Magnetske nanočestice od željezovog oksida nalaze široku upotrebu kao nanonostrukture u biokatalizi s obzirom da se mogu lako regenerirati u blizini magnetskog polja i koristiti više puta. Nedostatak je da su sklone aglomeraciji te im se mijenjaju magnetska svojstva i smanjuje homogenost, a rješava se inkapsuliranjem magnetskih čestica na različite biomaterijale. Nemagnetske nanočestice izrađene od zlata, silicijevog dioksida, kitozana, cirkonijevog oksida i drugih materijala također se široko upotrebljavaju za imobilizaciju enzima. [25]

Često se koriste porozni nosioci za enzimsku imobilizaciju jer imaju puno veći nosivi kapacitet. Osim toga, porozna struktura pomaže spriječiti inaktivaciju organskim otapalima. [25] Prema veličini pora, porozni materijali se dijele na: mikropore (< 2 nm), mezopore (2-50 nm) i makropore (> 50 nm). [26] Općenito, kovalentna imobilizacija enzima na mezoporoznu siliku pokazuje dobru stabilnost.

#### *2.4.2.1. Mezoporozna silika*

Mezoporozna silika pripada skupini anorganskih materijala sa jedinstvenom, dobro uređenom poroznom strukturom i vrlo velikom specifičnom površinom. [24] Najčešće se koristi kao stacionarna faza za tekućinsku kromatografiju, kao nosioc za imobilizaciju

biomolekula te kao katalizator. [27] Pojavljuje se u različitim oblicima (tanki filmovi, sferični, zakrivljeni, cjevasti, štapičasti te vlaknasti), na koje enzimi lako pristaju zbog relativno velikog promjera pora (2-40 nm), što se poklapa sa veličinom enzima, uskom raspodjelom veličina pora, velikim volumenom pora (oko 1,5 g/cm<sup>3</sup>) i velikom specifičnom površinom (do 1500 m<sup>2</sup>/g). [24]

Osim toga, anorganska silikatna mreža je kemijski i termički stabilna, ima nisku toksičnost i veliku mehaničku čvrstoću, te može biti lako funkcionalizirana za kovalentno vezanje enzima. Pokazano je da mezoporozna silika osigurava dobru učinkovitost vezanja i povećava katalitičku aktivnost i stabilnost enzima te također omogućava odvijanje reakcije u ekstremnim uvjetima (visoka temperatura, denaturirajući agensi i organska otapala sa odličnim svojstvima recikliranja za razliku od slobodnih enzima). [24]

Wang i sur. su pripisali poboljšanu stabilnost enzima imobiliziranog na mezoporoznu siliku konkavnoj površini pora, što olakšava vezanja enzima na više mjesta unutar kanala nanoveličine. Nanokanali djeluju kao mali kavezi, osiguravajući tako zaštitu u kemijskoj okolini, sličnu onoj kakvu enzimi imaju u biološkim stanicama. [24]

Prohodnost enzima u pore mezoporozne silike je ograničena dimenzijama pora. Ako su pore premale, vezanost enzima je ostvarena isključivo na vanjskoj površini silike i shodno tome, učinak vezanja će biti nizak. S druge strane, ako su pore prevelike, može doći do ispiranja enzima. Vinu i sur. su dokazali da moć adsorpcije raste povećanjem volumena pora i/ili promjera pora. Količina adsorbiranog enzima zauzima oko 30 % ukupnog volumena pora. [24]

## **2.5. Biokataliza u kontinuiranim sustavima**

Mjesto ili prostor u kojem se odvija neka kemijska reakcija s ciljem dobivanja određenog produkta naziva se kemijski reaktor. Reaktori u kojima se odvijaju biološki procesi u kontroliranim uvjetima nazivaju se bioreaktori. Pretvorba sirovina u produkte odvija se djelovanjem živih stanica (mikroorganizmi, alge) ili staničnih komponenti (enzimi). Osnovni tipovi reaktora su: kotlasti (šaržni), protočno kotlasti i cijevni reaktor. [28]

Enzimski reaktori mogu raditi šaržno ili kontinuirano. Usporedba između biokatalitičkih reakcija u šaržnom i kontinuiranom reaktoru je prilično teška jer su osnovni fizički uvjeti prilično različiti. Reaktori s kontinuiranim protokom općenito su manji od

šaržnih, ali unutar optimalnih uvjeta mogu proizvesti više produkta od analognog šaržnog reaktora. [2]

Glavni izazov tijekom rada reaktora je održati stabilnost enzima. Naime, za izvedbu kontinuiranog rada potrebno je osigurati visoku stabilnost enzima. Stoga se ovi procesi većinom provode s imobiliziranim enzimima. [2]

### 2.5.1. Prednosti

Smanjen utjecaj na okoliš, poboljšani prijenos topline i mase te visoka energetska učinkovitost samo su neke od prednosti tehnologije kontinuiranih sustava. Neke od njihovih drugih prednosti su: lakoća povećanja kapaciteta produljenjem vremena reakcije ili izgradnjom serijskih i/ili paralelnih reaktora, smanjen rizik povezan s akumulacijom i skladištenjem opasnih međuprodukata, smanjeno trošenje aktivnosti enzima u usporedbi s korištenjem imobiliziranih enzima u uvjetima miješanja. S obzirom da je ova tehnologija zelena i održiva, akademska zajednica i industrija se sada sve više usredotočuju na kontinuiranu proizvodnju. [29]

*Archer i sur.* proveli su ispitivanje između dva kontinuirana reaktora i jednog šaržnog. Kao što je i očekivano, povećanjem veličine šaržnog reaktora s 250 mL na 4 L smanjila se brzina reakcije. Bila su potrebna 4 h da se postigne 50 %-tna konverzija u reaktoru od 250 mL u odnosu na 25 h u reaktoru od 4 L. S druge strane, oba reaktora s kontinuiranim protokom poboljšali su brzinu reakcije zbog boljeg prijenosa mase; u ACR (eng. *Coflore agitated cell reactor*) reaktoru 75 %-tna konverzija je postignuta za 2 h. U ATR (eng. *Coflore agitated tube reactor*) reaktoru volumena 1 L, postignuta je 65 %-tna konverzija u usporedbi s 22 % u šaržnom reaktoru od 1 L. Ovaj primjer ukazuje na prednosti kontinuiranih sustava za biokatalizu u usporedbi sa šaržnim. U ovom radu autori su pratili pretvorbu u jednakim vremenima za obe šaržne i kontinuirane reakcije protoka, te također koristili isti volumenski reaktor za usporedbu. [30]

Još jedna prednost procesa kontinuiranog protoka je ta što omogućuje kontinuiranu proizvodnju kemikalija. Kontinuirani rad eliminira sve poremećaje koji se mogu naći u analognim proizvodnim serijama, posebno kod sinteze u više koraka. U serijskoj proizvodnji,

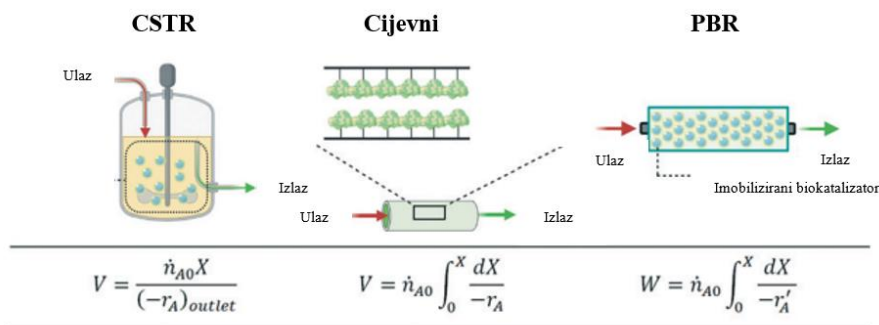
vrijeme potrebno za odvodnju, čišćenje i prijenos iz posude u posudu je dugo, čineći cijeli proces neučinkovitim. [23]

### 2.5.2. Upotreba

Sustavi s kontinuiranim protokom aktivnije se koriste u industriji od početka 20. stoljeća. Za razliku od proizvodnje velikih količina kemikalija, uključujući ugljikovodike, gnojiva, sintetička vlakna, papir, otpadnu vodu, čelik i metan, kontinuirana proizvodnja finih kemikalija je relativno nova. Nedavna istraživanja unaprijedila su kontinuiranu sintezu aktivnih farmaceutskih sastojaka (eng. *Active pharmaceutical ingredients*, API), kemikalija s dodanom vrijednošću, modernih agrokemikalija i materijala za hvatanje, skladištenje i elektroniku vodika. [30] Stotinama godina kemičari su rješavali te izazove izvedeći reakcije u tikvicama s okruglim dnom; pristup često pogodan za mnoštvo sinteza. Međutim, uz značajan napredak u laboratorijskoj tehnologiji, kemija ima priliku postati učinkovitija, sigurnija i automatizirana. Prevođenje reakcija u sustave kontinuiranog protoka pomaže istraživačima u ostvarivanju ove vizije. Kemija kontinuiranog toka nastavlja napredovati u akademskim i industrijskim laboratorijima potaknuta učinkovitim i inovativnim sintezama. [31]

### 2.5.3. Tipovi reaktora

Reaktori s kontinuiranim protokom mogu se postaviti u različitim izvedbama, a tri glavna tipa su: reaktor s kontinuiranim spremnikom s miješanjem (engl. *Continuous stirred tank reactor*, CSTR), cijevni reaktor i reaktor s pakiranim slojem katalizatora (engl. *Packed bed reactor*, PBR) (**Slika 12.**).



**Slika 12.** Osnovni tipovi kontinuiranih reaktora. [23]

CSTR je definiran kao spremnik koji se kontinuirano miješa, a reaktanti se kontinuirano dodaju i iz njega odvođe. Cijevni reaktor je definiran kao reaktor u obliku cijevi, gdje reaktanti ulaze na jednom kraju, a produkti izlaze na drugom kraju cijevi. Biokatalizatori se mogu nanijeti na stijenke cijevi ili u cijev. PBR je definiran kao reaktor ili posuda koja je često napunjena krutim česticama biokatalizatora. Reaktanti protječu kroz prazne prostore između pakiranih čestica. [23]

Reaktori s kontinuiranim protokom zahtijevaju određeno vrijeme za prijelazno razdoblje do pokretanja reakcije, nakon čega se uspostavlja stacionarno stanje. U stacionarnom stanju, koncentracije tvari na izlazu iz reaktora ostaju konstantne u različitim vremenskim intervalima. CSTR se često modelira s potpunim miješanjem, što rezultira prostorno ujednačenim koncentracijama unutar reaktora. Koncentracije su također iste kao i one na izlazu iz reaktora. CSTR reaktori se široko koriste u industriji zbog svog jednostavnog rada. Idealan model cijevnog reaktora je protočni reaktor (eng. *Plug flow reactor*) u kojem su linearne brzine identične po presjeku cijevi. [23]

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Aparatura

##### Analitička vaga

Analitička vaga *Shimadzu* je korištena za vaganje uzoraka (**Slika 13.**).



**Slika 13.** Analitička vaga *Shimadzu*.

##### Spektrofotometar

Za analizu spektra elektromagnetskog zračenja koristi se spektrofotometar, koji mjeri apsorpciju kao funkciju valne duljine svjetlosti. Ovaj instrument mjeri propušteno zračenje, odnosno intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak ( $I$ ) i uspoređuje ga sa intenzitetom ulaznog svjetla ( $I_0$ ). Iz Lambert-Beer-ovog zakona (1) slijedi da je intenzitet apsorbiranog zračenja proporcionalan koncentraciji tvari koja se određuje:

$$ABS = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

$ABS$  je apsorpcija pri određenoj valnoj duljini svjetlosti,  $b$  duljina puta svjetlosti kroz uzorak [cm],  $c$  koncentracija tvari u otopini [ $\text{mol}/\text{dm}^3$ ] i  $\varepsilon$  molarni apsorpcijski koeficijent [ $\text{dm}^3/\text{mol cm}$ ] karakterističan za svaku molekulsku vrstu i ovisan o valnoj duljini svjetlosti. [32]



Osnovni dijelovi spektrofotometra su: 1.izvor zračenja, 2.disperzni element (monokromator), 3.spremnik za uzorke, 4.detektor zračenja i pretvornik, 5.procesor signala i uređaj za njegova očitavanja.

Za mjerenje aktivnosti i stabilnosti enzima DERA u ovome radu korišten je spektrofotometar *Shimadzu UV-1800* (Slika 14.).



Slika 14. Spektrofotometar *Shimadzu UV-1800*.

#### Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC uređaj)

HPLC (engl. *High-performance liquid chromatography*) uređaj sastoji se od nekoliko dijelova: pumpe za isporuku otapala, jedinice za otplinjavanje, injektora uzoraka, kolone, detektora te računala za obradu podataka. Tehnika kromatografije se zasniva na kretanju komponenti različitim brzinama kroz stacionarnu fazu praćenih mobilnom fazom te se na taj način one razdvajaju. Stacionarna faza nalazi se u koloni, punjenoj krutinom, gelom ili poroznim česticama. Za mobilnu fazu obično se koriste dva otapala (voda i organsko otapalo). Kao detektori najčešće se koriste spektrofotometar, UV-detektor, fluorescentni detektor, detektor indeksa loma te maseni detektor. Kao rezultat kromatografije dobiva se kromatogram, krivulja koja prikazuje ovisnost koncentracije analita o vremenu eluiranja. [33] U ovom radu korišten je *Shimadzu* HPLC uređaj (Slika 15.) sa *Phenomenex Kinetex RP* kolonom (C18, 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, 100 Å) i UV detektorom. Eluenti koji su korišteni su 0,1 %-tna trifluorocetna kiselina (TFA) otopljena u vodi i 0,1 %-tna TFA u otopini ACN-a/vode u omjeru 80 % /20 %. U HPLC uređaju analizirani su uzorci reaktanata i produkata reakcije aldole adicije acetaldehida i kloroacetaldehida katalizirane enzimom DERA.



**Slika 15.** HPLC uređaj.

Aparatura za homogenizaciju: homogenizator (**Slika 16a**), termostatska tresilica (**Slika 16b**) i magnetska miješalica (**Slika 16c**)



**a)**



**b)**



**c)**

**Slika 16.** a) homogenizator, b) termostatska tresilica i c) magnetska miješalica.

## Peć za žarenje

Za žarenje uzoraka korištena je peć *Nabertherm* (Slika 17.).



**Slika 17.** Peć za žarenje *Nabertherm*.

## Centrifuga

Centrifuga *Hettich Universal 320R* (Slika 18.) je korištena za separaciju uzoraka.



**Slika 18.** Centrifuga *Hettich Universal 320R*.

## Pumpa

Za transport smjese aldehida korištena je pumpa *Harvard PHD 4400 Hpsi* (Slika 19).



**Slika 19.** Pumpa *Harvard PHD 4400 Hpsi*.

## BET (Brunauer, Emmet i Teller) fiziosorpcija

Uzorak MCF mezoporožne silike analiziran je BET metodom te su dobivene vrijednosti specifične površine, specifičnog volumena pora te veličina pora. Na **Slici 20.** prikazana je aparatura za BET fiziosorpciju.



**Slika 20.** Aparatura za BET fiziosorpciju.

### Skenirajući elektronski mikroskop (SEM)

Za karakterizaciju čestica MCF mezoporozne silike korišten je SEM uređaj (**Slika 21.**). Dobiven je 2D slikoviti prikaz te određene informacije o morfologiji čestica.



**Slika 21.** Skenirajući elektronski mikroskop.

### 3D-pisač

Za izradu reaktora korišten je 3D-pisač *Original Prusa i3 MK3S+* (**Slika 22.**). Reaktori volumena 300 i 600  $\mu\text{L}$  izrađeni su metodom proizvodnje rastaljenim filamentom (engl. *Fused filament fabrication*, FFF).



**Slika 22.** 3D-pisač.

### 3.2. Sinteza MCF mezoporožne silike

Mezoporožna silika je sintetizirana tako da je prvo 2 g Pluronic-a 123 otopljeno u 75 mL HCl-a (1,6 M) pri sobnoj temperaturi na magnetskoj miješalici. Zatim je dodano 5 g trimetilbenzen-a (TMB) i amonijev fluorid (NH<sub>4</sub>F), 46 mg/300 µL. NH<sub>4</sub>F povećava kanale koji povezuju pore bez utjecaja na samu veličinu pora. Nakon 45 min miješanja pri 40 °C i 250 o/min dodano je 6 g tetraetoksisilan-a (TEOS). Otopina je potom uz daljnje miješanje držana 20 h na 40 °C. Nakon 20 h zamućena smjesa je ostavljena 24 h u teflonskom reaktoru u peći na 120 °C bez miješanja. Nakon toga talog se isfiltrirao, smjesa se centrifugirala 5 min, isprala ultračistom vodom te sušila na zraku. Zatim je slijedilo žarenje na zraku: 4 h do 500 °C i 6 h na 500 °C.

### 3.3. Funkcionalizacija i aktivacija nosioca i imobilizacija enzima

Čestice mezoporožne silike funkcionalizirane su na 30 °C i 160 o/min kroz 24 h u inertnoj atmosferi argona, uz dodatak 50 mL etanola i 3 mL (3-aminopropil) trietoksisilana (APTMS). Suspenzija je miješana 24 h na 30 °C brzinom 160 o/min u inertnoj atmosferi dušika.

Aktivacija se provodila dodatkom 0,130 g 10% v/v sukcinog anhidrida na 35 mg nosioca u 1 mL dimetilformamida (DMF). Suspenzija je miješana tijekom 2 h na sobnoj temperaturi u inertnoj atmosferi. Nosioc je centrifugiran i ispran pet puta fosfatnim puferom (pH=6) kako bi se uklonio neizreagirani anhidrid.

Nakon funkcionalizacije i aktivacije napravljena je imobilizacija miješanjem enzima i nosioca. Aktiviranom nosiocu dodano je 150 µL otopine enzima koncentracije 6 mg/mL i 850 µL fosfatnog pufera (pH=6). Imobilizacija je provedena kroz 1,5 h na termostatskoj tresilici pri 900 o/min i temperaturi 30 °C. Metodom po Bradfordu je određena koncentracija enzima u temeljnoj otopini i u otopini enzima nakon provedene imobilizacije.

### 3.4. Određivanje skladišne stabilnosti

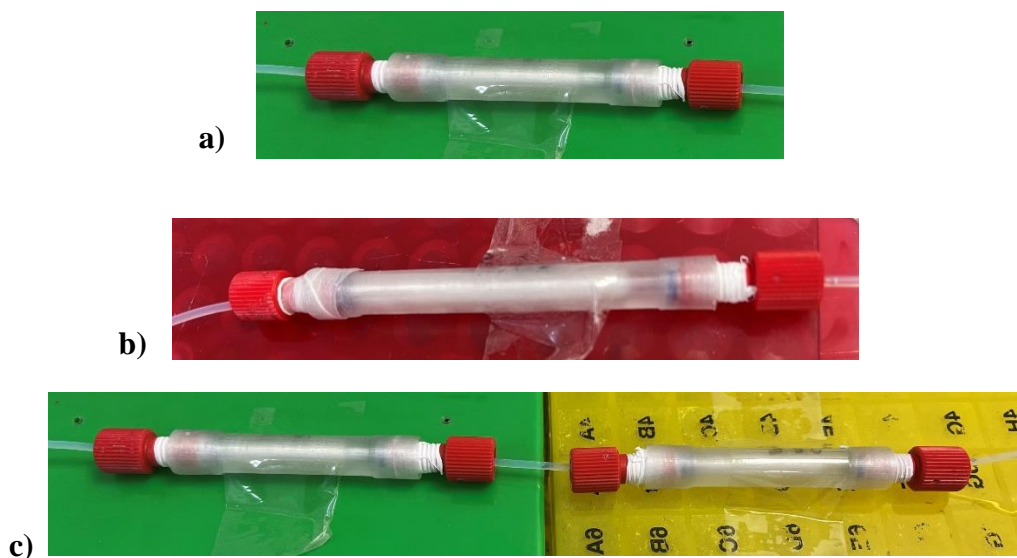
Nakon provedene aktivacije nosioca i imobilizacije enzima, imobilizirani enzim skladišten je na 4°C. Kroz 10 dana ispitivana je aktivnost skladištenog enzima u reakciji AA i CAA. Stabilnost enzima DERA izražena je kao relativna aktivnost nakon inkubacije:

$$\text{relativna aktivnost enzima} = \frac{\text{aktivnost enzima nakon inkubacije}}{\text{aktivnost enzima prije inkubacije}} \times 100 (\%).$$

### 3.5. Provedba reakcije u različitim tipovima reaktora

Sinteza statina imobiliziranim enzimom DERA provedena je u kontinuiranim reaktorima volumena: 300, 600 i 2 x 300  $\mu\text{L}$  (**Slika 23.**). Masa mezoporozne silike u reaktoru volumena 300  $\mu\text{L}$  je 35 mg, a u reaktoru volumena 600  $\mu\text{L}$  dva puta veća, odnosno 70 mg. Masa imobiliziranog enzima na mezoporoznoj silici je 0,8 mg u manjem i 1,6 mg u većem reaktoru. U serijski spojenim reaktorima volumena 300  $\mu\text{L}$ , masa mezoporozne silike je 2 x 35 mg, odnosno ukupno 70 mg. Masa imobiliziranog enzima je 2 x 0,8 mg, odnosno 1,6 mg.

Proces je proveden na način da se klipnom pumpom pri različitim protocima u reaktor uvodila ulazna otopina reaktanata ( $c_{AA} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{CAA} = 50 \text{ mM}$ , 0,1 M fosfatni pufer pH = 6) pri sobnoj temperaturi.



**Slika 23.** Kontinuirani reaktori; **a)**  $V = 300 \mu\text{L}$ , **b)**  $V = 600 \mu\text{L}$ , **c)**  $V = 2 \times 300 \mu\text{L}$ .

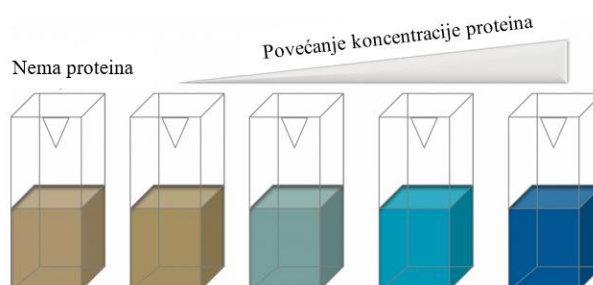


Radi usporedbe i određivanja parametara uspješnosti u pojedinom tipu reaktora, reakcija se provodila pri različitim protocima. U reaktoru  $V = 300 \mu\text{L}$ , reakcija se provodila pri protocima 2, 5 i  $7 \mu\text{L}/\text{min}$ , a u reaktoru  $V = 600 \mu\text{L}$  i serijski spojenim reaktorima  $V = 2 \times 300 \mu\text{L}$  pri protocima 2 i  $5 \mu\text{L}/\text{min}$ .

### 3.6. Analitičke metode

#### 3.6.1. Određivanje koncentracije enzima metodom po Bradfordu

Ukupna koncentracija enzima u otopini određivala se u svrhu provjere učinkovitosti imobilizacije, a korištena je metoda po Bradfordu. Ova metoda se temelji na reakciji proteina u kiselom mediju s bojilom *Coomassie Brilliant Blue* koje mijenja boju otopine iz smeđe-zelene u modru u prisutnosti proteina (**Slika 24.**). Ova reakcija promjene boje ovisi o aminokiselinskom sastavu izmjerenih proteina, s maksimumom apsorbancije koji se kreće od 465 do 595 nm. Postoje tri oblika *Coomassie Brilliant Blue* boje: anionska (plava), neutralna (zelena) i kationska (crvena). [34]



**Slika 24.** Promjena boje reagensa iz smeđe u modru s povećanjem koncentracije proteina. [35]

Intenzitet modre boje je proporcionalan koncentraciji proteina koja se zatim može točno izračunati korištenjem spektrofotometra. Iz ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina dobiva se baždarni dijagram (**Prilog 1.**) potreban za izračun koncentracije proteina u uzorcima koji sadrže nepoznatu koncentraciju proteina. Koncentracija proteina određena je u otopini čistog enzima i otopini nakon imobilizacije enzima na nosioc. Testovi se provode na sobnoj temperaturi i kompatibilni su s većinom otapala, soli i pufera.



### 3.6.2. *Određivanje aktivnosti enzima DERA*

Aktivnost enzima računa se preko promjene koncentracije produkta 6-kloro-3,5-dihidroksi heksanala te međuprodukta 4-kloro-3-hidroksibutanala s vremenom.

### 3.6.3. *Određivanje koncentracije reaktanata i produkata reakcije pomoću HPLC uređaja*

Uzorci su se uzimali iz reaktora u odgovarajućim vremenskim intervalima. 5 µL uzorka dodano je u 50 µL derivatizacijske otopine te je stavljeno na tresilicu pri 900 o/min i 30 °C 20 min. Nakon 20 min dodano je 350 µL metanola te su uzorci stavljeni na centrifugu 5 min pri 14000 o/min i 4 °C. Zatim se provodila analiza uzoraka na HPLC uređaju na koloni *Phenomenex Kinetex RP* (C18, 5 µm, 250 x 4,6 mm, 100 Å) u trajanju od 18 min pri 30°C i valnoj duljini od 215 nm. Eluenti koji su korišteni su 0,1 %-tna trifluoroctena kiselina (TFA) otopljena u vodi i 0,1 %-tna TFA u otopini ACN-a/vode u omjeru 80 %/20 %. Protok mobilne faze iznosio je 1,5 mL/min.

Iz dobivenog kromatograma identificirane su komponente u otopini na temelju retencijskih vremena. Nepoznata koncentracija kloroacetaldehida i acetaldehida izračunava se iz površine ispod odgovarajućega pika i baždarnog pravca za kloroacetaldehid odnosno acetaldehid (**Prilog 2. i 3.**).

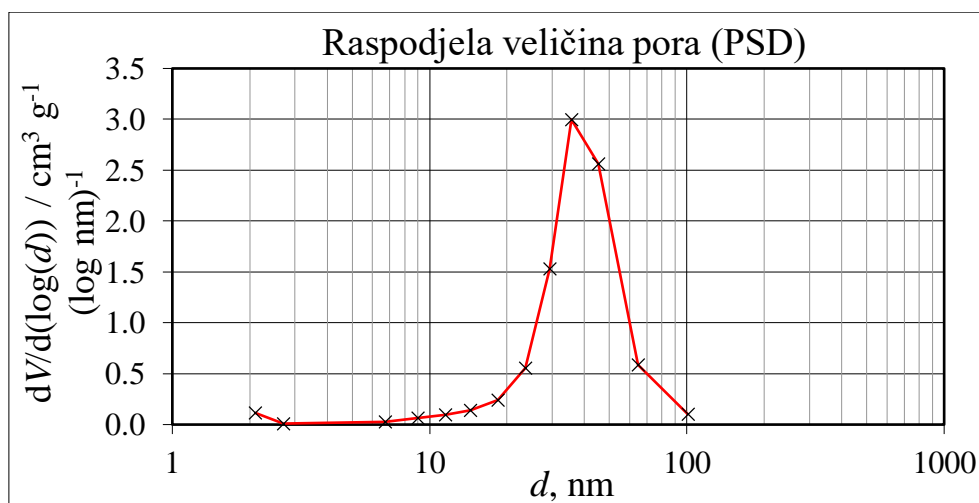
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Sinteza i karakterizacija mezoporozne silike

Kao nosioc za imobilizaciju sintetizirana je mezoporozna silika sol-gel metodom prema proceduri opisanom u poglavlju 3.2. Korištenjem ove procedure ukupno je dobiveno 1,2 g mezoporozne silike te je provedena karakterizacija iste BET analizom i SEM -om.

#### 4.1.1. BET analiza

Prema rezultatima BET analize ispostavilo se da su čestice sintetizirane za promjer pora 20 nm, imaju srednji promjer pora 20 nm, dok je najveći broj čestica s promjerom pora od 35,5 nm (Slika 25.). Ostali podaci dobiveni ovom analizom prikazani su u **Tablici 4**.



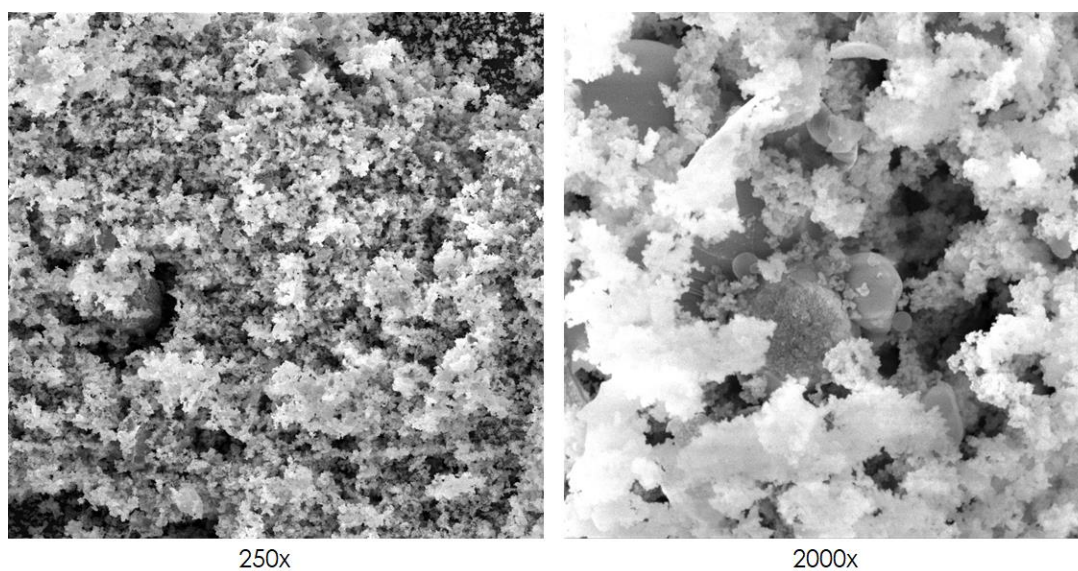
Slika 25. Rezultati BET fiziosorpcije za proizvedene čestice mezoporozne silike 20 nm.

**Tablica 4.** Rezultati BET fiziosorpcije za proizvedene čestice mezoporozne silike 20 nm.

$S_{\text{BET}} / \text{m}^2 \text{g}^{-1}$	216,0	Specifična površina
$V_{\text{pora}} / \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	1,05986	Volumen pora
$V_{\text{mikropora}} / \text{cm}^3 \text{g}^{-1}$	0,00856	Volumen mikropora (< 2 nm)
$d_{\text{srednji}} / \text{nm}$	20,0	Srednji promjer pora

#### 4.1.2. SEM karakterizacija

SEM karakterizacijom čestica MCF silike pri povećanju od 250 i 2000 puta može se jasno uočiti pjenasta struktura MCF silike. (Slika 26.).



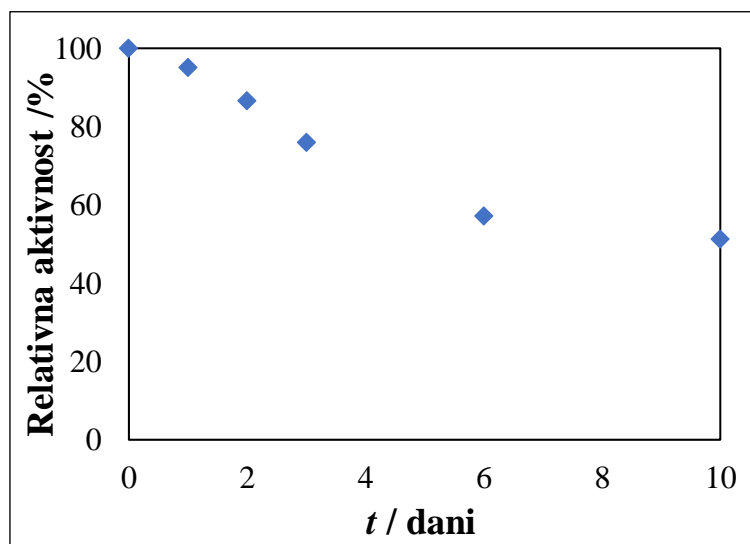
**Slika 26.** SEM slika MCF silike pri povećanju od 250 i 2000 puta.

#### 4.2. Skladišna stabilnost imobiliziranog enzima

Sintetizirana mezoporozna silika je u svrhu dobivanja pogodnog nosioca za kovalentnu imobilizaciju enzima funkcionalizirana APTMS-om i aktivirana sukcinjskim anhidridom. Na taj način na nosiocu su dobivene aktivne grupe koje se kovalentno vežu za amino skupinu enzima. Prije i poslije postupka imobilizacije izmjerila se koncentracija proteina u otopini enzima metodom po Bradfordu. Koncentracija proteina izmjerena ovom metodom je direktno

proporcionalna koncentraciji enzima. Na temelju mjerenja koncentracije proteina prije i poslije imobilizacije izračunato je iskorištenje koje je iznosilo 83 %. Na temelju toga je izračunata masa enzima po gramu nosioca koja je iznosila 22,9 mg/g nosioca.

Skladišna stabilnost je podatak koji nam govori koliko dugo možemo čuvati enzim pri određenim uvjetima, a da ne izgubi značajno svoju aktivnost. U radu je izmjerena skladišna stabilnost enzima pri 4 °C.



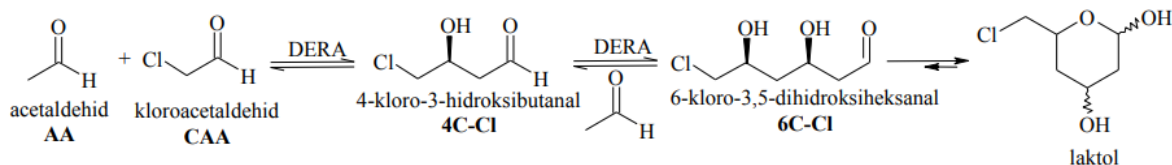
**Slika 27.** Relativna aktivnost imobiliziranog enzima DERA u ovisnosti o vremenu inkubacije ( $T = 4^{\circ}\text{C}$ ).

Nakon jednog dana inkubacije relativna aktivnost enzima pada na 95,16 %. Na **Slici 27.** vidljiv je daljnji kontinuirani pad relativne aktivnosti nakon 2. i 3. dana. U 6. i 10. danu vrijednosti su prilično bliske, a zadržano je više od 50 % relativne aktivnosti. Navedeno upućuje da se imobilizirani enzim mora koristiti u roku od 24 h kako bi ostvario najbolje rezultate obzirom da dužim čuvanjem njegova aktivnost značajno opada. U budućnosti bi svakako trebalo provjeriti i skladišnu stabilnost enzima na nižim temperaturama ( $-18^{\circ}\text{C}$ ).

### 4.3. Provedba procesa u reaktoru

U reaktoru se odvija reakcija dvostruke aldolne adicije katalizirane enzimom DERA. Adicijom jedne molekule acetaldehida na kloroacetaldehid nastaje međuprodukt 4-kloro-3-

hidroksibutanal (4C-Cl), a adicijom druge molekule acetaldehida nastaje 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal (6C-Cl), koji ciklizacijom prelazi u stabilniji oblik (**Slika 28.**).



**Slika 28.** Shema dvostruke aldolne adicije katalizirane enzimom DERA.

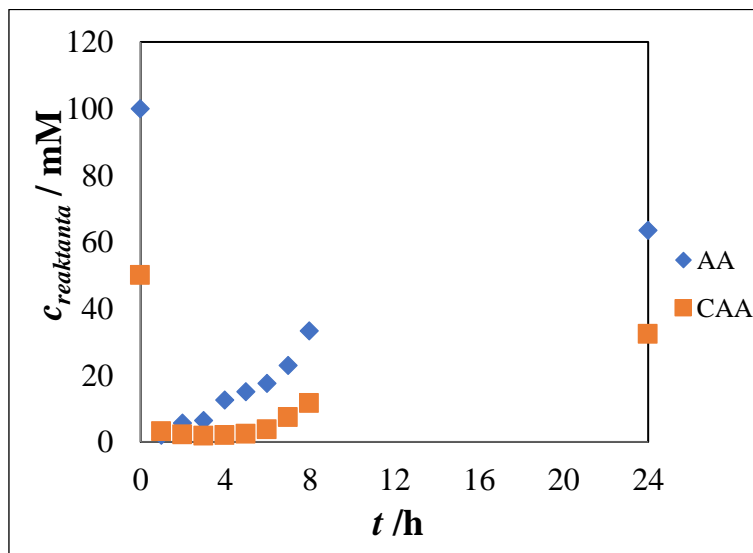
Dobiveni produkt je laktol sa 2 kiralna centra, koji predstavlja važan prekursor za sintezu široko korištenih lijekova za snižavanje kolesterola, poput atorvastatina. [36]

#### 4.3.1. Kontinuirani reaktor $V=300 \mu\text{L}$

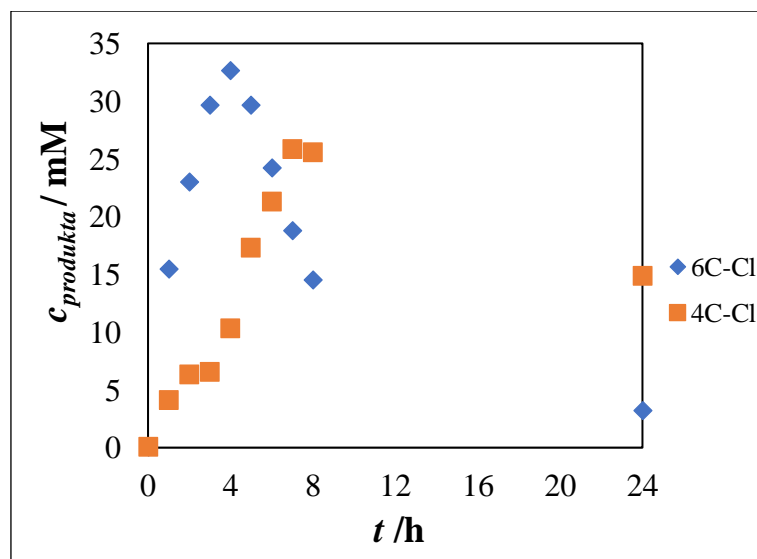
U kontinuiranom reaktoru  $V = 300 \mu\text{L}$  prikazanom na **Slici 23a** provedena su tri eksperimenta pri protocima ulazne otopine acetaldehida i kloroacetaldehida od 2, 5 i 7  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Radni volumen kontinuiranog reaktora je mjereno tako da je reaktor s enzimom izvagan prije pokretanja reakcije te ponovno nakon reakcije, kada je zapunjen s otopinom iz pumpe, te je iznosio 87  $\mu\text{L}$ . Sukladno tome postignuta su tri različita vremena zadržavanja od 43,5; 17,4 i 12,4 min. U ovom reaktoru bilo je moguće upakirati 35 mg mezoporozne silike. Obzirom da je prethodno dobiveno da masa enzima po gramu nosioca iznosi 22,9 mg/g nosioca navedeno upućuje da je u reaktoru bilo ukupno 0,8 mg enzima, odnosno da njegova koncentracija iznosi 9,2 mg/mL.

Na **Slikama 29.** i **30.** prikazane su promjene koncentracije reaktanata i produkata s vremenom u kontinuiranom reaktoru pri protoku od 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ , te vremenu zadržavanja od 43,5 min. Na **Slici 29.** vidljivo je naglo smanjenje koncentracije reaktanata, nakon čega slijedi povećanje uslijed deaktivacije enzima. Također može se vidjeti da koncentracija AA prije počinje rasti od koncentracije CAA. Razlog navedenom je što se sinteza laktola odvija u dva stupnja (**Slika 28.**). U prvom stupnju nastaje međuprodukt za koji se troši jedna molekula AA i jedna molekula CAA. Potom međuprodukt reagira s još jednom molekulom AA pri čemu nastaje konačni produkt 6C-Cl. Pretpostavka je da su za ove dvije reakcije odgovorna dva aktivna mjesta na enzimu DERA. Obzirom da se CAA jednoliko troši može se zaključiti da je

aktivno mjesto za proizvodnju međuprodukta stabilnije od aktivnog mjesta za drugu reakciju. Navedeno se vidi i na **Slici 30.** gdje je vidljivo da koncentracija 6C-Cl počinje ranije padati (nakon 4 h) od koncentracije 4C-Cl koja raste do 7 h. Maksimalna koncentracija produkta koja je dobivena iznosi 32,61 mM.

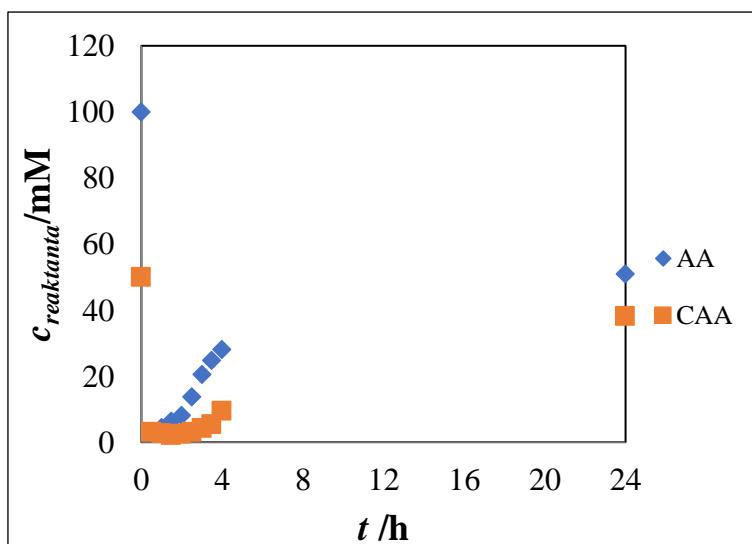


**Slika 29.** Promjena koncentracije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 300 \mu\text{L}$  pri protoku  $2 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 43,5 \text{ min}$ ,  $c_{AA} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{CAA} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

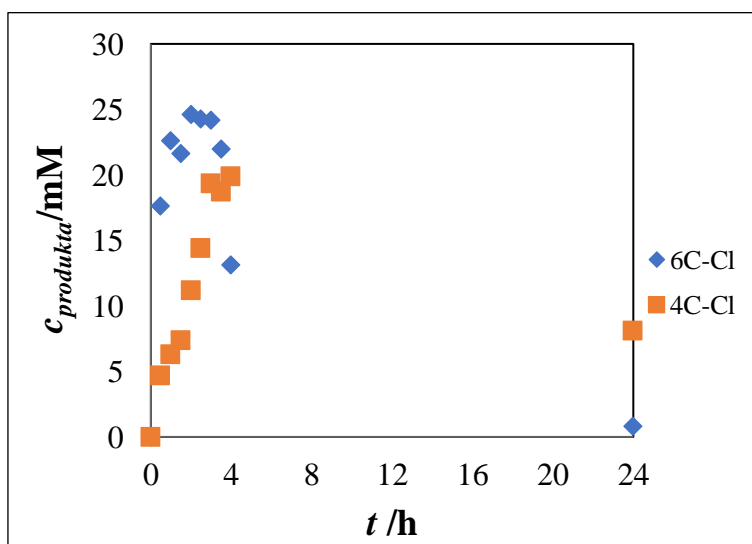


**Slika 30.** Promjena koncentracije međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 300 \mu\text{L}$  pri protoku  $2 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 43,5 \text{ min}$ ,  $c_{AA} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{CAA} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Provedbom procesa u ovom reaktoru pri većem protoku od 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  je smanjeno vrijeme zadržavanja na 17,4 min. Navedeno je rezultiralo s manjom maksimalnom koncentracijom produkta od 24,63 mM (Slika 32.). Također koncentracije reaktanata (Slika 31.), počinju značajno brže rasti nego što je to bio slučaj pri manjem protoku (Slika 29.). Navedenom može biti uzrok i veća brzina deaktivacije enzima zbog smičnih sila uzrokovanih većim protocima.

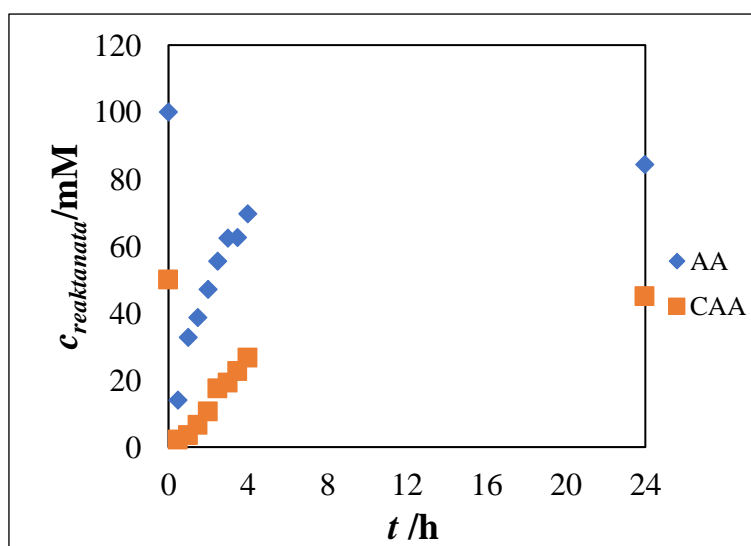


**Slika 31.** Promjena koncentracije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 300 \mu\text{L}$  pri protoku  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 17,4 \text{ min}$ ,  $c_{AA} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{CAA} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

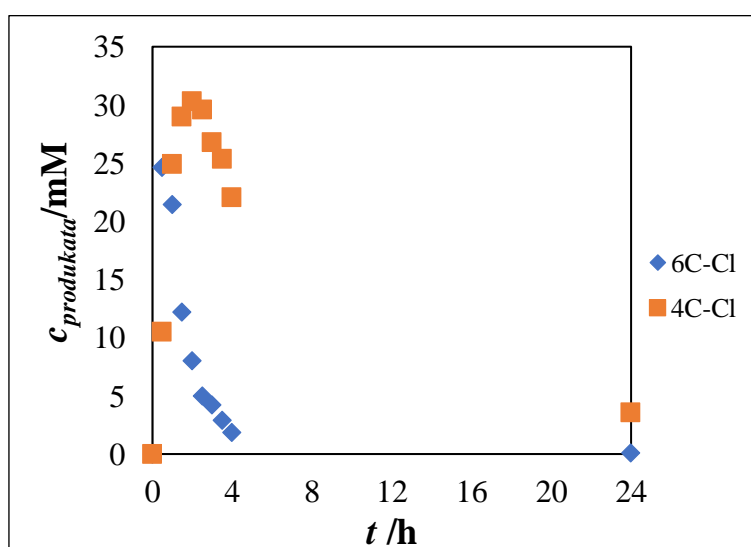


**Slika 32.** Promjena koncentracije međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 300 \mu\text{L}$  pri protoku  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 17,4 \text{ min}$ ,  $c_{AA} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{CAA} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Treći eksperiment je proveden pri protoku  $7 \mu\text{L}/\text{min}$  te je na **Slici 33.** vidljiva značajna razlika u koncentraciji AA i CAA u odnosu na prethodna dva slučaja. S obzirom na malo vrijeme zadržavanja, koncentracije reaktanata počinju brzo rasti već na početku reakcije. Pretpostavlja se da je došlo do brze deaktivacije enzima uslijed velikog protoka. Maksimalna koncentracija produkta iznosila je  $24,66 \text{ mM}$  nakon  $0,5 \text{ h}$ , a zatim opada i manja je od koncentracije međuprodukta (**Slika 34.**).



**Slika 33.** Promjena koncentracije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 300 \mu\text{L}$  pri protoku  $7 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 12,4 \text{ min}$ ,  $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{CAA}} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



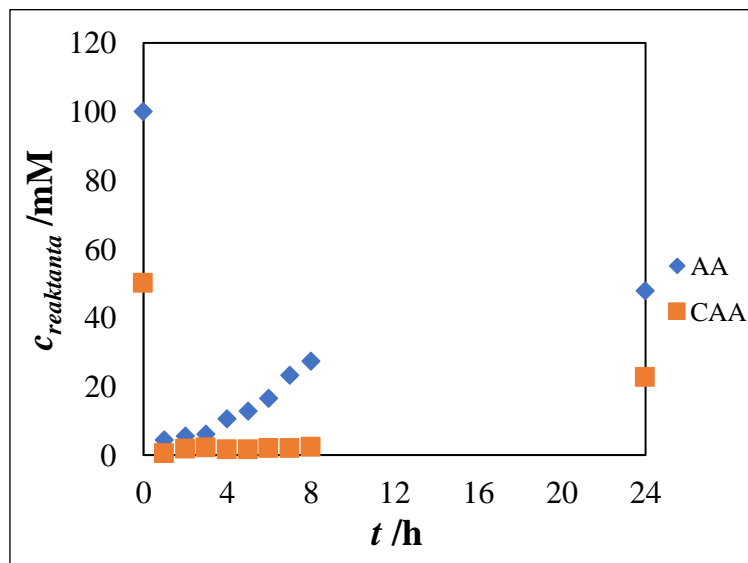
**Slika 34.** Promjena koncentracije međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 300 \mu\text{L}$  pri protoku  $7 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 12,4 \text{ min}$ ,  $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{CAA}} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



#### 4.3.2. Kontinuirani reaktor $V=600 \mu\text{L}$

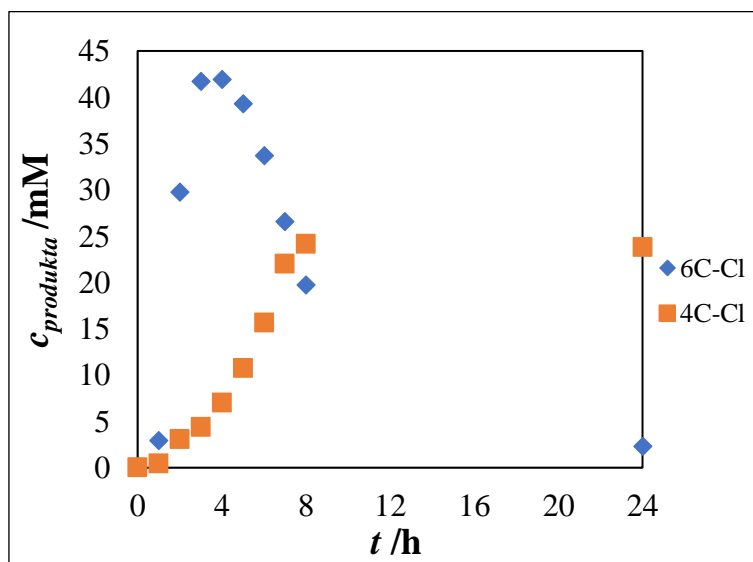
U kontinuiranom reaktoru  $V = 600 \mu\text{L}$  prikazanom na **Slici 23b** provedena su dva eksperimenta pri protocima ulazne otopine acetaldehida i kloroacetaldehida od 2 i 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Izmjereni radni volumen ovog reaktora je iznosio 174  $\mu\text{L}$ , te su obzirom na namještene protoke postignuta dva vremena zadržavanja od 87 i 34,8 min. U ovom reaktoru bilo je moguće upakirati 70 mg mezoporozne silike. Obzirom da je masa enzima po gramu nosioca iznosila 22,9 mg/g nosioca, u reaktoru je bilo ukupno 1,6 mg enzima, odnosno njegova koncentracija je iznosila 9,2 mg/mL, te je istovjetna onoj u reaktoru manjeg volumena.

U reaktoru većeg volumena pri protoku od 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  postignuta je maksimalna koncentracija produkta u iznosu 41,91 mM, što je znatno veće u odnosu na manji reaktor istog protoka (**Slika 36.**). Povećanjem volumena reaktora povećava se vrijeme zadržavanja, što znači da su molekule reaktanta duže vrijeme u kontaktu i imaju više vremena za pretvorbu u željeni produkt. Na **Slici 35.** vidljivo je naglo smanjenje koncentracije reaktanta, nakon čega koncentracija acetaldehida počinje rasti, dok se kloroacetaldehid jednoliko troši kroz duži period.



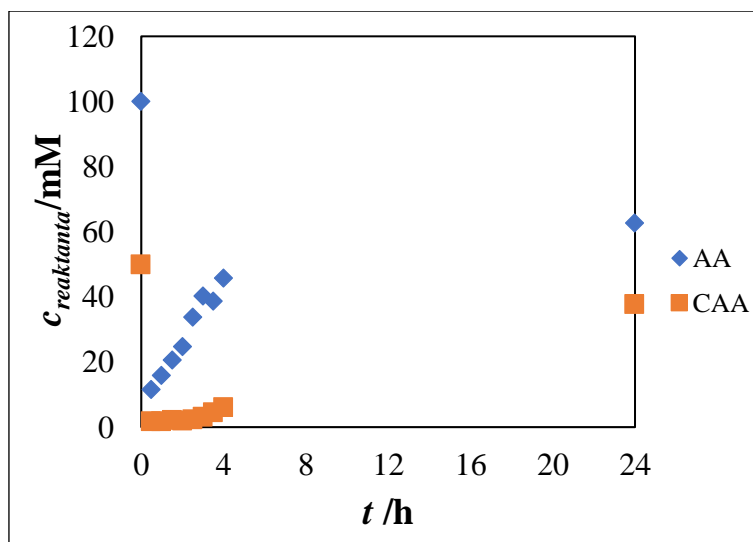
**Slika 35.** Promjena koncentracije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 600 \mu\text{L}$  pri protoku 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 87 \text{ min}$ ,  $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{CAA}} = 50 \text{ mM}$ , 0,1 M fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Na **Slici 36.** se može vidjeti da koncentracija međuprodukta raste s vremenom, dok koncentracija produkta počinje opadati nakon 4 h uslijed deaktivacije enzima. Navedeno kao i u prethodnim eksperimentima upućuje da je aktivno mjesto za stvaranje međuprodukta znatno stabilnije.

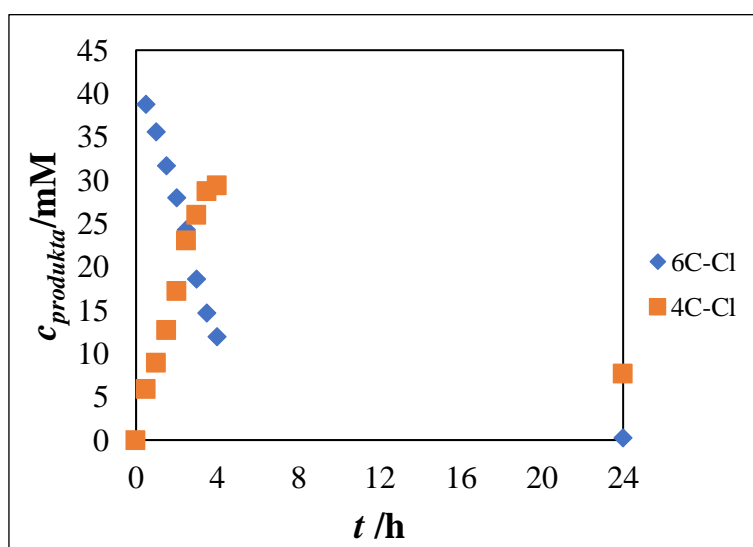


**Slika 36.** Promjena koncentracije međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 600 \mu\text{L}$  pri protoku  $2 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 87 \text{ min}$ ,  $c_{AA} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{CAA} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

U eksperimentu provedenom pri protoku od  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  na **Slici 38.** vidljiva je promjena u odnosu na ostale reakcije jer je maksimalna koncentracija produkta postignuta brže i to već nakon  $0,5 \text{ h}$  i iznosi  $38,80 \text{ mM}$ . Ako se usporedi ovaj reaktor s reaktorom manjeg volumena pri vremenu zadržavanja od  $43,5 \text{ min}$  gdje je postignuta maksimalna koncentracija produkta od  $32,61 \text{ mM}$  (**Slika 30.**), može se zaključiti da su dužina reaktora i veći volumen pozitivno utjecali na procesne pokazatelje. Također može se uočiti da koncentracija međuprodukta raste s vremenom, ali na kraju značajno opada. S obzirom na manje vrijeme zadržavanje nego pri  $2 \mu\text{L}/\text{min}$ , pretpostavlja se da je došlo do deaktivacije oba aktivna mjesta na enzimu. Navedeno se može uočiti i na **Slici 37.**, gdje se vidi brzi porast koncentracije AA s vremenom, dok se CAA jednoliko troši za stvaranje međuprodukta, ali njegova koncentracija nakon  $24 \text{ h}$  opet raste.



**Slika 37.** Promjena koncentracije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 600 \mu\text{L}$  pri protoku  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 34.8 \text{ min}$ ,  $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{CAA}} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



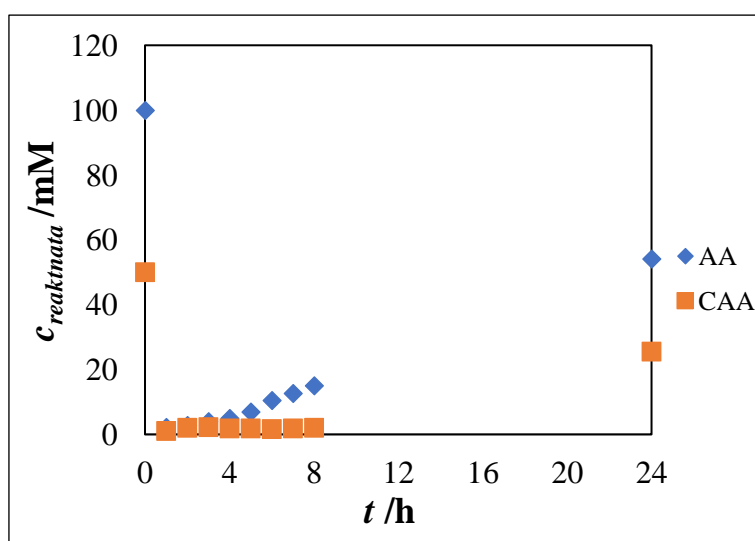
**Slika 38.** Promjena koncentracije međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u kontinuiranom reaktoru  $V = 600 \mu\text{L}$  pri protoku  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 34.8 \text{ min}$ ,  $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{CAA}} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### 4.3.3. Kontinuirani reaktor $V=2 \times 300 \mu\text{L}$

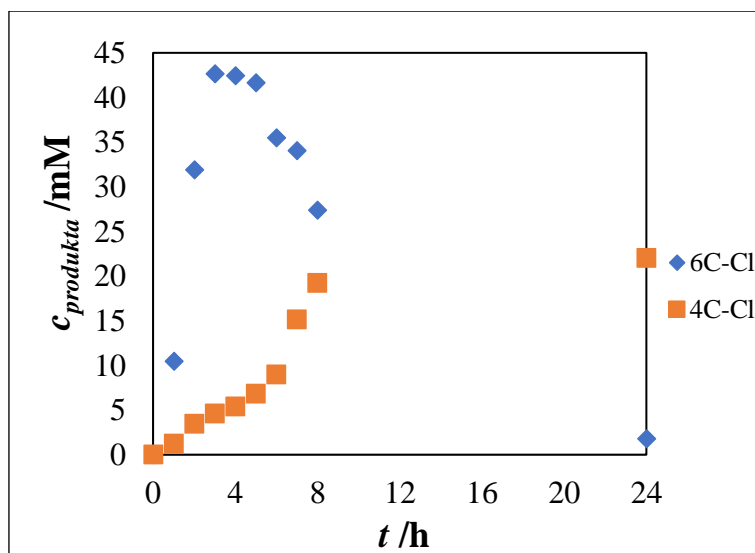
U serijski spojenim kontinuiranim reaktorima  $V = 2 \times 300 \mu\text{L}$  prikazanim na **Slici 23c** provedena su dva eksperimenta pri protocima ulazne otopine acetaldehida i kloroacetaldehida od  $2$  i  $5 \mu\text{L}/\text{min}$ . Izmjereni radni volumen svakog pojedinog reaktora je iznosio  $87 \mu\text{L}$ , te je

ukupni volumen oba reaktora iznosio 174  $\mu\text{L}$ . Obzirom na namještene protoke postignuta su dva vremena zadržavanja od 87 i 34,8 min. U svakom reaktoru bilo je moguće upakirati 35 mg mezoporozne silike, odnosno ukupno 70 mg. Obzirom da je masa enzima po gramu nosioca iznosila 22,9 mg/g nosioca, u reaktoru ju bilo ukupno 1,6 mg enzima, odnosno njegova koncentracija je iznosila 9,2 mg/mL, kao i u prethodna dva ispitivana reaktora.

U serijski spojenim reaktorima pri protoku od 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  dobiveni su otprilike jednaki rezultati (**Slike 39. i 40.**) kao i u reaktoru volumena 600  $\mu\text{L}$  pri istom protoku (**Slike 35. i 36.**). Navedeno je i očekivano obzirom da se radi o istom vremenu zadržavanja, te istoj koncentraciji enzima. Naime serijskim spajanjem reaktora se željelo ispitati da li će određena promjena konstrukcije značajno utjecati na rezultate, ali kao što se vidi pri ovom protoku odnosno vremenu zadržavanja to nije bio slučaj. U ovom eksperimentu postignuta je maksimalna koncentracija produkta u iznosu 42,65 mM, a u istom eksperimentu s jednim reaktorom ona je iznosila 41,91 mM.

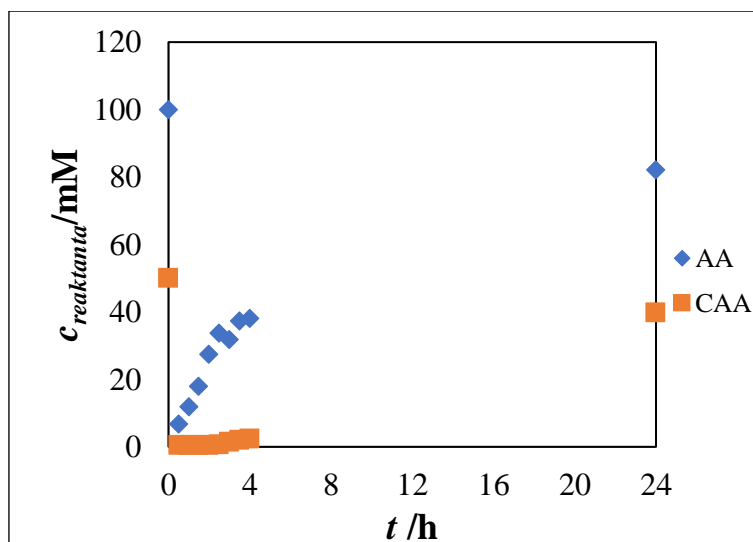


**Slika 39.** Promjena koncentracije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u serijski spojenim kontinuiranim reaktorima  $V = 2 \times 300 \mu\text{L}$  pri protoku 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 87 \text{ min}$ ,  $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{CAA}} = 50 \text{ mM}$ , 0,1 M fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

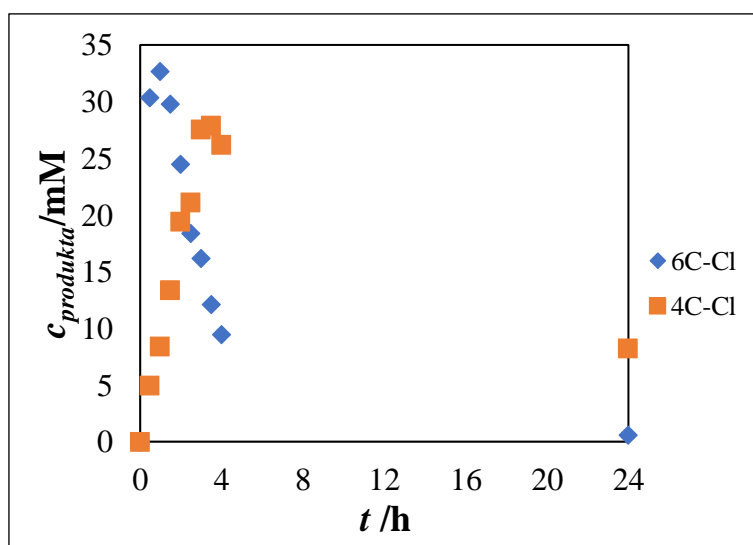


**Slika 40.** Promjena koncentracije međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe aldolne adicije u serijski spojenim kontinuiranim reaktorima  $V = 2 \times 300 \mu\text{L}$  pri protoku  $2 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 87 \text{ min}$ ,  $c_{AA} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{CAA} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Pri većem protoku od  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  u serijski spojenim reaktorima ukoliko gledamo dobivene rezultate (**Slike 41. i 42.**), uočen je otprilike isti trend kao i pri istom protoku u reaktoru volumena  $600 \mu\text{L}$  (**Slike 37. i 38.**). Navedeno upućuje da je moguće reaktore manjih volumena serijski spojiti te da pri tome neće doći do značajnijih promjena u procesnim pokazateljima. Razlika koja se uočava je maksimalna koncentracija produkta koja u ovom eksperimentu iznosi  $32,7 \text{ mM}$ , dok je u reaktoru većeg volumena ona iznosila  $38,8 \text{ mM}$ . Na navedeno može imati utjecaj vrijeme uzimanja uzorka obzirom da koncentracija produkta počinje brzo padati nakon dostizanja maksimalne vrijednosti.



**Slika 41.** Promjena koncentracije acetaldehida (AA) i kloroacetaldehida (CAA) u vremenu prilikom provedbe reakcije aldolne adicije u serijski spojenim kontinuiranim reaktorima  $V = 2 \times 300 \mu\text{L}$  pri protoku  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 34.8 \text{ min}$ ,  $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{CAA}} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).



**Slika 42.** Promjena koncentracije međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) u vremenu prilikom provedbe reakcije aldolne adicije u serijski spojenim kontinuiranim reaktorima  $V = 2 \times 300 \mu\text{L}$  pri protoku  $5 \mu\text{L}/\text{min}$  ( $\tau = 34.8 \text{ min}$ ,  $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{CAA}} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

#### 4.3.4. Usporedba procesnih pokazatelja u različitim tipovima kontinuiranih reaktora

U **Tablici 5.** dani su procesni pokazatelji koji uključuju maksimalnu konverziju kloroacetaldehida, maksimalnu koncentraciju produkta laktola i produktivnost procesa. Navedeni procesni parametri izmjereni su, odnosno izračunati u svim tipovima reaktora pri različitim vremenima zadržavanja.

**Tablica 5.** Usporedba procesnih pokazatelja u različitim tipovima kontinuiranih reaktora.

Tip reaktora	V / $\mu\text{L}$	q / $\mu\text{L}/\text{min}$	$\tau$ / min	$X_{CAA,max}$ / %	$c_{6C-Cl,max}$ / mM	$Pr_{6C-Cl}$ / mM/min
E1-1	300	2	43,5	93,69	32,61	0,75
E1-2	300	5	17,4	87,15	24,63	1,42
E1-3	300	7	12,4	92,76	24,66	1,99
E2-1	600	2	87,0	99,98	41,91	0,48
E2-2	600	5	34,8	94,56	38,80	1,12
E3-1	2 x 300	2	87,0	96,93	42,65	0,49
E3-2	2 x 300	5	34,8	87,81	32,70	0,94

Konverzija kloroacetaldehida (CAA) izračunata je prema izrazu (2), u kojem je  $c_{CAA,min}$  – minimalna izmjerena koncentracija CAA, a  $c_{CAA,0}$  koncentracija kloroacetaldehida u spremniku supstrata iz kojeg se puni kontinuirani reaktor.

$$X_{CAA} = \frac{c_{CAA,0} - c_{CAA,min}}{c_{CAA,0}} \quad (2)$$

Ostvarena produktivnost izračunata je preko izraza (3) u kojem je  $c_{6C-Cl,max}$  – maksimalna ostvarena koncentracija produkta.

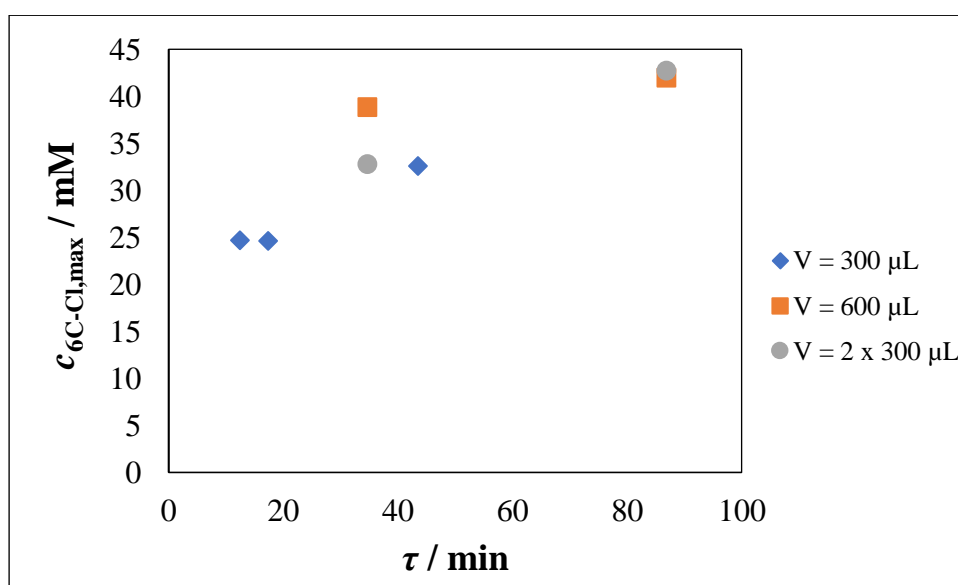
$$Pr = \frac{c_{6C-Cl,max}}{\tau} \quad (3)$$

Usporedbom procesnih pokazatelja u različitim tipovima kontinuiranih reaktora (**Tablica 5.**) proizlazi da je maksimalna konverzija,  $X_{CAA} = 99,98\%$  ostvarena u eksperimentu E2-1 pri najdužem vremenu zadržavanja ( $\tau = 87,0$  min).

Sljedeća značajna vrijednost konverzije,  $X_{CAA} = 96,93\%$  postignuta je u eksperimentu E3-1 na što upućuje i isto vrijeme zadržavanja kao u E2-1, a razlika je u serijski spojenim reaktorima. Veliko vrijeme zadržavanja dalo je molekulama reaktanata više vremena da reagiraju, kao i u E2-1. U ova dva reaktora, također iz istog razloga postignuta je i najveća koncentracija produkta laktola (6C-Cl).

Nadalje, najveća produktivnost,  $Pr_{6C-Cl} = 1,99 \text{ mM/min}$  dobivena je u pokusu E1-3, odnosno pri najmanjem vremenu zadržavanja od 12,4 min koje je ostvareno u reaktoru volumena 300  $\mu\text{L}$  pri najvećem protoku.

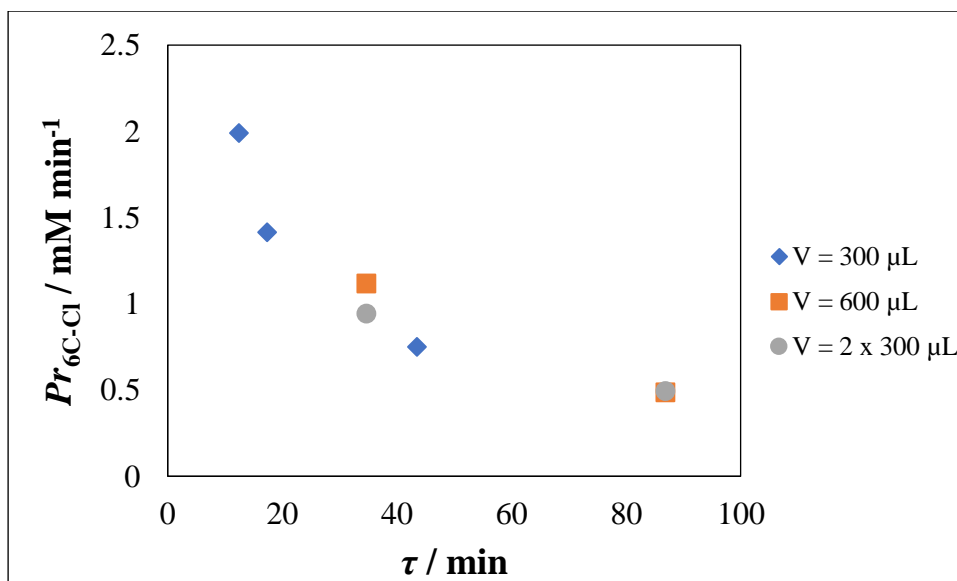
Na **Slici 43.** dana je ovisnost maksimalne koncentracije produkta o vremenu zadržavanja u različitim volumenima reaktora. S obzirom da su eksperimenti u reaktorima različitih volumena vođeni pri različitim vremenima zadržavanja ne može se dati eksplicitna usporedba, ali se na osnovu trenda može zaključiti da je po dobivenim vrijednostima najbolji reaktor volumena 600  $\mu\text{L}$ .



**Slika 43.** Ovisnost maksimalne koncentracije produkta (6C-Cl) o vremenu zadržavanja prilikom provedbe reakcije aldolne adicije u kontinuiranim reaktorima ( $c_{AA} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{CAA} = 50 \text{ mM}$ , 0,1 M fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Iz ovisnosti maksimalne produktivnosti o vremenu zadržavanja (**Slika 44.**) može se zaključiti da produktivnost pada s porastom vremena zadržavanja, te da ista ne ovisi o tipu reaktora.





**Slika 44.** Ovisnost maksimalne produktivnosti o vremenu zadržavanja prilikom provedbe reakcije aldolne adicije u kontinuiranim reaktorima ( $c_{AA} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{CAA} = 50 \text{ mM}$ ,  $0,1 \text{ M}$  fosfatni pufer pH 6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom radu, provedena je reakcija sinteze bočnog lanca prekursora statina katalizirana enzimom DERA imobiliziranim na mezoporoznoj siliki.

U različitim tipovima kontinuiranih reaktora volumena 300, 600 i 2 x 300  $\mu\text{L}$ , ispitan je utjecaj vremena zadržavanja na tijek dvostruke reakcije aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida.

Procijenjeni parametri uspješnosti pokazali su da su najveće maksimalne konverzije kloroacetaldehida, te maksimalne koncentracije produkta laktola (6C-Cl) ostvarene u reaktorima većeg volumena pri vremenu zadržavanja od 87 min.

Maksimalna produktivnost glavnog produkta reakcije opada s vremenom zadržavanja u svim tipovima kontinuiranih reaktora.

Usporedbom različitih parametara kod kontinuiranih reaktora, može se zaključiti da manji protok (2  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) i veći volumen reaktora (600  $\mu\text{L}$ ) daju najbolje rezultate. Vrijeme zadržavanja je tu najveće pa su reaktanti duže vrijeme u kontaktu te sporije dolazi do nakupljanja međuprodukta, a uz veću masu enzima postignuta je veća konverzija.

Zbog deaktivacije enzima ni u jednom eksperimentu nije ostvareno stacionarno stanje.

## 6. LITERATURA

[1] Hoyos, P., Pace, V., Alcantara, A., Biocatalyzed Synthesis of Statins: A Sustainable Strategy for the Preparation of Valuable Drugs, *Catalysts*, 9 (2019) 1-2.

[2] Illanes, A., *Enzyme Biocatalysis: Principle and Applications*, Springer, 2008., str. 155-164., 205-208.

[3] Liu, D. M., Chen, J., Shi, Y. P., Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102 (2018) 332-342.

[4] Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennely, P. J., Rodwell, V. W., Weil, P. A., *Harperova ilustrirana biokemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2011., str. 51-54., 62-72.

[5] <https://www.geeksforgeeks.org/protein-structure-primary-secondary-tertiary-quaternary/> (preuzeto: 15. ožujka 2023.)

[6] [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Biological\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Biological\\_Chemistry\)/Enzymes/3.\\_Proteins\\_as\\_Enzymes](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Biological_Chemistry/Supplemental_Modules_(Biological_Chemistry)/Enzymes/3._Proteins_as_Enzymes) (pristup: 15. ožujka 2023.)

[7] <https://bs.warbletoncouncil.org/proteinas-globulares-708> (pristup: 15. ožujka 2023.)

[8] Wheeler, R., *Zephyris*, 2007. (preuzeto: 17. ožujka 2023.)

[9] <https://thebiologynotes.com/lock-and-key-model-mode-of-action-of-enzymes/> (pristup: 20. ožujka 2023.)

[10] <https://nitroreductaseincancertreatment.wordpress.com/nitroreductase/reduction-mechanism/> (preuzeto: 20. ožujka 2023.)

[11] <https://www.labxchange.org/library/items/lb:LabXchange:b8f15bd6:html:1> (pristup: 20. ožujka 2023.)

[12] Copeland, R. A., *ENZYMES A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis*, Wiley-VCH, 2000., str. 113.

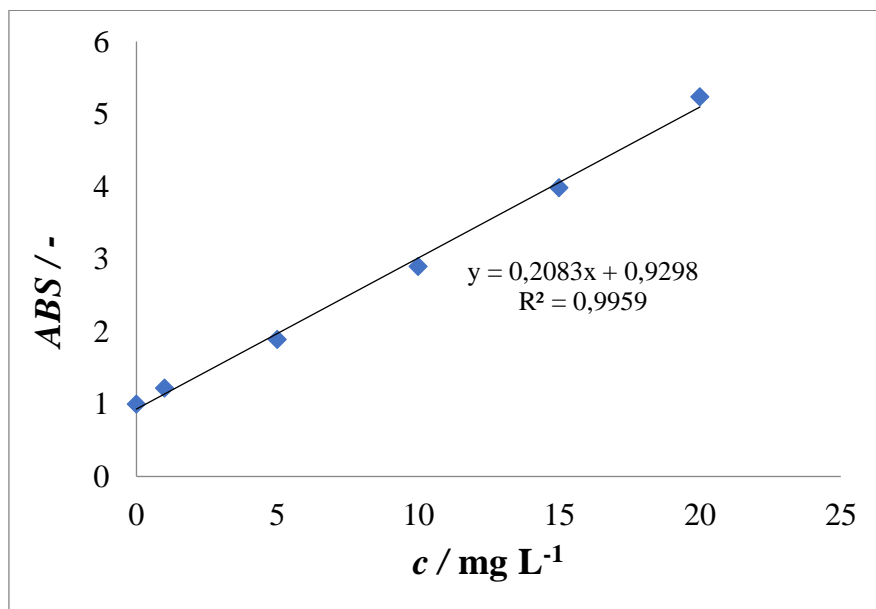
[13] [https://www.creative-enzymes.com/resource/effect-of-temperature-on-enzymatic-reaction\\_50.html](https://www.creative-enzymes.com/resource/effect-of-temperature-on-enzymatic-reaction_50.html) (pristup: 23. ožujka 2023.)

- [14] Hamilton, S., Modeliranje sinteze farmaceutika katalizirane imobiliziranim enzimom, Diplomski rad, Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2023.
- [15] Beilen, J. B., Li, Z., Enzyme technology: an overview, *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (2002) 338-344.
- [16] Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U. T., *Biocatalysts and Enzyme Technology*, 2nd edition, Wiley-Blackwell, 2012., str. 21-22., 312-317.
- [17] Dean, S. M., Greenberg, W. A., Wong, C., Recent Advances in Aldolase-Catalyzed Asymmetric Synthesis, *Synthesis & Catalysis*, 349 (2017) 1308-1320.
- [18] Haridas, M., Abdelraheem, E. M. M., Hanefeld, U., 2-Deoxy-D-ribose-5-phosphate aldolase (DERA): applications and modifications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102 (2018) 9959-9971.
- [19] Stancu, C., Sima, A., Statins: mechanism of action and effects, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 5 (2001), 378-387.
- [20] Manzoni, M., Rollini, M., Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterol-lowering drugs, *Appl Microbiol Biotechnol*, 58 (2002) 555–564.
- [21] Ošljaj, M., Cluzeau, J., Orkić, D., Kopitar, G., Mrak, P., Casar, Z., A highly productive, whole-cell DERA chemoenzymatic process for production of key lactonized side-chain intermediates in statin synthesis, *PLoS One*, 8 (2013) 62250.
- [22] Liu, D., Dong, C., Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications, *Process Biochemistry*, 92 (2020) 464-475.
- [23] Naramittanakul, A., Buttranon, S., Petchsuk, A., Chaiyen, P., Weeranoppanant, N., Development of a continuous-flow system with immobilized biocatalysts towards sustainable bioprocessing, *Reaction Chemistry & Engineering*, 6 (2021) 1771-1790.
- [24] Ispas, C., Sokolov, I., Andreescu, S., Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393 (2009) 543-554., 574-575.

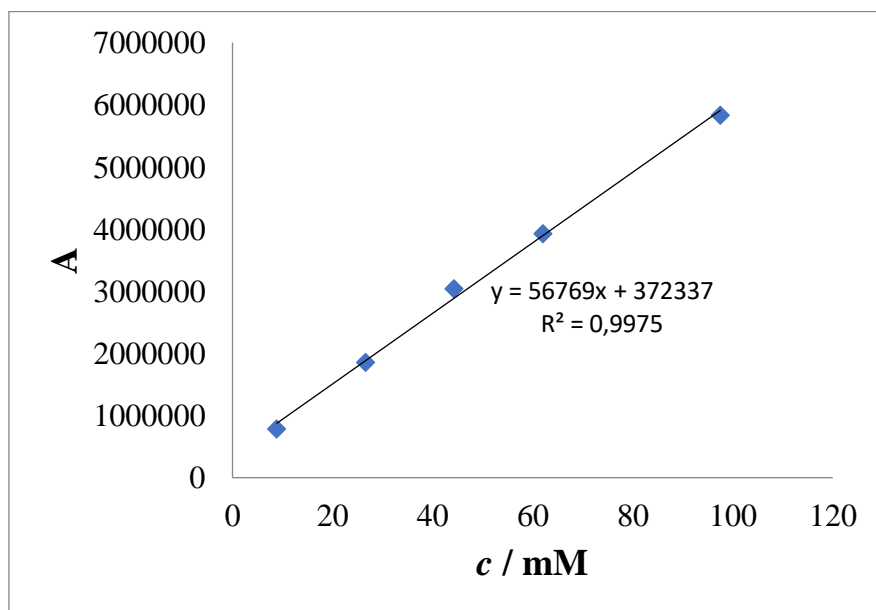
- [25] Gutarra, M.L.E., Miranda, L.S.M., Souza, R.O.M.A., Enzyme Immobilization for Organic Synthesis in Organic Synthesis Using Biocatalysis (Ur: Goswami, A., Stewart, J.D.), Elsevier, 2016., str. 99-126.
- [26] Fan, X., Jiao, Y., Porous Materials for Catalysis: Toward Sustainable Synthesis and Applications of Zeolites in Sustainable Nanoscale Engineering: From Materials Design to Chemical Processing (Ur: Szekely, G., Livingston, A.), Elsevier, 2020., str. 115-137.
- [27] Giraldo, L. F., Lopez, B. L., Perez, L., Urrego, S., Sierra, L., Mesa, M., Mesoporous Silica Applications, *Macromolecular Symposia*, 258 (2007) 129-141.
- [28] <https://www.bioreactors.net/what-is-a-bioreactor> (pristup: 20. lipnja 2023.)
- [29] De Santis, P., Meyer, L.E., Kara, S., The rise of continuous flow biocatalysis – fundamentals, very recent developments and future perspectives, *Reaction Chemistry & Engineering*, 5 (2020) 2155-2184.
- [30] Britton, J., Majumdar, S., Weiss, G. A., Continuous Flow Biocatalysis, *Chemical Society Reviews*, 47 (2018) 5891-5918.
- [31] Britton, J., Raston, C. L., Multi-step continuous-flow synthesis, *Chemical Society Reviews*, 46 (2017) 1250-1271.
- [32] Swinehart, D. F., The Beer-Lambert Law, *Journal of Chemical Education*, 39 (1962) 333.
- [33] [https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what\\_is\\_hplc.html](https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basic/what_is_hplc.html) (pristup: 19. lipnja 2023.)
- [34] Becker, J. M., Caldwell, G. A., & Zachgo, E. A., Protein Assays, *Biotechnology*, 13 (1996) 119–124.
- [35] <https://www.bioagilytix.com/2020/10/09/utilizing-bradford-assay-for-protein-concentration-calculation/> (pristup: 23. lipnja 2023.)
- [36] Jennewein, S., Schürmann, M., Wolberg, M., Directed evolution of an industrial biocatalyst: 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase, *Biotechnology Journal*, 1 (2006) 537-548.

## 7. PRILOZI

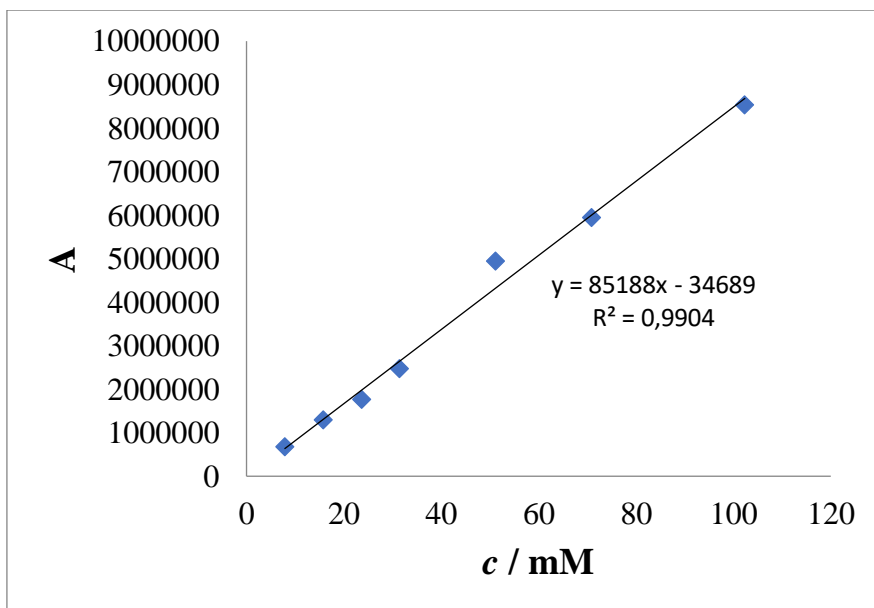
**Prilog 1.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije proteina.



**Prilog 2.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije acetaldehida.



**Prilog 3.** Baždarni dijagram za određivanje koncentracije kloroacetaldehida.



## 8. POPIS SIMBOLA I KRATICA

### SIMBOLI

$X_{CAA,max}$  – maksimalna konverzija kloroacetaldehida [%]

$Pr_{6\text{ C-Cl}}$  – produktivnost 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala [mM/min]

$k$  - konstanta brzine reakcije [ $\text{min}^{-1}$ ]

$K_m$  - Michaelis - Menteničina konstanta [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]

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

$I$  – intenzitet svjetla koje je prošlo kroz analizirani uzorak [-]

$I_0$  – intenzitet ulaznog svjetla [-]

$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent [ $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ ]

$b$  – duljina puta svjetlosti [cm]

$c$  – koncentracija [mM]

$t$  – vrijeme [min]

$\tau$  – vrijeme zadržavanja [min]

### KRATICE

DERA – 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza

AA - acetaldehid

CAA - kloroacetaldehid

6 C-Cl - 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal

4 C-Cl – 4-kloro-3-hidroksibutanal

IUB – Međunarodna unija biokemičara



ATP – adenozin-trifosfat

E - enzim

S - supstrat

ES – enzim-supstrat kompleks

P - produkt

HMG-CoA - 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A

LDL – kolesterol niske gustoće

ACR – eng. *Agitated cell reactor*

ATR – eng. *Agitated tube reactor*

API – aktivni farmaceutski sastojak

CSTR - reaktor s kontinuiranim spremnikom s miješanjem

PBR – reaktor s pakiranim slojem katalizatora

ABS - apsorbancija

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

BET – (Brunauer, Emmet i Teller) fiziosorpcija

SEM – skenirajući elektronski mikroskop

FFF – metoda proizvodnje rastaljenim filamentom

TMB – trimetilbenzen

TEOS - tetraetoksisilan

APTMS - (3-aminopropil) trietoksisilan

DMF – dimetilformamid

## 9. ŽIVOTOPIS

Martina Batur [REDACTED] Završila je Osnovnu školu Sveti Filip i Jakov 2013., te Opću gimnaziju Biograd 2017. godine. Iste godine upisuje preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Nakon završenog preddiplomskog studija, 2021. upisuje diplomski studij Kemijsko inženjerstvo na istoimenom fakultetu. Članica je studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa (HDKI) te je sudjelovala u organizaciji brojnih projekata. Dobitnica je Rektorove nagrade za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici u ak. god. 2020./2021. Vrlo dobro vlada programima MS Office paketa (Word, Excel i PowePoint) te programskim jezikom Matlab i simulacijskim sustavom ChemCAD. Aktivno se služi engleskim i njemačkim jezikom.