

Kinetička karakterizacija aldolaze immobilizirane na magnetske nanočestice

Petrić, Ivana

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:149:197164>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

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





FKIT MCMXIX

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU



FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Petrić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU



FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ivana Petrić

**KINETIČKA KARAKTERIZACIJA ALDOLAZE
IMOBILIZIRANE NA MAGNETSKE NANOČESTICE
DIPLOMSKI RAD**

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
2. doc. dr. sc. Martina Sudar
3. izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Zagreb, rujan 2023.

Prvenstveno zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki i asistentu Dini Skendroviću, mag. ing. oecoing., na pristupačnosti, savjetima i pomoći pri izradi diplomskog rada.

*Veliko hvala roditeljima i bratu, čiju sam podršku imala u svakom trenutku studiranja.
Naučili ste me ustrajnosti bez koje je teže završiti fakultet.*

Također zahvaljujem svim prijateljima i prijateljicama – svojim ste mi društvom uljepšali studentske dane.

Rad posvećujem svom Beliju, koji me strpljivo čekao svaki dan kad sam odrađivala eksperimentalni dio rada.

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je odrediti kinetiku kovalentno imobiliziranog enzima DERA u reakciji dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Produkt navedene reakcije je laktol – ključni prekursor u sintezi bočnog lanca statina, lijeka za snižavanje koncentracije kolesterola u krvi. Kao nosioc za imobilizaciju, korištene su magnetske nanočestice, sintetizirane hidrotermalnom metodom, funkcionalizirane 3-aminopropiltrietoksisilanom te aktivirane 10 %-tnim anhidridom jantarne kiseline. Kinetika je za oba koraka reakcije opisana Michaelis-Mentenčinom jednačbom, a kinetički su parametri procijenjeni metodom nelinearne regresije programa MicroMath *Scientist*. Uz to, razvijen je matematički model procesa i validiran u kotlastom reaktoru.

Ključne riječi

2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza, imobilizacija, magnetske nanočestice, statin, kinetika

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the kinetics of the covalently immobilized DERA enzyme in the double aldol addition reaction of acetaldehyde and chloroacetaldehyde. The product of the mentioned reaction is lactol – a key precursor in the synthesis of the side chain of statin, a drug used for lowering blood cholesterol level. Magnetic nanoparticles were used as a carrier and were synthesized by the hydrothermal method, functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane and activated with 10 % succinic anhydride. The kinetics for both reaction steps was described by the Michaelis-Menten equation, and the kinetic parameters were estimated using the nonlinear regression method of the MicroMath *Scientist* software. A mathematical model of the process was also developed and validated in a batch reactor.

Key words

2-deoxyribose-5-phosphate aldolase, immobilization, magnetic nanoparticles, statin, kinetics

SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	OPĆI DIO	2
2.1.	Enzimi	2
2.1.1.	Klasifikacija enzima.....	3
2.1.2.	Struktura enzima	4
2.1.3.	Mehanizam djelovanja enzima	5
2.1.4.	Prednosti i nedostaci enzima.....	6
2.2.	Imobilizacija enzima	7
2.2.1.	Kovalentna imobilizacija	9
2.2.2.	Nosioc za imobilizaciju.....	10
2.2.2.1.	Magnetske nanočestice	10
2.3.	Aldolaza	11
2.3.1.	2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA)	13
2.4.	Statini	14
2.5.	Matematičko modeliranje enzimatskih reakcija.....	15
2.5.1.	Uvod u matematičko modeliranje	15
2.5.2.	Modeliranje enzimatskih reakcija	16
2.5.3.	Enzimaska reakcijska kinetika.....	16
2.5.3.1.	Michaelis-Menteničina kinetika	17
2.5.3.2.	Enzimaska inhibicija	19
2.5.3.3.	Enzimaska deaktivacija	20
2.5.4.	Rektorski modeli	20
2.5.4.1.	Kotlasti reaktor	21
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	23
3.1.	Uređaji za mjerenje	23
3.1.1.	Analitička vaga	23
3.1.2.	Centrifuga	23
3.1.3.	Homogenizator.....	25
3.1.4.	Liofilizator	25
3.1.5.	Spektrofotometar.....	26
3.1.6.	Termostatirana tresilica.....	26
3.1.7.	Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)	27
3.2.	Analitičke metode	27

3.2.1.	Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom	27
3.2.2.	Određivanje koncentracije supstrata, međuprodukta i produkta.....	28
3.3.	Proces imobilizacije enzima DERA.....	29
3.3.1.	Sinteza magnetskih nanočestica i oblaganje silikom.....	29
3.3.2.	Funkcionalizacija i aktivacija magnetskih nanočestica	29
3.3.3.	Imobilizacija enzima DERA i određivanje učinkovitosti	30
3.3.4.	Određivanje aktivnosti i stabilnosti imobiliziranog enzima DERA	30
3.4.	Karakterizacija enzima DERA.....	30
3.4.1.	Određivanje kinetike enzima DERA	30
3.4.1.1.	Reakcija acetaldehida i kloroacetaldehida.....	30
3.4.1.2.	Reakcija acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala.....	31
3.5.	Sinteza 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala u kotlastom reaktoru.....	31
3.6.	Matematički model.....	32
3.6.1.	Kinetički model.....	32
3.6.2.	Reaktorski model	32
3.6.3.	Obrada rezultata	33
4.	Rezultati i rasprava	34
4.1.	Kinetika enzima DERA.....	34
4.1.1.	Kinetika enzima u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida	34
4.1.2.	Kinetika enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i 4-kloro-3- hidroksibutanala.....	36
4.2.	Sinteza 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala aldolnom adicijom katalizirana enzimom DERA u kotlastom reaktoru.....	38
5.	ZAKLJUČAK.....	41
6.	LITERATURA.....	42
7.	PRILOZI.....	48
8.	POPIS SIMBOLA I KRATICA	51
9.	ŽIVOTOPIS.....	53

1. UVOD

Kardiovaskularne bolesti (KVB) desetljećima su vodeći uzrok smrti u svijetu i razlog gubitka 20,5 milijuna ljudskih života godine 2021.¹ Hiperkolesterolemija, primjer česte KVB bolesti, karakterizirana je povećanom koncentracijom lipoproteina niske gustoće, odnosno tzv. “štetnog kolesterola”. Jedan od mehanizama liječenja ove bolesti uključuje inhibiciju koenzima 3-hidroksi-3-metilglutari A (HMG-CoA) reduktaze, esencijalnog enzima u sintezi kolesterola. Lijekovi statini poznati su inhibitori HMG-CoA reduktaze koji snižavaju koncentraciju kolesterola niske gustoće i triglicerida, dok povećavaju koncentraciju lipoproteina visoke gustoće (tzv. “dobar kolesterol”). Najzastupljeniji statini korišteni za liječenje KVB su atorvastatin, rosuvastatin, simvastatin, pravastatin, fluvastatin, lovastatin i pitavastatin.^{2,3,4}

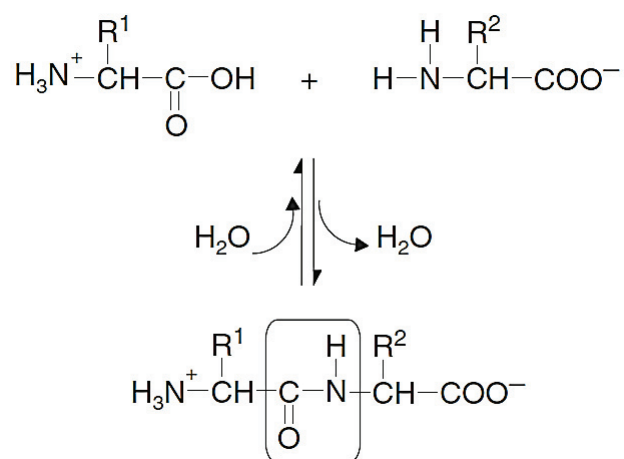
Samo je jedan od enantiomera kiralnog bočnog lanca statina aktivan te ga je potrebno osigurati u velikoj čistoći za odgovarajuću aktivnost. Uobičajeni kemijski putevi dobivanja ovog spoja nisu u skladu sa sve bitnijom održivošću industrijskih procesa zbog korištenja štetnih kemikalija, stvaranja otpada i sl. Biokataliza nudi obećavajuće i ekološki prihvatljivije rješenje industrijskoj sintezi statina u obliku enzima, konkretno deoksiriboze-5-fosfat aldolaze (DERA). Prepreka široj industrijskoj primjeni enzima je u njegovoj nestabilnosti. Međutim, navedeno je moguće savladati raznim metodama stabilizacije, poput imobilizacije.^{5,6}

Kako bi se omogućilo veće razumijevanje imobilizacije enzima, ali i ostalih biotehnoloških postupaka, uobičajeno se koristi matematičko modeliranje reakcija. Korištenjem matematičkih modela moguće je proučavati kinetiku određene reakcije, optimizirati dizajn reaktora i katalizatora, razviti sustave za isporuku lijekova, savladati okolišne uvjete i sl. U ovom je radu razvijen matematički model dvostruke aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida kataliziran imobiliziranim enzimom DERA.⁷

2. OPĆI DIO

2.1. Enzimi

Osnovna građevna jedinica svih živih organizama je stanica – strukturna i funkcionalna sastavnica života.⁸ Stanice imaju sposobnost učinkovitog korištenja biokatalizatora, odnosno enzima, za ubrzavanje biokemijskih reakcija u svim živim sustavima.^{8,9} S izuzetkom nekoliko klasa katalitičkih molekula RNK, enzimi su proteini sastavljeni od 100 do nekoliko stotina aminokiselinskih ostataka.^{10,6} Te su aminokiseline kovalentno vezane peptidnom vezom, koja se stvara između ugljikovog atoma karboksilne skupine jedne aminokiseline i dušikovog atoma α -amino skupine druge (slika 1).⁶



Slika 1. Shema stvaranja peptidne veze između dviju susjednih α -aminokiselina⁶

Enzimi imaju izvanrednu katalitičku moć, a njihova visoka razina specifičnosti za određen supstrat čini ih ključnim za stanični metabolizam. Svaka kemijska reakcija koja se odvija u biljkama, mikroorganizmima i životinjama odvija se mjerljivom brzinom kao izravan rezultat enzimske katalize.⁸ Osim spomenute svrhe, enzimi se također mogu ekstrahirati iz stanica te zatim koristiti za kataliziranje širokog spektra komercijalno važnih procesa. Na primjer, imaju važnu ulogu u proizvodnji zaslađivača i modificiranju antibiotika, a koriste se i u prašcima za pranje i raznim proizvodima za čišćenje. Nadalje, imaju ulogu u analitičkim uređajima i testovima za kliničku, forenzičku i ekološku primjenu (tablica 1).⁹

Tablica 1. Primjena industrijskih enzima⁹

Enzim	Primjena
Industrijski katalizatori	
Alkalne proteaze	Deterdženti i prašci za pranje
Amiloglukozidaza	Proizvodnja glukoze
Glukoza izomeraza	Proizvodnja fruktoznog sirupa
Penicilin acilaza	Stvaranje 6-aminopenicilanske kiseline za proizvodnju polusintetskih penicilina
Terapeutska sredstva	
L-asparaginaza	Kemoterapija
Urokinaza	Uklanjanje fibrinskih ugrušaka iz krvotoka
Analitički reagensi	
Luciferaza	Bioluminiscentni testovi koji uključuju adenzin trifosfat
Peroksidaza	Kvantifikacija hormona i antitijela
Ureaza	Kvantifikacija ureje u tjelesnim tekućinama
Alati za manipulaciju	
Lizosom	Disrupcija mukopeptida u bakterijskim staničnim stijenkama
DNK polimeraza	Amplifikacija deoksiribonukleinske kiseline (DNK) u lančanoj reakciji

Za razliku od tradicionalnih kemijskih katalizatora, kao što su vodikovi ioni, teški metali ili metalni oksidi, koji su najučinkovitiji u organskim otapalima, na vrlo visokim temperaturama ili pri ekstremnim pH-vrijednostima, enzimi najučinkovitije djeluju u vrlo blagim uvjetima. Prilikom korištenja enzima, potrebno je obratiti pažnju na odstupanja od homogenih vodenih otopina, pH-vrijednost i temperaturu jer u protivnom može doći do smanjenja aktivnosti korištenog enzima.⁸

2.1.1. Klasifikacija enzima

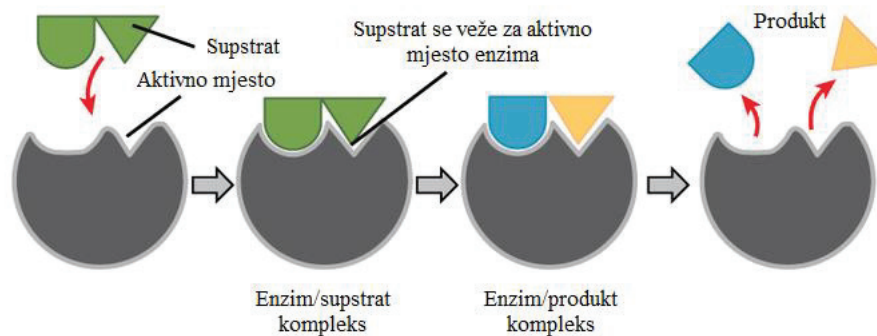
Uobičajena imena enzima, tzv. "trivijalni nazivi", uglavnom se odnose na kataliziranu reakciju, sa sufiksom -aza (npr. oksidaza, dehidrogenaza, karboksilaza). Postoje još i određeni nazivi proteolitičkih enzima sa sufiksom -in (tripsin, kimotripsin, papain). Često trivijalni naziv

označava i supstrat na koji enzim djeluje (glukoza oksidaza, alkohol dehidrogenaza, piruvat dekarboksilaza).⁹ Međutim, neki trivijalni nazivi daju malo informacija o supstratu, produktu ili uključenoj reakciji, a njihova primjena u pojedinačnim slučajevima može dovesti do zabune.^{9,11} Stoga je formirana Komisija za enzime (engl. *Enzyme Commission*, EC) u sklopu Međunarodne unije za čistu i primijenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC). Na taj je način razvijena sustavna numerička nomenklatura za enzime uz univerzalno prihvaćene oznake.¹¹

2.1.2. Struktura enzima

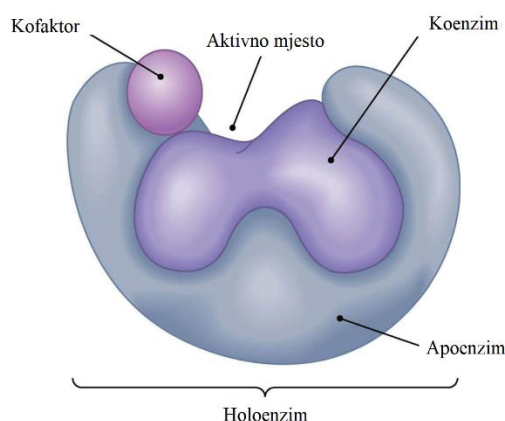
Kao i svi proteini, enzimi se uglavnom sastoje od 20 prirodno prisutnih aminokiselina. Pojedinačni bočni lanci aminokiselina osiguravaju kemijsku reaktivnost koju enzim iskorištava u katalizi određenih kemijskih transformacija.¹¹ Osim kemijske reaktivnosti i katalitičkih sposobnosti, enzimi pokazuju i fizikalno-kemijska svojstva proteina poput topljivosti, elektroforetskih karakteristika i elektrolitičkih ponašanja. Primarna strukturna konfiguracija i katalitičko djelovanje enzima određeno je linearnim lancem aminokiselinskih ostataka povezanih peptidnim vezama. Lokalizirano savijanje primarne strukture naziva se sekundarnom strukturom, dok je potpuno savijanje molekule poznato kao tercijska struktura. Za razliku od navedenih strukturnih konfiguracija, kvartarna struktura je aglomeracija nekoliko presavijenih lanaca.⁸

Aminokiseline u enzimu mogu biti raspoređene kao jedan ili više polipeptidnih lanaca koji su presavijeni kako bi formirali specifičnu trodimenzionalnu strukturu, uključujući područje koje se naziva aktivno mjesto, gdje se supstrat veže i daje produkt (slika 2). Oblik i svojstvo naboja aktivnog mjesta enzima omogućuju mu da se veže za jednu vrstu molekule supstrata, čime enzim pokazuje značajnu specifičnost u svojoj katalitičkoj aktivnosti.⁹ Prilikom vezanja supstrata za enzim dolazi do promjena u raspodjeli elektrona u kemijskim vezama, koje uzrokuju reakcije te dovode do stvaranja produkata. Produkti se tada odvajaju od enzima, koji je spreman za ponovno korištenje.⁶



Slika 2. Princip dobivanja produkta vezanjem supstrata za aktivno mjesto enzima¹²

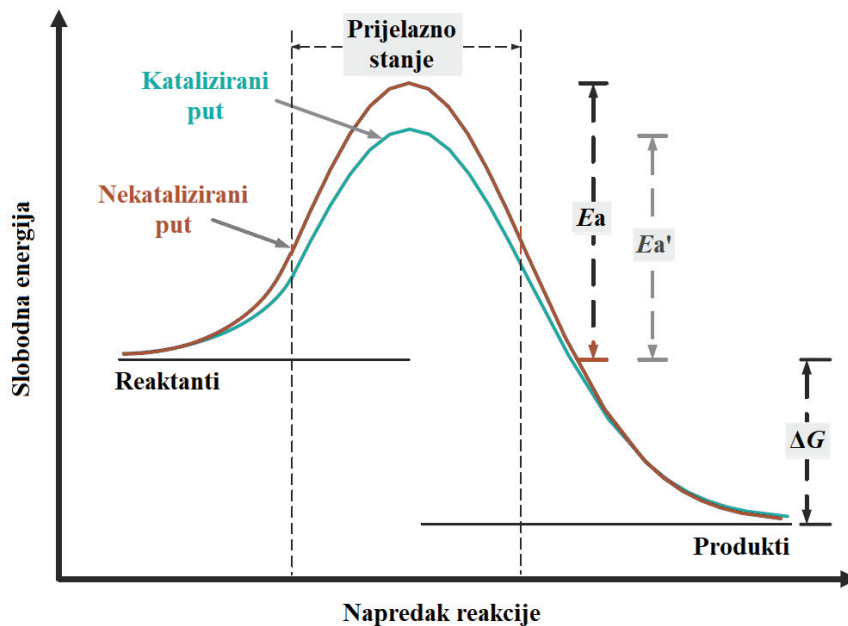
Mnogim je enzimima za katalitičku aktivnost potrebna i neproteinska komponenta, odnosno kofaktor.^{9,11} Kofaktor se odnosi na anorgansku molekulu, obično metalni ion poput željeza, mangana, kobalta, bakra ili cinka. Neproteinska komponenta koja podrazumijeva drugu organsku molekulu naziva se još koenzim. Kada je enzimu za svoju aktivnost potreban kofaktor, neaktivna proteinska komponenta općenito se naziva apoenzim, a apoenzim plus kofaktor (koenzim) naziva se holoenzim.⁹ Navedeno je ilustrativno prikazano slikom 3.



Slika 3. Struktura holoenzima¹³

2.1.3. Mehanizam djelovanja enzima

Mehanizam djelovanja enzima temelji se na smanjenju energije aktivacije reakcije kojom se iz supstrata dobije produkt.^{8,6} Bočni lanci aminokiselinskih ostataka na katalitičkom mjestu enzima osiguravaju skupine za vezanje sa specifičnim skupinama supstrata. Vezanje inducira konformacijsku reakciju na aktivnom mjestu enzima.⁸ Tijekom reakcije stvara se kompleks enzim-supstrat, koji omogućuje prevladavanje energetske barijere za dobivanje produkta.^{8,9} Termodinamički, veličina ove energetske barijere izražuje se u smislu promjene slobodne energije.⁶ Navedeni mehanizam prikazan je slikom 4.



Slika 4. Mehanizam enzimske katalize⁶

2.1.4. Prednosti i nedostaci enzima

Nekoliko je izraženih prednosti enzima u odnosu na konvencionalne kemijske katalizatore.⁶ Neke od tih prednosti su kako slijede:

- visoka specifičnost i selektivnost (regio- i stereoselektivnost)
- mogućnost katalize određene reakcije eliminirajući sporedne reakcije i neželjene nusproizvode
- smanjeni troškovi pročišćavanja okoliša i opterećenje okoliša
- blagi uvjeti rada (pH-vrijednost, temperatura, tlak) → smanjeni energetske zahtjevi i kapitalni troškovi
- povećanje produktivnosti uz smanjenje troškova proizvodnje.

Prisutni su i određeni nedostaci korištenja enzima, koji se ne mogu zanemariti, ali se trenutno radi na njihovom prevladavanju:

- nestabilna priroda enzima kada se uklone iz prirodnog okruženja
- blagi uvjeti rada → izazov kod primjene u reakcijama industrijskih procesa
- visoki troškovi izolacije i pročišćavanja enzima.^{6,14}

2.2. Imobilizacija enzima

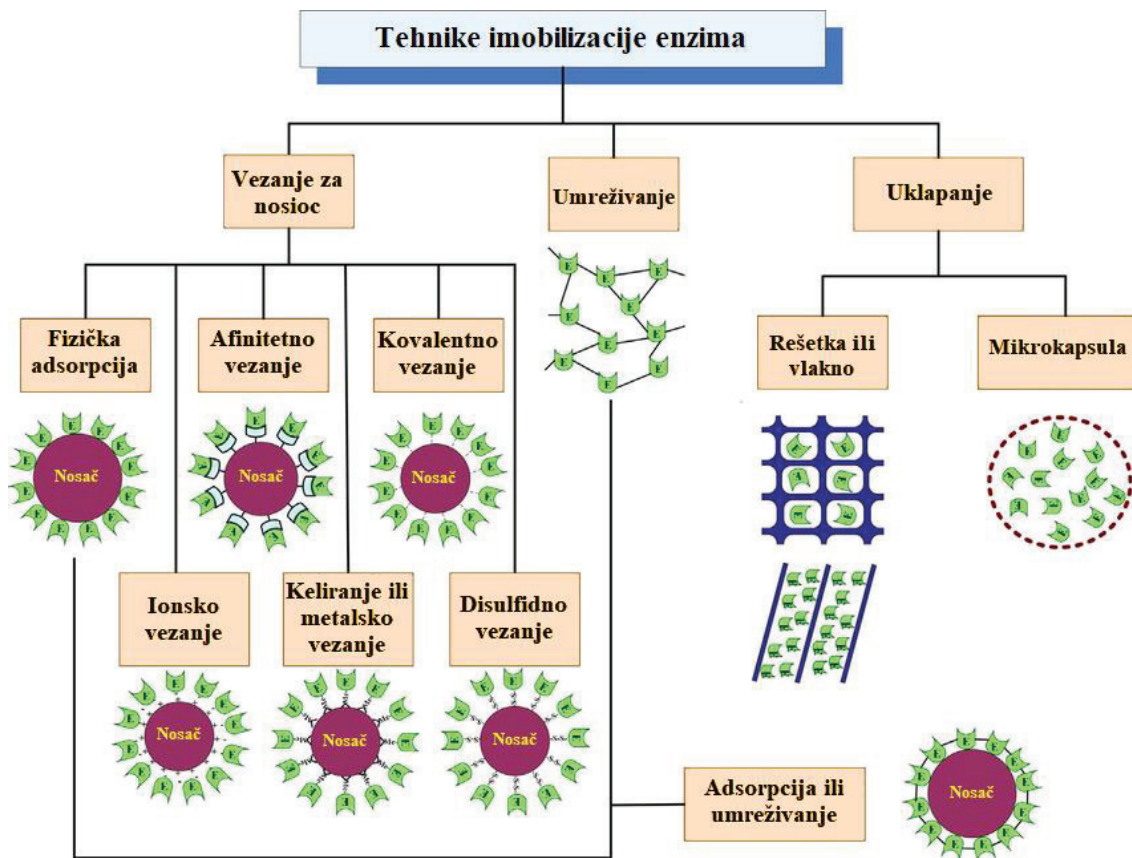
Spomenuti potencijalni problem enzimske nestabilnosti moguće je riješiti tehnikom imobilizacije. Proces imobilizacije služi za optimiziranje operativnih performansi enzima za industrijske primjene.¹⁵ Tablicom 2 prikazani su čimbenici koji utječu na rad imobiliziranih enzima. Glavne komponente imobiliziranog enzimskog sustava čine enzim, nosioc i način pričvršćivanja enzima za nosioc.¹⁶

Tablica 2. Čimbenici koji utječu na rad imobiliziranih iona¹⁷

Čimbenici	Posljedice imobilizacije
Hidrofobna pregrada	Povećanje brzine reakcije hidrofobne podloge
Mikrookolina nosača	Hidrofobna priroda stabilizira enzim
Pričvršćivanje nosača u više točaka	Povećanje toplinske stabilnosti enzima
Odstojnik ili krak raznih vrsta imobiliziranih enzima	Sprječavanje deaktivacije enzima
Difuzijska ograničenja	Smanjenje aktivnosti i povećavanje stabilnosti enzima
Prisutnost supstrata ili inhibitora	Veće zadržavanje aktivnosti
Naknadni fizički tretmani	Poboljšanje učinka enzima
Različiti načini uvezivanja	Mogućnost ugroženja aktivnosti i stabilnosti
Fizička struktura nosača kao što je veličina pora	Zadržavanje aktivnosti često ovisi o veličini pora
Fizička priroda nositelja	Nosači s velikom veličinom pora ublažavaju ograničenje difuzije, što dovodi do većeg zadržavanja aktivnosti

U usporedbi sa slobodnim oblikom, imobilizirani enzim općenito je stabilniji i lakši za rukovanje. Osim toga, produkt katalizirane reakcije nije onečišćen enzimom, što je korisno u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Uz navedeno, imobilizacija također poboljšava mnoga svojstva enzima kao što su učinak u organskim otapalima, pH-tolerancija, selektivnost, toplinska stabilnost ili funkcionalna stabilnost. Na kraju reakcije, enzim je spreman za sljedeću reakciju bez potrebe za ponovljenim, dugotrajnim i skupim postupcima ekstrakcije i pročišćavanja.¹⁵

Jedan način klasificiranja različitih pristupa imobilizaciji enzima je u dvije široke kategorije: ireverzibilne i reverzibilne metode.⁶ Reverzibilne metode uključuju adsorpciju, ionsko i afinitetno vezanje, dok ireverzibilne podrazumijevaju kovalentno vezanje, zarobljivanje, inkapsuliranje i unakrsno povezivanje.¹⁸ Slika 5 shematski prikazuje podjelu metoda imobilizacije enzima, dok su tablicom 3 sažete ključne metode s pripadajućim prednostima i nedostacima.



Slika 5. Shematski prikaz metoda imobilizacije enzima¹⁹

Tablica 3. Prednosti i nedostaci glavnih metoda imobilizacije enzima¹⁶

Metoda i priroda veze	Prednosti	Nedostaci
ADSORPCIJA Slabe veze: hidrofobne, Van der Waals ili ionske interakcije	Jednostavan proces niske cijene Malo konformacijskih promjena enzima	Desorpcija Nespecifična adsorpcija
AFINITETNO VEZANJE Afinitetne veze između dva afinitetna partnera	Jednostavna i usmjerena imobilizacija Izvanredna selektivnost	Visoka cijena
KOVALENTNO VEZANJE Kemijske veze između funkcionalnih skupina enzima i nosača	Bez propuštanja enzima Potencijal za stabilizaciju enzima	Nosač i enzim nisu regenerabilni Velik gubitak aktivnosti
ZAROBLJIVANJE Okluzija enzima unutar polimerne mreže	Velika primjenjivost	Ograničenja prijenosu mase Propuštanje enzima
UNAKRSNO VEZANJE Molekule enzima unakrsno su vezane funkcionalnim reaktantom	Stabilizacija enzima	Manje korisno za reaktore s nepokretnim slojem katalizatora Ograničenja prijenosu mase Gubitak aktivnosti

2.2.1. Kovalentna imobilizacija

Kovalentna imobilizacija jedna je od najraširenijih metoda imobilizacije enzima.¹⁶ Temelji se na stvaranju kovalentnih veza između funkcionalnih skupina aktiviranog nosača i enzima.^{16,6} Funkcionalne skupine u aminokiselinskim ostacima enzima odnose se na skupine poput hidroksilne, amino, karboksilne, tiolne i fenolne.^{6,20} Kako bi se postiglo učinkovito povezivanje, funkcionalne skupine potrebno je prethodno aktivirati.²¹

Značajna prednost navedene metode imobilizacije očitava se iz stabilne prirode veza između enzima i nosača. Posljedično, ne dolazi do ispuštanja enzima u otopinu tijekom uporabe te također čini enzim vrlo stabilnim.^{16,22} Jednom kada se enzim imobilizira, ostaje čvrsto vezan

za nosioc.²³ Među mnogim sustavima za kovalentnu imobilizaciju enzima, posebno je zanimljivo kovalentno pričvršćivanje u više točaka, gdje je enzim povezan s nosačem preko nekoliko aminokiselinskih ostataka, a razvijeno je korištenjem različitih čvrstih nosača poput poroznog stakla, poliakrilamida, celuloze, magnetskih čestica itd.⁶

2.2.2. Nosioc za imobilizaciju

Izvedba imobiliziranog enzima vezanog za nosioc ovisi ne samo o kemijskoj prirodi nosioca (kemijski sastav, kemija površine, prisutnost funkcionalnih skupina), već i u velikoj mjeri o fizičkoj (oblik, veličina, poroznost, veličina i raspodjela veličine pora, morfologija, mehanička stabilnost, faktor bubrenja, hidrofilnost). Dakle, varijacije fizičkih svojstava nosioca utječu na vezanje enzima i ekspresiju aktivnosti te specifičnu aktivnost, volumnu aktivnost, selektivnost i stabilnost enzima.^{24,21}

U području biokatalize, općenito je poželjno da nosioc ima slijedeća svojstva:

- niska cijena,
- jednolik sastav,
- dovoljno porozan ili propusan,
- ne sadrži denaturirajuće tvari,
- stabilnost,
- mehanička čvrstoća,
- inertnost.

Budući da enzimi zahtijevaju barem minimalnu količinu vode za očuvanje aktivne strukture proteina i aktivnosti, najvažnije svojstvo nosioca jest njegova hidrofilnost. Ostala važna svojstva nosioca uključuju raspodjelu enzima unutar nosioca, orijentacija enzima na nosiocu te konformacija enzima u trenutku vezanja. Navedeno direktno utječe na aktivnost imobiliziranog enzima.²³

2.2.2.1. Magnetske nanočestice

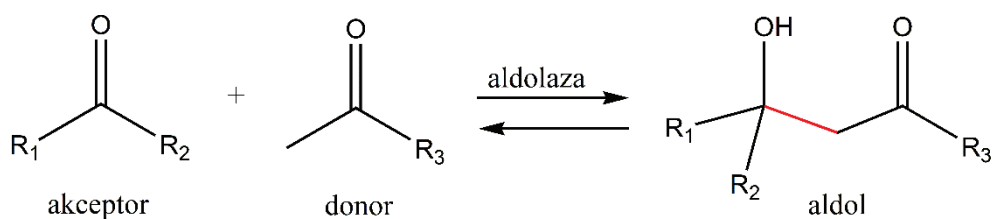
U posljednjem desetljeću, korištenje nanomaterijala za imobilizaciju različitih enzima postaje sve češće zbog svojstva povećanja omjera površine i volumena, što posljedično povećava stabilnost i učinkovitost imobiliziranog enzima.^{25,26} U sklopu ovog rada korištene su magnetske nanočestice kao nosioc enzima.

Magnetske nanočestice (MNČ) uglavnom se sastoje od magnetskih elemenata kao što su željezo, kobalt, krom, mangan, nikal i gadolinij te njihovih derivata.²⁷ Svojstva MNČ-a

ovise o načinu njihove sinteze i kemijskoj strukturi, a uz to, fizikalno-kemijska svojstva nanomaterijala čine ih korisnim matricama.^{27,26} Nadalje, ono što čini MNČ zahvaljujućim kandidatima za imobilizaciju su njihova jedinstvena svojstva poput netoksičnosti, biokompatibilnosti i ujednačene veličine čestica.^{28,29} Također, njihovo magnetsko svojstvo pridonosi poželjnosti primjene zbog posljedične mogućnosti obnavljanja enzima uz primjenu vanjskog magnetskog polja.²⁹ Pored jednostavnog i brzog odvajanja te ponovne upotrebe enzima, Darwesh, Matter i Eida (2019) zapazili su visoku enzimsku stabilnost i nakon tri mjeseca prilikom korištenja MNČ pri imobilizaciji enzima.²⁷

2.3. Aldolaza

Aldolaza (EC 4.1.2.13) je liaza koja katalizira aldolne reakcije te ima važnu ulogu u metabolizmu glukoze.^{30,31} Aldolna reakcija osigurava spajanje nukleofilnog donora, uglavnom ketona, s elektrofilnim akceptorom aldehidom, kako bi se stvorila C-C veza između novonastalih asimetričnih centara (slika 6). Glavni izazov reakcije je upravljanje stereokemijom produkta.^{32,31}



Slika 6. Aldolna adicija, reakcija katalizirana aldolazom

Enzim aldolaza vjerojatno je prisutan u svim stanicama organizma, a u većim se količinama nalazi u tkivima mišića, jetre i mozga.³⁰ Unutar stanice, aldolaza je locirana u citoplazmi i jezgri. U slučaju kralježnjaka, identificirana su tri izoenzima aldolaze s različitom distribucijom i kinetikom u tkivima – aldolaza A (mišići i crvena krvna zrnca), aldolaza B (jetra, bubrezi i tanko crijevo) te aldolaza C (moždano i neuronsko tkivo).^{33,34}

Općenito, postoje tri različite klase aldolaza: I, IA i II,³⁵ čije su osnovne karakteristike prikazane u tablici 4. Aldolaze klase I uglavnom su prisutne kod životinja i viših biljaka te tipično tvore homotetramere ukupne molekulske težine ~ 160 kDa.^{36,35} Nadalje, koriste ostatke lizina unutar aktivnog mjesta za stvaranje stabilizirajućeg međuprodukta Schiffove baze sa supstratom.³⁴ Ne inhibira ih prisutnost etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), no inaktiviraju se redukcijom s NaBH u prisutnosti supstrata.³⁶ Klasa IA odnosi se na aldolaze koje imaju sličan mehanizam djelovanja kao aldolaze klase I te postoje kao homoktameri, dekameri ili čak

viši oligomeri. Također, može ih se pronaći u arhejama. S druge strane, aldolaze klase II tipično tvore homodimere ukupne molekularne težine ~ 78 kDa, a mogu tvoriti i tetramere i oktamere. Ova klasa aldolaza uglavnom je zastupljena u nižim eukariotima, gljivama i bakterijama.³⁵ Nasuprot aldolazama klase I, ove aldolaze nisu inaktivirane redukcijom s NaBH u prisutnosti ili odsutnosti supstrata. No, s obzirom da ih inhibira EDTA, za njihovo djelovanje potreban je kofaktor metalnih iona.³⁶ U najviše slučajeva se oslanjaju na dvovalentne ione, konkretno Zn²⁺.³⁵

Tablica 4. Osnovne karakteristike pojedine klase aldolaza³⁵

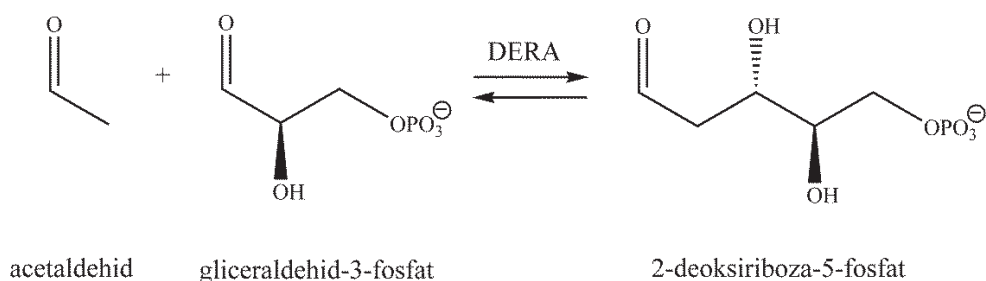
Klasa aldolaza	Organizmi	Karakteristike	
		Mehanizam djelovanja	Struktura
I	Viši eukarioti (biljke, životinje), neke protozoe (npr. <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania donovani</i>), neke bakterije, neke alge	Schiffova baza tvori supstrat intermedijer	Tipično tvori homotetramere, sadrži TPI β/α-proteinsko savijanje
IA	Arheje (npr. <i>Thermoproteus tenax</i> , <i>Pyrococcus furiosus</i>)	Schiffova baza tvori supstrat intermedijer	Tipično tvori homoktamere/dekamere/više oligomere, sadrži TPI β/α-proteinsko savijanje
II	Niži eukarioti, neke protozoe (npr. <i>Giardia lamblia</i>), plijesni, kvasci, većina bakterija, neke arheje	Divalentni ion tvori supstrat intermedijer, ovisi o metalnom kofaktoru	Tipično tvori homo-dimere, sadrži TPI β/α-proteinsko savijanje

* TPI – trioza-fosfat izomeraza

2.3.1. 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza (DERA)

Enzim 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza, skraćenog naziva DERA, pripada aldolazama klase I.³² Ova se aldolaza sastoji od 259 aminokiselina, molekulske mase 27,7 kDa.³⁷ Budući da se nalazi u svim carstvima živog svijeta, uključujući psihrofilne i hipertermofilne organizme, predstavlja prikladan modelni sustav za proučavanje prilagodbe na ekstremne temperature.³⁸ Kod ljudi se najviše izražava u stanicama pluća i jetre te je ovaj enzim uključen u odgovor na stres odgađanjem ili minimiziranjem oštećenja u tim stanicama. Pomoću rendgenskih analiza strukture enzima DERA, otkriven je tipičan oblik TPI (α/β)8-proteinsko savijanje. Nadalje, DERA postoji u obliku dimera u kristalnoj strukturi. Uspoređujući kristalne strukture ovog enzima iz različitih organizama, primijećeno je da molekula vode postoji u svim kristalnim strukturama, što ukazuje na njenu značajnost u katalitičkom mehanizmu.³⁷

DERA katalizira reverzibilnu adiciju donorske molekule acetaldehida na akceptor gliceraldehid 3-fosfat te stereoselektivno stvara molekulu 2-deoksiriboza-5-fosfat (slika 7).^{32,39} Za razliku od ostalih aldolaza klase I, DERA kao prirodni donor prihvaća i aldehyd, a prednost imaju molekule manje veličine.^{39,37} Za aktivnost enzima ključna je konfiguracija ugljika akceptora C2. Polarne skupine na tom aktivnom mjestu daju prednost D-izomerima nad L-izomerima, dok hidrofobne skupine na istom položaju pokazuju obrnutu enantioselektivnost.³⁷



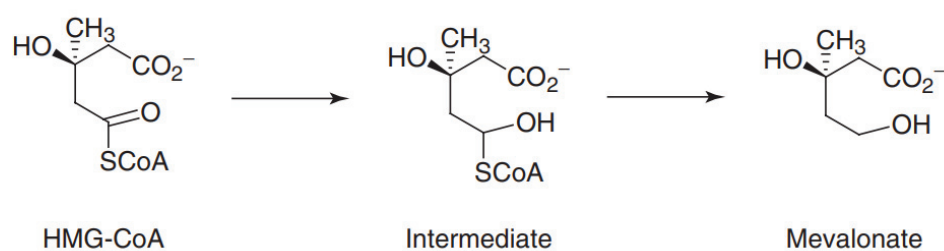
Slika 7. Primjer reakcije aldolne adicije katalizirane enzimom DERA

Svoju industrijsku primjenu DERA pronalazi u brojnim reakcijama poput sinteze lijekova protiv raka.³⁹ Osim toga, ova aldolaza može katalizirati sekvencijalne aldolne reakcije dajući 2,4,5-trideoksiheksoze, vrijedne međuprodukte za proizvodnju atorvastatina i ostalih lijekova za snižavanje kolesterola u krvi.³⁷

U sklopu ovog diplomskog rada, korišten je enzim DERA⁰²⁴ proizvođača *Prozomix*.

2.4. Statini

Koronarna bolest srca, posljedica taloženja i zadržavanja kolesterola u arterijskim stijenkama, vodeći je uzrok obolijevanja i smrtnosti u razvijenim zemljama, a njezina učestalost i dalje raste.^{40,41} Lipoproteini su ključni pokretači te bolesti, a najčešće propisivani lijekovi za snižavanje lipida su statini.^{41,42} Statini djeluju tako da inhibiraju enzim hidrosimetilglutaril-koenzim A (HMG-CoA) reduktazu, čime sprječavaju pretvorbu HMG-CoA u mevalonat, što u konačnici ograničava brzinu biosinteze kolesterola (slika 8).⁴⁰



Slika 8. Reakcija katalizirana HMG-CoA reduktazom⁴³

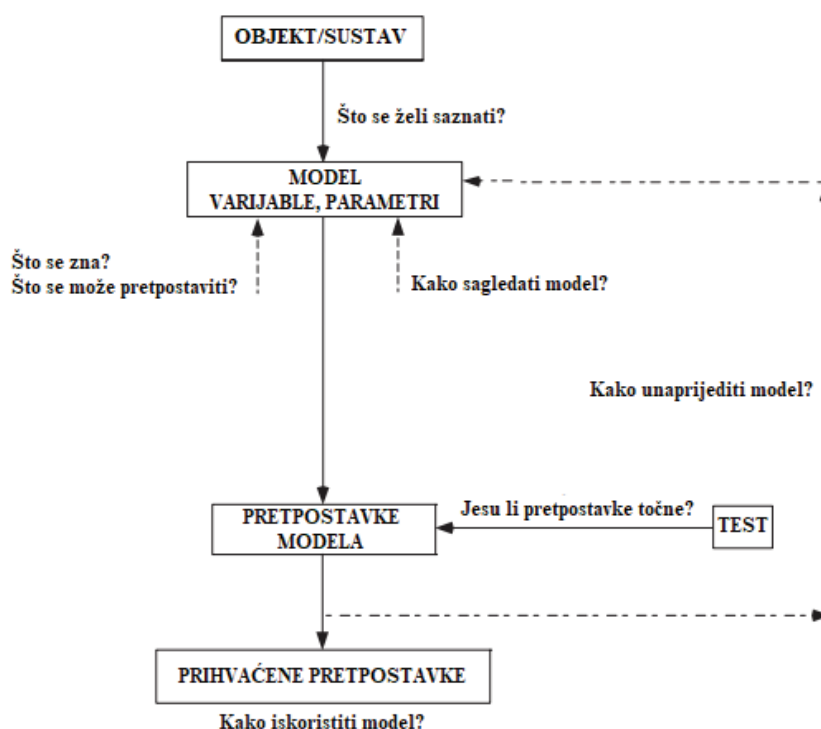
Identificirane su dvije opće klase statina: raniji statini na bazi prirodnih proizvoda (mevastatin, lovastatin, simvastatin, pravastatin) i novija generacija sintetičkih statina (atorvastatin, fluvastatin, cerivastatin, rosuvastatin, pitavastatin).⁴³ Iako svi statini djeluju na sličan način, razlikuju se po svojim kemijskim strukturama, farmakokinetičkim profilima i učinkovitosti modificiranja lipida.⁴² Nadalje, funkcionalna razlika između prirodnih i sintetičkih statina odnosi se na njihovu sposobnost interakcije i inhibicije HMG-CoA reduktaze te lipofilnost. Sintetski statini stvaraju više interakcija s HMG-CoA reduktazom zbog svojih strukturnih karakteristika.⁴⁰ Spomenuti prirodni statini imaju poluvrijeme eliminacije od 1 do 3 sata, dok su za sintetske statine karakteristična poluvremena eliminacije u rasponu od 1 sata za fluvastatin do 19 sati za rosuvastatin. Atorvastatin, simvastatin, lovastatin, fluvastatin, cerivastatin i pitavastatin su relativno lipofilni spojevi, što ih čini osjetljivijima na metabolizam putem sustava citokroma P450, osim pitavastatina, koji se podvrgava ograničenom metabolizmu ovim putem. S druge strane, pravastatin i rosuvastatin su relativno hidrofilni i ne metaboliziraju se značajno pomoću enzima citokroma P450.⁴²

2.5. Matematičko modeliranje enzimskih reakcija

2.5.1. Uvod u matematičko modeliranje

Matematičko modeliranje predstavlja proces opisivanja određenog sustava pomoću matematičkih koncepta. Cilj razvijanja matematičkog modela je omogućiti bolje razumijevanje, predviđanje i opisivanje pojava. S obzirom na složenost svojstava određenih fizičkih sustava, poput kemijske reakcije, matematički su modeli aproksimacije tih svojstava. Iako ne uključuju sva detaljna svojstva sustava koje modeliraju, dobro razvijeni matematički modeli pružaju rješenja koja su dovoljno bliska stvarnim promatranjima.^{44,45}

Vizualan prikaz osnovnog pristupa matematičkog modeliranju prikazan je slikom 9. Jedan od ključnih aspekata matematičkog modeliranja je pronalaženje uzročno-posljedičnih veza između ulaznih parametara i promatranog fenomena. Ovaj proces omogućuje stvaranje povezanosti između varijabli te daje uvid u utjecaj različitih faktora na promatrani sustav. Kroz upotrebu matematičkog jezika, moguće je zapisati pretpostavke i veze koje vladaju u sustavu, što omogućuje primjenu matematičke teorije i raznih računalnih tehnika za rješavanje problema.^{45,46}



Slika 9. Shematski prikaz pristupa matematičkom modeliranju⁴⁷

Važno je napomenuti da svaki matematički model ima svoje granice i da ne može u potpunosti opisati sve aspekte stvarnog sustava. Ipak, pažljivim razvojem i validacijom matematičkog modela, moguće je dobiti vrijedne uvide u ponašanje sustava te predviđati njegovo ponašanje u različitim uvjetima. Konačno, matematičko modeliranje ima široku primjenu u različitim područjima, od prirodnih znanosti do inženjerstva, što doprinosi boljem razumijevanju svijeta oko nas i sposobnosti rješavanja kompleksnih problema.^{7,46,44}

2.5.2. Modeliranje enzimskih reakcija

Matematičko modeliranje moguće je primijeniti u području biokatalize za simulaciju enzimskih reakcija s različitim uvjetima. Varijacijom procesnih značajki procesa poput tipa reaktora te dotoka supstrata i/ili enzima, pridonosi se optimizaciji procesa. Također, modeliranje je koristan alat u procjeni ekonomičnosti procesa i njegovog utjecaja na okoliš. Na industrijskoj razini, matematički modeli korisni su u smislu pronalaženja najisplativijeg načina biosinteze određenog proizvoda.^{48,49}

Većina se dinamičkih sustava može aproksimirati putem različitih vrsta diferencijalnih i integralnih jednadžbi koje obuhvaćaju konačan broj varijabli i parametara. Konkretno, pri modeliranju kinetike enzima, često se koriste obične i parcijalne diferencijalne jednadžbe. Ponašanje sustava može se predvidjeti ukoliko su poznati parametri kinetičkog modela i početna stanja varijabli. Nadalje, neophodno je uspostaviti jasnu vezu između brzine reakcije i tipa reaktora, što uključuje korištenje kinetičkog modela za opis ukupne brzine reakcije i ravnotežne jednadžbe, specifične za tip reaktora.^{50,6}

Kako bi se potvrdila točnost kinetičkog modela, bitno je usporediti podatke dobivene iz eksperimenata šaržnog reaktora sa simuliranim rezultatima izvedenim numeričkom integracijom. Ovaj proces provjere valjanosti osigurava pouzdanost predviđanja modela. Uz to, istraživanje ponašanja reaktora u uvjetima nestabilnog stanja ključno je zbog uvida u stabilnost sustava i njegovu otpornost na potencijalne sustavne smetnje, poput varijacija u protoku ili koncentraciji onečišćujuće tvari. Razvoj dinamičkog modela za određeni proces pokazao se temeljnim alatom u izradi učinkovite strategije kontrole kvalitete procesa, omogućavajući bolje upravljanje i optimizaciju enzimskog reakcijskog sustava.⁶

2.5.3. Enzimski reakcijska kinetika

Enzimski reakcijska kinetika je disciplina koja proučava brzinu odvijanja reakcije katalizirane enzimom te uključuje kvantitativnu analizu svih čimbenika koji utječu na katalitičku sposobnost enzima. Aktivnost enzima podrazumijeva maksimalni katalitički

potencijal, a na njega mogu utjecati: koncentracije enzima i supstrata, temperatura i pH-vrijednost. Proučavanje brzine reakcije i njezine povezanosti s dostupnom količinom supstrata bitno je za razumijevanje djelovanja enzima.^{51,6}

Enzimske reakcije odstupaju od izravne primjene zakona o djelovanju mase i brzine. Brzina reakcije raste povećanjem koncentracije supstrata do određene točke. Pri visokim koncentracijama supstrata, reakcija postiže najveću brzinu zbog zasićenja enzima. Ovo je u suprotnosti sa zakonom djelovanja mase, koji obično predviđa kontinuirani porast brzine reakcije s koncentracijom supstrata. Victor Henri predstavio je prvu korisnu jednadžbu za opisivanje takvih reakcija. Henrijeva jednadžba razmatrala je nekoliko svojstava enzima, kao što je njihova visoka specifičnost za određene supstrate, zaštitni učinak supstrata protiv inaktivacije enzima toplinom te hiperbolički odnos uočen između početne brzine i koncentracije supstrata. Sva ova svojstva ukazuju na uključenost kompleksa enzim-supstrat. Slijedeći Henrijev rad, kasniji istraživači, poput Michaelisa i Mentena, potvrdili su i dalje razvili njegovu jednadžbu.^{52,53}

2.5.3.1. Michaelis-Menteničina kinetika

Najosnovniji i široko korišten model u biokemiji za opisivanje kinetike enzima je model koji su predložili Michaelis i Menten 1913. godine. Ovaj se model temelji na pretpostavci da se enzim veže sa supstratom kako bi formirao međukompleks, koji zatim disocira dajući konačni produkt te oslobađa enzim u njegovom izvornom stanju.⁵² Naveden proces u slučaju jednosupstratne reakcije prikazan je jednadžbom 1:



gdje se k_1 , k_{-1} i k_2 odnose na konstante brzine odgovarajuće reakcije, dok E, S, ES i P podrazumijevaju enzim, supstrat, međuprodukt enzim-supstrat i produkt. Iz jednadžbe 1 također je moguće primijetiti povrativost samo prvog koraka reakcije, što se pripisuje pretpostavci kontinuiranog odvođenja produkta.

Ukoliko se koristi mala količina enzima uz određen supstrat, tada brzina katalizirane reakcije ovisi o koncentraciji supstrata i početnoj brzini, prikazano jednadžbom 2.

$$r = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m + c_S} \quad (2)$$

Navedena jednađba opisuje Michaelis-Menteničinu kinetiku, gdje su:

r – brzina potrošnje supstrata [mM/min]

V_m – maksimalna brzina reakcije [mM/min]

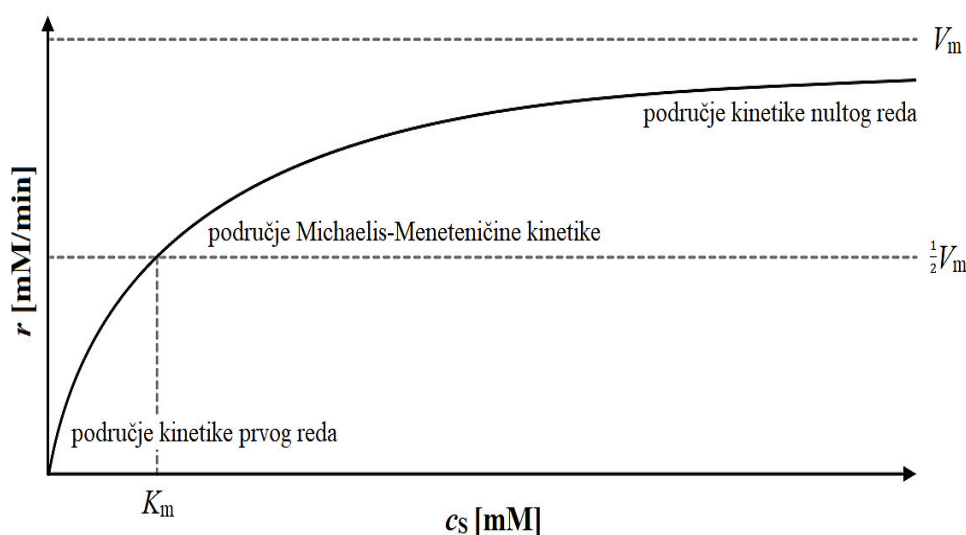
c_S – koncentracija supstrata [mM]

K_m – Michaelis-Menteničina konstanta [mM].

Ključni parametri Michaelis-Menteničine kinetike V_m i K_m opisani su jednađbama 3 i 4 te grafički prikazani slikom 10.

$$V_m = k_{-1} \cdot c_{E0} \quad (3)$$

$$K_m = \frac{k_{-1}k_2}{k_1} \quad (4)$$



Slika 10. Pravokutna hiperbolična ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata

Iz grafičkog prikaza ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata (slika 10) vidljiva su tri svojstvena područja: kinetika prvog reda, Michealis-Menteničina kinetika i kinetika nultog reda. U slučaju niske koncentracije supstrata ($c_S < K_m$) navedena se ovisnost nalazi u području kinetike prvog reda, dok se pri visokoj koncentraciji supstrata ($c_S > K_m$) ova ovisnost pomiče u područje kinetike nultog reda. Kada koncentracija supstrata odgovara Michaelis-Menteničinoj konstanti ($c_S = K_m$), brzina reakcije jednaka je polovičnoj vrijednosti maksimalne brzine reakcije ($r = \frac{1}{2}V_m$). Stoga, početna karakterizacija enzima uključuje

određivanje Michaelis-Menteničine konstante, koja ovisi o supstratu, konstantama brzina reakcija (k_1 , k_{-1} i k_2) te o uvjetima okoline poput pH-vrijednosti i temperature.^{52,54}

Dvosupstratna kinetika, konkretno prisutna u eksperimentalnom dijelu ovog rada, opisana je vrlo složenim mehaničkim modelima i temelji se na mehanizmu reakcije koji se odnosi na početnu brzinu reakcije. Stvaran oblik jednadžbi intrinzične početne brzine reakcije ovisi o mehanizmu enzimskih transformacija, a sam kinetički model sadrži značajan broj parametara.⁵⁴ Michaelis-Menteničina jednadžba za ovaj slučaj opisuje se jednadžbom 5.

$$r = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) \cdot (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (5)$$

2.5.3.2. Enzimaska inhibicija

Velik broj farmakološki važnih spojeva djeluju kao inhibitori enzima, a modeliranje kinetike procesa inhibicije može pružiti važne informacije poput načina interakcije inhibitora s enzimom.⁵⁵

Ovisno o načinu interakcije između inhibitora, supstrata i enzima, postoji nekoliko oblika inhibicije:

- Kompetitivna inhibicija – Inhibitor se veže samo na slobodni enzim, što onemogućuje vezanje enzima za supstrat te posljedično uklanja njegovu katalitičku aktivnost, odnosno smanjuje brzinu reakcije i povećava Michaelis-Menteničinu konstantu.
- Nekompetitivna inhibicija – Inhibitor se veže i na slobodni enzim i na kompleks enzim-supstrat te posljedično uklanja katalitičku aktivnost nastalog kompleksa, odnosno smanjuje brzinu reakcije.
- Antikompetitivna inhibicija – Inhibitor se veže samo na kompleks enzim-supstrat te posljedično uklanja katalitičku aktivnost nastalog kompleksa.
- Djelomična inhibicija – Slična nekompetitivnoj inhibiciji uz razliku u prisutnosti djelomične katalitičke aktivnosti nastalog kompleksa. Međutim, ovakav tip inhibicije je relativno rijedak.

Jednadžbe za izračun brzine reakcije u prisustvu kompetitivnog, nekompetitivnog i antikompetitivnog inhibitora dane su jednadžbama 6, 7 i 8:

$$r = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_i}\right) + c_S} \quad (6)$$

$$r = \frac{V_m \cdot c_S}{(c_S + K_m) \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_i}\right)} \quad (7)$$

$$r = \frac{V_m \cdot c_S}{c_S \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_i}\right) + K_m} \quad (8)$$

gdje se c_I odnosi na koncentraciju određenog inhibitora [mM], a K_i na konstantu inhibicije [mM].^{56,11}

2.5.3.3. Enzimska deaktivacija

Deaktivacija enzima ireverzibilna je promjena koja se uglavnom pripisuje mehanizmima povezanim s reaktorom, komponentama medija ili samim proteinom. Ova pojava može biti inducirana kemijskim procesima poput oksidacije, racemizacije i kondenzacije te radnim uvjetima enzima, kao što su temperatura i pH-vrijednost sustava.⁵⁷

Kinetika deaktivacije enzima često je prvog reda (jednadžba 9). Inicijalno, aktivno stanje enzima (E) deaktivira se u potpunosti (E_d) konstantom deaktivacije k_d . Jednadžbama 10 i 11 opisana je kinetika deaktivacije enzima.⁵⁸



$$\frac{dc_E}{dt} = -k_d \cdot c_E \quad (10)$$

$$c_E = c_{E0} \cdot e^{-k_d t} \quad (11)$$

2.5.4. Reaktorski modeli

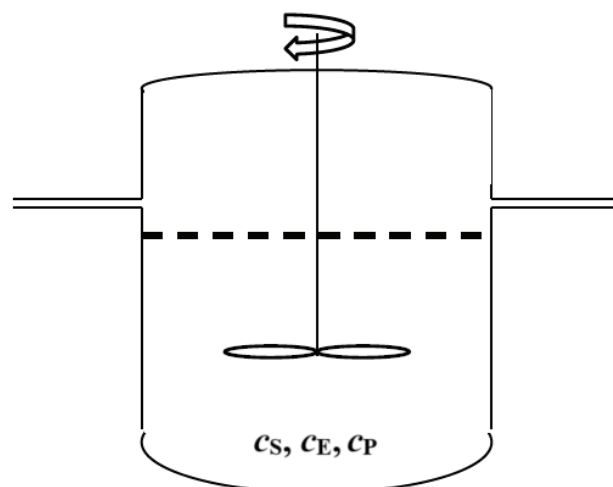
Osim predviđanja brzina različitih reakcija, kemijska kinetika omogućuje predviđanje selektivnosti i brzine proizvodnje te je stoga neophodan alat u modeliranju i dizajnu kemijskih reaktora. Prije razvijanja novog kemijskog procesa, potrebna je određena indikacija učinkovitosti reaktora kako bi se omogućila ekonomska procjena projekta u cjelini.^{59,60}

Jedan od osnovnih ciljeva projektiranja reaktora jest proizvesti određeni proizvod zadanom brzinom iz poznatih reaktora. Sa svrhom postizanja optimalnih rezultata, potrebno je riješiti dva pitanja. Prvo i osnovno, odabir tipa reaktora i njegov način rada – pažnja se obraća činjenici je li proces šaržni ili kontinuirani te hoće li reaktor raditi u izotermnim, adijabatskim ili nekim drugim uvjetima. Sljedeće, proučava se fizičko stanje reaktanata na ulazu u reaktor. Ovisno o tome, određuju se osnovni uvjeti obrade u smislu tlaka, temperature i sastava reaktanata na ulazu u reaktor. Naposljetku, vodi se računa o sljedećim glavnim značajkama reaktora:

- ukupna veličina reaktora, njegova opća konfiguracija i dimenzije unutarnjih struktura,
- točan sastav i fizičko stanje proizvoda na izlazu iz reaktora,
- temperatura unutar reaktora i prijenos topline,
- radni tlak i pad tlaka povezan s protokom reakcijske smjese.⁶⁰

2.5.4.1. Kotlasti reaktor

Kotlasti ili šaržni reaktor (slika 11) podrazumijeva provođenje reakcije bez dodavanja reaktanata ili uklanjanja produkta uz idealno miješanje. Rad unutar reaktora je u nestacionarnom stanju – volumen se puni reakcijskom smjesom koja sadrži supstrat te se dodaje enzim za početak reakcije. Dakle, supstrat se troši s vremenom, dok se istovremeno količina produkta povećava. Enzim se inaktivira i uklanja, ako je otopljen u reakcijskom mediju, a ukoliko je imobiliziran, zadržava se unutar reaktora, ispire te priprema za sljedeću šaržu.^{61,6}



Slika 11. Shematski prikaz kotlastog reaktora⁶²

S obzirom da u kotlastom reaktoru nema ulaza i izlaza tvari, bilanca se pojednostavljuje na slijedeći način:

$$-r \cdot V_r = \frac{dc_S}{dt} \quad (12)$$

gdje je V_r ukupan volumen reaktora [dm^3]. Ukoliko se uzme u obzir pretpostavka stalnog reaktorskog volumena, jednadžbu 12 moguće je dodatno pojednostaviti do jednadžbe 13.

$$-r = \frac{dc_S}{dt} \quad (13)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uređaji za mjerenje

3.1.1. Analitička vaga

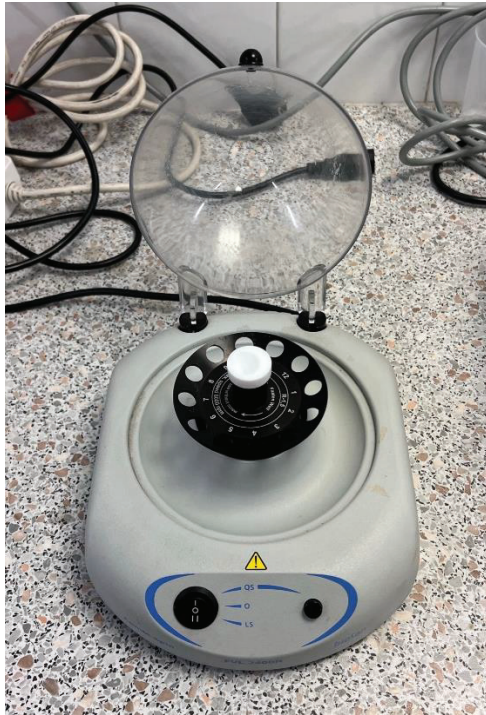
Mjerenje mase svih uzoraka u čvrstom agregatnom stanju provodilo se na *Shimadzu* analitičkoj vagi (slika 12).



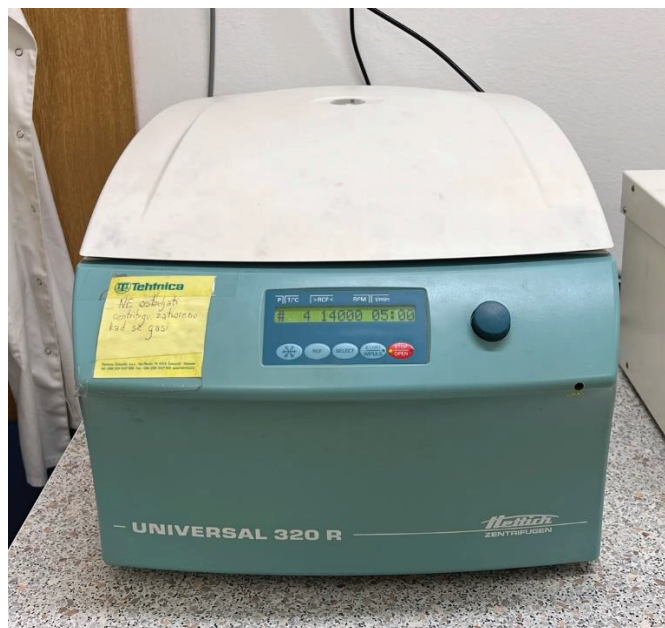
Slika 12. Analitička vaga proizvođača *Shimadzu*

3.1.2. Centrifuga

Za centrifugiranje uzoraka, odnosno razdvajanje enzima ili zaostalog nosioca od reakcijske otopine, korištene su centrifuge *Biosan Combi-spin FVL-2400N* i *Hettich Universal 320R* (slike 13 i 14). Na prvom su se uređaju centrifugirali uzorci između procesa aktivacije nosioca i imobilizacije enzima 30-ak sekundi pri sobnim uvjetima, dok se na drugom centrifugiranje odvijalo pri 14000 o/min i 4 °C.



Slika 13. Centrifuga *Combi-spin FVL-2400N* proizvođača *Biosan*



Slika 14. Centrifuga *Universal 320R* proizvođača *Hettich*

3.1.3. Homogenizator

Za homogeniziranje uzoraka korišten je uređaj *DLAB MX-S* (slika 15).



Slika 15. Homogenizator *MX-S* proizvođača *DLAB*

3.1.4. Liofilizator

Sušenje nosioca provelo se u liofilizatoru *LABCONCO Free Zone* (slika 16).



Slika 16. Liofilizator *Free Zone* proizvođača *LABCONCO*

3.1.5. Spektrofotometar

Za određivanje koncentracije proteina Bradford metodom korišten je spektrofotometar *Shimadzu UV 1701* (slika 17).



Slika 17. Spektrofotometar *UV-1800* proizvođača *Shimadzu*

3.1.6. Termostatirana tresilica

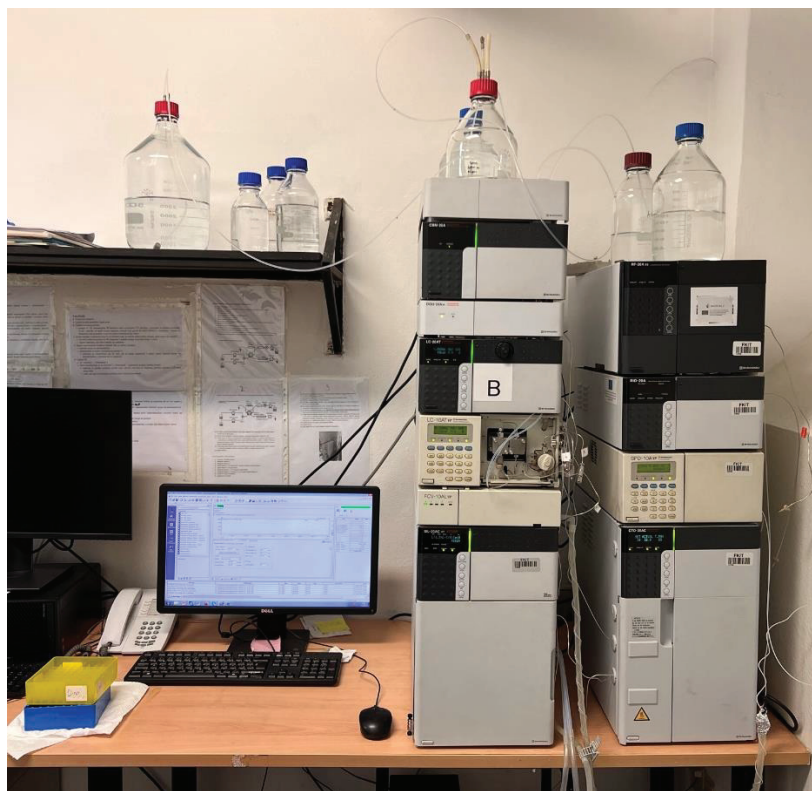
Za termostatiranje i miješanje uzoraka tijekom aktivacije nosioca, imobilizacije enzima i provođenja reakcija korištena je tresilica *Eppendorf Thermomixer C* (slika 18) pri 900 o/min.



Slika 18. Termostatirana tresilica *Eppendorf Thermomixer C* proizvođača *Eppendorf*

3.1.7. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

Shimadzu HPLC uređaj (slika 19) korišten je za određivanje koncentracija supstrata i produkata.

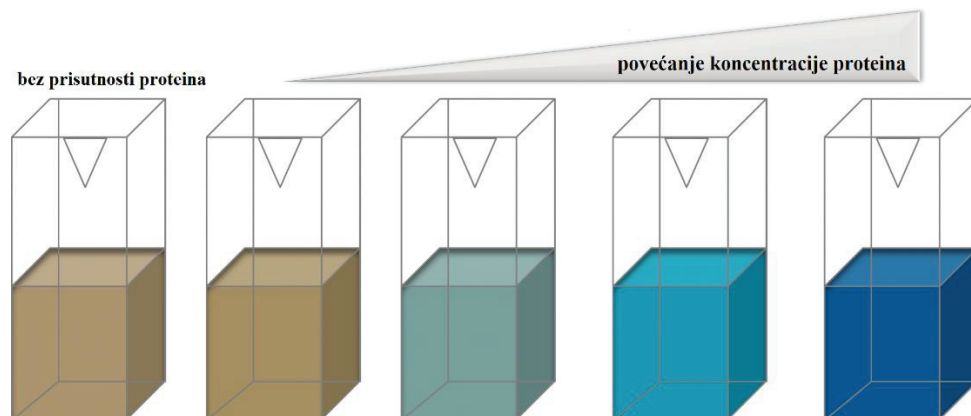


Slika 19. HPLC uređaj proizvođača *Shimadzu*

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Određivanje koncentracije proteina Bradfordovom metodom

Metoda po Bradfordu korištena je kako bi se odredila koncentracija proteina u uzorku enzima, potrebna za izračun učinkovitosti imobilizacije enzima. Temelj metode je reakcija između proteina u otopini enzima i Bradfordovog reagensa (boje *Coomassie Blue G-250* ili CBB) u kiselom okruženju. Protein i CBB se vežu pomoću hidrofobnih i ionskih veza, što dovodi do stabilizacije boje u obliku aniona te posljedično uzrokuje određenu nijansu boje između smeđe i plave. Što je veća koncentracija proteina u uzorku, više je interakcija s CBB, a time i tamnija otopina modrije boje (slika 20). Navedeni proces prati i promjena apsorpcijskog maksimuma boje, što se određuje spektrofotometrijski.



Slika 20. Promjena boje otopine povećanjem koncentracije proteina⁶³

Prije samog određivanja koncentracije proteina potreban je baždarni pravac iz kojeg se iščitava odnos koncentracije proteina i odgovarajuće apsorbancije. U sklopu ovog eksperimentalnog rada, baždarni pravac dobiven je mjerenjem poznatih koncentracija otopine albumina (engl. *Bovine serum albumin* – BSA) na valnim duljinama od 450 i 595 nm. Prvo je bilo potrebno pripremiti standardne otopine BSA s koncentracijama od 1, 5, 10, 15 i 20 mg/L. Potom je u plastične kivete dodano 500 μ L standardne otopine određene koncentracije i 500 μ L Bradfordovog reagensa. Nakon inkubacije od 10 min na sobnoj temperaturi, otopine su dobile plavo obojenje različitog intenziteta, ovisno o koncentraciji BSA. Apsorbancije su očitane na *Shimadzu* spektrofotometru *UV-1800* te pomoću dobivenih rezultata napravljen baždarni pravac, dan u prilogu 1. Na isti su način očitane apsorbancije realnih uzoraka enzima, pri čemu su uzorci razrijeđeni do odgovarajućih koncentracija kako bi se mjerene vrijednosti bile unutar granica detekcije i kvantifikacije. Koncentracije proteina određene su pomoću jednadžbe baždarnog pravca.

3.2.2. Određivanje koncentracije supstrata, međuprodukta i produkta

Metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti korištena je da bi se odredile koncentracije supstrata i produkata, točnije acetaldehida, kloroacetaldehida, 4-kloro-3-hidroksibutanala i 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala. Prije mjerenja, uzorci su derivatizirani kako bi se omogućila detekcija UV detektorom. Derivatizacijska otopina sastoji se od 0,02 mg/L *o*-benzilhidroksilamin hidroklorida u smjesi piridina, metanola i vode (u omjeru 33:15:2). 5 μ L uzorka miješalo se s 50 μ L derivatizacijske otopine na tresilici *Eppendorf Thermomixer C* tijekom 20 min pri 25 °C, nakon čega se dodalo 350 μ L metanola za zaustavljanje reakcije. Potom je uslijedilo centrifugiranje uzoraka u *Hettich* centrifugi *Universal 320R* 5 min pri odgovarajućim uvjetima. Naposljetku, uzorci su analizirani na koloni *Phenomenex Kinetex RP*

(C18, 5 μm , 250 x 4.6 mm, 100 \AA) u trajanju od 18 min pri 30 $^{\circ}\text{C}$ i valnoj duljini od 215 nm. Kao pokretna faza, upotrijebljena je trifluoroctena kiselina otopljena u vodi (eluent A) i acetonitrilu (eluent B). Protok pokretne faze iznosio je 1,5 mL/min. Na temelju retencijskih vremena supstrata, međuprodukta i produkta identificiranih na kromatogramu, izračunata je nepoznata koncentracija acetaldehida i kloroacetaldehida uz pomoć odgovarajućih baždarnih pravaca. Primjer kromatograma dan je prilogom 2, a baždarni pravci acetaldehida i kloroacetaldehida priložima 3 i 4.

3.3. Proces imobilizacije enzima DERA

3.3.1. Sinteza magnetskih nanočestica i oblaganje silikom

Za sintezu magnetskih nanočestica je bilo potrebno otopiti 3,2 g $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ u 50 mL etilen glikola zajedno s prethodno dodanim 7,7 g natrijevog acetata radi sprječavanja aglomeracije. Dobivena smjesa je potom temeljito miješana tijekom 30 min, nakon čega je žarena u autoklavu tijekom 3 h na 200 $^{\circ}\text{C}$ te dodatnih 8 h pri dostignutoj konstantnoj temperaturi. Nakon toga, precipitat se odvojio etanolom i magnetom te je nekoliko puta ispran etanolom. Potom je obavljeno sušenje u liofilizatoru *LABCONCO Free Zone*. Naposljetku je dobiveno 930 mg suhih magnetskih nanočestica.

Kako bi se dobivene magnetske nanočestice funkcionalizirale, 930 mg suhih čestica je pomiješano s 50 mL ultračiste vode. Zatim je u tu smjesu dodano 150 mL etanola i 1 mL tetraetil ortosilikata te je cijela mješavina tretirana u ultrazvučnoj kupelji na sobnoj temperaturi tijekom 10 min, uz postepeno dokapavanje ukupno 4,5 mL amonijaka. Cijela smjesa je miješana 12 h. Nakon ispiranja etanolom i sušenja u liofilizatoru, dobiveno je 1100 mg funkcionaliziranih magnetskih nanočestica.

3.3.2. Funkcionalizacija i aktivacija magnetskih nanočestica

Funkcionalizacija magnetskih nanočestica odvila se dodatkom 50 mL etanola i 3 mL 3-aminopropiltrioksilana, nakon čega je uslijedilo 24-satno miješanje smjese u inertoj atmosferi dušika pri 30 $^{\circ}\text{C}$ i 160 o/min.

Nakon uspješno provedene funkcionalizacije, 20 mg magnetskih nanočestica je aktivirano dodavanjem 1 mL 10 %-tnog anhidrida jantarne kiseline te miješanjem u razdoblju od 1 h pri 900 o/min i 25 $^{\circ}\text{C}$. Nakon toga, dobivene magnetne nanočestice su isprane 2-3 puta s 0,1 M fosfatnim puferom (pH 6) i aktivirane.

3.3.3. Imobilizacija enzima DERA i određivanje učinkovitosti

100 μL otopine enzima koncentracije 6 mg/mL pomiješano je s 900 μL fosfatnog pufera (pH 6,5) i 20 mg aktiviranog nosioca u tresilici pri 900 okr/min i 25 °C u razdoblju od 1,5 h. Koncentracija imobiliziranog enzima određena je iz supernatanta otopine metodom po Bradfordu. Nakon imobilizacije, enzim je ispran tri puta s 0,1 M fosfatnim puferom (pH 6) kako bi se uklonili nevezani dijelovi enzima. Učinkovitost imobilizacije izračunata je prema jednadžbi 14.

$$\text{Iskorištenje} = \frac{\text{ukupna koncentracija enzima} - \text{koncentracija enzima u supernatantu}}{\text{ukupna koncentracija enzima}} \quad (14)$$

3.3.4. Određivanje aktivnosti imobiliziranog enzima DERA

Za početak reakcije pomiješalo se 100 μL otopine fosfatnog pufera (pH 6) s imobiliziranim enzimom i 100 μL otopine aldehida. Otopina aldehida podrazumijeva smjesu 200 mM aldehida i 100 mM kloroacetaldehida. Zatim je provedeno uzorkovanje na način da se u pravilnim vremenskim razmacima miješalo 5 μL uzorka s 50 μL derivatizacijske otopine na tresilici *Eppendorf Thermomixer C* pri 900 o/min i 25 °C. Nakon 20 min dodalo se 350 μL metanola za zaustavljanje reakcije. Potom je uslijedilo centrifugiranje uzoraka u *Hettich* centrifugi *Universal 320R* 5 min pri odgovarajućim uvjetima, a uzorci su analizirani na HPLC uređaju. Iz promjene koncentracije međuprodukta 4-klor-3-hidroksibutanala i produkta 6-kloro-3,5-dihidroksi heksanala u vremenu izračunata je aktivnost enzima (Prilog 5).

3.4. Karakterizacija enzima DERA

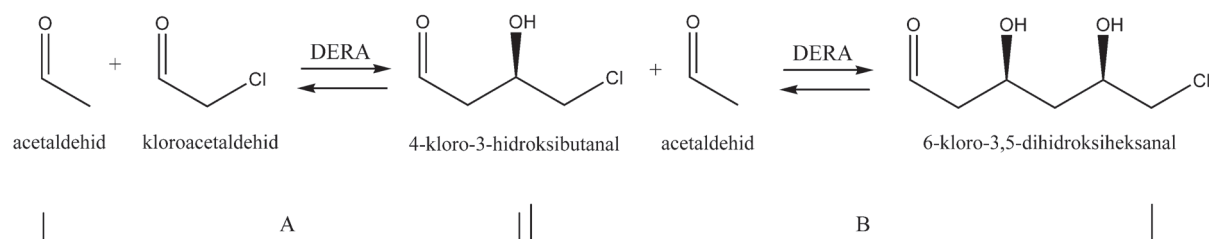
3.4.1. Određivanje kinetike enzima DERA

Metoda početnih brzina korištena je sa svrhom određivanja kinetike enzima u prvom i drugom stupnju reakcije. Sve su reakcije provedene u kotlastom reaktoru s fosfatnim puferom (pH 6) pri 25 °C.

3.4.1.1. Kinetika DERA-e u reakciji acetaldehida i kloroacetaldehida

Kinetika enzima određena je u prvom stupnju sinteze bočnog lanca statina, odnosno reakciji aldolne adicije (slika 21, A) korištenjem metode početnih brzina. U svrhu mjerenja kinetike ove reakcije provodila su se dva seta mjerenja – mijenjanje početne koncentracije acetaldehida (AA) u rasponu od 3 do 200 mM uz držanje koncentracije kloroacetaldehida (CAA) u konstantnoj vrijednosti od 140 mM te obrnuto, mijenjanje početne koncentracije CAA od 10 do 400 mM uz konstantnu koncentraciju AA od 100 mM. Koncentracija imobiliziranog

enzima iznosila je 2 mg/mL. Uzimanje uzoraka (čija je metodika opisana u poglavlju 3.3.4.) ukupno je trajalo 10 min. Koncentracija produkata je potom određena na HPLC uređaju. Brzina reakcije je za svaku pojedinu točku određivana iz promjene koncentracije međuprodukta, 4-klor-3-hidroksibutanala i produkta 6-kloro-3,5-dihidroksi heksanala u vremenu (Prilog 5).



Slika 21. Reakcija sinteze bočnog lanca statina

3.4.1.2. Kinetika DERA-e u reakciji acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala

U procesu sinteze 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala (6C-Cl), drugi je korak karakteriziran reakcijom između supstrata acetaldehida i međuprodukta 4-kloro-3-hidroksibutanala (4C-Cl), što je prikazano na slici 21, B. Proces određivanja kinetike enzima temelji se na istom principu kao i u poglavlju 3.4.1.1., samo što se u ovom slučaju pratio utjecaj promjene koncentracije supstrata uz konstantnu vrijednost koncentracije međuprodukta i suprotno. Konkretno, ispitao se utjecaj različite koncentracije AA (5 – 180 mM) uz konstantnu koncentraciju 4C-Cl (40 mM) i različite koncentracije 4C-Cl (10 - 180 mM) uz konstantnu koncentraciju AA (50 mM). Koncentracija imobiliziranog enzima iznosila je 2 mg/mL. Brzina reakcije za svaku pojedinu točku određivana je iz promjene koncentracije 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala u vremenu (Prilog 6).

3.5. Sinteza 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala u kotlastom reaktoru

Produkt 6C-Cl dobiven je reakcijom aldolne adicije provedene u kotlastom reaktoru ukupnog volumena 100 mL uz pretpostavku stacionarnog sustava te idealnog i izotermnog miješanja. Koncentracije supstrata iznosile su 100 mM u slučaju AA i 45 mM u slučaju CAA, dok je koncentracija imobiliziranog enzima iznosila 4 mg/mL. Uzorci za analizu su uzimani u pravilnim vremenskim intervalima te analizirani na HPLC uređaju. Aktivnost enzima u navedenoj reakciji određena je prema promjenama u koncentraciji supstrata i produkata na standardan način, prethodno opisan u poglavlju 3.3.4. Brzina reakcije za svaku pojedinu točku određivana je iz promjene koncentracije produkta 6-kloro-3,5-dihidroksi heksanala u vremenu (Prilog 6).

3.6. Matematički model

Za reakciju dobivanja laktola uz korištenje enzima DERA (slika 21) napravljen je matematički model, koji u sklopu kinetičkog i reaktorskog modela uključuje kinetičke i bilančne jednadžbe.

3.6.1. Kinetički model

Kinetički model izrađen je na temelju Michaelis-Menteničine kinetike. Izraz za brzinu prvog koraka reakcije aldolne adicije (slika 21, A) dan je jednadžbom 15, dok je za drugi korak (slika 21, B) dan jednadžbom 16.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_{AA} \cdot c_{CAA}}{(K_{m1}^{AA} + c_{AA}) \cdot \left(K_m^{CAA} + c_{CAA} + \frac{c_{CAA}^n}{K_{i,CAA}^n} \right)} \quad (15)$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot c_{AA} \cdot c_{4C-Cl}}{\left(K_{m2}^{AA} + c_{AA} + \frac{c_{AA}^2}{K_i^{AA}} \right) \cdot \left(K_m^{4C-Cl} + c_{4C-Cl} + \frac{c_{4C-Cl}^2}{K_i^{4C-Cl}} \right)} \quad (16)$$

U spomenutim se jednadžbama V_m odnosi na maksimalnu brzinu i K_m na Michaelis-Menteničinu konstantu određene reakcije, dok se K_i odnosi na konstantu inhibicije odgovarajuće molekule, a n na broj CAA molekula vezanih na područje inhibicije.

3.6.2. Reaktorski model

Promjene koncentracija supstrata (AA, CAA), međuprodukta (4C-Cl) i produkta (6C-Cl) dane su jednadžbama 17, 18, 19 i 20. Deaktivacija enzima DERA opisana je kinetikom drugog reda (jednadžba 21).

$$\frac{dc_{AA}}{dt} = -r_1 - r_2 \quad (17)$$

$$\frac{dc_{CAA}}{dt} = -r_1 \quad (18)$$

$$\frac{dc_{4C-Cl}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (19)$$

$$\frac{dc_{6C-Cl}}{dt} = r_2 \quad (20)$$

$$\frac{dA_{DERA}}{dt} = -k_d \times A_{DERA}^2 \quad (21)$$

3.6.3. Obrada rezultata

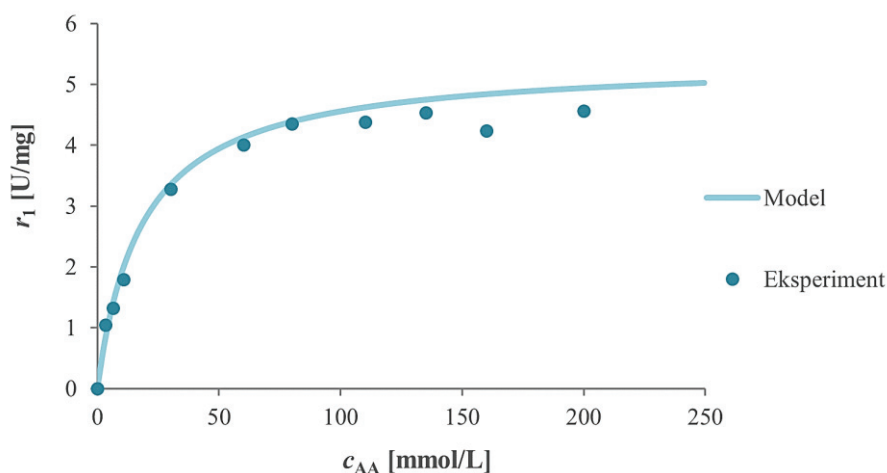
Kinetički parametri, odnosno maksimalna brzina reakcije, Michaelis-Menteničina konstanta, konstanta inhibicije i konstanta deaktivacije procijenjeni su na temelju dobivenih eksperimentalnih podataka nelinearnom regresijom simpleks metodom ili metodom najmanjih kvadrata te su korišteni za simulaciju pomoću modela. Diferencijalne jednačbe su riješene metodama koje se nalaze u sklopu programa *Scientist* (Euler, Runge Kutta IV, Bulirsch-Stoer, Episode algoritam). Na taj su način predviđene promjene koncentracija i deaktivacija enzima, opisano jednačbama 17-20. Uz to, program *Scientist* korišten je i za dobivanje statističkih parametara.

4. REZULTATI I RASPRAVA

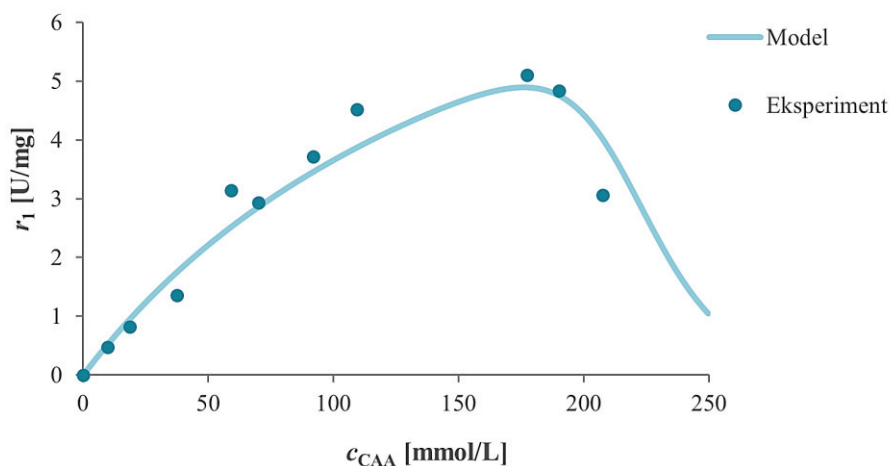
4.1. Kinetika enzima DERA

4.1.1. Kinetika enzima u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida

Kinetika enzima DERA u prvom stupnju reakcije dobivanja laktola uz variranje koncentracije jednog supstrata dok se drugi drži konstantnim grafički je prikazana slikama 22 i 23. Vidljivo je dobro slaganje eksperimentalnih podataka i modela (jednadžba 15) u oba slučaja, što potvrđuje validnost razvijenog modela. Kod grafičkog prikaza variranja koncentracije AA (slika 22) vidljiv je tipičan izgled Michealis-Menteničine krivulje, dok se u slučaju variranja koncentracije CAA (slika 23) može primijetiti pad aktivnosti, konkretno pri 180 mM. Navedeno je moguće objasniti pojavom antikompitivne inhibicije kloroacetaldehidom, tj. vezanjem inhibitora za kompleks enzim-supstrat te posljedičnim zaustavljanjem reakcije.



Slika 22. Kinetika enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Promjena početne brzine reakcije ovisno o koncentraciji AA uz konstantu koncentraciju CAA ($\gamma_{DERA} = 2$ mg/mL, 0,1 M fosfatni pufer pH 6, $c_{CAA} = 140$ mM).



Slika 23. Kinetika enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida. Promjena početne brzine reakcije ovisno o koncentraciji CAA uz konstantu koncentraciju AA ($\gamma_{DERA} = 2$ mg/mL, 0,1 M fosfatni pufer pH 6, $c_{AA} = 100$ mM).

Tablicom 5 usporedno su prikazani kinetički parametri prvog stupnja sinteze laktola za imobilizirani i čisti enzim DERA. Vidljivo je kako je vrijednost maksimalne brzine reakcije veća kod imobiliziranog enzima, što je u skladu s prethodno dobivenim rezultatima za mjerenje očuvane aktivnosti imobiliziranog enzima.^A Nadalje, moguće je uočiti da je vrijednost Michealis-Menteničine konstante manja kod AA nego CAA, što ukazuje na veći afinitet enzima za AA. Parametar n ukazuje na vezanje više molekula CAA u blizini aktivnog mjesta enzima čime dolazi do značajnog pada brzine reakcije pri višim koncentracijama ovog supstrata.

Tablica 5. Kinetički parametri enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i kloroacetaldehida

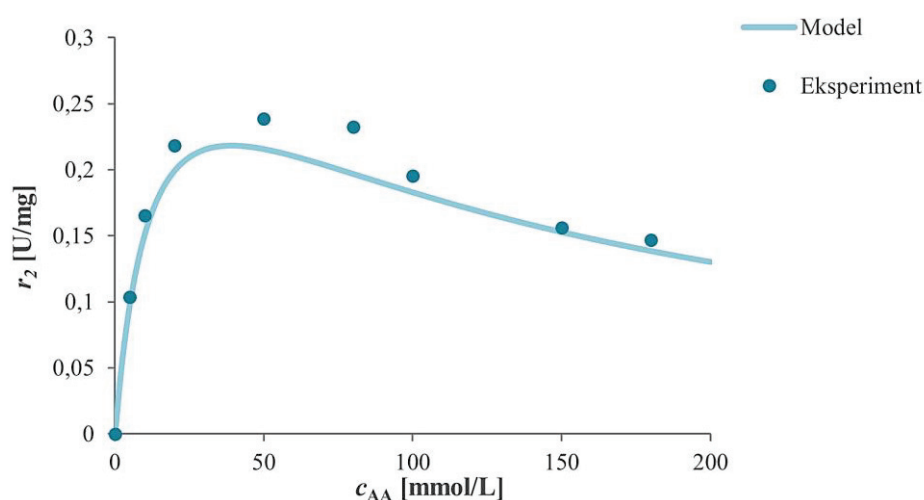
	V_{m1} [U/mg]	K_m^{AA} [mM]	K_m^{CAA} [mM]	K_i^{CAA} [mM]	n
imobilizirani enzim DERA⁰²⁴	$13,64 \pm 0,33$	$28,34 \pm 2,82$	$188,20 \pm 8,11$	$204,88 \pm 3,27$	$15,34 \pm 3,75$ (*)
čisti enzim DERA⁰²⁴ (**)	$4,72 \pm 0,63$	$5,04 \pm 0,54$	$135,59 \pm 12,11$	-	-

* Bapiro et al., 2018.⁶⁴

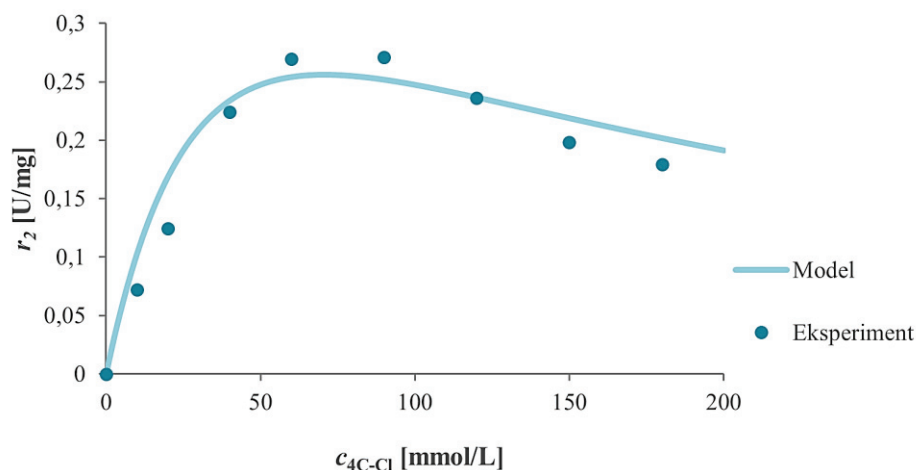
** Švarc et al., 2020.⁶⁵

4.1.2. Kinetika enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala

Kinetika enzima DERA u drugom stupnju reakcije dobivanja laktola izmjerena je uz variranje koncentracije acetaldehida i držanje koncentracije 4-kloro-3-hidroksibutanala konstantnom, te je grafički prikazana slikom 24, dok je obrnuta situacija prikazana slikom 25. Prisutno je dobro slaganje eksperimentalnih podataka i modela (jednadžba 16) u oba slučaja. Vidljiv je pad aktivnosti u obje situacije – kod povećanja koncentracije AA (~ 40 mM) i 4C-Cl (~ 60 mM). Navedeno ukazuje na prisutnost inhibicije u prisustvu oba supstrata.



Slika 24. Kinetika enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala. Promjena početne brzine reakcije ovisno o koncentraciji AA uz konstantu koncentraciju 4C-Cl ($\gamma_{\text{DERA}} = 2$ mg/mL, 0,1 M fosfatni pufer pH 6, $c_{4\text{C-Cl}} = 40$ mM).



Slika 25. Kinetika enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala. Promjena početne brzine reakcije ovisno o koncentraciji 4C-Cl uz konstantu koncentraciju AA ($\gamma_{\text{DERA}} = 2\text{mg/mL}$, 0,1 M fosfatni pufer pH 6, $c_{\text{AA}} = 50\text{ mM}$)

Kinetički parametri drugog stupnja sinteze laktola prikazani su usporedno za imobiliziran i čisti enzim DERA tablicom 6. Vrijednosti maksimalne brzine reakcije približno su iste za imobilizirani i čisti enzim DERA, s malo većim parametrom za potonji. To znači da je brzina reakcije otprilike ista bez obzira na imobilizaciju enzima. Nadalje, uspoređujući V_m vrijednosti za prvi i drugi stupanj sinteze laktola (tablice 5 i 6), može se primijetiti da je aldolna adicija AA i CAA brža reakcija. Na temelju navedenog, može se zaključiti da će prilikom sinteze laktola doći do nakupljanja određene količine međuprodukta u reaktoru što može dovesti do izraženije inhibicije i deaktivacije enzima. Što se tiče vrijednosti Michealis-Menteničinih konstanti, i u ovom se stupnju reakcije uočava manja brojčana vrijednost kod AA, odnosno veći afinitet enzima DERA za taj supstrat. Manja konstanta inhibicije za 4C-Cl ukazuje na manju koncentraciju supstrata potrebnu za pojavu inhibicije tj. veću inhibiciju enzima 4-kloro-3-hidroksibutanalom.

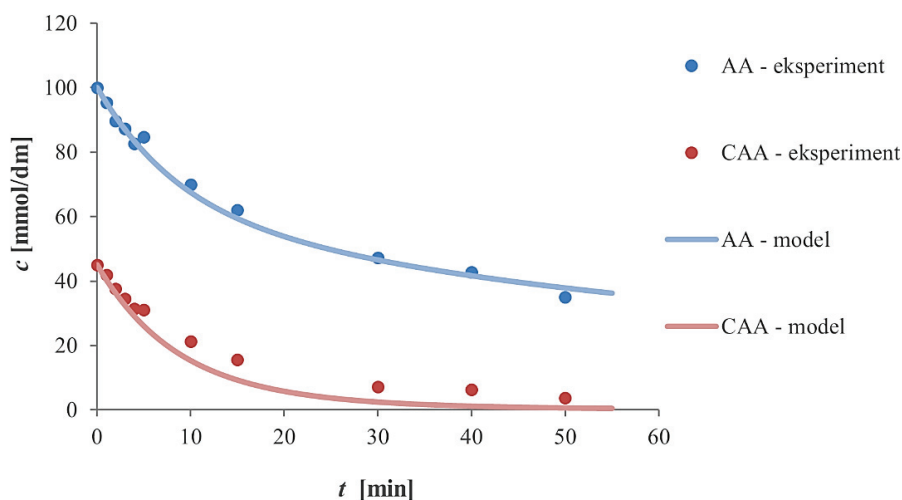
Tablica 6. Kinetički parametri enzima DERA u reakciji aldolne adicije acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala

	V_{m2} [U/mg]	K_m^{AA} [mM]	K_m^{4C-Cl} [mM]	K_i^{AA} [mM]	K_i^{4C-Cl} [mM]
imobilizirani enzim DERA⁰²⁴	1,06 ± 0,02	13,11 ± 1,52	47,90 ± 3,15	115,19 ± 9,70	103,42 ± 8,03
čisti enzim DERA⁰²⁴ (*)	1,53 ± 0,26	2,03 ± 0,28	86,26 ± 7,62	-	15,43 ± 3,75

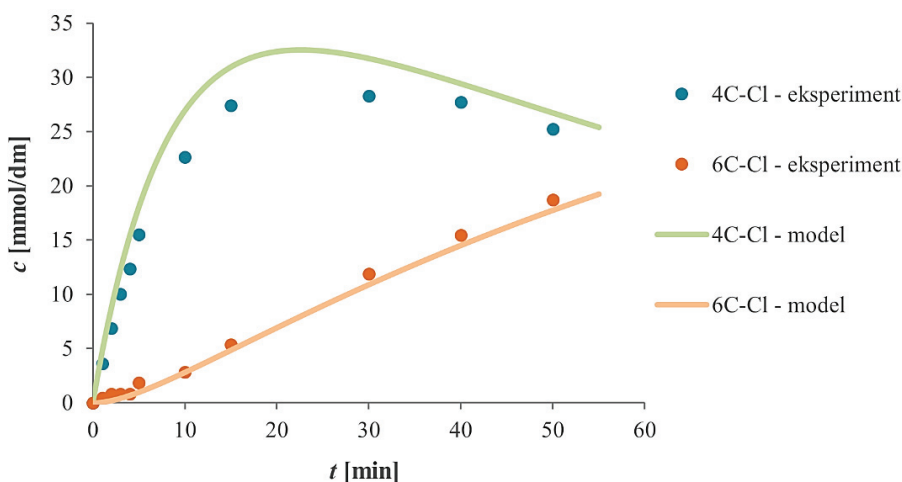
* Švarc et al., 2020.⁶⁵

4.2. Sinteza 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala aldolnom adicijom katalizirana enzimom DERA u kotlastom reaktoru

Sinteza laktola aldolnom adicijom katalizirana enzimom DERA uspješno je provedena u kotlastom reaktoru. Slikama 26 i 27 prikazana je promjena koncentracija supstrata i produkata s vremenom. Na obje je slike vidljivo dobro slaganje eksperimentalnih podataka s modelom, što potvrđuje točnost razvijenog modela. Statistički parametri iznosili su $\sigma = 1,92$ i $R^2 = 0,99$ te dodatno potvrđuju točnost modela i mogućnost njegova korištenja za daljnje optimiranje i predviđanje toka reakcije. Nadalje, postignute su konverzije od 65 % za acetaldehid i 91,68 % za kloroacetaldehid. Kao što je i očekivano, prisutan je padajući trend koncentracija oba supstrata, odnosno rastući kod produkta laktola, dok je u slučaju međuprodukta 4C-Cl moguće vidjeti oba trenda obzirom da nastaje u prvom stupnju reakcije, a troši se u drugom.

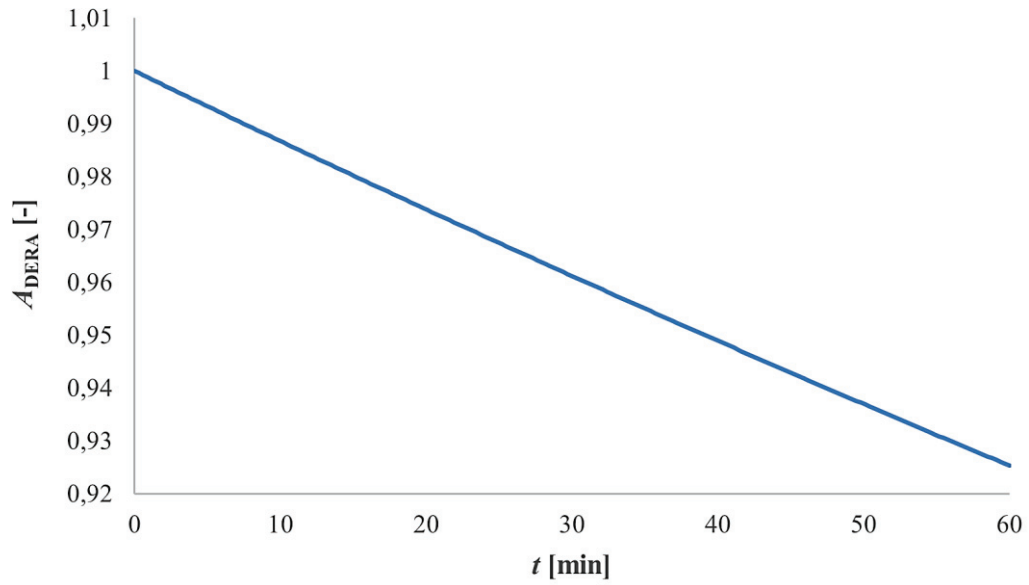


Slika 26. Vremenska promjena koncentracija supstrata pri sintezi 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala aldolnom adicijom kataliziranoj enzimom DERA u kotlastom reaktoru ($\gamma_{\text{DERA}} = 4 \text{ mg/mL}$, 0,1 M fosfatni pufer pH-vrijednosti 6, $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{CAA}} = 45 \text{ mM}$)



Slika 27. Vremenska promjena koncentracija međuprodukta i produkta pri sintezi 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala aldolnom adicijom kataliziranoj enzimom DERA u kotlastom reaktoru ($\gamma_{\text{DERA}} = 4 \text{ mg/mL}$, 0,1 M fosfatni pufer pH-vrijednosti 6, $c_{\text{AA}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{CAA}} = 45 \text{ mM}$)

Korištenjem eksperimentalnih podataka i predloženog modela u kojem je uvrštena brzina deaktivacije enzima opisana modelom drugog reda (jednadžba 21) procijenjena je konstanta deaktivacije imobiliziranog enzima DERA te je iznosila $k_d = 0,001345 \text{ min}^{-1}$. Simulacija vremenske ovisnosti aktivnosti enzima DERA grafički je prikazana slikom 28 te se može vidjeti da je imobilizirani enzim dosta stabilan, obzirom da je izgubio manje od 10 % početne aktivnosti tijekom provedbe eksperimenta. Konkretno, nakon 60 min reakcije, enzim je zadržao 92,53 % svoje aktivnosti.



Slika 28. Simulacija vremenske ovisnosti aktivnosti enzima DERA pri sintezi 6-kloro-3,5-dihidroksiheksanala aldolnom adicijom kataliziranoj enzimom DERA u kotlastom reaktoru ($\gamma_{DERA} = 4$ mg/mL, 0,1 M fosfatni pufer pH-vrijednosti 6, $c_{AA} = 100$ mM, $c_{CAA} = 45$ mM)

5. ZAKLJUČAK

Kinetika enzima DERA se mjerila za dva stupnja reakcije. Prvi je stupanj katalizirane reakcije, aldolna adicija acetaldehida i kloroacetaldehida, pokazao bolje kinetičke parametre u odnosu na istu reakciju uz čisti enzim. Konkretno, ostvarena je veća vrijednost maksimalne brzine reakcije ($13,64 \pm 0,33$ U/mg naspram $4,72 \pm 0,63$ U/mg). Drugi stupanj reakcije, odnosno aldolna adicija acetaldehida i 4-kloro-3-hidroksibutanala značajno je sporiji proces ($1,06 \pm 0,02$ U/mg naspram $1,53 \pm 0,26$ U/mg).

Matematički model korišten je kao alat za opisivanje navedene reakcije u kotlastom reaktoru te je na temelju ostvarenih eksperimentalnih podataka ($\sigma = 1,92$ i $R^2 = 0,99$) uspješno validiran. Zadržavanje aktivnosti enzima DERA uz nisku vrijednost konstante deaktivacije (92,53 % aktivnosti nakon 60 min reakcije uz $k_d = 0,001345 \text{ min}^{-1}$) potvrđuje da je primijenjena metoda imobilizacije doprinijela stabilnosti enzima.

6. LITERATURA

- [1] Lindstrom, M., DeCleene, N., Dorsey, H., et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risks Collaboration, 1990-2021. *J Am Coll Cardiol.* 2022;80(25):2372–2425. doi: 10.1016/j.jacc.2022.11.001.
- [2] Sizar, O., Khare, S., Jamil, R. T., Talati, R. Statin Medications. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430940/> (Pristup: 17.8.2023.).
- [3] Wald, N.J., Law, M. R. A strategy to reduce cardiovascular disease by more than 80 %. *BMJ.* 2003;326(7404):1419. doi: 10.1136/bmj.326.7404.1419.
- [4] Feingold, K.R., Cholesterol Lowering Drugs. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK395573/> (Pristup: 17.8.2023.).
- [5] Grabner, B., Pokhilchuk, Y., Gruber-Woelfler, H. Dera in flow: Synthesis of a statin side chain precursor in continuous flow employing deoxyribose-5-phosphate aldolase immobilized in alginate-luffa matrix. *Catalysts.* 2020;10(1):137. doi: 10.3390/catal10010137.
- [6] Illanes, A. *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications.* Springer Science & Business Media; 2008.
- [7] Wollkind, D. J., Dichone, B. J. *Comprehensive Applied Mathematical Modeling in the Natural and Engineering Sciences: Theoretical Predictions compared with Data.* Springer; 2017.
- [8] Bhatia, S. *Introduction to enzymes and their applications. U: Introduction to Pharmaceutical Biotechnology: Enzymes, proteins and bioinformatics (2)* IOP Publishing; 2018. 1-29.
- [9] Robinson, P. K. *Enzymes: principles and biotechnological applications. Essays In Biochemistry.* 2015;59(0):1–41. doi: 10.1042/bse0590001.
- [10] Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry (7)* W.H. Freeman; 2017.
- [11] Copeland, R. A., *Enzymes: Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis.* New York: John Wiley and Sons; 2000.
- [12] Creative biolabs. Hybrid protein generation for substrate specificity study. <https://www.creative-biolabs.com/hybrid-protein-generation-for-substrate-specificity-study.html> (Pristup: 17.8.2023.).

- [13] Botnam. What are enzymes: History, structure, Function. <https://botnam.com/enzymes/> (Pristup: 17.8.2023.).
- [14] Chaplin, M. F., Bucke, C. Enzyme Technology. Cambridge University Press; 1990.
- [15] Meryam Sardar, R. A. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochem Anal Biochem.* 2015;4(2). doi: 10.4172/2161-1009.1000178.
- [16] Brena, B., González-Pombo, P., Batista-Viera, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. U: Guisan, J. M., ur. *Immobilization of Enzymes and Cells: Methods in Molecular Biology* (3) 1051. Springer Science & Business Media; 2013. 15-31. doi: 10.1007/978-1-62703-550-7_2.
- [17] Datta, S., Christena, L. R., Rajaram, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* 2012;3(1):1–9. doi: 10.1007/s13205-012-0071-7.
- [18] Maghraby, Y. R., El-Shabasy, R. M., Ibrahim, A. H., Azzazy, H. M. E., Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. *ACS Omega.* 2023;8(6):5139-6125. doi: 10.1021/acsomega.2c07560.
- [19] Vaghari, H., Jafarizadeh-Malmiri, H., Mohammadlou, M., Berenjian, A., Anarjan, N., Jafari, N., Nasiri, S. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnol Lett.* 2016;38(2):223-233. doi: 10.1007/s10529-015-1977-z.
- [20] Nguyen, H. H., Kim, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Converg. Technol.* 2017;26(6):157-163. doi: 10.5757/ASCT.2017.26.6.157.
- [21] Cao, L. Covalent Enzyme Immobilization. U: *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.; 2006. 169–316. doi:10.1002/3527607668.ch3.
- [22] Yoo, Y. J., Feng, Y., Kim, Y.-H., Yagonia, C. F. J. (2017). *Fundamentals of Enzyme Engineering.* Springer; 2017. doi:10.1007/978-94-024-1026-6.
- [23] izv. prof. dr. sc. Z. Findrik Blažević, *Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu,* 2013.
- [24] Cao, L. (2005). *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Applications and Design.* WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.; 2005. doi:10.1002/3527607668

- [25] Nawaz, A.F., Zafar, S., Fatim, S. L., Shahzadi, K., Fatima, Z., Siddique, I. Use of Nanomaterials for the Immobilization of Industrially Important Enzymes. *J Nanotechnol Res.* 2021;3(4):45-57. doi: 10.26502/jnr.2688-85210023
- [26] Pawar, V., Maske, P. Khan, A., Ghosh, A., Keshari, R., Bhatt, M., et al. Responsive Nanostructure for Targeted Drug Delivery. *J. Nanotheranostics.* 2023;4(1):55-85. doi: 10.3390/jnt4010004.
- [27] Darwesh, O. M., Ali, S. S., Matter, I. A., Elsamahy, T., Mahmoud, Y. A. Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to improve industrial and environmental applications. *Methods in Enzymology.* 2020;630:481-502. doi: 10.1016/bs.mie.2019.11.006
- [28] Johnson, P. A., Park, H. J., Driscoll, A. J. Enzyme Nanoparticle Fabrication: Magnetic Nanoparticle Synthesis and Enzyme Immobilization. *Methods in Molecular Biology.* 2010;679:183–191. doi: 10.1007/978-1-60761-895-9_15
- [29] Seenuvasan, M., Vinodhini, G., Malar, C. G., Balaji, N., Kumar, K. S. Magnetic nanoparticles: a versatile carrier for enzymes in bio-processing sectors. *IET Nanobiotechnol.* 2018;12(5):535-548. doi: 10.1049/iet-nbt.2017.0041
- [30] Taguchi, K., Takagi, Y. Aldolase. *Rinsho Byori.* 2001;116:117-24.
- [31] Widersten, M. Engineering aldolases for asymmetric synthesis. *Methods in Enzymology.* 2020;664:149-167. doi: 10.1016/bs.mie.2020.07.011
- [32] Voutilainen, S., Heinonen, M., Andberg, M., Jokinen, E., Maaheimo, H., Pääkkönen, J., et al. Substrate specificity of 2-deoxy-D-ribose 5-phosphate aldolase (DERA) assessed by different protein engineering and machine learning methods. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(24):10515–10529. doi: 10.1007/s00253-020-10960-x
- [33] Berridge, B. R., Van Vleet, J. F., Herman, E. Cardiac, Vascular, and Skeletal Muscle Systems. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology (3) Elsevier Inc.;* 2013. 1567–1665. doi: 10.1016/b978-0-12-415759-0.00046-7
- [34] Arakaki, T. L., Pezza, J. A., Cronin, M. A., Hopkins, C. E., Zimmer, D. B., Tolan, D. R., et al. Structure of human brain fructose 1,6-(bis)phosphate aldolase: Linking isozyme structure with function. *Protein Science.* 2004;13(12):3077–3084. doi: 10.1110/ps.04915904

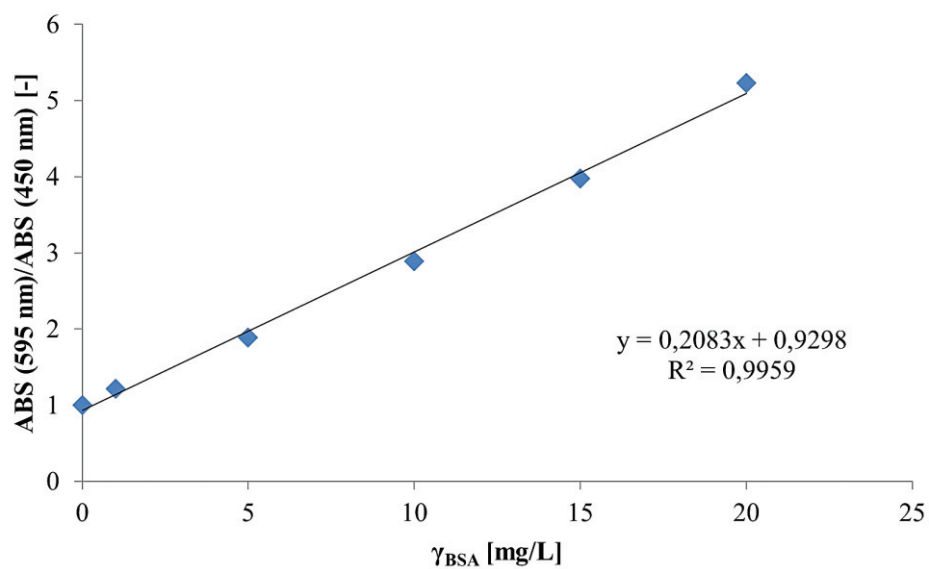
- [35] Pirovich, D. B., Da'dara, A. A., Skelly, P. J. Multifunctional Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolase as a Therapeutic Target. *Front. Mol. Biosci.* 2021;8:719678. doi: 10.3389/fmolb.2021.719678.
- [36] Horecker, B. L., Tsolas, O., Lai, C. Y. Aldolases. U: Boyer, P. D., ur. *The Enzymes* (7) Academic Press; 1972. 213–258. doi: 10.1016/s1874-6047(08)60450-3
- [37] Haridas, M., Abdelraheem, E. M. M., Hanefeld, U. 2-Deoxy-d-ribose-5-phosphate aldolase (DERA): applications and modifications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(23):9959–9971. doi: 10.1007/s00253-018-9392-8
- [38] Dick, M., Weiergräber, O. H., Classen, T., Bisterfeld, C., Bramski, J., Gohlke, H., et al. Trading off stability against activity in extremophilic aldolases. *Sci. Rep.* 2016;6(1):36431. doi:10.1038/srep17908
- [39] Chambre, D., Guérard-Hélaine, C., Darii, E., Mariage, A., Petit, J.-L., Salanoubat, M., et al. 2-Deoxyribose-5-phosphate Aldolase, a Remarkably Tolerant Aldolase towards Nucleophile Substrates. *Chem. Commun.* 2019;55:7498-7501. doi: 10.1039/c9cc03361k
- [40] Patel, M., & Kothari, C. Critical review of statins: A bio-analytical perspective for therapeutic drug monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 2017;86:206–221. doi:10.1016/j.trac.2016.10.011
- [41] Toth, P. P., Banach, M. Statins: Then and Now. *Methodist Debakey Cardiovasc J.* 2019;15(1):23–31. doi: 10.14797/mdcj-15-1-23
- [42] Schachter, M. Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update. *Fundamental and Clinical Pharmacology.* 2005;19(1):117–125. doi: 10.1111/j.1472-8206.2004.00299.x
- [43] Wang, H., Garruti, G., Liu, M., Portincasa, P., Wang, D. Q.-H. Cholesterol and Lipoprotein Metabolism and Atherosclerosis: Recent Advances In reverse Cholesterol Transport. *Ann Hepatol.* 2017;16:21-36. doi: 10.5604/01.3001.0010.5495
- [44] Bender, E. A. *An Introduction to Mathematical Modeling.* Dover Publications; 2012.
- [45] Kittrell, J. R. *Mathematical Modeling of Chemical Reactions.* Advances in Chemical Engineering. 1970;8:97–183. doi: 10.1016/s0065-2377(08)60184-2
- [46] Lee, S., Buzby, M. *Mathematical Modeling and Simulation with MATLAB.* 2021.

- [47] Dym, C. Principles of mathematical modeling (2) Academic Press; 2004.
- [48] Milčić, N., Česnik, M., Sudar, M., Findrik Blažević, Z. Primjena matematičkog modeliranja u razvoju enzimskih kaskadnih reakcija. *Kem. Ind.* 2019;68(9-10):427–436. doi: 10.15255/KUI.2019.035
- [49] Švarc, A., Fekete, M., Hernandez, K., Clapés, P., Findrik Blažević, Z., Szekrenyi, A., et al. An innovative route for the production of atorvastatin side-chain precursor by DERA-catalysed double aldol addition. *Chemical Engineering Science.* 2020;231(5):116312. doi: 10.1016/j.ces.2020.116312
- [50] Rajendran, L., Devi, M. C., Fernandez, C., Peng, Q. Mathematical Modeling and Simulation of Nonlinear Process in Enzyme Kinetics. *InTech.* 2018. doi: 10.5772/intechopen.70914
- [51] Talens-Perales, D., Marín-Navarro, J., Polaina, J. Enzymes: Functions and Characteristics. *Encyclopedia of Food and Health.* 2016:532–538. doi: 10.1016/b978-0-12-384947-2.00256-7
- [52] Sharmila, D. M. C., Praveen, T., Rajendran, L. Mathematical Modeling and Analysis of Nonlinear Enzyme Catalyzed Reaction Processes. *Journal of Theoretical Chemistry.* 2013. doi: 10.1155/2013/931091
- [53] Segel, I. H. Enzyme Kinetics. U: Lennarz, W. J., Lane, M. D., ur. *Encyclopedia of Biological Chemistry (2)* Elsevier; 2013. 216-220.
- [54] Vasić-Rački, D., Findrik, Z., Vrsalović Presečki, A. Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011;91(4):845–856. doi:10.1007/s00253-011-3414-0
- [55] Tipton, K. F. Enzyme kinetics in relation to enzyme inhibitors. *Biochemical Pharmacology,* 1973;22(23):2933–2941. doi: 10.1016/0006-2952(73)90179-2
- [56] Buxbaum, E. Inhibition and Inactivation of Enzymes. *Fundamentals of Protein Structure and Function.* 2015;141–161. doi: 10.1007/978-3-319-19920-7_6
- [57] Bechtold, M., Panke, S. Reaction Engineering of Biotransformations. *Comprehensive Chirality.* 2012;71–100. doi: 10.1016/b978-0-08-095167-6.00705-9
- [58] Sadana, A. Enzyme deactivation. *Biotech. Adv.* 1988;6(3):349–446. doi: 10.1016/0734-9750(88)91890-3

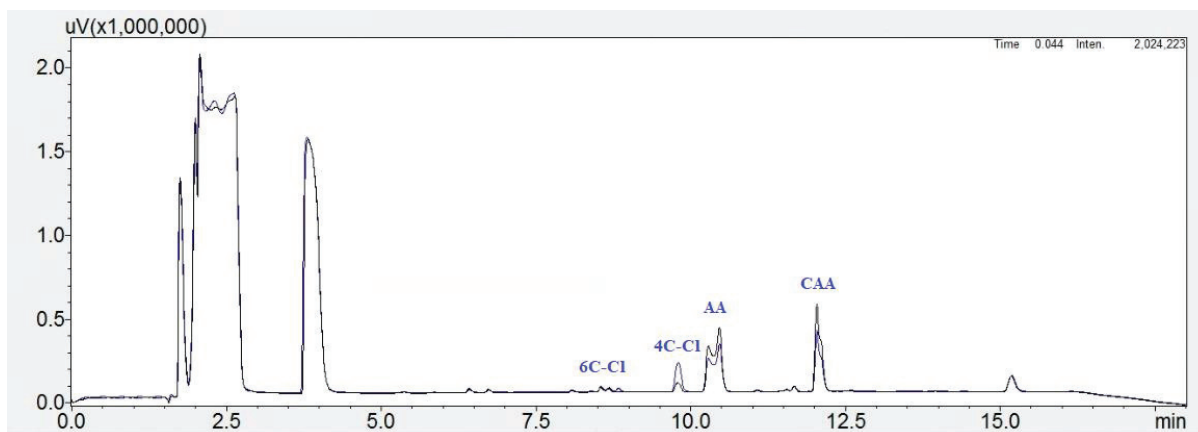
- [59] De Oliveira, L. P., Hudebine, D., Guillaume, D., Verstraete, J. J. A Review of Kinetic Modeling Methodologies for Complex Processes. *Oil & Gas Science and Technology – Rev. IFP Energies Nouvelles*. 2016;71(3):45. doi: 10.2516/ogst/2016011
- [60] Seider, W. D., Lewin, D. R., Seader, J. D., Widagdo, S., Gani, R., Ng, K. M. *Product and Process Design Principles: Synthesis, Analysis and Evaluation* (4) Wiley; 2016.
- [61] Foutch, G. L., Johannes, A. H. Reactors in Process Engineering. *Encyclopedia of Physical Science and Technology*. 2003;23–43. doi: 10.1016/b0-12-227410-5/00654-2
- [62] izv. prof. dr. sc. V. Kosar, *Reaktori i bioreaktori*, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
- [63] <https://ecampusontario.pressbooks.pub/biochem2106/chapter/3-1-lab-overview-and-background-information/> (Pristup: 17.8.2023.)
- [64] Bapiro, T. E., Sykes, A., Martin, S., Davies, M., Yates, J. W. T., Hoch, M., et al. Complete Substrate Inhibition of Cytochrome P450 2C8 by AZD9496, an Oral Selective Estrogen Receptor Degradar. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(9):1268–1276. doi: 10.1124/dmd.118.081539
- [65] Švarc, A., Findrik Blažević, Z. Vasić-Rački, Đ., Charnock, S. J., Vrsalović Presečki, A. A multi-enzyme startegy for the production of a highly valuable lactonized statin side-chain precursor. *Chem. Eng. Res. Des.* 2020;164:35-45. doi: 10.1016/j.cherd.2020.09.016

7. PRILOZI

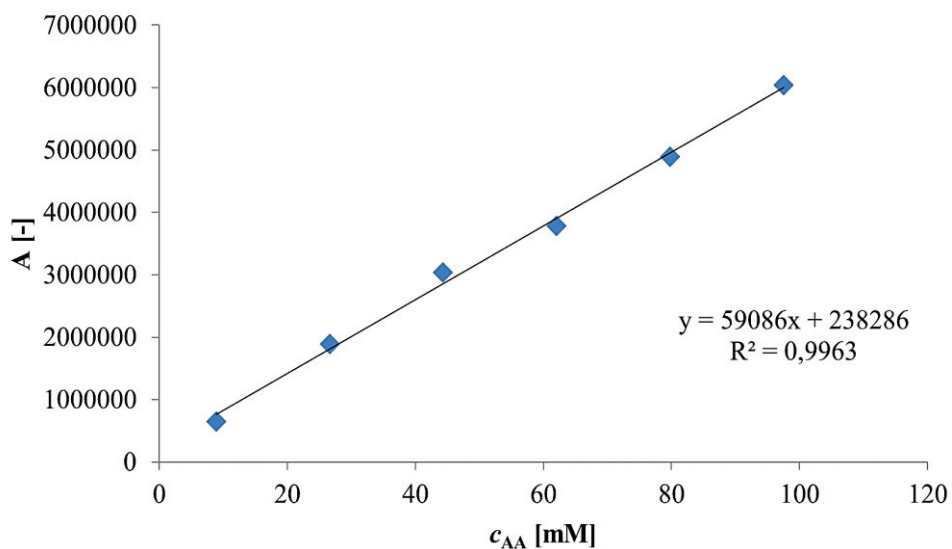
Prilog 1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina Bradfordom metodom



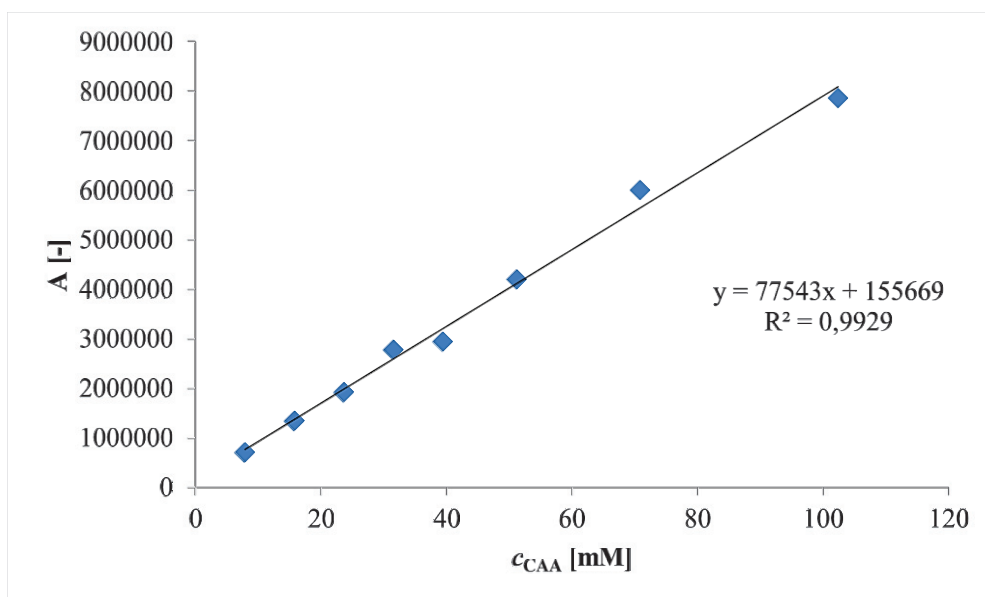
Prilog 2. Primjer kromatograma u procesu sinteze



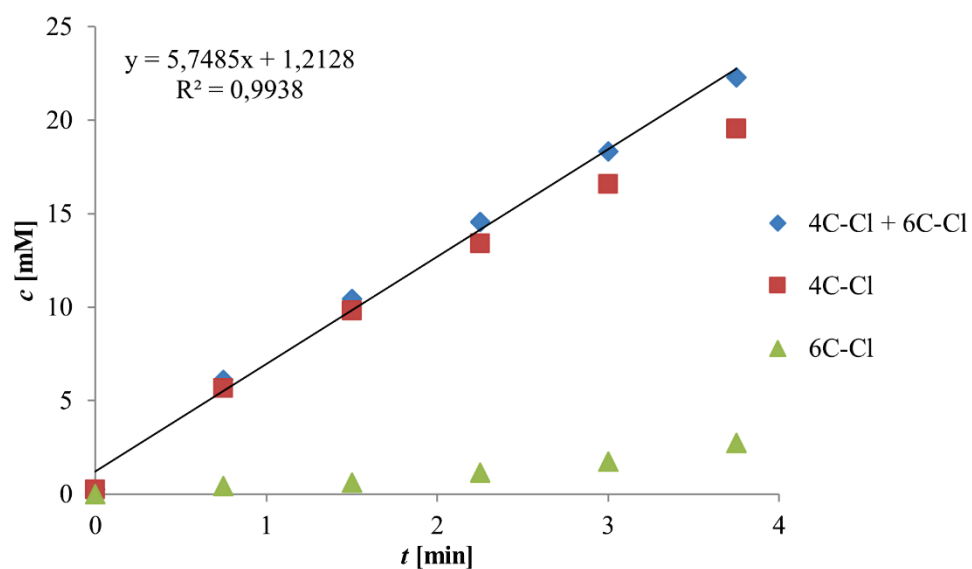
Prilog 3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije acetaldehida



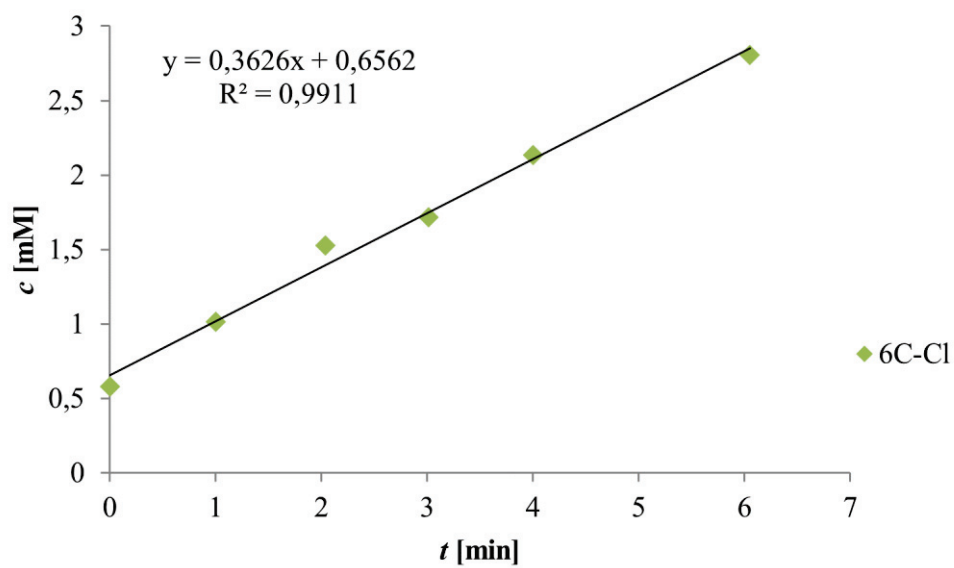
Prilog 4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije kloroacetaldehida



Prilog 5. Primjer određivanja aktivnosti enzima DERA-e



Prilog 6. Primjer određivanja brzine reakcije



8. POPIS SIMBOLA I KRATICA

SIMBOLI

c	molarna koncentracija	[mol dm ⁻³]
A	površina ispod odziva	[-]
γ	masena koncentracija	[mg L ⁻¹]
k	konstanta brzine reakcije	[min ⁻¹]
k_d	konstanta brzine deaktivacije	[min ⁻¹]
K_i	konstanta inhibicije	[mmol dm ⁻³]
K_m	Michaelis-Menteničina konstanta	[mmol dm ⁻³]
λ	valna duljina zračenja	[nm]
n	broj molekula vezan na područje inhibicije	[-]
r	brzina reakcije	[mmol dm ³ min ⁻¹]
t	vrijeme	[min]
σ	standarna devijacija	[-]
V	volumen	[dm ³]
V_m	maksimalna brzina reakcije	[mmol dm ⁻³ min ⁻¹]

KRATICE

4C-Cl	4-kloro-3-hidroksibutanal
6C-Cl	6-kloro-3,5-dihidroksiheksanal ili laktol
AA	acetaldehid
ABS	apsorbancija
BSA	apsorbancija otopine albumina (engl. <i>Bovine serum albumin</i>)
CAA	kloroacetaldehid
CBB	boja <i>Coomassie Blue G-250</i>
DERA	2-deoksiriboza-5-fosfat aldolaza
E	enzim
ES	kompleks enzim-supstrat
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A
HPLC	tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. <i>High performance liquid chromatography</i>)
I	inhibitor

M	mol dm ⁻³
MNČ	magnetske nanočestice
P	produkt
S	supstrat
TPI	trioza-fosfat izomeraza

9. ŽIVOTOPIS

Ivana Petrić [REDACTED] Godine 2013. završava Osnovnu školu “Đuro Ester” u Koprivnici te iste godine i u istom gradu upisuje Gimnaziju “Fran Galović”. Maturu uspješno prolazi 2017. godine, nakon čega upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, smjer Ekoinženjerstvo. Godine 2021. odrađuje stručnu praksu na postrojenju za obradu otpadnih voda u sklopu tvrtke Koprivničke vode d.o.o. te završava preddiplomski studij obranom završnog rada na temu “Tretiranje otpadnih voda taloženjem” pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Vladimira Dananića. Iste godine nastavlja obrazovanje na fakultetu te upisuje diplomski studij Ekoinženjerstva. Godine 2023. sudjeluje posterskim izlaganjem na 28. Skupu kemijskih inženjera i kemičara na temu “Optimization of aldolase immobilization on magnetic nanoparticles”. Trenutno radi studentski posao u Biotech materials j.d.o.o.