

Matematičko modeliranje proizvodnje optički aktivnog diola korištenjem višeenzimskog sustava

Baković, Tatjana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:149:334918>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-29**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tatjana Baković

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Tatjana Baković

MATEMATIČKO MODELIRANJE PROIZVODNJE OPTIČKI AKTIVNOG DIOLA
KORIŠTENJEM VIŠEENZIMSKOG SUSTAVA

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec

izv. prof. dr. sc. Vanja Kosar

Zagreb, rujan 2017.

Hvala!

Mojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Ani Vrsalović Presečki, na Vašem prenesenom znanju i korisnim savjetima kojima ste me vodili kroz ovaj rad. Veliko hvala na mentorstvu.

Mojim roditeljima, baki, bratu i sestri, na strpljenju i moralnoj podršci. Igoru, za mnogobrojna ohrabrenja i potporu. Hvala za sva zajednička učenja. Hvala mojim prijateljima i kolegama za svaki kolokvij i ispit koji ste proživljavali zajedno sa mnom.

SAŽETAK

MATEMATIČKO MODELIRANJE PROIZVODNJE OPTIČKI AKTIVNOG DIOLA KORIŠTENJEM VIŠEENZIMSKOG SUSTAVA

U području biokatalize, kaskadne višeenzimske reakcije su važan pristup za proizvodnju optički aktivnih spojeva. Navedeni pristup je vrlo obećavajući s ekološke i ekonomske točke gledišta, jer se time postižu veće konverzije i produktivnosti, troši se manje kemikalija, izbjegava se izolacija međuprodukata, a na industrijskoj razini se smanjuju troškovi otpada i proizvodnje. Sinteza kiralnih spojeva uvijek predstavlja izazov u području organske kemije, posebice proizvodnja molekula s dva kiralna centra, kao što su kiralni 1,2-dioli. U ovom radu je u svrhu dobivanja enantiomerno čistog diastereoselektivnog 1,2-diola proučavan višeenzimski sustav koji se sastojao od reakcije stereoselektivne karboligacije, katalizirane enzimom benzoilformat dekarboksilazom (BFD), L-selektivne redukcije karbonilne skupine s alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis* (*LbADH*) uz regeneraciju koenzima korištenjem formijat dehidrogenaze (FDH). Određena je kinetika svih enzima. Ispitan je utjecaj acetaldehida na stabilnost BFD i *LbADH*. Na temelju tih rezultata postavljen je matematički model. Primijenjena su dva različita načina provedbe višeenzimskih reakcija: sekvencijalni i simultani način. Na temelju rezultata simulacije predložen je optimalni način provedbe, te optimalni početni uvjeti.

Ključne riječi: matematičko modeliranje, benzoilformat dekarboksilaza, alkohol dehidrogenaza, formijat dehidrogenaza, (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol

ABSTRACT

MATEMATICAL MODELLING OF OPTICALLY ACTIVE DIOLS PRODUCTION BY MULTIENZYME CATALYSIS APPROACH

Within the field of biocatalysis, multi-enzyme cascade reactions are an important strategy for the production of optically active chemicals. This approach is very promising from an environmental and as well the economical point of view since in this manner higher yields and productivities is accomplished, fewer chemicals are spent, isolation of intermediates is avoided and on industrial scale, waste and production costs are reduced. The synthesis of chiral building blocks is always challenging in the field of organic chemistry, especially the production of molecules with two chiral centers, as the chiral 1,2-diols. By coupling stereoselective carbonylation catalyzed by benzoylformate decarboxylase (BFD), L-selective reduction of carbonyl group with alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* (ADHLb) as well as the coenzyme regeneration by formate dehydrogenase (FDH), enantiometrically pure diastereoselective 1,2-diol production was explored. All enzymes were kinetically characterized. The impact of acetaldehyde on the BFD and ADHLb stability was investigated. Based on these results mathematical model was set. Two different multi-enzyme system approaches were applied: the sequential two-step one-pot and the simultaneous one-pot cascade. Based on the result from the simulation by model optimal approach as well the optimal initial conditions was proposed.

Keywords: matemactical modelling, benzoylformate decarboxylase, alcohol dehydrogenase, formate dehydrogenase, (1*S*,2*S*)-1-phenylpropane-1,2-diol

Sadržaj

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. OPĆI DIO | 2 |
| 2.1. Biokatalizatori..... | 2 |
| 2.1.1. Podjela i djelovanje enzima | 2 |
| 2.1.2. Prednosti i nedostaci enzima | 4 |
| 2.1.3. Benzoilformat dekarboksilaza | 5 |
| 2.1.3.1. Tiamin difosfat | 5 |
| 2.1.4. Alkohol dehidrogenaza..... | 6 |
| 2.1.4.1. Nikotinamid adenin dinukleotid | 7 |
| 2.1.5. Formijat dehidrogenaza | 7 |
| 2.2. α -hidroksi ketoni..... | 8 |
| 2.3. Kiralni alkoholi..... | 9 |
| 2.4. Višeenzimski sustavi | 10 |
| 2.5. Modeliranje biotransformacija..... | 12 |
| 2.5.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija | 13 |
| 2.5.2. Reaktorski modeli..... | 17 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 18 |
| 3.1. Matematički model procesa proizvodnje (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima nadh u kotlastom reaktoru..... | 18 |
| 3.1.2. Kinetički model | 18 |
| 3.1.2. Reaktorski model..... | 20 |
| 3.2. Obrada podataka | 21 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 22 |
| 4.1. Kinetika enzima benzoilformat dekarboksilaze iz <i>Pseudomonas putida</i> | 22 |
| 4.2. Utjecaj acetaldehida na stabilnost enzima benzoilformat dekarboksilaze iz <i>Pseudomonas putida</i> | 24 |
| 4.3. Kinetika enzima alkohol dehidrogenaze iz <i>Lactobacillus brevis</i> | 26 |
| 4.4. Utjecaj acetaldehida na stabilnost enzima alkohol dehidrogenaze iz <i>Lactobacillus brevis</i> | 29 |
| 4.5. Kinetika enzima formijat dehidrogenaze iz <i>Candida boidinii</i> | 31 |
| 4.6. Simulacija proizvodnje (<i>S</i>)-2-hidroksipropiofenona u reakciji karboligacije uz katalizator benzoilformat dekarboksilazu..... | 35 |
| 4.7. Simulacija proizvodnje (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1-fenilpropan-1,2-diola oksidacijom (<i>S</i>)-2-hidroksipropiofenona uz regeneraciju koenzima NADH..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 4.8. Simulacija proizvodnje (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru | 40 |
| 5.ZAKLJUČAK..... | 44 |
| 6.LITERATURA | 45 |
| 7.PRILOZI | 47 |
| 8.SIMBOLI I SKRAĆENICE..... | 53 |
| ŽIVOTOPIS..... | 55 |

1.UVOD

Danas su kiralni spojevi važne građevne jedinice u kemijskoj i farmaceutskoj industriji za proizvodnju, primjerice, kemijskih katalizatora, tekućih kristala, aroma, agrokemikalija ili lijekova. Optički aktivni sekundarni alkoholi značajni su kao međuprodukti za dobivanje kiralnih produkata. U industriji se obično koriste dobro poznate kemijske metode, ali u posljednjim desetljećima se povećao interes za stvaranje stereogenih centara primjenom biokatalitičkih metoda. (Goldberg et al., 2007) Razlog tome su blagi uvjeti (tlak, temperatura, pH) u kojima se provode reakcije, a time i manji energetske zahtjevi i troškovi procesne opreme. Osim toga velika selektivnost, odnosno specifičnost biokatalizatora su također razlog porasta interesa za razvojem biokatalitičkih metoda. Biokatalizatori su produkti živih stanica zbog čega se na kraju procesa lako razgrađuju u okolišu, a u sintezama se mogu primjenjivati kao cijele stanice ili izolirani enzimi što proširuje njihovu uporabu u industrijskoj sintetskoj kemiji.

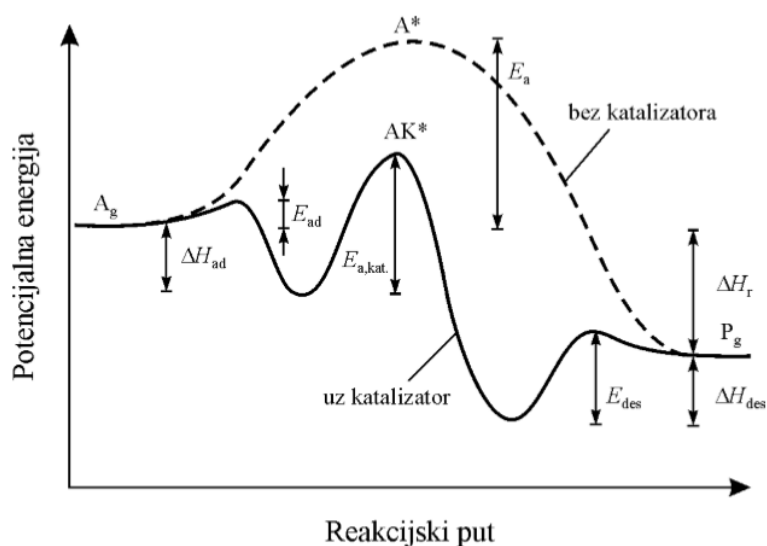
Modeliranje procesa sve više ima ulogu u razvoju biokatalitičkih procesa, te njegova primjena sve više raste kako se povećava uporaba enzima u industriji. Model je bitan alat za predviđanje brzina reakcije pri različitim početnim koncentracijama supstrata, te proračun vremena reakcije i iskorištenja. Izgradnja modela korisna je za dizajn reaktora i optimizaciju, te se upravo zbog toga sve više primjenjuje u farmaceutskoj industriji, kako bi se nadoknadili visoki troškovi ulaganja u farmaceutski razvoj i klinička ispitivanja i smanjio pritisak na razvoj ekološki prihvatljivih procesa. (Vasić-Rački et al, 2011)

U ovom je radu postavljen je matematički model proizvodnje kiralnog alkohola, (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola. Keton (*S*)-2-hidroksipropiofenon je dobiven biokatalitičkom reakcijom, iz benzaldehida i acetaldehida, uz biokatalizator benzoilformat dekarboksilazu izoliranu iz bakterije *Pseudomonas putida* i koenzim tiamin difosfat. Zatim je iz ketona proizveden kiralni alkohol, (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol, reakcijom uz biokatalizator alkohol dehidrogenazu izoliranu iz bakterije *Lactobacillus brevis* i koenzim nikotinamid adenin dinukleotid uz regeneraciju koenzima uz biokatalizator formijat dehidrogenazu izoliranu iz kvasca *Candida boidinii*.

- izomeraze (izomerizacija unutar jedne molekule, npr. racemaze)
- ligaze (sinteza dviju molekula, uz potrošnju ATP-a)

Sve navedene skupine enzima se primjenjuju u industriji, farmaceutskoj, prehrambenoj, agrokemijskoj, kozmetičkoj, s različitim udjelima.

Kao i svi katalizatori, enzimi djeluju na način da smanjuju energiju aktivacije pojedine reakcije, te je na taj način ubrzavaju. Tijekom katalizirane reakcije dolazi do stvaranja aktiviranog kompleksa između supstrata i enzima, koji se kasnije razgrađuje i nastaje produkt, te nepromijenjeni enzim. (Slika 2.2) Iako katalizator ubrzava kemijsku reakciju, on nikada ne određuje njenu konačnu točku ili ravnotežno stanje (te veličine određene su samo termodinamičkim uvjetima reakcije).



Slika 2.2 Promjena energije aktivacije za katalitičku i nekatalitičku reakciju

2.1.2. Prednosti i nedostaci enzima

Primjena biokatalizatora može imati mnoge prednosti u usporedbi s konvencionalnim kemijskim katalizatorima. Enzimi sve češće zamjenjuju kemijske katalizatore (teški ili opasni metali, toksični katalizatori) jer su biorazgradivi i time ekološki prihvatljiviji. Najveći broj omogućava rad pri blagim uvjetima što se odnosi na pH vrijednost (pH 5-8) i temperaturu (20-40° C). Enzimske reakcije u blagim uvjetima minimiziraju poteškoće s izomerizacijom, epimerizacijom, racemizacijom, pregradnjom, razgradnjom, i drugim neželjenim reakcijama koje su vrlo česte u kemijskim reakcijama. Enzimi kataliziraju reakcije do 10^8 - 10^{10} puta brže u usporedbi s nekataliziranim reakcijama. Enzimi su selektivni s obzirom da omogućavaju specifično djelovanje samo na jednoj funkcionalnoj skupini u prisustvu drugih, što je vrlo korisno u slučajevima kada funkcionalne skupine koje se ne bi trebale transformirati moraju biti zaštićene. Osim toga, imaju mogućnost razlikovanja funkcionalnih skupina, koje su identične, ali se nalaze na različitim položajima. Također su i stereoselektivni što znači da se reakcija provodi stereoselektivno, pri čemu se formira jedan stereoizomer. (Kulig, 2013) Zahvaljujući genetskom inženjerstvu koje je omogućilo kloniranje i eksperimentiranje u kultiviranim mikroorganizmima ili staničnim kulturama, enzimi iz raznih izvora, čak i oni koji su jako rijetki mogu se proizvoditi u velikim količinama s prihvatljivim troškovima. (Vasić-Rački et al, 2011)

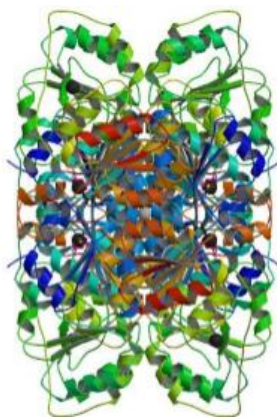
Uz navedene prednosti, enzimi imaju i sljedeće nedostatke: visoka cijena izolacije i pročišćavanja, lako podliježu inhibiciji supstratom i/ili produktom, deaktivacija uslijed promjene reakcijskih uvjeta, nestabilnost izvan prirodnog okruženja (u otopljenom obliku). (Čulig, 2016). S obzirom da se biokatalitički procesi razlikuju od konvencionalnih kemijskih procesa potrebno je uzeti u obzir enzimatsku kinetiku i stabilnost enzima. (Vasić-Rački et al 2011) Većina navedenih svojstava je posljedica njihove složene molekularne strukture.

S obzirom na navedene nedostatke enzimi nisu nikako idealni katalizatori, ali njihova iznimno velika specifičnost i aktivnost pod umjerenim uvjetima predstavljaju istaknute karakteristike koje se sve više cijeni od strane različitih proizvodnih sektora, među kojima su farmaceutska i kemijska industrija. (Illanes, 2008)

2.1.3. Benzoilformat dekarboksilaza

Enzim benzoilformat dekarboksilaza (BFD; Slika 2.3) može se izolirati iz bakterija kao što su *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter calcoeticus* i *Pseudomonas aeruginosa*. Koristi se za kataliziranje reakcija pri kojima nastaju kiralni 2-hidroksiketoni. Osnovna reakcija u kojoj se koristi BFD je neoksidativna dekarboksilacija benzoil formijata do benzaldehida (Slika 2.4). Promatrajući formaciju (*S*)-2-hidroksi-1-fenil-propanona kada je benzoil formijat bio dekarboksiliran uz prisustvo acetaldehida korištenjem sirovog ekstrakta stanica *Pseudomonas putida* Wilcocks i suradnici su uočili potencijal BFD-a da katalizira nastajanje C – C veze. (Pohl et al, 2002)

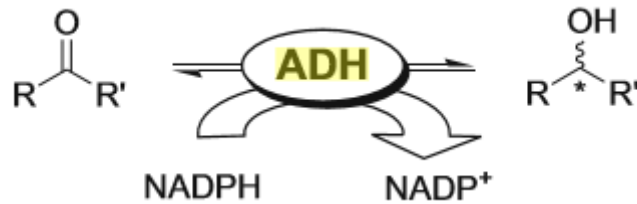
Enzim benzoilformat dekarboksilaza je kvartarne je strukture i ovisan o koenzimu tiamin difosfatu. Koristeći aldehide umjesto 2-keto kiseline kao jedini supstrate, BFD se primjenjuje pri kataliziranju enantioselektivnih reakcija u kojima nastaju raznih aromatski, pa čak i alifatski (*S*)-2 hidroksi ketoni. (Iding et al, 1998)



Slika 2.3 Kristalna struktura benzoilformat dekarboksilaze

2.1.3.1. Tiamin difosfat

Tiamin difosfat (engl. Thiamine diphosphate; ThDP) se naziva koenzimom dekarboksilaza α -keto kiseline i aldehyd transferaza. Enzimi ovisni o ThDP imaju potencijal za stvaranje i kidanje C – C veza, a obje reakcije katalizirane su enzimima: dekarboksilaze α -keto kiseline, trans-ketolaze, acetolaktat sintaze i ThDP dehidrogenaze. Zajednička karakteristika enzima ovisnih o ThDP je stvaranje „aktivnog aldehida“, intermedijera ThDP



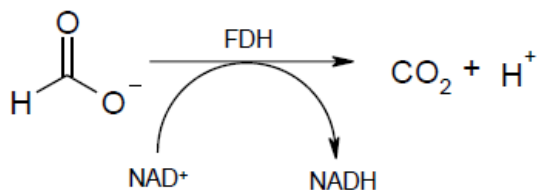
Slika 2.5 Općenita shema reakcije redukcije ketona u optički aktivan oblik alkohola koju katalizira biokatalizator alkohol dehidrogenaza iz *Lactobacillus brevis* uz prisustvo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida

2.1.4.1. Nikotinamid adenin dinukleotid

Enzim *LbADH* zahtjeva prisustvo koenzima, a jedan od najvažnijih je nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) koji primanjem vodikovog iona prelazi u reducirani oblik (NADH). Reverzibilni transfer vodikovog iona iz reduciranog supstrata u NAD^+ i obrnuto je stereoselektivan i karakterističan za svaki pojedini enzim. Nikotinamid koenzimi obično se ne vežu na enzime kovalentnom vezom pa lagano disociraju. Preskupi su da bi ih se koristilo kao stehiometrijske reagense zbog čega je potrebno pronaći način njihove regeneracije (Vrsalović Presečki, 2006) koja se najčešće provodi paralelno pretvorbi supstrata u produkt.

2.1.5. Formijat dehidrogenaza

Enzim formijat dehidrogenaza (FDH) ubraja se u skupinu NAD^+ ovisnih oksidoreduktaza koje se međusobno razlikuju u kvartarnoj strukturi. Formijat dehidrogenaze katalizira oksidaciju iona formijata do ugljikova dioksida pri čemu donira elektrone NAD^+ -u koji se reducira do NADH . (Slika 2.6) Prednosti enzima formijat dehidrogenaze su stabilnost, lako uklanjanje ugljikovog dioksida i time postignuta termodinamička ravnoteža, dostupnost na tržištu, te povoljna cijena. U nekim slučajevima, promjena pH tijekom regeneracije koenzima uzrokuje inhibicijske učinke. (Goldberg et al, 2007)

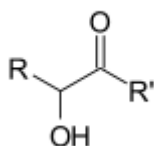


Slika 2.6 Shema reakcije oksidacije formijata u ugljikov dioksid katalizirane formijat dehidrogenazom uz oksidaciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida

Važna značajka korištenja FDH za regeneraciju koenzima je skoro nepovratna katalitička reakcija s 100% iskorištenjem pri sobnim uvjetima. Enzim je aktivan u širokom rasponu pH (pH 5,5-11,0) i stoga se može koristiti kao enzim za regeneraciju koenzima NADH povezati s gotovo bilo kojom drugom dehidrogenazom. (Schirwitz et al., 2007)

2.2. α -hidroksi ketoni

Razvoj sinteze optički aktivnih α -hidroksi ketona (Slika 2.7) važan je istraživački fokus u farmaceutskoj industriji. α -hidroksi ketoni su zastupljeni u antidepresivima, selektivnim inhibitorima pri proizvodnji amiloid- β proteina (koriste se u liječenju Alzheimerove bolesti), osim toga koriste se za dobivanje finih kemikalija, zbog sposobnosti izgradnje velikih molekula. Također se primjenjuju u proizvodnji amino alkohola i diola. (Hoyos et al, 2010)



Slika 2.7 Struktura α -hidroksi ketona

Biokatalitički pristupi za efikasnu proizvodnju α -hidroksi ketona:

1. Primjena liaze ovisne o tiamin difosfatu (ThDP-liaza) za katalizu karboligacije aldehida. Ovakvim pristupom nastaju enantiočisti α -hidroksi ketoni iz jeftinih aldehida. Upotreba dvofaznog medija s rekombinantnim cijelim stanicama koje sadrže liaze rezultira produktivnošću od 80–100 g/L s visokom enantiospecifičnošću.

2. Korištenje hidrolaza koje razgrađuju racemate za proizvodnju α -hidroksi ketona. Maksimalno iskorištenje ovakvog pristupa je 50%. Kako bi se taj problem prevladao kombinira se tradicionalna kataliza lipazom s racemizacijom preostalog supstrata. Navedeno se može provesti in situ ili u različitim odjeljcima čime se postiže visoka konverzija ($> 90\%$) i vrlo visoka enantiospecifičnost ($> 99\%$).
3. Redoks postupak s cijelim stanicama, kataliziran različitim mikroorganizmima, pomoću izoliranog enzima ili cijelih stanica. Mogu se koristiti različiti postupci za postizanje visoke konverzije i dobivanje enantiočistih produkata. Neki enantiočisti α -hidroksi ketoni mogu nastati redukcijom diketona i selektivnom oksidacijom vicinalnih diola.

Navedena tri pristupa predstavljaju korisne i ekološki prihvatljive sintetske puteve. Također, primjer su kako biokataliza pomaže u standardnim procesima sinteze te kako se njihovom integracijom može postići veća konverzija i enantioselektivnost nastalih produkata. (Hoyos et al., 2010)

2.3. Kiralni alkoholi

Kiralne molekule (enantiomeri) su molekule koje imaju četiri različite skupine (supstituenti) vezane na stereosredište. Zbog nesimetričnosti prostornog rasporeda atoma ili molekula ne mogu se poklopiti sa svojom zrcalnom slikom odnosno zrcalnim prostornim oblikom. Jednake su konstitucije, ali suprotne konfiguracije i uvijek dolaze u dva oblika (u paru). Optički aktivni su spojevi koji s obzirom na različite konfiguracije različito zakreću ravninu polariziranog svjetla, tj. za isti iznos, ali u suprotnom smjeru. Imaju jednaka fizikalna svojstva, ali različita biološka, stoga različito reagiraju s drugim kiralnim spojevima. Najčešći uzrok kiralnosti je asimetrični ugljikov atom (atom na koji su vezane 4 različite skupine (stereogeni centar)), koji je sp^3 hibridiziran. (Solomon, 2014)

Kiralni alkoholi se najčešće dobivaju reakcijom redukcije ketona u biotehnološkim procesima, a reakcija može biti katalizirana bilo izoliranim enzimima ili cijelim stanicama. Korištenje izoliranih enzima često poželjnije zbog veće volumetrijske produktivnosti i odstupanja sporednih reakcija.

Tri najčešća načina dobivanja kiralnih alkohola su (a) redukcija α -diketona uz enzim alkohol dehidrogenazu, (b) redukcija α -hidroksi ketona i (c) hidroliza epoksida pomoću epoksid hidrolaza. (Kulig, 2013)

2.4. Višeenzimski sustavi

Višeenzimski sustavi, tj. biokatalitička sinteza s više enzima u kotlastom reaktoru, nude znatne prednosti: smanjenje troškova, vremena i kemikalija za sintezu produkta. Osim toga korištenjem višeenzimskih sustava sporedne i reverzibilne reakcije su svedene na minimum, pri čemu je smanjena vjerojatnost nastajanja štetnih ili nestabilnih spojeva. Višeenzimski sustavi se najčešće primjenjuju za asimetričnu sintezu kiralnih alkohola, amina i aminokiselina, kao i za stvaranje C-C veze. Integracija nekoliko biokatalitičkih reakcija u sustav s više enzima sve više nalazi primjenu u biokemijskom inženjerstvu, jer su biokatalizatori biorazgradivi, visoko selektivni i najvažnije kompatibilni jedni s drugima unutar određenih raspona radnih uvjeta. Pri multienzimskim sintezama važno je pronaći optimalne uvjete za sve enzime kao što su pH, temperatura, koncentracija enzima, supstrata, te koenzima kako bi iskorištenje reakcije bilo što veće.

Višeenzimske reakcije mogu biti katalizirane slijedećim kombinacijama biokatalizatora: (i) cijele stanice, (ii) topivi enzimi, (iii) kombinacija topivih enzima i cijelih stanica, (iv) imobilizirani enzimi i (v) topivi i imobilizirani enzimi. Tip katalizatora za novi biokatalitički proces jedan je od najvažnijih izbora u razvoju procesa. Izbor jedne od gore navedenih mogućnosti ovisi o mnogim čimbenicima, te se razmatra zasebno za svaku biokatalitičku sintezu. Općenito, prelazak iz cijelih stanica u topive enzime, a zatim i na imobilizirane enzime mora se opravdati specifičnim potrebama procesa, jer podrazumijeva veće troškove za izolaciju enzima, pročišćavanje i eventualno imobilizaciju. Međutim, reakcije katalizirane cijelim stanicama mogu dati sporedne produkte, te to zahtjeva dodatno pročišćavanje produkta. Kompromis u ovom slučaju može biti između utjecaja troškova katalizatora i troškova odvajanja. Imobilizacija biokatalizatora nudi mnoge prednosti u smislu ponovne uporabe biokatalizatora i izvedivosti kontinuiranih procesa. Najbolji način imobilizacije često postiže kovalentnom imobilizacijom enzima. Mogućnost imobilizacije enzima umjesto da se koristi u topivom obliku treba usvojiti kada je katalizator vrlo skup.

Biokatalitički kaskadni sustav je reakcijski sustav gdje se istovremeno provode dvije ili više reakcija uz upotrebu najmanje jednog biokatalizatora. Podjela biokatalitičkih kaskadnih sustava prema vrsti međuprodukta:

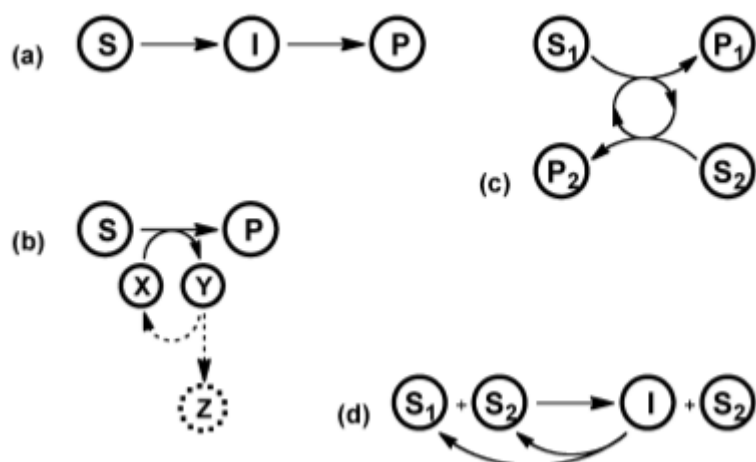
Linearni kaskadni sustav (Slika 2.8 a). Supstrat prelazi u jedan produkt preko jednog ili više međuprodukata. Kaskadni procesi ove vrste ne samo da pomažu u uštedama vremena i smanjenju sporednih reakcija, nego nude i prednosti kada su uključeni nestabilni ili toksični međuprodukti, budući da se oni ne akumuliraju, već se transformiraju dalje u produkt. To dovodi do sigurnijih procesa, manje sporednih reakcija i većih iskorištenja.

Ortogonalni kaskadni sustav (Slika 2.8b). Osnovna sintetska reakcija povezana je s daljnjim reakcijama regeneracije koenzima. Primjer navedenog sustava je regeneracije koenzima za oksidoreduktaze ovisne o nikotinamidu s drugim redoks enzimom.

Paralelni kaskadni sustav (Slika 2.8c). Reakcije s dva supstrata, pri čemu nastaju dva produkta pomoću dvije različite biokatalitičke reakcije, koje se spajaju koenzimima.

Ciklički kaskadni sustav (Slika 2.8d). Jedan supstrat iz mješavine supstrata najčešće racematne smjese selektivno se pretvara u intermedijer koji se zatim pretvara u polazni supstrat (jedan od enantiomera). Ponavljanje ovog ciklusa dovodi do nakupljanja spoja koji je ostavljen u prvoj transformaciji.

Naravno, prikazana klasifikacija nije strogo definirana jer se kaskadni sustavi mogu kombinirati na mnogo različitih načina. Primjerice, jedan korak linearne kaskade može zahtijevati dodatne ortogonalne reakcije (npr. regeneracija koenzima).



Slika 2.8 Biokatalitički kaskadni sustav: (a) linearni, (b) ortogonalni, (c) paralelni, (d) ciklički

2.5. Modeliranje biotransformacija

Modeliranje procesa sve više ima ulogu u razvoju biokatalitičkih procesa, te njegova primjena sve više raste kako se povećava uporaba enzima u industriji. Model je bitan alat za predviđanje brzina reakcije pri različitim početnim koncentracijama supstrata i biokatalizatora, te proračun vremena reakcije i iskorištenja. Izgradnja modela korisna je za dizajn reaktora i optimizaciju, te se upravo zbog toga sve više primjenjuje u farmaceutskoj industriji, kako bi se nadoknadili visoki troškovi ulaganja u farmaceutski razvoj i klinička ispitivanja i smanjio pritisak na razvoj ekološki prihvatljivih procesa.

Razvoj modela za biokatalitički proces sastoji se od postavljanja modela za kinetiku enzima, te model reaktora, pri čemu je masa tvari konstantna tijekom cijele reakcije (kotlasti reaktor, reaktori uz idealno miješanje, itd.).

Prvi korak pri postavljanju modela za reaktor u kojem se provodi katalizirana reakcija je utvrđivanje ovisnosti svojstava biokatalizatora o pH, temperaturi, te koncentraciji supstrata prikladnima za „scale up“. Posebice je važno, kod višeenzimskih sustava, utvrditi odgovarajuću temperaturu i pH za sve enzime. Kompromisna pH vrijednost odabrana za višeenzimске sustave može biti daleko od optimalne i fiziološke vrijednosti, te može značajno smanjiti enzimsku aktivnost i stabilnost. Osim toga potrebno je procijeniti sve kinetičke parametre iz eksperimentalnih podataka kako bi se mogao postaviti odgovarajući kinetički

model. Posebice je važno kod složenijih reakcija npr. s regeneracijom koenzima, ispitati utjecaj svih komponenti na brzinu reakcije. Procjena kinetičkih parametara u kinetičkim modelima s visokom točnošću parametara bitna je za uspješnu validaciju modela. Parametri modela se najčešće procjenjuju nelinearnom regresijskom analizom. Numeričke vrijednosti parametara su procijenjene uklapanjem modela u eksperimentalne podatke. Jednadžbe modela je moguće riješiti numerički pomoću algoritma Runge-Kutta IV. Izračunati podaci uspoređuju se s eksperimentalnim podacima, ukoliko postoji odstupanje, unose se u fazu integracije dok se ne postignu minimalne pogreške između eksperimentalnih i integriranih vrijednosti. Skup procijenjenih parametara s visokom točnosti koristi se za validaciju modela. Razvijeni kinetički model povezan je s jednadžbama bilancama mase za reaktor. Takav prošireni model mora se eksperimentalno potvrditi u reaktoru na različitoj koncentraciji supstrata, i / ili enzima. Provjera modela provodi se usporedbom eksperimentalnih podataka s simulacijama pod istim uvjetima. Važno je provjeriti model pomoću podataka koji su različiti od onih koji se primjenjuju za prepoznavanje parametara. Simulacijski podaci dobiveni iz proširenog modela koristeći računalne i eksperimentalne podatke iz reaktora moraju odgovarati jedni drugima s prihvatljivom točnošću. Te posljednji korak je uporaba modela za biokatalitičkih procesa s izoliranim topljivim enzimima. Računalne simulacije trebale bi omogućiti optimizaciju koncentracije biokatalizatora i supstrata za različite tipove reaktora.

Zaključno, matematičko modeliranje je vrlo korisno u razvoju procesnog modela za biokatalitičke reakcije jer omogućuje predviđanje stabilnosti enzima i karakteristika reaktora, te koji će on njih biti najučinkovitiji. Upotrebom razvijenog modela, konverziju supstrata, produktivnost procesa i potrošnja biokatalizatora moguće je optimizirati iz eksperimenta, tj. na laboratorijskoj razini. Iako se modeliranje biokatalitičkog procesa ne koristi vrlo često, dobar je alat za smanjenje troškova proizvodnje. (Vasić-Rački et al, 2011)

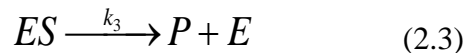
2.5.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija

Enzimska aktivnost ovisi linearno o koncentraciji enzima, tj. proteina, iako u nekim posebnim okolnostima dolazi do odstupanja. Međutim, pretpostavlja se da je enzimska aktivnost proporcionalna koncentraciji enzimskih proteina i to je temeljni princip kinetike enzima. Ključna varijabla kinetike enzima je koncentracija supstrata, a njezin učinak čini osnovu hipoteze kinetike enzima. (Ilanes, 2008)

Michaelis-Menteničina kinetička jednačba (jedn. 2.1) opisuje ovisnost početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata i enzima, te vrijedi za jednosupstratnu reakciju.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S + c_s} \quad (2.1)$$

U navedenom izrazu r_s je brzina potrošnje supstrata [$\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$], c_s je koncentracija supstrata [mmol dm^{-3}], V_m je maksimalna brzina reakcije [$\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$], dok K_m^S predstavlja Michaelis – Menteničinu konstantu [mmol dm^{-3}]. Michaelis i Menten (1913) su predložili prvu hipotezu za enzimsku katalizu temeljenu na dva slijedna koraka, kako je predložio Henri (pretvaranje supstrata (S) u produkt uključuje reverzibilnu reakciju između enzima (E) i supstrata (S), pri čemu se formira kompleks enzim-supstrat (ES) (jedn. 2.2) koji daje produkt). (Ilanes, 2008) U prvom koraku enzimske katalize je supstrat zarobljen na aktivnom mjestu enzima, a u sljedećem koraku kompleks može disocirati na enzim i supstrat ili se kemijski promijeniti što rezultira stvaranjem produkta (P) i njegovim odvajanjem od enzima (jedn. 2.3). Enzim izlazi iz reakcije nepromijenjen i dostupan za sljedeću katalitičku reakciju.



Najveća brzina reakcije bit će ostvarena kada sve molekule enzima budu u obliku ES kompleksa. Tu brzinu definiramo kao maksimalnu brzinu enzimski katalizirane reakcije (V_m), koji ovisi o koncentraciji enzima E_0 , a određuje se kao (jedn. 2.4):

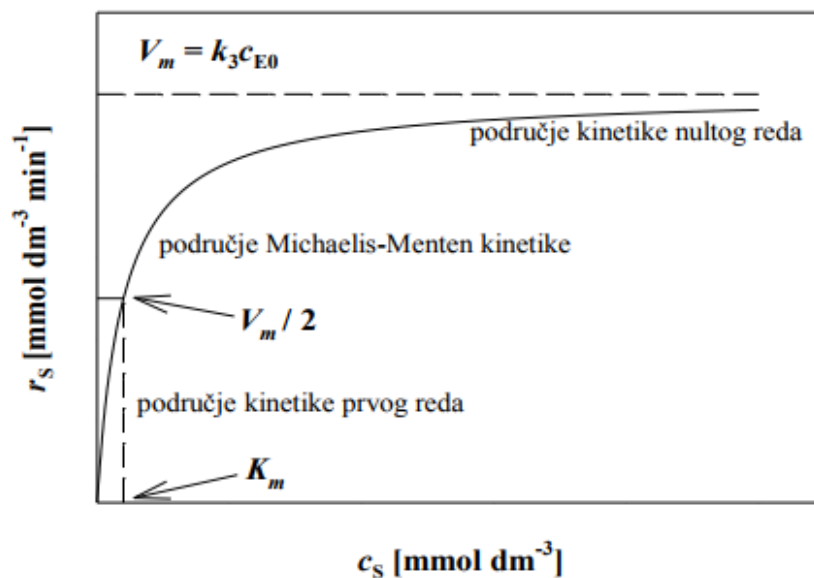
$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.4)$$

Michaelisova konstanta (K_m^S) numerički izražava afinitet enzima prema supstratu. K_m^S se definira kao ona koncentracija supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine, a ovisi o supstratu te o uvjetima okoline kao što su pH i temperatura. Računski se definira kao (jedn. 2.5):

$$K_m^S = \frac{k_1 + k_3}{k_2} \quad (2.5)$$

V_m (maksimalna brzina reakcije) i K_m^S (Michaelisova konstanta) dva su značajna kinetička parametra veoma korisna za opisivanje svojstava enzimski kataliziranih reakcija. Ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata prikazan je krivuljom na Slici 2.9.

Brzina reakcije određuje se iz Michaelis – Menteničinog izraza (jedin. 2.1) te se mogu uočiti tri područja brzine reakcije: područje kinetike prvog reda, područje Michaelis – Menteničine kinetike i područje kinetike nultog reda. Pri vrlo niskim, te visokim koncentracijama supstrata, brzina reakcije je linearno proporcionalna koncentraciji supstrata (Slika 2.9). Područje niske koncentracije, $c_s \ll K_m^S$, pri stalnoj koncentraciji enzima, može se aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda. Kinetikom nultog reda aproksimira se područje visoke koncentracije supstrata, $c_s \gg K_m^S$, u kojem brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata. Područje koje se nalazi između područja kinetike prvog i nultog reda je područje Michaelis – Menteničine kinetike. (Dunn, 2003)



Slika 2.9 Grafički prikaz ovisnosti reakcijske brzine o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis – Menteničine kinetike

Dvosupstratna enzimatska reakcija (jedn. 2.6) opisuje se jednađbom koja slijedi Michaelis – Menteničinu kinetiku i dana je izrazom (jedn. 2.7).



$$r = \frac{V_m \cdot c_{S_1} \cdot c_{S_2}}{(K_m^{S_1} + c_{S_1}) \cdot (K_m^{S_2} + c_{S_2})} \quad (2.7)$$

Kod većine enzimskih reakcija industrijske važnosti dolazi do inhibicije produktom i / ili supstratom. Inhibitor je kemijski spoj koji se veže na aktivno mjesto enzima, te time smanjuje brzinu reakcije. (Ilanes, 2008) Razlikujemo tri tipa inhibicije enzima s obzirom u kojem katalitičkom koraku djeluju: kompetitivnu, nekompetitivnu i antikompetitivnu. Kompetitivni inhibitor utječe na prvi korak katalize, tj. veže se na aktivno mjesto enzima te tako konkurrira supstratu pri vezivanju na slobodni enzim, po svojoj je strukturi sličan supstratu (jedn. 2.8). Kompetitivna inhibicija može biti ukupna (ako se inhibitor veže na aktivnom mjestu, te potpuno isključuje supstrat) ili djelomična (ako inhibitor ometa vezanje supstrata bez potpunog isključivanja iz aktivnog mjesta). Djelomična kompetitivna inhibicija vrlo je rijetka. Nekompetitivni inhibitori su oni koji utječu na drugi stupanj katalize, na kemijsku obradu vezanog supstrata u aktivnom mjestu, bez ometanja vezanja supstrata (jedn. 2.9). Antikompetitivna inhibicija (jedn. 2.10) je kombinacija kompetitivne i nekompetitivne inhibicije.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s} \quad (2.8)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(K_m^S + c_s) \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.9)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.10)$$

2.5.2. Reaktorski modeli

Kotlasti reaktor ili šaržni reaktor, eng. batch reactor je zatvoreni sustav jer se za vrijeme reakcije sa okolinom ne razmjenjuje reakcijska masa. U reaktoru se ostvaruje približno idealno miješanje, što znači da su vrijednosti svih parametara približno iste u bilo kojoj točki reaktorskog prostora. Po prirodi stvari, zbog kemijske reakcije koja je vremenski proces, kotlasti reaktor je uvijek u nestacionarnom radu. Kotlasti reaktor se često koristi u industriji, uglavnom za reakcije u kapljevitoj fazi, za proizvodnju manjih količina produkata na umjerenim tlakovima i temperaturama. (Kosar, 2017)

Uz sve prethodno navedene pretpostavke, opće bilance za množinu tvari je (jedn. 2.11) :

$$r_A \cdot V = -\frac{dn_A}{dt} \quad (2.11)$$

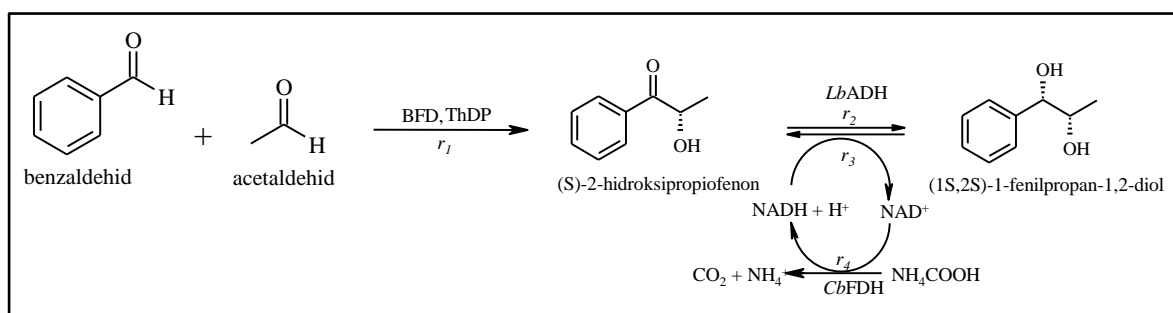
Uz pretpostavku da je i volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu, slijedi (jedn. 2.12):

$$r_A = -\frac{dc_A}{dt} \quad (2.12)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Matematički model procesa proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru

Simulacija proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (Slika 3.1) provedena je u kotlastom reaktoru. Za tu reakciju je postavljen matematički model koji se sastoji od kinetičkog i reaktorskog modela. Postavljen je na temelju eksperimentalnih podataka (Pintarić, 2016) i pretpostavki da je reakcijski volumen konstantan, miješanje u reaktoru idealno, a temperatura konstantna.



Slika 3.1 Shema procesa proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima

3.1.2. Kinetički model

Kinetički model koji se sastoji od nekoliko kinetičkih jednadžbi razvijen je na temelju sheme reakcije (Slika 3.1), eksperimentalnih rezultata i procijenjenih kinetičkih parametara.

Kinetika proizvodnje (*S*)-2-hidroksipropiofenona iz benzaldehida i acetaldehida katalizirane enzimom benzoilformat dekarboksilazom iz *Pseudomonas putida* uz prisustvo koenzima tiamin difosfata opisana je Michaelis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom (acetaldehidom) i prikazana je jednadžbom (jedn. 3.1).

$$r_1 = \frac{V_m^{BFD} \cdot c_{benzaldehyd} \cdot c_{acetaldehyd} \cdot c_{BFD}}{(K_m^{benzaldehyd} + c_{benzaldehyd}) \cdot (K_m^{acetaldehyd} + c_{acetaldehyd} + \frac{c_{acetaldehyd}^2}{K_i})} \quad (3.1)$$

Deaktivacija enzima benzoilformat dekarboksilaze opisana je bieksponecijalnim modelom koji je prikazan jednadžbom (jedn. 3.2). Model pretpostavlja postojanje dva izoenzima s određenim udjelima pojedinog izoenzima u ukupnoj količini enzima, a i b, te se deaktiviraju različitim brzinama deaktivacije koje su opisane konstantama k_1 i k_2 te vrijedi da je $b = 1 - a$.

$$\frac{V_m^{BFD}}{V_{m0}} = a^{BFD} \cdot e^{-k_1^{BFD} \cdot t} + b^{BFD} \cdot e^{-k_2^{BFD} \cdot t} \quad (3.2)$$

Kinetika proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola, redukcijom (S)-2-HPP, katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis* uz prisustvo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida i njegovu regeneraciju opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NAD^+ , te je prikazana jednadžbom (jedn. 3.3). Kinetika povratne reakcije je opisana kinetikom drugog reda, odnosno kinetikom prvog reda u odnosu na svaki supstrat koji sudjeluje u reakciji, te je prikazana jednadžbom (jedn. 3.4). Kinetika regeneracije koenzima NADH pomoću amonij formijata i enzima formijat dehidrogenaze iz kvasca *Candida boidinii* opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NADH, s uključenom inhibicijom supstratima iz drugih reakcija, (S)-2-idroksipropiofenonom i acetaldehidom (jedn. 3.5).

$$r_2 = \frac{V_m^{LbADH} \cdot c_{(S)-2-HPP} \cdot c_{NADH} \cdot c_{LbADH}}{(K_m^{(S)-2-HPP} + c_{(S)-2-HPP}) \cdot (K_m^{NADH} \cdot (1 + \frac{c_{NAD^+}}{K_i^{NAD^+}}) + c_{NADH})} \quad (3.3)$$

$$r_3 = k_3 \cdot c_{LbADH} \cdot c_{NAD^+} \cdot c_{(1S,2S)-1-FPD} \quad (3.4)$$

$$r_4 = \frac{V_m^{FDH} \cdot c_{NAD^+} \cdot c_{NH_4COOH} \cdot c_{FDH}}{(K_m^{NH_4COOH} + c_{NH_4COOH}) \cdot (1 + \frac{c_{(S)-2-HPP}}{K_i^{(S)-2-HPP}} + \frac{c_{acetaldehid}}{K_i^{acetaldehid}})) \cdot (K_m^{NAD^+} + c_{NAD^+} \cdot (1 + \frac{c_{NADH}}{K_i^{NADH}}))} \quad (3.5)$$

U navedenim izrazima r_i je molarna brzina pojedine reakcije [$mmol \, dm^{-3} \, min^{-1}$], V_m^i predstavlja maksimalnu molarnu reakcijsku brzinu, odnosno maksimalna aktivnost pojedinog

enzima [$\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$], K_m^i označava Michaelis – Menteničinu konstantu za određenu komponentu [mmol dm^{-3}], te je K_i^i konstanta inhibicije određene komponente [mmol dm^{-3}].

Deaktivacija enzima alkohol dehidrogenaze opisana je također bieksponecijalnim modelom te je prikazana jednažbom (jedm. 3.6).

$$\frac{V_m^{LbADH}}{V_{m0}} = a^{LbADH} \cdot e^{-k_1^{LbADH} \cdot t} + b^{LbADH} \cdot e^{-k_2^{LbADH} \cdot t} \quad (3.6)$$

Parametri k_1^i i k_2^i predstavljaju konstante brzine deaktivacije određenog izoenzima, dok k_3 predstavlja konstantu brzine povratne reakcije [$\text{dm}^3 \text{ mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$]. Koncentracija pojedine komponente označena je s c_i [mmol dm^3].

3.1.2. Reaktorski model

Reaktorski model proizvodnje optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u kotlastom reaktoru sastoji se od bilancnih jednažbi (jedm. 3.7 – 3.13) koje opisuju promjene koncentracije pojedinih reaktanata i produkata s vremenom.

$$\frac{dc_{\text{benzaldehyd}}}{dt} = -r_1 \quad (3.7)$$

$$\frac{dc_{\text{acetaldehyd}}}{dt} = -r_1 \quad (3.8)$$

$$\frac{dc_{(S)-2-HPP}}{dt} = r_1 - r_2 + r_3 \quad (3.9)$$

$$\frac{dc_{(1S,2S)-1-FPD}}{dt} = r_2 - r_3 \quad (3.10)$$

$$\frac{dc_{NADH}}{dt} = -r_2 + r_3 + r_4 \quad (3.11)$$

$$\frac{dc_{NAD^+}}{dt} = r_2 - r_3 - r_4 \quad (3.12)$$

$$\frac{dc_{NH_4COOH}}{dt} = -r_4 \quad (3.13)$$

3.2. Obrada podataka

Eksperimentalni podaci (Pintarić, 2016) obrađeni su u programskom paketu Scientist. Simulacija je provedena na temelju napisanog modela (Prilog 11-12) i eksperimentalnih podataka. Nelinearnom regresijom pomoću metode najmanjih kvadrata i simpleks metode procijenjeni su parametri. Metode procjene parametara imaju za cilj pronaći minimalni zbroj kvadrata greške između seta eksperimentalnih podataka i seta podataka izračunatih pomoću modela.

Simpleks metoda se koristi kada je velika razlika između početne vrijednosti parametra i njegove prave vrijednosti i dobra je za određivanje približne vrijednosti parametara. Na temelju napisanog modela i procijenjenih parametara provodi se simulacija rješavanjem diferencijalnih jednadžbi određenog modela. Numeričke metode za rješavanje seta diferencijalnih jednadžbi koje koristi Scientist su: Euler-ova metoda, metoda Runge Kutta IV, Bulirsch – Stoer metoda i Episode algoritam.

Na temelju eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri matematičkog modela: maksimalna brzina reakcije, Michaelis-Menteničine konstante te konstante inhibicije. Ovi parametri su korišteni za simulacije pomoću modela, odnosno za predviđanje promjena koncentracija reaktanata i produkata s vremenom.

4.REZULTATI I RASPRAVA

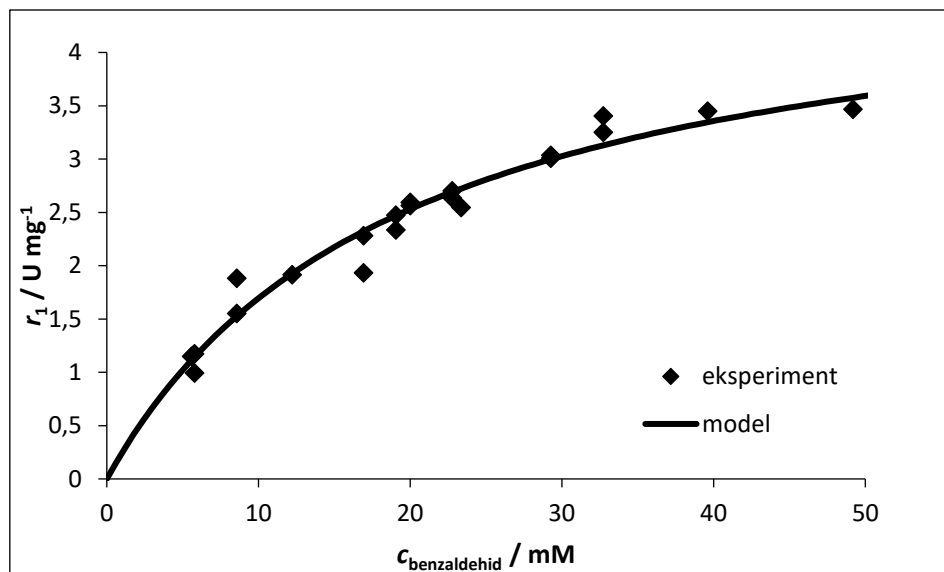
4.1. Kinetika enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida*



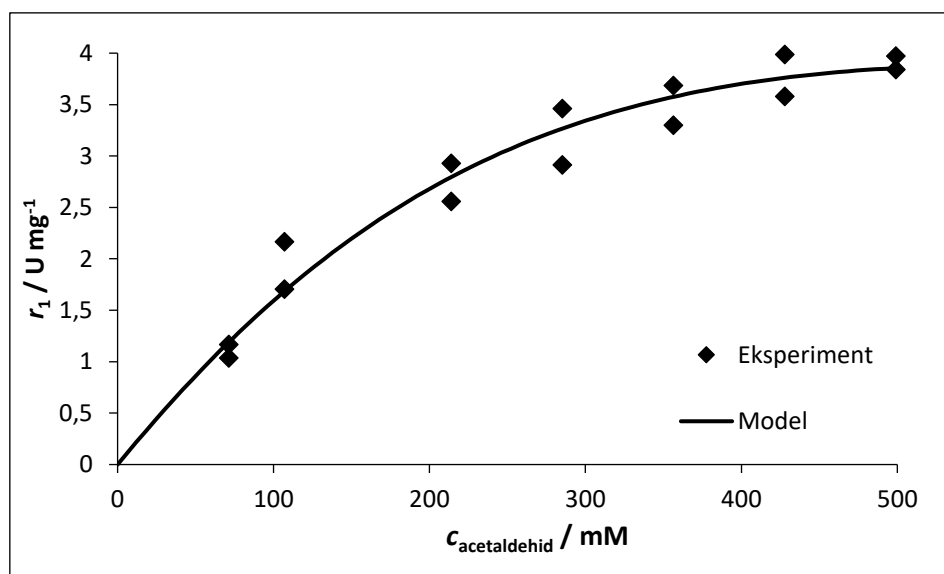
Slika 4.1 Reakcija karboligacije benzaldehida i acetaldehida katalizirana BFD-om

Metodom početnih brzina određena je kinetika enzima benzoilformat dekarboksilaze izolirane iz bakterije *Pseudomonas putida*, u reakciji proizvodnje (S)-2-hidroksipropiofenona iz benzaldehida i acetaldehida kataliziranoj BFD-om (Slika 4.1). Grafički je prikazana ovisnost početne reakcijske brzine o koncentracijama supstrata: benzaldehida (Slika 4.2) i acetaldehida (Slika 4.3).

Kinetika je opisana dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom jednadžbom s inhibicijom supstratom (jedn. 3.1). Vrijednosti Michaelis – Menteničinih konstanti za benzaldehid ($K_m^{\text{benzaldehyd}}$) i acetaldehyd ($K_m^{\text{acetaldehyd}}$) preuzete su iz literature (Pepper et al., 2011) dok su konstanta inhibicije acetaldehydom ($K_{iS}^{\text{acetaldehyd}}$) maksimalna specifična brzina reakcije, odnosno maksimalna aktivnost enzima (V_m^{BFD}) procijenjeni nelinearnom regresijom u programskom paketu Scientist modelom iz priloga 1. Svi navedeni parametri prikazani su u Tablici 4.1.



Slika 4.2 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji sinteze (S)-2-hidroksipropiofenona uz izolirani enzim BFD o koncentraciji: benzaldehida ($c_{\text{benzaldehyd}} = 0 - 50 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{acetaldehyd}} = 356,41 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Slika 4.3 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji sinteze (S)-2-hidroksipropiofenona uz izolirani enzim BFD o koncentraciji acetaldehida ($c_{\text{acetaldehyd}} = 0 - 500 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{benzaldehyd}} = 49,19 \text{ mmol dm}^{-3}$)

Tablica 4.1 Kinetički parametri u reakciji proizvodnje (S)-2-hidroksipropiofenona iz benzaldehida i acetaldehida uz enzim benzoilformat dekarboksilazu izoliranu iz bakterije *Pseudomonas putida*

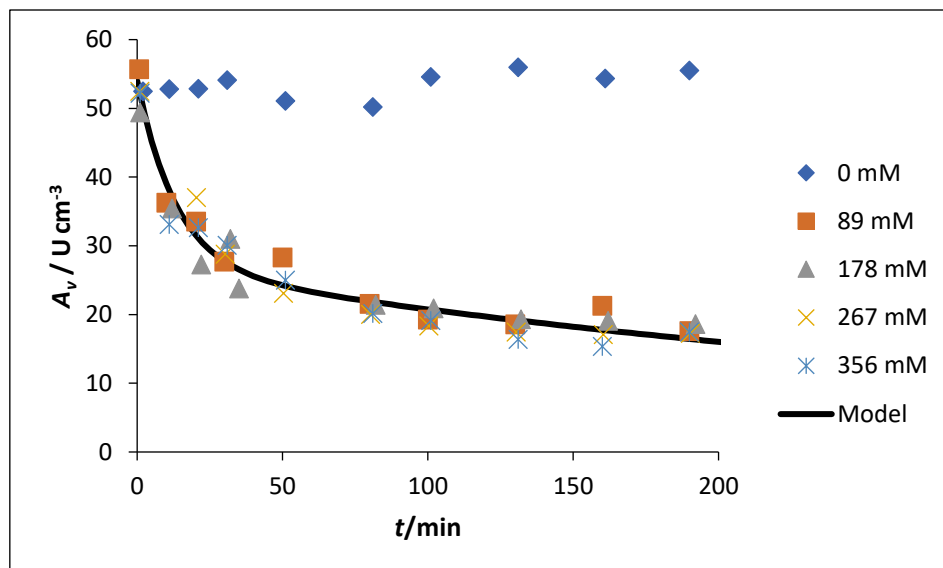
| Parametar | Vrijednost |
|---|--------------|
| $V_m^{\text{BFD}} / \text{U mg}^{-1}$ | 19,95±0,83 |
| $K_m^{\text{benzaldehyd}} / \text{mmol dm}^{-3} *$ | 19,40 |
| $K_m^{\text{acetaldehyd}} / \text{mmol dm}^{-3} *$ | 775,0 |
| $K_{iS}^{\text{acetaldehyd}} / \text{mmol dm}^{-3}$ | 430,54±82,67 |

* Pepper et al., 2011

Vrijednost Michaelis – Menteničine konstante, K_m^S , opisuje afinitet enzima prema supstratu, odnosno što je navedena vrijednost niža, enzim će biti specifičniji za određeni supstrat. S obzirom na to, prema literaturnim podacima za Michaelis – Menteničine konstante za benzaldehid i acetaldehyd, za korišteni enzim BFD, benzaldehid značajno specifičniji supstrat u odnosu na acetaldehyd. Također, prema procijenjenoj konstanti inhibicije acetaldehydom može se zaključiti da acetaldehyd značajno inhibira enzim.

4.2. Utjecaj acetaldehida na stabilnost enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida*

Prisutnost acetaldehida u otopini utječe na brzinu deaktivacije enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida*. Stoga, je ispitan utjecaj različitih koncentracija acetaldehida na aktivnost enzima. Rezultati ispitivanja prikazani su kao ovisnost volumne aktivnosti enzima BFD (A_V) o vremenu trajanja inkubacije enzima uz različite koncentracije acetaldehida (Slika 4.4).



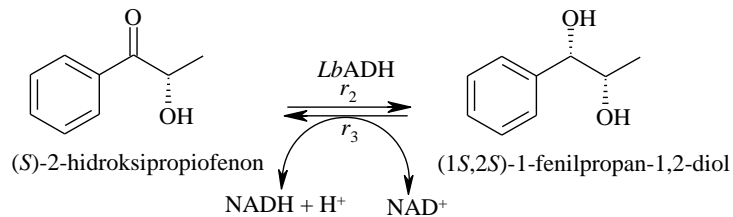
Slika 4.4 Utjecaj različitih koncentracija acetaldehida na aktivnost enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida*

Prisustvo acetaldehida uzrokuje deaktivaciju enzima benzoilformat dekarboksilaze, što se može zaključiti iz slike 4.4, a deaktivacija je približno ista pri svim ispitanim koncentracijama acetaldehida u otopini. Deaktivacija enzima BFD opisana je bieksponecijalnim modelom (jednadžba 3.2), a parametri navedenog modela procijenjeni su u programskom paketu Scientist na temelju mjerenja aktivnosti u vremenu pri različitim koncentracijama acetaldehida te su prikazani Tablicom 4.2.

Tablica 4.2 Parametri bieksponecijalnog modela deaktivacije enzima benzoilformat dekarboksilaze iz *Pseudomonas putida*

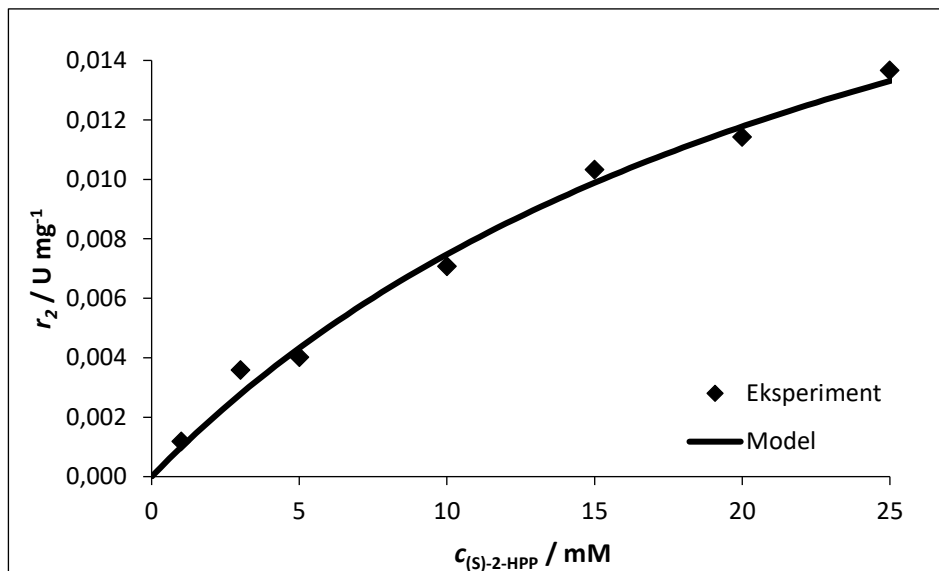
| Parametar | Vrijednost |
|--------------------------------|-----------------------|
| $\alpha^{BFD}/-$ | $0,497 \pm 0,036$ |
| $k_{d1}^{BFD}/\text{min}^{-1}$ | $0,00257 \pm 0,00058$ |
| $k_{d2}^{BFD}/\text{min}^{-1}$ | $0,07430 \pm 0,01177$ |

4.3 Kinetika enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis*

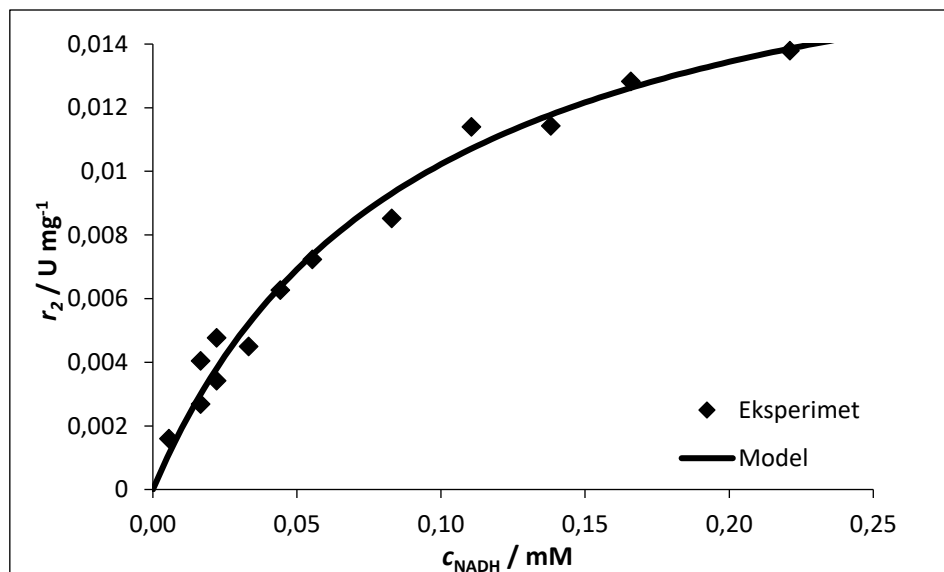


Slika 4.5 Redukcija (S)-2-hidroksipropiofenona u (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diol katalizirana LbADH

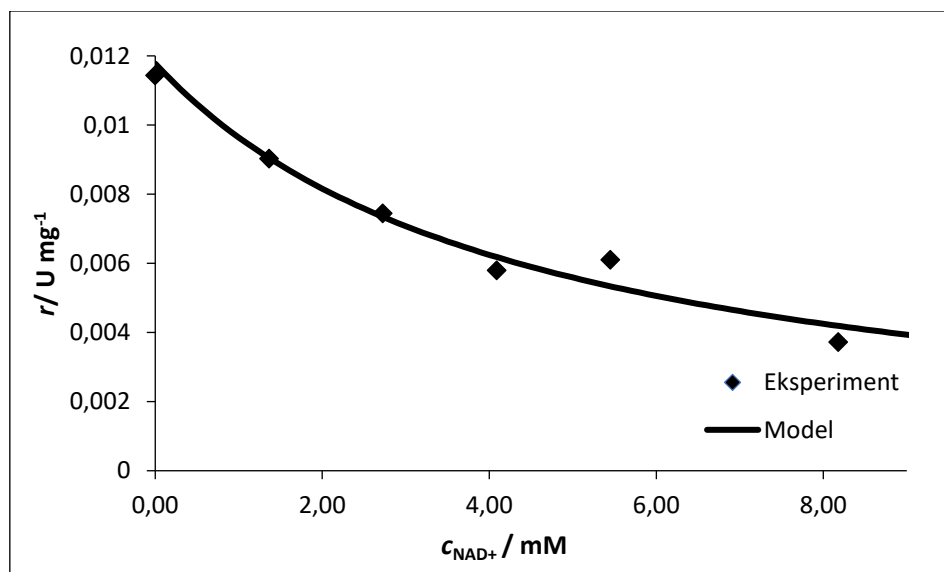
Kinetika enzima alkohol dehidrogenaze izolirane iz bakterije *Lactobacillus brevis*, odnosno reakcije proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola iz (S)-2-hidroksipropiofenona uz prisustvo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida (Slika 4.5) određena je metodom početnih brzina korištenjem modela u prilogu 2, te je prikazana kao ovisnost početne reakcijske brzine o koncentraciji supstrata, (S)-2-HPP (Slika 4.6) i koenzima NADH (Slika 4.7). Određen je i utjecaj produkta reakcije, NAD^+ na početnu reakcijsku brzinu (Slika 4.8).



Slika 4.6 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola uz izolirani enzim LbADH i koenzim NADH o koncentraciji (S)-2-hidroksipropiofenona ($c_{NADH}=0,138 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Slika 4.7 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola uz izolirani enzim *Lb*ADH o koncentraciji reduciranog nikotinamid adenin dinukleotida ($c_{(S)\text{-}2\text{-HPP}} = 19,993 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Slika 4.8 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola uz izolirani enzim *Lb*ADH i koenzim NADH o koncentraciji produkta, oksidiranog nikotinamid adenin dinukleotida ($c_{\text{NADH}} = 0,138 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{(S)\text{-}2\text{-HPP}} = 19,993 \text{ mmol dm}^{-3}$)

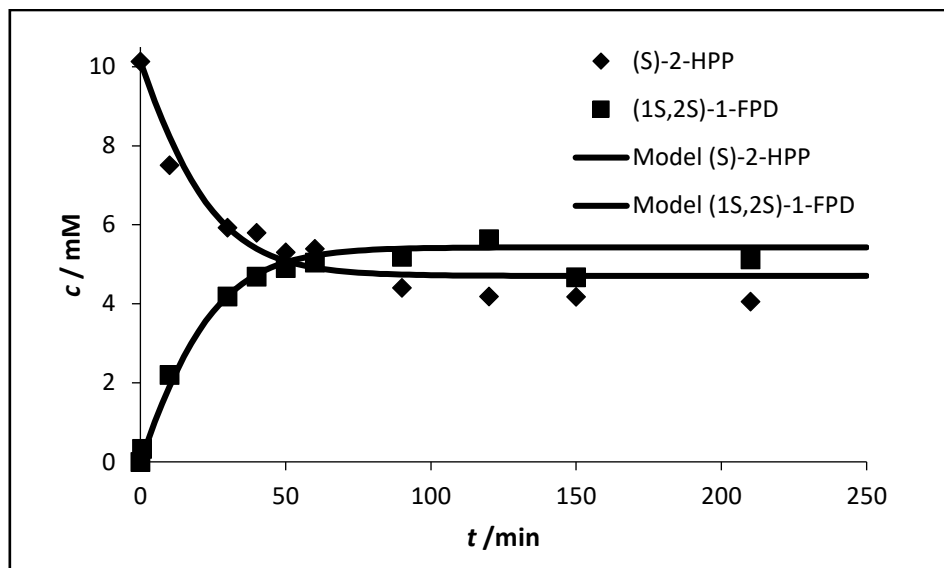
Kinetika proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola, redukcijom (S)-2-HPP, katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz *Lactobacillus brevis* uz prisustvo koenzima nikotinamid adenin dinukleotida opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom

jednadžbom s kompetitivnom inhibicijom produktom (jedn. 3.3). Vrijednosti Michaelis – Menteničinih konstanti za (*S*)-2-hidroksipropiofenon ($K_m^{(S)\text{-}2\text{-HPP}}$) i koenzim NADH (K_m^{NADH}), konstanta inhibicije za NAD^+ ($K_i^{\text{NAD}^+}$) i maksimalna specifična brzina reakcije, odnosno maksimalna aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze (V_m^{LbADH}) procijenjene su nelinearnom regresijom u Scientistu te su prikazane Tablicom 4.3.

Tablica 4.3 Kinetički parametri u reakciji proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola iz (*S*)-2-hidroksipropiofenona uz enzim alkohol dehidrogenazu izoliranu iz bakterije *Lactobacillus brevis* i prisustvo koenzima nikotinamid adenin difosfata

| Parametar | Vrijednost |
|---|--------------------------------------|
| $V_m^{\text{LbADH}} / \text{U mg}^{-1}$ | 0,04615 ± 0,00797 |
| $K_m^{(S)\text{-}2\text{-HPP}} / \text{mmol dm}^{-3}$ | 27,0096 ± 7,41170 |
| $K_m^{\text{NADH}} / \text{mmol dm}^{-3}$ | 0,09191 ± 0,01187 |
| $K_i^{\text{NAD}^+} / \text{mmol dm}^{-3}$ | 1,80538 ± 0,13923 |
| $k_3^{\text{ADH}} / \text{min}^{-1}$ | 0,000215 ± 1,8229 · 10 ⁻⁵ |

Kinetika povratne reakcije nije izmjerena nezavisnim mjerenjima metodom početnih brzina zbog nedostupnosti supstrata tj. (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola. Stoga je kinetika ove reakcije opisana kinetikom drugog reda odnosno kinetikom prvog reda u odnosu na svaki supstrat koji sudjeluje u reakciji (jedn. 3.4). Konstanta brzine povratne reakcije, k_3 , je procijenjena iz eksperimenta koji je proveden s približno ekvimolarnim koncentracijama supstrata i bez regeneracije koenzima (Slika 4.9) metodom nelinearne regresije u Scientistu (Prilog 10) i iznosi $k_3 = 0.000215 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$.

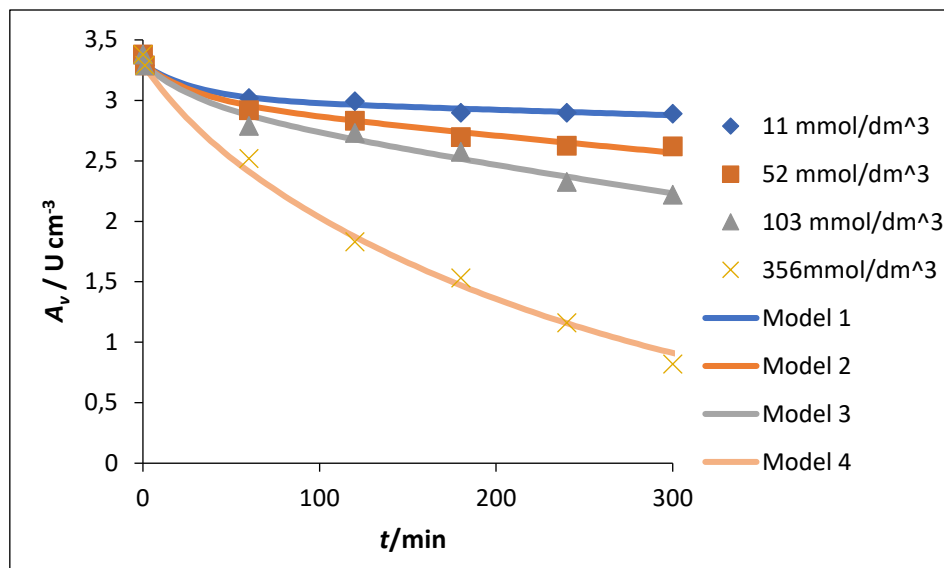


Slika 4.9 Promjena koncentracije (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola u reakciji proizvodnje (1S,2S)-1-FPD uz izolirani enzim *LbADH* i koenzim NADH, bez regeneracije koenzima NADH ($c_{ADH}=5 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{NADH}=10,113 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{(S)\text{-}2\text{-HPP}} = 10,321 \text{ mmol dm}^{-3}$;))

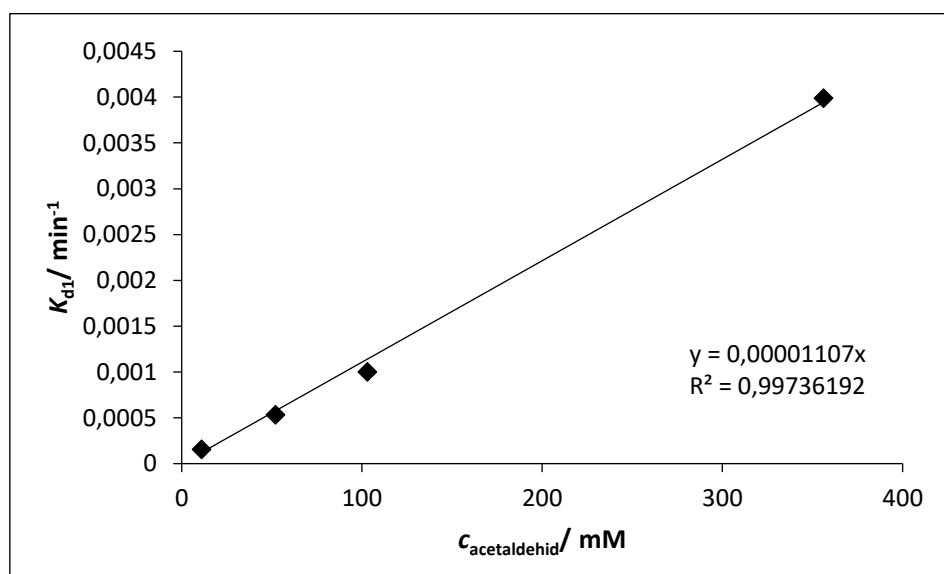
Prema procijenjenim vrijednostima Michaelis – Menteničine konstante (Tablica 4.3) može se zaključiti kako je NADH znatno specifičniji supstrat za *LbADH* u odnosu na (S)-2-HPP. Također, prema procijenjenoj konstanti inhibicije za NAD^+ može se zaključiti da navedeni produkt značajno inhibira enzim.

4.4. Utjecaj acetaldehida na stabilnost enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis*

Različite koncentracije acetaldehida u otopini utječu na brzinu deaktivacije alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis*. Ispitan je utjecaj različitih koncentracija acetaldehida na aktivnost enzima modelom iz priloga 8. Rezultati ispitivanja prikazani su kao ovisnost volumne aktivnosti enzima ADH (A_V) o vremenu trajanja inkubacije enzima uz različite koncentracije acetaldehida (Slika 4.10).



Slika 4.10 Utjecaj različitih koncentracija acetaldehida na aktivnost enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis*



Slika 4.11 Ovisnost konstante deaktivacije o koncentraciji acetaldehida ($c_{\text{acetaldehyd}}=11 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{acetaldehyd}}=52 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{acetaldehyd}}=103 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{acetaldehyd}}=356 \text{ mmol dm}^{-3}$; $k_{d2}=0.03322 \text{ min}^{-1}$; $\alpha=0.91306$)

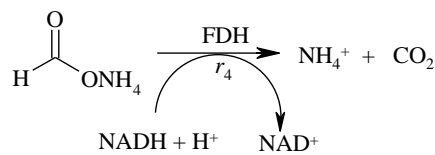
Prisustvo acetaldehida uzrokuje deaktivaciju enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobacillus brevis*, što se može zaključiti iz slike 4.8, a deaktivacija enzima raste kako se povećava koncentracija acetaldehida u otopini. Deaktivacija enzima ADH također je opisana biekspencijalnim modelom (jednadžba 3.6), a parametri navedenog modela procijenjeni su

u programskom paketu Scientist pomoću modela iz priloga 8, te su prikazani Tablicom 4.4. Konstanta deaktivacije k_{d1} ovisi o koncentraciji acetaldehida, tj. vrijednost konstante deaktivacije raste porastom koncentracije acetaldehida u sustavu (Slika 4.11). Ovisnost je opisana jednadžbom $k_{d1} = 0,00001107 * c_{\text{acetaldehid}}$, Navedena jednadžba je uvrštena u model prilikom provođenja simulacija proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola. Parametri α^{LbADH} i k_{d2} su jednaki za sve ispitane koncentracije.

Tablica 4.4 Parametri bieksponencijalnog modela deaktivacije enzima alkohol dehidrogenaze iz *Lactobecillus brevis*

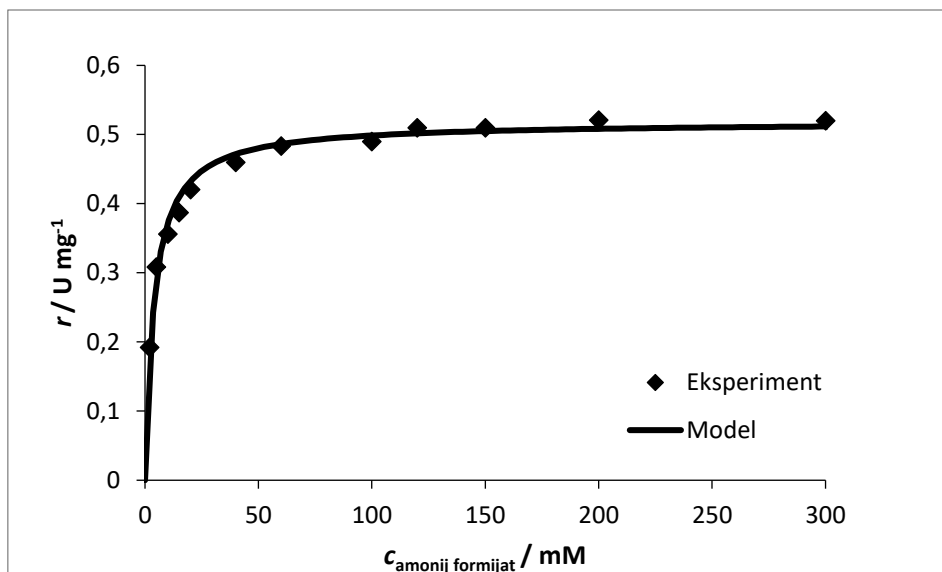
| Parametar | Vrijednost |
|-------------------------------------|--------------------------------------|
| α^{LbADH} | 0,91306±0,02401 |
| k_{d1}^{ADH} [min ⁻¹] | 0.0000111 * $c_{\text{acetaldehid}}$ |
| k_{d2}^{ADH} [min ⁻¹] | 0,0332±0,0245 |

4.5. Kinetika enzima formijat dehidrogenaze iz *Candida boidinii*

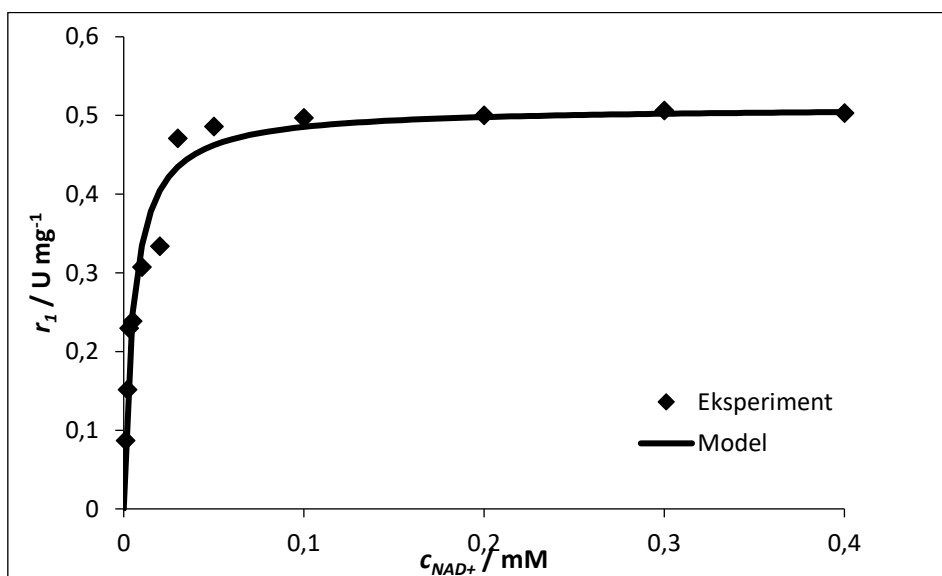


Slika 4.12 Oksidacija amonij formijata katalizirana enzimom FDH

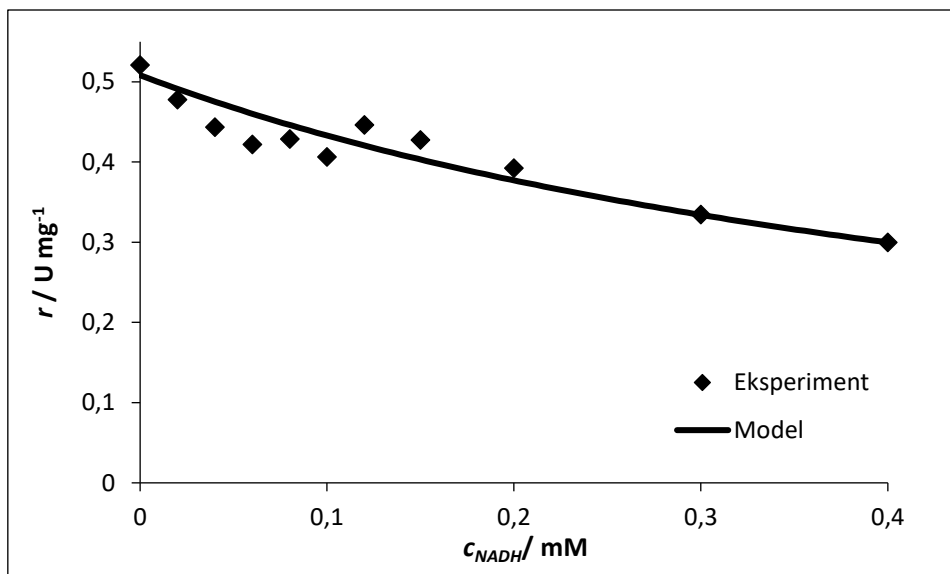
Kinetika enzima formijat dehidrogenaze izolirane iz kvasca *Candida boidinii* određena je u reakciji oksidacije amonij formijata u ugljikov dioksid i amonijev ion uz istovremenu redukciju NAD^+ u NADH (Slika 4.12) korištenjem modela iz priloga 3. Prikazana je kao ovisnost početne reakcijske brzine o koncentracijama supstrata, amonij formijata i NAD^+ (Slika 4.13 i Slika 4.14). Ispitan je i utjecaj produkta, NADH (Slika 4.15), te utjecaj supstrata iz drugih reakcija, (S)-2-HPP i acetaldehida (Slika 4.16 i Slika 4.17), na početnu reakcijsku brzinu.



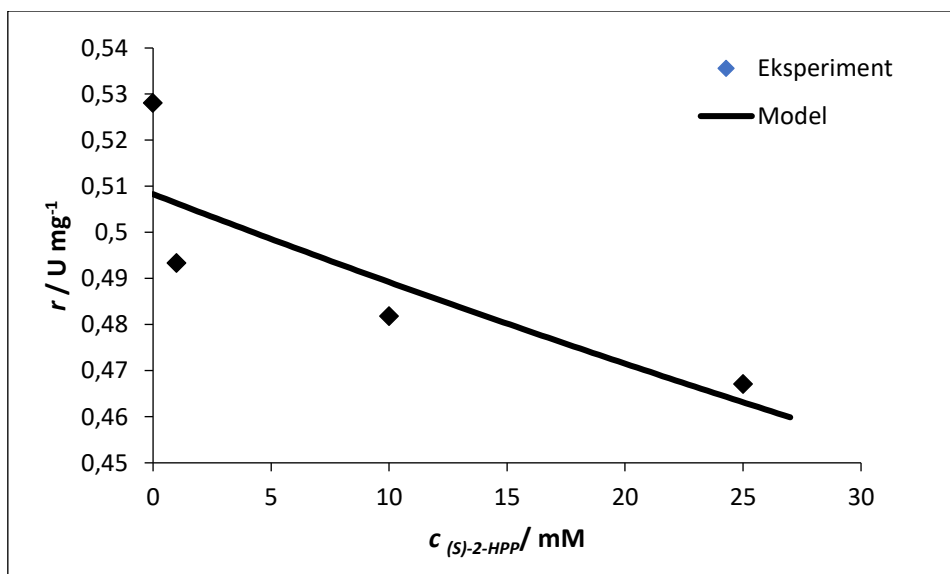
Slika 4.13 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim CbFDH o koncentraciji amonij formijata ($c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$)



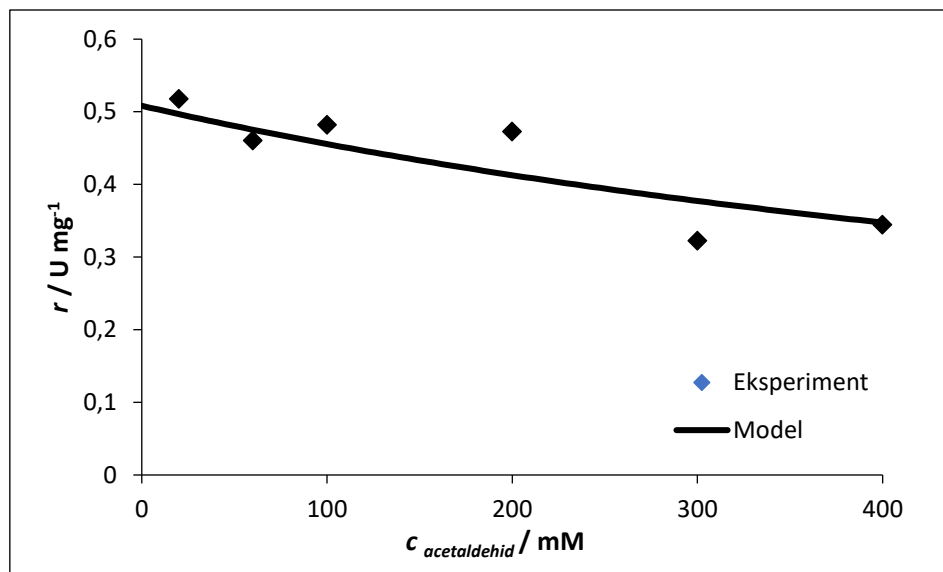
Slika 4.14 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim CbFDH o koncentraciji supstrata, nikotinamid adenin dinukleotida ($c_{\text{amonij formijata}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Slika 4.15 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim CbFDH o koncentraciji produkta, NADH ($c_{NAD^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{amonij formijata}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Slika 4.16 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim CbFDH o koncentraciji (S)-2-HPP ($c_{NAD^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{amonij formijata}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$)



Slika 4.17 Ovisnost početne reakcijske brzine u reakciji oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim *CbFDH* o koncentraciji acetaldehida ($c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{amonij formijata}} = 200 \text{ mmol dm}^{-3}$)

Prema grafičkim prikazima ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentracijama produkta reakcije, NADH, i supstrata iz drugih reakcija, (S)-2-HPP i acetaldehida (Slike 4.15, 4.16, 4.17), može se zaključiti da navedene komponente inhibiraju reakciju, odnosno smanjuju aktivnost enzima. Stoga je kinetika regeneracije koenzima nikotinamid adenin dinukleotida pomoću amonij formijata i enzima formijat dehidrogenaze izolirane iz kvasca *Candida boidinii* opisana dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NADH, s uključenom inhibicijom supstratima iz drugih reakcija, (S)-2-hidroksipropiofenonom i acetaldehidom (jednadžba 3.5). U tablici 4.5 prikazane su vrijednosti Michaelis – Menteničinih konstanti za amonij formijat i NAD^+ ($K_m^{\text{amonij formijat}}$ i $K_m^{\text{NAD}^+}$), konstante inhibicije za NADH, (S)-2-HPP i acetaldehyd (K_i^{NADH} , $K_i^{(\text{S})-2\text{-HPP}}$ i $K_i^{\text{acetaldehyd}}$) te maksimalne aktivnosti enzima *CbFDH*, odnosno maksimalne specifične reakcijske brzine (V_m^{CbFDH}) koje su procijenjene nelinearnom regresijom u Scientistu modelima iz priloga 4,5,6 i 7.

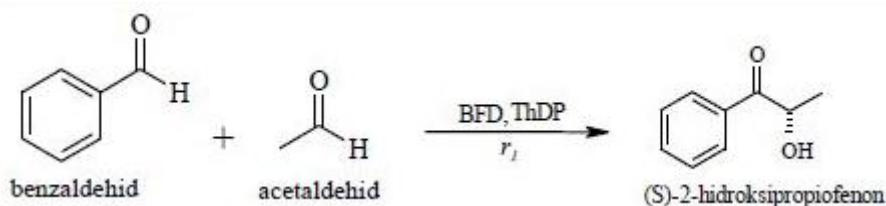
Tablica 4.5 Kinetički parametri u reakciji regeneracije koenzima nikotinamid adenin dinukleotida, odnosno oksidacije amonij formijata uz izolirani enzim formijat dehidrogenazu izoliranu iz kvasca *Candida boidinii*

| Parametar | Vrijednost |
|--|----------------------|
| $V_m^{CbFDH} / U \text{ mg}^{-1}$ | $0,5211 \pm 0,0082$ |
| $K_m^{\text{amonij formijat}} / \text{mmol dm}^{-3}$ | $3,9737 \pm 0,4829$ |
| $K_m^{\text{NAD}^+} / \text{mmol dm}^{-3}$ | $0,0053 \pm 0,0005$ |
| $K_i^{\text{NADH}} / \text{mmol dm}^{-3}$ | $0,0030 \pm 0,0003$ |
| $K_i^{(S)\text{-2-HPP}} / \text{mmol dm}^{-3}$ | $4,9960 \pm 1,6077$ |
| $K_i^{\text{acetaldehid}} / \text{mmol dm}^{-3}$ | $16,8261 \pm 3,8190$ |

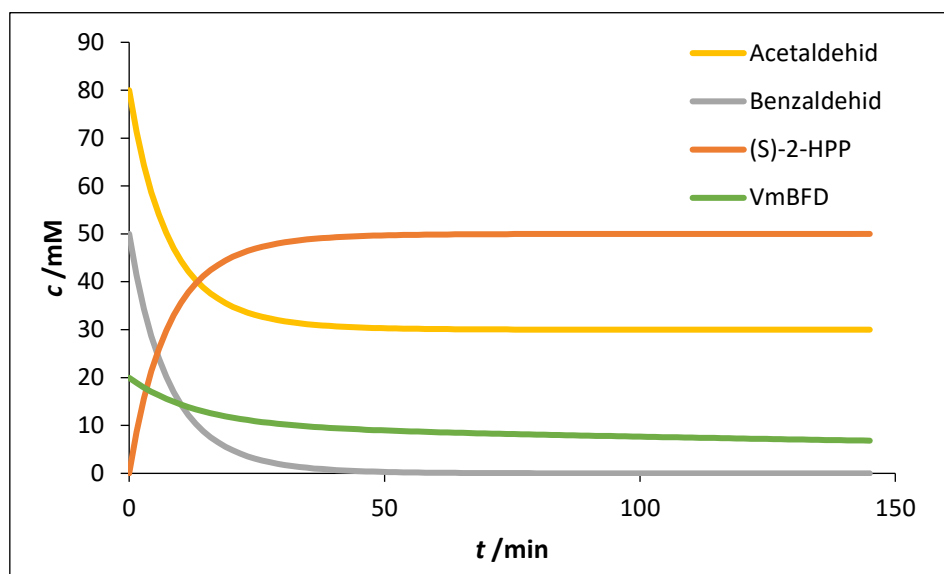
S obzirom na procijenjene vrijednosti Michaelis – Menteničine konstante može se zaključiti kako je supstrat NAD^+ znatno specifičniji za korišteni enzim, *CbFDH*, u odnosu na amonij formijat. Iz procijenjenih konstanti inhibicije, može se zaključiti da NADH značajno inhibira reakciju oksidacije amonij formijata uz korišteni enzim, dok prisutnost (S) -2-HPP i acetaldehida iz drugih reakcija, nema značajan utjecaj na brzinu reakcije.

4.6 Simulacija proizvodnje (S) -2-hidroksipropiofenona u reakciji karboligacije uz katalizator benzoilformat dekarboksilazu

Simulacija proizvodnje (S) -2-hidroksipropiofenona u reakciji karboligacije uz katalizator benzoilformat dekarboksilazu (Slika 4.18) u kotlastom reaktoru je provedena korištenjem modela u prilogu 9, uz kinetičke podatke procijenjene iz nezavisnih mjerenja (Tablica 4.16). Primjer jedne simulacije pri koncentraciji benzaldehida $c_{\text{benzaldehyd}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$, acetaldehida $c_{\text{acetaldehyd}} = 80 \text{ mmol dm}^{-3}$ i enzima benzoilformat dehidrogenaze $c_{\text{BFD}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$ dan na slici 4.19.

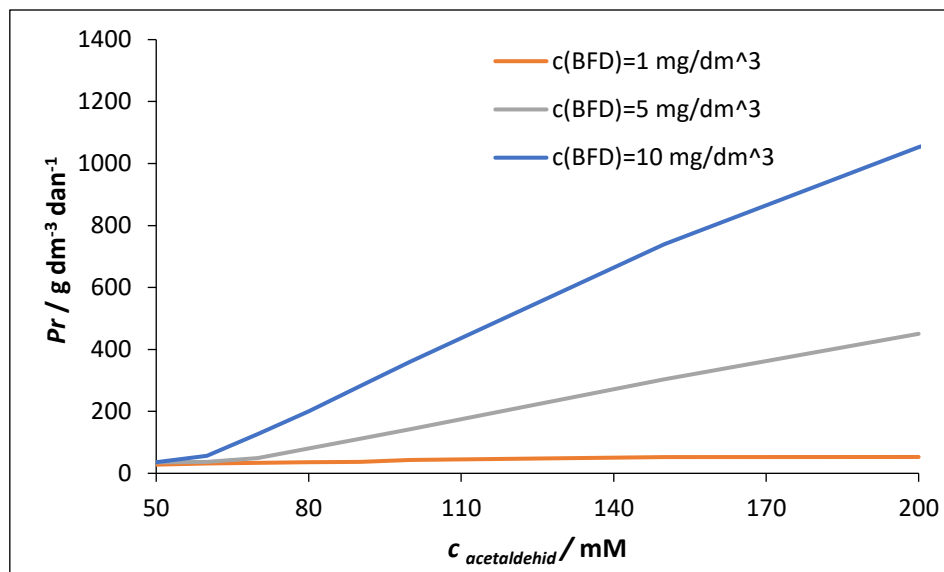


Slika 4.18 Shema proizvodnje (S) -2-hidroksipropiofenona



Slika 4.19 Simulacija proizvodnje (*S*)-2-hidroksipropiofenona u reakciji karboligacije uz katalizator benzoilformat dekarboksilazu ($c_{\text{benzaldehyd}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{acetaldehyd}} = 80 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{BFD}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$)

Produktivnost reakcije karboligacije, tj. proizvodnje (*S*)-2-hidroksipropiofenona uz katalizator benzoilformat dekarboksilazu izračunata je s obzirom na različite koncentracije acetaldehida i enzima benzoilformat dekarboksilaze (Slika 4.20), pri konverziji od 99%.

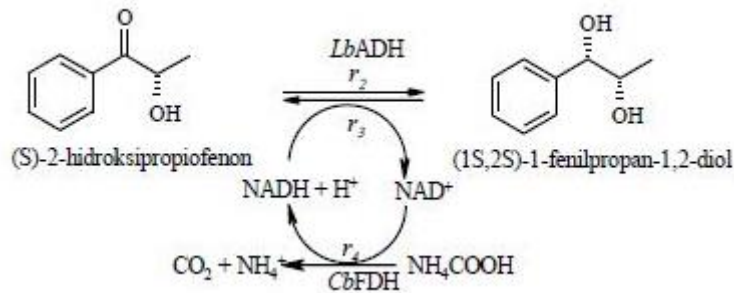


Slika 4.20 Ovisnost produktivnosti reakcije o koncentraciji acetaldehida ($c_{\text{acetaldehyd}} = 50\text{-}200 \text{ mmol dm}^{-3}$) i enzima benzoilformat dekarboksilaze BFD ($c_{\text{BFD}}=1;5;10 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{benzaldehyd}}=50 \text{ mmol dm}^{-3}$)

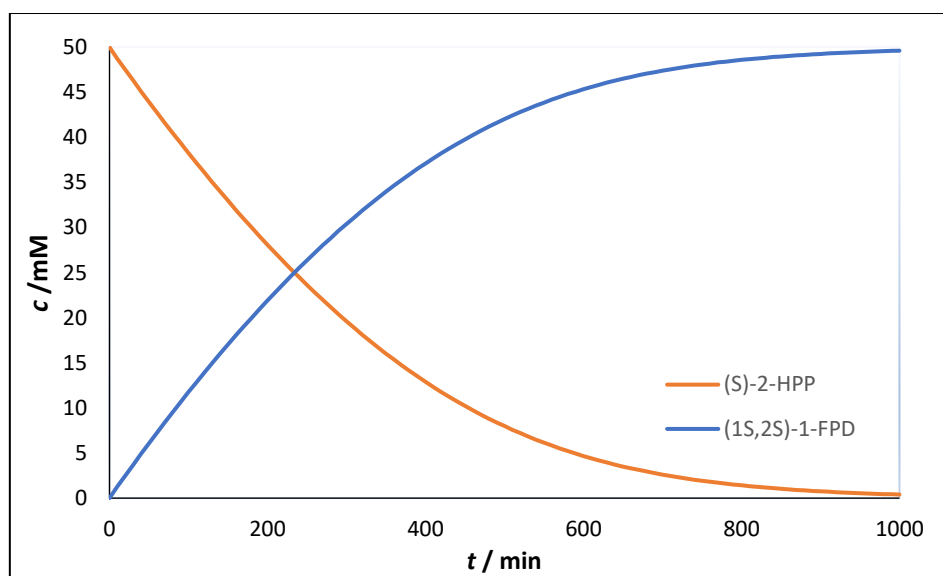
Produktivnost reakcije proizvodnje (*S*)-2-hidroksipropiofenona raste s porastom koncentracije supstrata, acetaldehida i enzima benzoilformat dekarboksilaze. Iako je uočeno da je produktivnost reakcije najveća pri koncentraciji enzima benzoilformat dehidrogenaze od 10 mg dm^{-3} , daljnje simulacije su provedene pri koncentraciji enzima benzoilformat dekarboksilaze od 5 mg dm^{-3} , zbog ekonomičnosti procesa.

4.7 Simulacija proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola oksidacijom (*S*)-2-hidroksipropiofenona uz regeneraciju koenzima NADH

Simulacija proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola oksidacijom (*S*)-2-hidroksipropiofenona uz regeneraciju koenzima NADH (Slika 4.21) u kolastom reaktoru je provedena korištenjem modela u prilogu 11 korištenjem kinetičkih podataka procijenjenih iz nezavisnih mjerenja (Tablica 4.3 i Tablica 4.5). Primjer jedne simulacije je dan na slici 4.22.



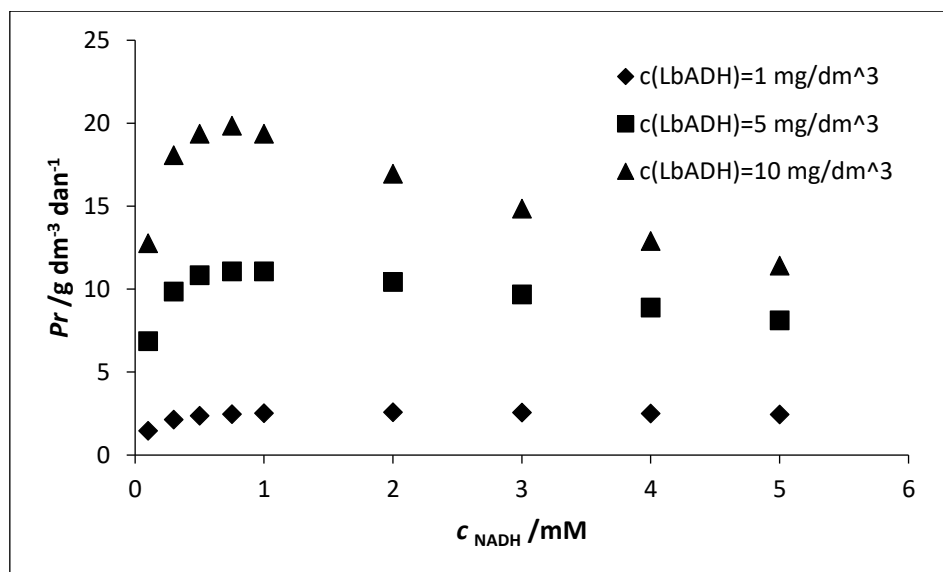
Slika 4.21 Shema proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola



Slika 4.22 Simulacija proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola oksidacijom (S)-2-hidroksipropiofenona uz regeneraciju koenzima NADH ($c_{(S)\text{-}2\text{-HPP}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{NADH} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{LbADH} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{amonij formijat}} = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$)

Produktivnost reakcije proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola oksidacijom (S)-2-hidroksipropiofenona uz regeneraciju koenzima NADH je određena s obzirom na utjecaj različitih koncentracija koenzima NADH pri različitim koncentracijama enzima FDH (1, 5, 10 mg cm^{-3}). Iz rezultata koji nisu prikazani uočeno je da produktivnost ne ovisi o koncentraciji enzima FDH u navedenom rasponu koji je ispitan. Stoga je u daljnim simulacijama korištena najniža koncentracija enzima FDH ($c_{FDH} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$). Zatim je određena produktivnost reakcije proizvodnje (1S,2S)-1-fenilpropan-1,2-diola oksidacijom (S)-2-hidroksipropiofenona uz regeneraciju koenzima NADH je određena s obzirom na utjecaj različitih koncentracija

koenzima NADH pri različitim koncentracijama enzima *LbADH* (1, 5, 10 mg cm⁻³) (Slika 4.23).

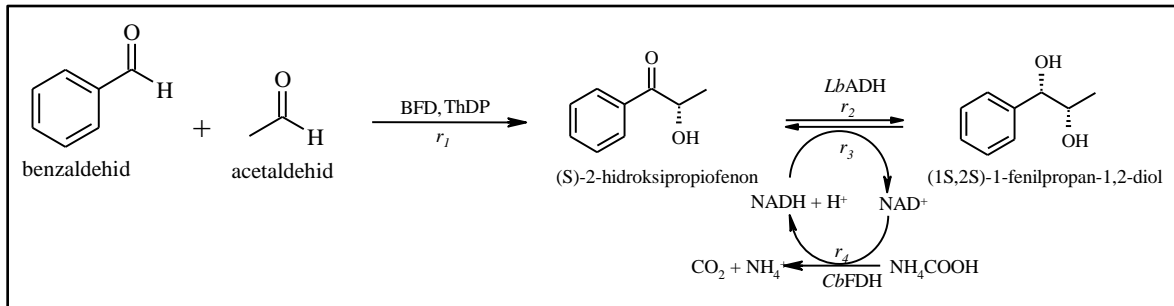


Slika 4.23 Utjecaj različitih koncentracija koenzima NADH i enzima alkohol dehidrogenaze izolirane iz bakterije *Lactobacillus brevis* na produktivnost reakcije ($c_{\text{FDH}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{(S)-2-HPP}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{amonij formijat}} = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$)

Povećanjem koncentracije enzima alkohol dehidrogenaze izolirane iz bakterije *Lactobacillus brevis* ($c_{\text{LbADH}} = 10 \text{ mg cm}^{-3}$) pri nižim koncentracijama koenzima NADH ($c_{\text{NADH}} = 0,3\text{-}1 \text{ mM}$) dolazi do značajnog porasta produktivnosti. Enzim alkohol dehidrogenaza izolirana iz bakterije *Lactobacillus brevis* ne utječe značajno na produktivnost reakcije pri koncentraciji ($c_{\text{LbADH}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$) na rasponu koncentracija koenzima NADH ($c_{\text{NADH}} = 0,3\text{-}5 \text{ mM}$). Također je uočeno da pri koncentraciji NADH većoj od 1 mmol dm^{-3} , dolazi do pada produktivnosti zbog inhibicije reakcije regeneracije koenzima katalizirane FDH (Slika 4.15). U daljnim simulacijama je korištena koncentracija enzima *LbADH* od $c_{\text{LbADH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$, te koncentracija NADH $c_{\text{NADH}} = 1 \text{ mM}$.

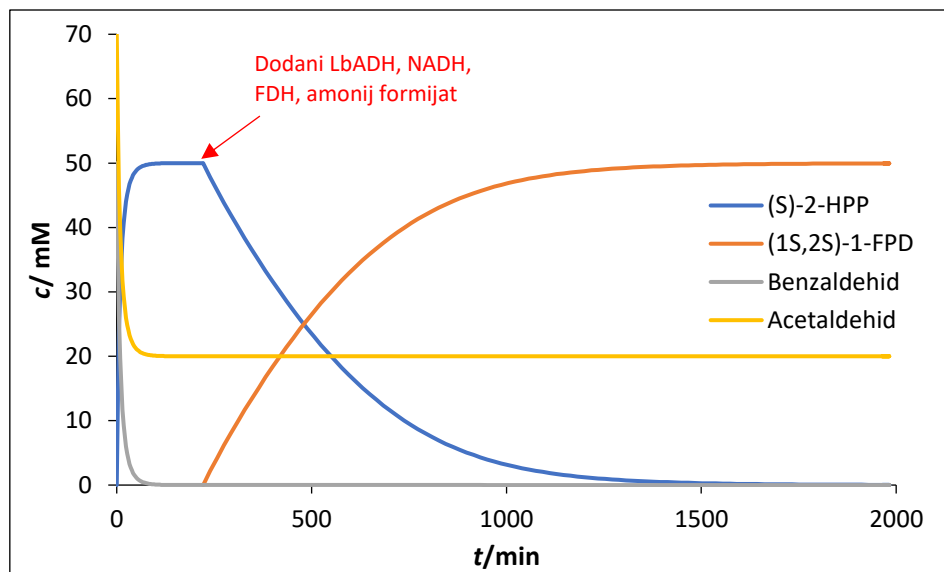
4.8. Simulacija proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru

Simulacija proizvodnje optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola provedena je u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH (Slika 4.24) u kotlastom reaktoru na dva načina, sekvencijalni i simultani način.



Slika 4.24 Shema procesa proizvodnje (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima

Simulacija proizvodnje optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH na sekvencijalni način (Slika 4.25) provedena je u dva koraka korištenjem modela u prilogu 11. U prvom koraku, je korištenjem simulacije pomoću modela praćena promjena koncentracije benzaldehida ($c_{\text{benzaldehyd}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$) i acetaldehida ($c_{\text{acetaldehyd}} = 70 \text{ mmol dm}^{-3}$), uz enzim benzoilformat dekarboksilazu BFD ($c_{\text{BFD}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$). Nakon što je potrošen benzaldehid ili je njegova potrošnja prestala zbog deaktivacije BFD-a, simulacija se provela na način da su u reakcijsku otopinu dodani enzimi LbADH ($c_{\text{LbADH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$) i CbFDH ($c_{\text{CbFDH}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$), kao i koenzim NADH ($c_{\text{NADH}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$), te amonij formijat ($c_{\text{amonij formijat}} = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$).

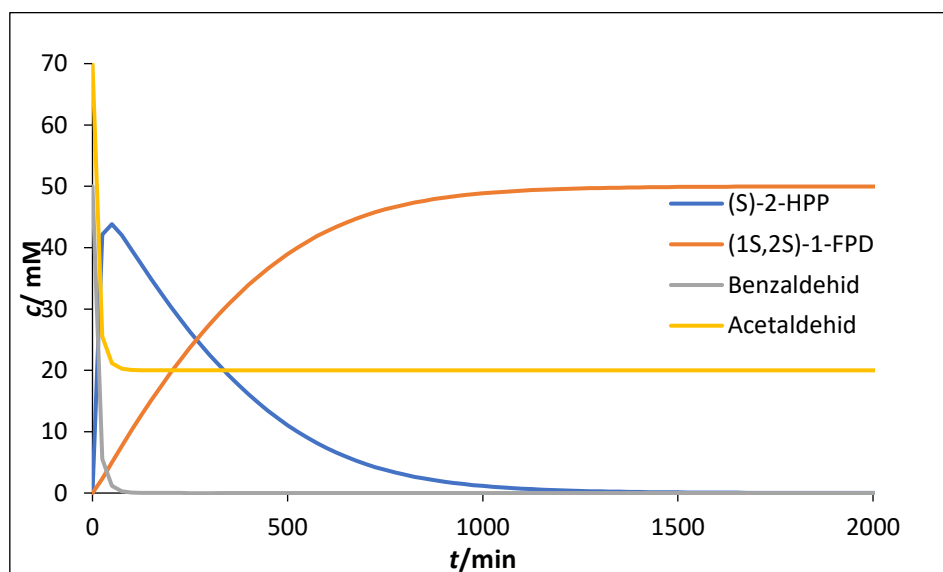


Slika 4.25 Proizvodnja optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola provedena u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru $c_{\text{benzaldehyd}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{acetaldehyd}} = 70 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{BFD}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{LbADH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{NADH}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{FDH}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{amonij formijat}} = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$

Kao što je vidljivo i prema slici 4.25 u prvom koraku proizveden je (*S*)-2-hidroksipropiofenon iz benzaldehida (50 mmol dm^{-3}) i acetaldehida (70 mmol dm^{-3}). Reakcija je katalizirana enzimom BFD. Nakon 1.253 minuta reakcije postignuta je konverzija benzaldehida od $X_{\text{benzaldehyd}} = 99\%$. U drugom koraku eksperimenta provedena je redukcija (*S*)-2-HPP u (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol katalizirana enzimom *LbADH* uz prisustvo koenzima NADH i njegovu istovremenu regeneraciju. Regeneracija je provedena uz dodatak amonijeva formijata i enzima *CbFDH*. Koncentracija (*S*)-2-HPP na početku drugog ciklusa eksperimenta iznosila je $c_{(\text{S})\text{-2-HPP}} = 49,99 \text{ mmol dm}^{-3}$ te je bilo potrebno oko 1031 minuta da se postigne njegova potpuna konverzija u (1*S*,2*S*)-1-FPD. Simulacije su provedene za različite koncentracije acetaldehida ($c_{\text{acetaldehyd}} = 50\text{-}200 \text{ mmol dm}^{-3}$), te je iz rezultata uočeno da porastom koncentracije acetaldehida potrebno duže provoditi reakciju kako bi se postigla potpuna konverzija benzaldehida. Tome je uzrok deaktivacija enzima *LbADH* koja raste s porastom koncentracije acetaldehida.

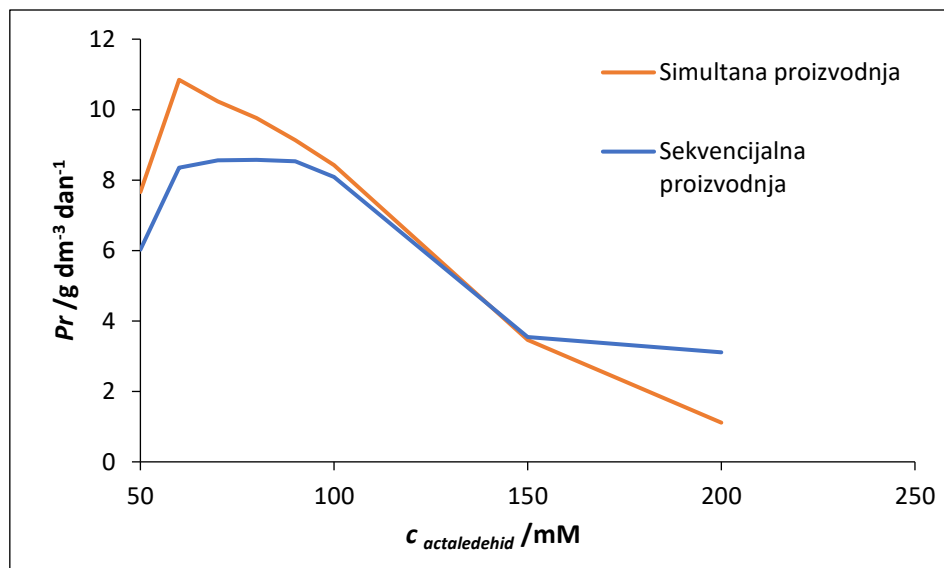
Pri simultanoj proizvodnji optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH (Slika 4.26) sve komponente su dodane istodobno, benzaldehyd ($c_{\text{benzaldehyd}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$), acetaldehyd ($c_{\text{acetaldehyd}} = 70 \text{ mmol dm}^{-3}$), enzim BFD ($c_{\text{BFD}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$), enzim *LbADH* ($c_{\text{LbADH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$), enzim *CbFDH*

($c_{CBFDH} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$), kao i koenzim NADH ($c_{NADH} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$), te amonij formijat ($c_{\text{amonij formijat}} = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$). Simulacija je provedena korištenjem modela u prilogu 12.



Slika 4.26 Proizvodnja optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola provedena u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru; simultani način $c_{\text{benzaldehyd}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{acetaldehyd}} = 70 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{BFD} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{LBADH} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{NADH} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{FDH} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{amonij formijat}} = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$

Prema slici 4.26 proizveden je (1*S*,2*S*)-1-FPD na simultani način. Nakon 1.050 minuta reakcije postignuta je konverzija (S)-HPP-a od $X_{(S)\text{-2-HPP}} = 99\%$. Također kao i kod sekvencijalne proizvodnje je uočeno da porastom koncentracije acetaldehida potrebno duže provoditi reakciju kako bi se postigla potpuna konverzija benzaldehida.



Slika 4.27 Produktivnost reakcije proizvodnje optički aktivnog (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola simultani i sekvencijalni način $c_{\text{benzaldehyd}} = 50 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{acetaldehyd}} = 50\text{-}200 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{BFD}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{ADH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{NADH}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$; $c_{\text{FDH}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$; $c_{\text{amonij formijat}} = 150 \text{ mmol dm}^{-3}$

Zaključno je uspoređena produktivnost reakcije s obzirom na sekvencijalni i simultani način proizvodnje (Slika 4.27). Najveća produktivnost je ostvarena pri koncentraciji acetaldehida od 60 mmol dm^{-3} pri simultanoj proizvodnji.

5.ZAKLJUČAK

Ispitivanjem utjecaja acetaldehida na deaktivaciju enzima BFD pokazano je da acetaldehid značajno deaktivira BFD, ali ne ovisi značajno o koncentracijama acetaldehida. Kinetika enzima BFD opisana je dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s inhibicijom supstratom, acetaldehidom. Prema rezultatima provedenih ispitivanja može se vidjeti da je benzaldehid značajno specifičniji supstrat za BFD u odnosu na acetaldehid.

Dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NAD^+ opisana je kinetika enzima *LbADH* uz prisustvo koenzima NADH, dok je kinetika povratne reakcije opisana kinetikom drugog reda. Utvrđeno je da je NADH značajno specifičniji supstrat za *LbADH* u odnosu na (S)-2-HPP. Ispitivanjem utjecaja acetaldehida na stabilnost enzima *LbADH* pokazano je da acetaldehid deaktivira enzim, te da brzina deaktivacije ovisi o koncentraciji acetaldehida

Kinetika enzima *CbFDH* također je opisana dvosupstratnom Michaelis – Menteničinom kinetikom s kompetitivnom inhibicijom produktom, NADH, s uključenom inhibicijom supstratima iz drugih reakcija, (S)-2-HPP i acetaldehidom. Prema rezultatima provedenih ispitivanja zaključeno je da je NAD^+ znatno specifičniji supstrat za *CbFDH* u odnosu na amonij formijat.

Postavljen je matematički model procesa biokatalitičke sinteze (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH te su provedene simulacije uz pretpostavku dva pristupa višeenzimske sinteze: sekvencijalni i simulatani.

Nakon provedene simulacije biokatalitičke sinteze (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diola u višeenzimskom sustavu uz regeneraciju koenzima NADH u kotlastom reaktoru kao optimalni način za provedbu reakcije pokazao se simultani način proizvodnje pri koncentraciji acetaldehida od 60 mmol dm^{-3} s obzirom na veću produktivnost reakcije.

6.LITERATURA

1. Goldberg, K., Schroer, K., Lütz, S., Biocatalytic ketone reduction- - a powerful tool for the production of chiral alcohols-part I: processes with isolated enzymes, *Applied Microbiology and Biotechnology* 76 (2007), 237-248
2. Vasić-Rački, Đ., Findrik, Z., Vrsalović Presečki, A., Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Applied Microbiology and Biotechnology* 91 (2011), 845-856
3. Illanes, A., *Enzyme Biocatalysis: principles and applications*, Springer (2008), 1-31
4. Kulig, K. J., Stereoselective synthesis of vicinal diols with enzymatic cascade reactions, disertacija, Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (2013)
5. Čulig J., Modeliranje sinteze intermedijera statina katalizirane 2-deoksiriboza-5-fosfat aldolazom, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2016)
6. Pohl, M., Lingen B., Müller M., Thiamin-Diphosphate-Dependent Enzymes: New Aspects of Asymmetric C-C Bond Formation, *Chemistry A European Journal* 8 (2002), 5288-5295
7. Iding, H., Siegert, P., Mesch, K., Pohl, M., Application of α -keto acid decarboxylases in biotransformations, *Biochimica et Biophysica Acta* 1385 (1998), 307-322
8. Machielsen, R., Looger, L., Raedts, J., Dijkhuizen, J., Hummel, W., Hennemann, H.G., Dausmann, T., Oost, J., Cofactor engineering of *Lactobacillus brevis* alcohol dehydrogenase by computational design, *Engineering in Life Sciences* 9 (2009), 34-44
9. Halloum I., Thompson, B., Pugh, S., Nielsen, D.R., Activity of *Lactobacillus brevis* Alcohol Dehydrogenase on Primary and Secondary Alcohol Biofuel Precursors, *Fermentation* (2015), 24-37
10. Vrsalović Presečki, A., Studij fumaraze i alkohol dehidrogenaze u biotransformacijama, disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2006)

11. Schirwitz, K., Schmidt, A., Lamzin, V.S., High-resolution structures of formate dehydrogenase, *Protein Science* 16 (2007), 1146-1156
12. Hoyos, P., Sinisterra, J., Molinari, F., Alcantara, A. R., De Maria, P.D., Biocatalytic strategies for asymmetric synthesis of α -hidroxy ketones, *Accounts of Chemical Research* 43 (2010), 288-299
13. Solomon G., Fryhle, C.B., Snyder, S.A., *Organic Chemistry*, Wiley, (2014), 191 - 199
14. Ricca, E., Brucher, B., Schrittwieser J.H., Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 353 (2011), 2239- 2262
15. Dunn, I. J., Heinzle, E., Ingham, J., Pfenosil J. E, *Biological Reaction Engineering Dynamic Modelling Fundamentals with Simulation Examples*, Second, Completely Revised Edition, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim (2003) 67-115
16. Kosar V., *Kemijsko reakcijsko inženjerstvo (nastavni tekstovi)*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2017)
17. Pintarić H., *Proizvodnja optički aktivnog diola korištenjem višeenzimskog sustava*, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb (2016), 5-6

7.PRILOZI

Prilog 1

// MMBFD

IndVars: c

DepVars: r1, r2

Params: Vm, Kmacal, Kmba, Kis

$r1 = Vm * c * 356.41 / ((Kmba + c) * (Kmacal + 356.41 + 356.41 * 356.41 / Kis))$

$r2 = Vm * c * 49.19 / ((Kmba + 49.19) * (Kmacal + c + c * c / Kis))$

Vm = 4

Kmacal = 775

Kmba = 19.4

Kis = 1

Prilog 2

// MMADH

IndVars: c

DepVars: r1, r2

Params: Vm, Kmndh, KmHPP

$r1 = Vm * c * 19.993 / ((KmHPP + 19.993) * (Kmndh + c))$

$r2 = Vm * c * 0.138 / ((KmHPP + c) * (Kmndh + 0.138))$

Vm = 0.046150173052230972

Kmndh = 0.091910304886671609

KmHPP = 27.0366026762500269

Prilog 3

// MMFDH

IndVars: c

DepVars: r1, r2

Params: Vm, Kmfor, KmNAD

$r1 = Vm * c * 200 / ((Kmfor + 200) * (KmNAD + c))$

$r2 = Vm * c * 1 / ((Kmfor + c) * (KmNAD + 1))$

Vm = 0.521126186

Kmfor = 3.97373523

KmNAD = 0.00527077724

Prilog 4

// MMADHIN

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, Kmnadh, KmHPP, Ki

$r = Vm * 0.138 * 19.993 / ((KmHPP + 19.993) * (Kmnadh * (1 + c/Ki) + 0.138))$

Vm = 0.046150173052230972

Kmnadh = 0.091910304886671609

KmHPP = 27.0366026762500269

Ki = 1

Prilog 5

// INHAC

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, Kmfor, KmNAD, Kiac

$r = Vm * 1 * 200 / ((KmNAD + 1) * (Kmfor * (1 + (c/Kiac)) + 200))$

Vm = 0.521126186

Kmfor = 3.97373523

KmNAD = 0.00527077724

Kiac = 1

Prilog 6

// INHB HPP

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, Kmfor, KmNAD, KiHPP

$r = Vm * 1 * 200 / ((KmNAD + 1) * (Kmfor * (1 + (c/KiHPP)) + 200))$

Vm = 0.521126186

Kmfor = 3.97373523

KmNAD = 0.00527077724

KiHPP = 1

Prilog 7

// INH NADH

IndVars: c

DepVars: r

Params: Vm, Kmfor, KmNAD, KiNADH

$r = Vm * 1 * 200 / ((KmNAD * (1 + (c / KiNADH))) + 1) * (Kmfor + 200)$

Vm = 0.521126186

Kmfor = 3.97373523

KmNAD = 0.00527077724

KiNADH = 1

Prilog 8

// deADH

IndVars: t

DepVars: A1, A2, A3, A4

Params: al, kd11, kd12, kd13, kd14, kd2

$A1 = A10 * (al * \exp(-kd11 * t) + (1 - al) * \exp(-kd2 * t))$

$A2 = A20 * (al * \exp(-kd12 * t) + (1 - al) * \exp(-kd2 * t))$

$A3 = A30 * (al * \exp(-kd13 * t) + (1 - al) * \exp(-kd2 * t))$

$A4 = A40 * (al * \exp(-kd14 * t) + (1 - al) * \exp(-kd2 * t))$

A10 = 3.30

A20 = 3.30

A30 = 3.30

A40 = 3.30

al = 0.5

kd11 = 0.01

kd2 = 0.01

kd12 = 0.01

kd13 = 0.01

kd14 = 0.01

Prilog 9

// Proizvodnja HPP

IndVars: t

DepVars: cAC, cBA, cHPP, VmBFD

Params: Kmba, Kmac, Kis, VmBFD0, al, kd1, kd2

//Kineticki model

$r1 = VmBFD * cAC * cBA * cBFD / ((Kmba + cBA) * (Kmac + cAC + (cAC * cAC / Kis)))$

$VmBFD = VmBFD0 * (al * \exp(-kd1 * t) + (1 - al) * \exp(-kd2 * t))$

//Reaktorski model

$cAC' = -r1$

$cBA' = -r1$

$cHPP' = r1$

Kmba = 19.4

Kmac = 775

Kis = 430.543076

VmBFD0 = 19.95253

Al = 0.496874

kd1 = 0.002577

kd2 = 0.074301

t = 0

cac = 60

cba = 50

chpp = 0

cbfd = 10

Prilog 10

// ADH bez regeneracije

IndVars: t

DepVars: HPP, diol, NADH, NAD

Params: Vm, KmNadh, KmHPP, Ki, k3, ADH

//Kinetički model

$r1 = Vm * ADH * HPP * NADH / ((KmHPP + HPP) * (KmNadh * (1 + NAD / Ki) + NADH))$

$r2 = k3 * ADH * NAD * diol$

//Reaktorski model

$HPP' = -r1 + r2$

$diol' = r1 - r2$

$NADH' = -r1 + r2$

$NAD' = r1 - r2$

Vm = 0.046150173052230972

KmNadh = 0.091910304886671609

KmHPP = 27.0366026762500269

Ki = 1.805378

k3 = 0.01

t = 0

ADH = 5

HPP = 10.13609635

NADH = 10.113

NAD = 0

diol = 0

Prilog 11

// ADH s regeneracijom

IndVars: t

DepVars: HPP, diol, NADH, NAD, f, X

Params: Vm2, Km_{nadh}, Km_{HPP}, Ki, k₃, Vm₄, Km_{NAD}, Km_{for}, Ki_{HPP}, Ki_{NADH}

//Kinetički model

$r_2 = Vm_2 \cdot ADH \cdot HPP \cdot NADH / ((Km_{HPP} + HPP) \cdot (Km_{nadh} \cdot (1 + NAD/Ki) + NADH))$

$r_3 = k_3 \cdot ADH \cdot NAD \cdot diol$

$r_4 =$

$Vm_4 \cdot f \cdot NAD \cdot fdh / ((Km_{NAD} \cdot (1 + NADH/Ki_{NADH}) + NAD) \cdot (Km_{for} \cdot (1 + (HPP/Ki_{HPP})) + f))$

//Reaktorski model

$HPP' = -r_2 + r_3$

$diol' = r_2 - r_3$

$NADH' = -r_2 + r_3 + r_4$

$NAD' = r_2 - r_3 - r_4$

$f' = -r_4$

$X = diol/50$

$Vm_2 = 0.046150173052230972$

$Km_{nadh} = 0.091910304886671609$

$Km_{HPP} = 27.0366026762500269$

$Ki = 1.805378$

$k_3 = 0.00021532653$

$Vm_4 = 0.521126186$

$Km_{for} = 3.97373523$

$Km_{NAD} = 0.00527077724$

$Ki_{HPP} = 4.99604904$

$Ki_{NADH} = 0.00301732947$

$t = 0$

$HPP = 50$

$NADH = 5$

$ADH = 10$

$NAD = 0$

$diol = 0$

$f = 150$

$fdh = 10$

Prilog 12

// Simultana proizvodnja diola

IndVars: t

DepVars: AC, BA, HPP, VmBFD, diol, NADH, NAD, f, X, ADH

Params: Kmba, Kmac, Kis, VmBFD0, al, kd1, kd2, Vm2, Kmndh, KmHPP, Ki, k3, Vm4, KmNAD, Kmfor, KiHPP, KiNADH

//Kinetički model

$r1 = VmBFD \cdot AC \cdot BA \cdot BFD / ((Kmba + BA) \cdot (Kmac + AC + (AC \cdot AC / Kis)))$

$r2 = Vm2 \cdot ADH \cdot HPP \cdot NADH / ((KmHPP + HPP) \cdot (Kmndh \cdot (1 + NAD / Ki) + NADH))$

$r3 = k3 \cdot ADH \cdot NAD \cdot diol$

$r4 =$

$Vm4 \cdot f \cdot NAD \cdot fdh / ((KmNAD \cdot (1 + NADH / KiNADH) + NAD) \cdot (Kmfor \cdot (1 + (HPP / KiHPP) + (AC / Kiac)) + f))$

$VmBFD = VmBFD0 \cdot (al \cdot \exp(-kd1 \cdot t) + (1 - al) \cdot \exp(-kd2 \cdot t))$

$ADH = ADH0 \cdot (ala \cdot \exp(-kda1 \cdot t) + (1 - ala) \cdot \exp(-kda2 \cdot t))$

//Reaktorski model

$AC' = -r1$

$BA' = -r1$

$HPP' = r1 - r2 + r3$

$diol' = r2 - r3$

$NADH' = -r2 + r3 + r4$

$NAD' = r2 - r3 - r4$

$f' = -r4$

$X = diol / 50$

Kmba = 19.4

Kmac = 775

Kis = 430.543076

VmBFD0 = 19.95253

al = 0.496874

kd1 = 0.002577

kd2 = 0.074301

ala = 0.913062203

kda1 = 0.00001107 * AC

kda2 = 0.0332179035

Vm2 = 0.046150173052230972

Kmndh = 0.091910304886671609

KmHPP = 27.0366026762500269

Kiac = 16.8261884

Ki = 1.805378

k3 = 0.00021532653

Vm4 = 0.521126186

Kmfor = 3.97373523

KmNAD = 0.00527077724

KiHPP = 4.99604904

KiNADH = 0.00301732947

t = 0

AC = 200

BA = 50

BFD = 5

HPP = 0

NADH = 1

ADH0 = 5

NAD = 0

diol = 0

f = 150

fdh = 1

8.SIMBOLI I SKRAĆENICE

SIMBOLI

a^i – udio izoenzima [-]

A_S – specifična aktivnost enzima [U mg⁻¹]

A_V – volumna aktivnost enzima [U cm⁻³]

b^i – udio izoenzima [-]

c – koncentracija komponente [mmol dm⁻³; mg cm⁻³]

k_1, k_2 – konstante bieksponecijalnog modela deaktivacije enzima [min⁻¹]

k_3 – konstanta brzine povratne reakcije [dm³ mmol⁻¹ min⁻¹]

K_i – konstanta inhibicije [mmol dm⁻³]

K_m^S – Michaelis – Menteničina konstantu [mmol dm⁻³]

r – reakcijska brzina [mmol dm⁻³ min⁻¹]

t – vrijeme [min]

V_m – maksimalna brzina reakcije [mmol dm⁻³ min⁻¹]

SKRAĆENICE

(1*S*,2*S*)-1-FPD – (1*S*,2*S*)-1-fenilpropan-1,2-diol

(*S*)-2-HPP – (*S*)-2-hidroksipropiofenon

ADH – enzim alkohol dehidrogenaza

BFD – enzim benzoilformat dekarboksilaza

*Cb*FDH – enzim formijat dehidrogenaza izolirana iz kvasca *Candida boidinii*

E – enzim

ES – kompleks enzim – supstrat

FDH – enzim formijat dehidrogenaza

LbADH – enzim alkohol dehidrogenaza izolirana iz bakterije *Lactobacillus brevis*

NAD⁺ – koenzim nikotinamid adenin dinukleotid, oksidirani oblik

NADH – koenzim nikotinamid adenin dinukleotid, reducirani oblik

P – produkt

S – supstrat

ThDP – tiamin difosfat (*engl. Thiamine diphosphate*)

ŽIVOTOPIS

Tatjana Baković [REDACTED] Osnovnu školu pohađala je u Osnovnoj školi Josipa Kozarca u Lipovljanima, nakon koje 2010. godine upisuje Gimnaziju „Tin Ujević“, opći smjer u Kutini. Preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2014. godine. Za vrijeme preddiplomskog studija odradila je stručnu praksu u Laboratoriju za sintetsku organsku kemiju na Zavodu za organsku kemiju i biokemiju na Institutu Ruđer Bošković.