

# Kinetika oksidacije aldehida katalizirana aldehyd dehidrogenazom

---

**Volf, Anamarija**

**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:149:545891>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Anamarija Volf

# ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Anamarija Volf

KINETIKA OKSIDACIJE ALDEHIDA KATALIZIRANA ALDEHID  
DEHIDROGENAZOM

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitne komisije: izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.

izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2017.



This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under Grant Agreement No 635595

*Ovim putem se zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na velikoj pomoći, savjetima i strpljenju koje mi je pružila tijekom izrade završnog rada.*

*Također, veliku zahvalnost dugujem asistentici mag. ing. oecoing. Morani Česnik koja mi je bila velika potpora i uvelike mi pomogla tijekom rada u laboratoriju, kao i tijekom pisanja samog rada. Hvala na svom izdvojenom vremenu i ugodnoj suradnji.*

## Sažetak

U ovom je radu provedena enzimatska oksidacija dvaju aldehida: formaldehida (FA) i propanala (PA) uz prisutstvo enzima aldehyd dehidrogenaze (ALDH).

Aldehyd dehidrogenaza je enzim koji za svoje katalitičko djelovanje treba prisutstvo koenzima  $\text{NAD}^+$ .  $\text{NAD}^+$  se obnavlja regeneracijom uz pomoć enzima NADH oksidaze (NOX).

Određena je kinetika reakcije oksidacije aldehida katalizirana aldehyd dehidrogenazom. Ispitan je utjecaj promjene koncentracije supstrata (FA/PA i  $\text{NAD}^+$ ) te produkta (NADH) na početnu reakcijsku brzinu. Uz pomoć eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri Michaelis-Menteničinog modela koji je kasnije validiran eksperimentom u kotlastom reaktoru za oksidaciju propanala.

**Ključne riječi:** enzimatska oksidacija, aldehyd, enzim, koenzim, kinetika, kotlasti reaktor

## Abstract

Enzymatic oxidation of two aldehydes: formaldehyde (FA) and propionaldehyde (PA) in presence of enzyme aldehyde dehydrogenase (ALDH) was studied in this work.

Aldehyde dehydrogenase is an enzyme which requires coenzyme  $\text{NAD}^+$  for its catalytic activity.  $\text{NAD}^+$  is regenerated by enzyme NADH oxidase (NOX).

Kinetic model of aldehyde oxidation catalyzed by aldehyde dehydrogenase was developed. The influence of concentration of substrates (FA/PA and  $\text{NAD}^+$ ) and product (NADH) on the initial reaction rate was examined. Kinetic parameters of the Michaelis-Menten model were estimated from the experimental data. The mathematical model was experimentally validated in the batch reactor for propanal oxidation.

**Key words:** enzymatic oxidation, aldehyde, enzyme, coenzyme, kinetics, batch reactor

# Sadržaj

|  |    |
|--|----|
| <b>1. UVOD</b> .....   | 1  |
| <b>2. OPĆI DIO</b> .....   | 2  |
| <b>2.1. KATALIZA</b> .....   | 2  |
| <b>2.2. BIODKATALIZA</b> .....   | 3  |
| <b>2.3. ENZIMI</b> .....   | 3  |
| <b>2.4. ENZIMSKA KINETIKA</b> .....  | 4  |
| <b>2.5. ALDEHID DEHIDROGENAZA</b> .....  | 6  |
| <b>2.6. MATEMATIČKO MODELIRANJE</b> .....  | 8  |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....  | 10 |
| <b>3.1. APARATURA</b> .....  | 10 |
| <b>3.1.1. Analitička Vaga</b> .....  | 10 |
| <b>3.1.2. Homogenizator</b> .....  | 10 |
| <b>3.1.3. Spektrofotometar</b> .....   | 11 |
| <b>3.1.4. Tresilica</b> .....  | 12 |
| <b>3.1.5. Centrifuga</b> .....   | 12 |
| <b>3.1.6. Uređaj za kapljevinsku kromatografiju visokog učinka (HPLC)</b> .....                                | 13 |
| <b>3.2. ANALITIČKE METODE</b> .....  | 14 |
| <b>3.2.1. Provođenje derivatizacije – priprema uzorka za HPLC</b> .....  | 14 |
| <b>3.2.2. Mjerenje koncentracije reaktanata i produkata kapljevinskom kromatografijom visokog učinka</b> ..... | 14 |
| <b>3.2.3. Određivanje aktivnosti aldehyd dehidrogenaze (ALDH) spektrofotometrijskom metodom</b> .....          | 15 |
| <b>3.3. OPIS PROVEDBE EKSPERIMENTA U KOTLASTOM REAKTORU</b> .....  | 18 |
| <b>4. MATEMATIČKI MODEL</b> .....  | 21 |
| <b>4.1. OBRADA PODATAKA</b> .....  | 22 |
| <b>5. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....   | 23 |
| <b>5.1. KINETIKA OKSIDACIJE ALDEHIDA</b> .....   | 23 |
| <b>5.1.1. Kinetika oksidacije formaldehida</b> .....   | 23 |
| <b>5.1.2. Kinetika oksidacije propanala</b> .....  | 25 |
| <b>5.2. REAKCIJA ENZIMATSKE OKSIDACIJE PROPANALA U KOTLASTOM REAKTORU</b> .....                                | 27 |
| <b>6. ZAKLJUČAK</b> .....  | 30 |
| <b>7. PRILOZI</b> .....  | 31 |
| <b>8. POPIS SIMBOLA</b> .....  | 33 |
| <b>9. LITERATURA</b> .....   | 35 |
| <b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....   | 37 |



# 1. UVOD

Enzimi, odnosno biokatalizatori, najučinkovitiji su katalizatori i oni uključuju puno veći broj mogućih kompetitivnih procesa u usporedbi s kemijskim katalizatorima. Velik broj procesa temeljenih na enzimima komercijaliziran je za proizvodnju značajnih produkata još od prve uporabe biokatalizatora prije gotovo sto godina. [1]

Uporaba enzima kao katalizatora u sintetskoj organskoj kemiji dobila je svoju važnost u kasnim godinama 20. stoljeća, ali unatoč tomu patila je od dva velika nedostatka. Prvo, brojni enzimi nisu bili dostupni u dovoljno velikim količinama koja je bila potrebna za praktičnu primjenu. Do drastičnih promjena dolazi uvođenjem tehnologije rekombinantne DNA u kasnim 1970.-im godinama. Drugi nedostatak bio je taj da su mnogi enzimi obuhvaćali uski raspon mogućih supstrata, nerijetko su pokazivali slabu stereo i/ili regioselektivnost te nedovoljnu stabilnost pod određenim uvjetima rada. Razvojem usmjerene evolucije, koja je počela u 1990.-im godinama, a traje sve do današnjeg dana, svi navedeni problemi su generalno riješivi. Vrlo je vjerojatno da će se već dostupne napredne tehnike usmjerene evolucije koje koriste najučinkovitije genetičke metode i strategije nastaviti primjenjivati na sve tipove enzimatskih reakcija. [2]

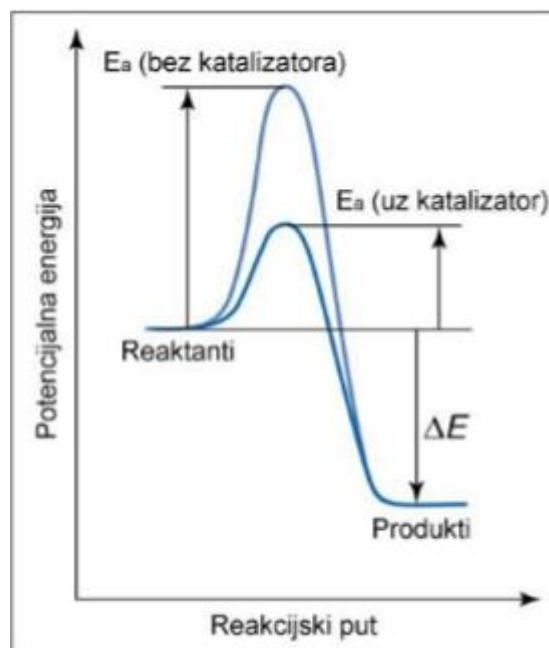
Gledajući iz okolišnih aspekata, enzimi su prirodni, obnovljivi i netoksični katalizatori te tako pripadaju „zelenim katalizatorima“. Enzimatske reakcije se osim u organskim, mogu odvijati i u „zelenim“ otapalima, kakva su primjerice voda, ionske tekućine, superkritični ugljikov dioksid itd. [3]

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. KATALIZA

Brojne kemijske reakcije odvijaju se spontano; druge pak moraju biti potaknute, odnosno katalizirane, kako bi se odvale u značajnom stupnju. [4]

Katalizatori su molekule čija je uloga smanjivanje intenziteta energetske barijere koju je potrebno svladati da bi se neka tvar kemijski pretvorila u drugu tvar. Termodinamički gledano, veličina energetske barijere može se izraziti i kao promjena slobodne energije. Na slici 1. prikazan je princip djelovanja katalizatora. Katalizator, dakle, reagira sa supstratom, pri čemu nastaje aktivirani prijelazni kompleks iz kojeg potom nastaje produkt, dok se katalizator oslobađa iz reakcije. Katalizator iz reakcije izlazi nepromijenjen pa se on, u principu, može beskonačno mnogo puta iskoristiti za pretvorbu supstrata u produkt. U praksi to ipak nije moguće jer je taj ponavljajući proces ograničen stabilnošću katalizatora. [4]



**Slika 1.** Prikaz odvijanja kemijske reakcije bez katalizatora i sa katalizatorom

Uobičajeno je promatrati tri podskupine katalize: homogenu, heterogenu i biokatalizu. Kod homogene katalize se katalizator i reaktanti nalaze u istoj fazi. Kod heterogene katalize se, promatrajući istom logikom, katalizator i reaktanti nalaze u različitim fazama. O biokatalizi kao posebnoj vrsti katalize govorit će se u poglavlju 2.2. [5]

## **2.2. BOKATALIZA**

Biokataliza se načelno može definirati kao upotreba enzima ili cjelovitih stanica kao biokatalizatora za industrijsku sintetsku kemiju. U usporedbi sa cjelovitim stanicama, izolirani enzimi nude nekoliko prednosti uključujući jednostavnije uređaje, veću produktivnost procesa uslijed veće koncentracije katalizatora i lakše pročišćavanje produkata. [6]

Biokatalitički procesi su slični konvencionalnim kemijskim procesima iz mnogo razloga. Ipak, najbitnija razlika između njih je ta da se kod biokatalitičkih procesa moraju uzeti u obzir enzimatska kinetika i funkcionalna stabilnost enzima. Nije iznenađujuća činjenica kako biokatalitički procesi sve više prodiru u kemijsku, a ponajviše farmaceutsku industriju. [6]

Brojne su prednosti biokatalize nad običnim kemijskim procesima. Glavna prednost upotrebe biokatalizatora je njihova specifičnost; biokatalizatori uvelike nadmašuju ostale katalizatore po pitanju kemijske specifičnosti. Nadalje, biokatalizatori često funkcioniraju u uvjetima bliskim okolini poštujući temperaturu i pH vrijednost ponajviše u vodenim otopinama. To obećava energetske učinkovitost biokatalitičkih procesa. Tipični obnovljivi neprerađeni materijali, kao što su ugljikohidrati ili masne kiseline, hidrofilniji su nego sirovine dobivene iz petrokemikalija, što su najčešće ugljikovodici. Takve je hidrofilne neprerađene materijale pogodno obraditi u vodenim otopinama, pa je biokataliza dobra tehnološka metoda za obradu obnovljivih sirovina. [7]

Iako su biokatalizatori često vrlo aktivni i ekstremno selektivni, ipak postoji nekoliko nedostataka biokatalize kao opće primijenjive metode. Navode se tri glavne mane, a to su [7]:

- 1) razvoj biokatalizatora je spor i ne slijedi nikakav red;
- 2) biokatalizatori imaju vrlo ograničeno područje stabilnosti po pitanju temperature, pH vrijednosti, otapala, ionske jakosti i vrsta soli;
- 3) mali je broj dobro poznatih biokatalizatora u usporedbi s kemijskim katalizatorima te je također prisutan mali broj komercijalno dostupnih biokatalizatora.

## **2.3. ENZIMI**

Enzimi su katalizatori prisutni u živim stanicama. Svaka pojedina biokemijska reakcija staničnog metabolizma katalizirana je određenim enzimom. Enzimi su proteinske molekule koje su se razvile na način da uspješno obavljaju svoju zadaću pri blagim uvjetima u kojima

se održavaju funkcionalnost i ispravnost biološkog sustava. Enzimi imaju sposobnost ubrzavanja kemijskih reakcija širokog raspona, od kojih se brojne reakcije ekstremno teško odvijaju uobičajenom kemijskom sintezom. [4]

Većina karakteristika enzima kao katalizatora potječe iz njihove molekulske strukture. Oni su, kako je već ranije spomenuto, proteini, sastavljeni od velikog broja aminokiselinskih ostataka čiji broj varira od sto do nekoliko stotina. Te aminokiseline su kovalentno povezane kroz peptidnu vezu formiranu između atoma ugljika karbonilne skupine jedne aminokiseline i atoma dušika  $\alpha$ -amino skupine nadolazeće aminokiseline. [4]

Kataliza se odvija u malom dijeliću enzima koji se naziva „aktivno mjesto“. Na tom se mjestu supstrat veže za enzim. Tada dolazi do preraspodjele elektrona u kemijskoj vezi te kao posljedica kemijske reakcije nastaju produkti. Produkti se potom oslobađaju s enzima koji je spreman za idući katalitički ciklus. Prema ranom modelu „ključ-brava“ kojeg je 1894. godine uveo Emil Fischer, aktivno mjesto ima jedinstvenu geometrijsku strukturu komplementarnu strukturi molekule supstrata. [4]

Brojni enzimi zahtijevaju male molekule koje imaju ulogu katalizatora. Te se molekule nazivaju koenzimima ili kofaktorima. Pod pojmom koenzim misli se na organsku molekulu male molekulske mase koja je reverzibilno povezana s enzimom, ali ne čini dio strukture enzima. Koenzimi često imaju ulogu posrednika pri prijenosu elektrona (npr.  $\text{NAD}^+$  ili FAD kod dehidrogenaze), specifičnih atoma ili funkcionalnih skupina u kemijskoj reakciji. Termin kofaktor se koristi kada se govori o metalnim ionima koji su također reverzibilno vezani s enzimom, ali su kemijski neometani tijekom reakcije. [4]

## 2.4. ENZIMSKA KINETIKA

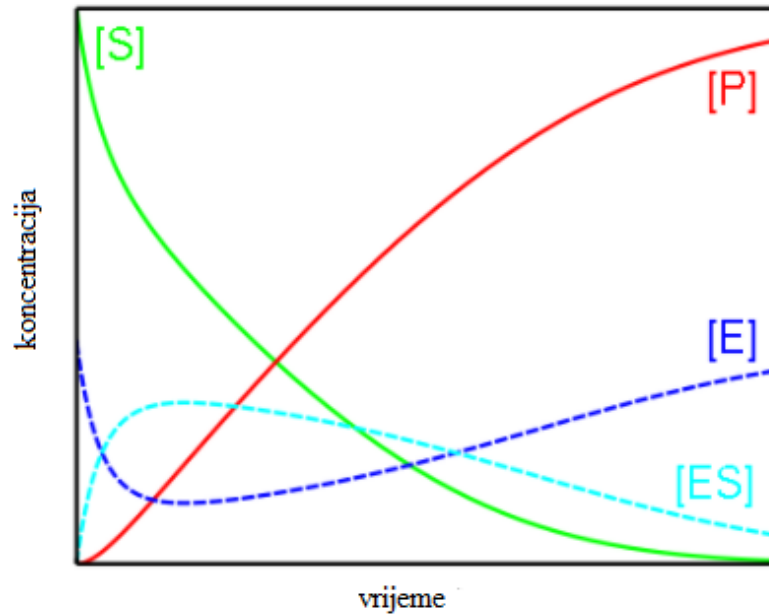
Enzimska kinetika pruža model za opisivanje brzine kojom se reakcija odvija i omogućuje nam povezivanje brzine s reakcijskim mehanizmom koji pokazuje kako molekule reagiraju kroz međuprodukte do krajnjih produkata. [5]

Jednosupstratna enzimska reakcija najjednostavniji je primjer enzimski katalizirane reakcije. Ona podrazumijeva konverziju jednog supstrata u produkt. Mehanizam takve reakcije može se prikazati jednadžbom (1):



Mehanizam navedene reakcije pretpostavlja tri moguća reakcijska stupnja [7]:

- a) formiranje enzim-supstrat (ES) kompleksa
- b) raspad enzim-supstrat (ES) kompleksa na enzim (E) i supstrat (S)
- c) odvijanje ireverzibilne reakcije u smjeru nastajanja produkta (P)

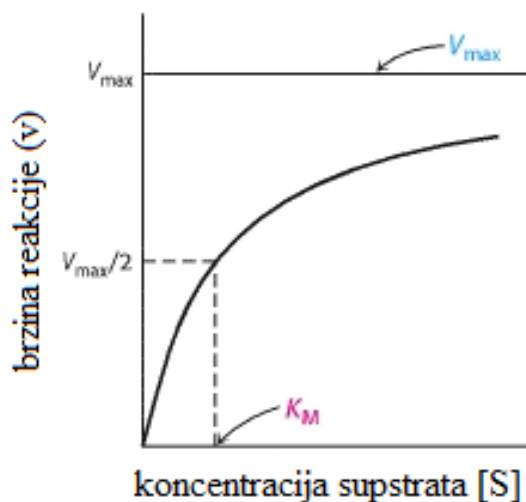


**Slika 2.** Promjena koncentracije sudionika enzimске reakcije u ovisnosti o vremenu

Kinetika ovakvih reakcija obično se opisuje Michaelis-Menteničinom (MM) jednađbom (2).

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} = \frac{k_2[E][S]}{K_m + [S]} \quad (2)$$

Michaelis-Menteničina jednađba je dvoparametarska jednađba s monotono rastućom reakcijskom brzinom pri čemu se uzima u obzir koncentracija supstrata i zasićenost pri visokim koncentracijama supstrata. Maksimalna brzina reakcije u stanju zasićenosti označava se kao  $V_{\max}$ , pri čemu je  $V_{\max} = k_2 [E]$ . Vrijednost konstante  $K_m$  odgovara koncentraciji supstrata na polovini njegove zasićenosti ( $V_{\max}/2$ ) i mjera je sklonosti vezanja supstrata za enzim. Visoke vrijednosti konstante  $K_m$  upućuju na slab afinitet vezanja supstrata za enzim i obratno. Variranje ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata pokazuje kako se maksimalna brzina,  $V_{\max}$ , postiže asimptotski, što je prikazano na slici 3. [7]



**Slika 3.** Prikaz Michaelis-Menteničine kinetike

Izvor: prilagođeno prema izvoru [8]

## 2.5. ALDEHID DEHIDROGENAZA

Aldehid dehidrogenaze pripadaju široko rasprostranjenoj skupini enzima čija je uloga kataliziranje ireverzibilnih reakcija oksidacije endogenih i egzogenih aldehida u njihove odgovarajuće karboksilne kiseline. [9]

Reakcijski mehanizam humanih aldehid dehidrogenaza odvija se točno određenim slijedom. Prvo se  $NAD^+$  kofaktor veže za enzim. Zatim se za njih nukleofilnim napadom sumpora iz katalitičkog cisteinskog ostatka veže i aldehid. Karbonil hidrid tetraedarskog intermedijera se prenosi do C4 atoma nikotinamidskog dijela  $NAD^+$  kofaktora. Konformacijska promjena NADH tada potiče aktivaciju vodene molekule pomoću glutamata. Vodena molekula zatim napada supstrat-enzim tioestersku vezu pri čemu se oslobađa odgovarajuća karboksilna kiselina. [9]

Aldehid dehidrogenaze obuhvaćaju više od devet „obitelji“ u ljudskim stanicama. ALDH1, ALDH3 i ALDH9 nalaze se citosolu jetre, a ALDH2, ALDH4, ALDH5 i ALDH6 u mitohondriju jetre. ALDH7 i ALDH8 obitavaju u prostoru izvan jetre. Istraženo je kako ALDH2 metabolizira kratkolančane alifatske aldehide kao što je primjerice acetaldehid. [10]

Aldehid dehidrogenaze su sveprisutna skupina enzima koja ima detoksikacijsku ulogu u svrhu suočavanja s toksičnim aldehydima nastalim u brojnim staničnim metabolizmima. Ti su enzimi također uključeni u nekolicinu biokonverzijskih procesa, kao što je razgradnja alkana, u kojoj alkilni aldehidi nastaju kao intermedijeri. [11]

Enzimatsko uklanjanje aldehida iz ljudskog organizma posredovano je nizom nespecifičnih enzima, primjerice aldehid oksidazom i aldehid dehidrogenazom. Većinski dio reakcija oksidacije acetaldehida u jetri i ostalim organima kataliziran je upravo aldehid dehidrogenazom. Dehidrogenacija aldehida u odgovarajuće trikarboksilne kiseline odvija se prema reakciji (3):



Reakcija katalizirana aldehid dehidrogenazom je ireverzibilna pri čemu širok spektar ravnolančanih i razgranatih alifatskih i aromatskih aldehida ima ulogu supstrata u stvaranju odgovarajućih keto kiselina. Reakcijski mehanizam se uglavnom odvija kroz binarni kompleks enzima i  $\text{NAD}^+$  kofaktora. [12]

Epidemiološki podaci pokazali su da je kronična konzumacija alkohola značajan rizični faktor za obolijevanje od raka kod čovjeka. Metabolizam etanola vodi k nastajanju acetaldehida (AA) koji je vrlo toksičan i kancerogen. Etanol se metabolizmom pretvara u acetaldehid uz pomoć alkohol dehidrogenaze (ADH). Enzim koji je odgovoran za oksidaciju acetaldehida je aldehid dehidrogenaza (ALDH). Ukupna aktivnost alkohol dehidrogenaze puno je veća u kancerogenim tkivima nego što je to slučaj kod zdravih organa (npr. jetra, želudac, jednjak...). To dovodi do saznanja da kancerogene stanice imaju povećanu sposobnost za oksidaciju etanola, ali smanjenu sposobnost za uklanjanje acetaldehida od normalnih tkiva. [13]

Pretvorba zdravih stanica u kancerogene stanice zasniva se na gubitku upravljačkog mehanizma, staničnom poremećaju i nekontroliranom rastu. Metabolizam raka u stanicama uvelike se razlikuje od metabolizma zdravih stanica. Razlike između aktivnosti ADH i ALDH enzima u kancerogenim i zdravim tkivima mogući su uzrok intenziviranja širenja karcinoma. [13]

## 2.6. MATEMATIČKO MODELIRANJE

Prije nekoliko godina, matematičko modeliranje se nije smatralo pretjerano bitnim za tadašnju industrijsku upotrebu. Međutim, danas se zbog velike potražnje za što bržim razvojem biokatalitičkih procesa situacija drastično mijenja. Modeliranje kao načelo reakcijskog inženjerstva svakako ima bitnu ulogu u razvoju biokatalitičkih procesa i očekuje se njegov rast usporedno s rastom upotrebe biokatalize u industriji. [6]

Sin, Woodley i Gernaey podijelili su matematičke modele s područja biokatalize na slijedeća četiri dijela [6]:

- 1) Biokataliza – model opisuje katalizu na molekularnoj razini;
- 2) Reakcija – kinetički model opisuje mehanizam reakcije i reakcijsku brzinu;
- 3) Reaktor – model opisuje promatranu reakcijsku kinetiku uključujući bilancu mase kao i hidrodinamičke uvjete u reaktoru;
- 4) Proces – model opisuje interakciju između različitih operacijskih jedinica uključenih u proces.

Predloženi modeli odgovaraju Michaelis-Menteničinoj kinetici s jednim ili dva supstrata. Svrha ovih modela je utvrditi saznanja o enzimskom reakcijskom mehanizmu i reakcijskoj brzini te procijeniti kinetičke parametre. Ovi kinetički modeli sadržavaju značajan broj parametara i zahtijevaju veliki eksperimentalni i računski trud kako bi se provele odgovarajuće procjene. Utjecaj svih komponenata reakcijskog medija na formalnu reakcijsku brzinu mora se uzeti u obzir, pri čemu visoka koncentracija supstrata i produkta pri velikim konverzijama može imati posebno snažan utjecaj na brzinu. Životni vijek biokatalizatora pod operacijskim uvjetima također ima bitnu ulogu u određivanju formalne reakcijske brzine. Matematički modeli su empirijski i temelje se na podacima. [6]

Koriste se brojni mehanizmi za opisivanje dvosupstratne kinetike, među kojima je bitno spomenuti oksidaciju formijata kataliziranu enzimom formijat dehidrogenazom, kojemu je potreban koenzim NAD kao drugi supstrat. Za tu je reakciju osmišljen mehanistički model koji se temelji na Bi-Bi mehanizmu, a to znači da uz korištenje jednog enzima postoje dva supstrata i dva produkta uključena u reakciju. [6]

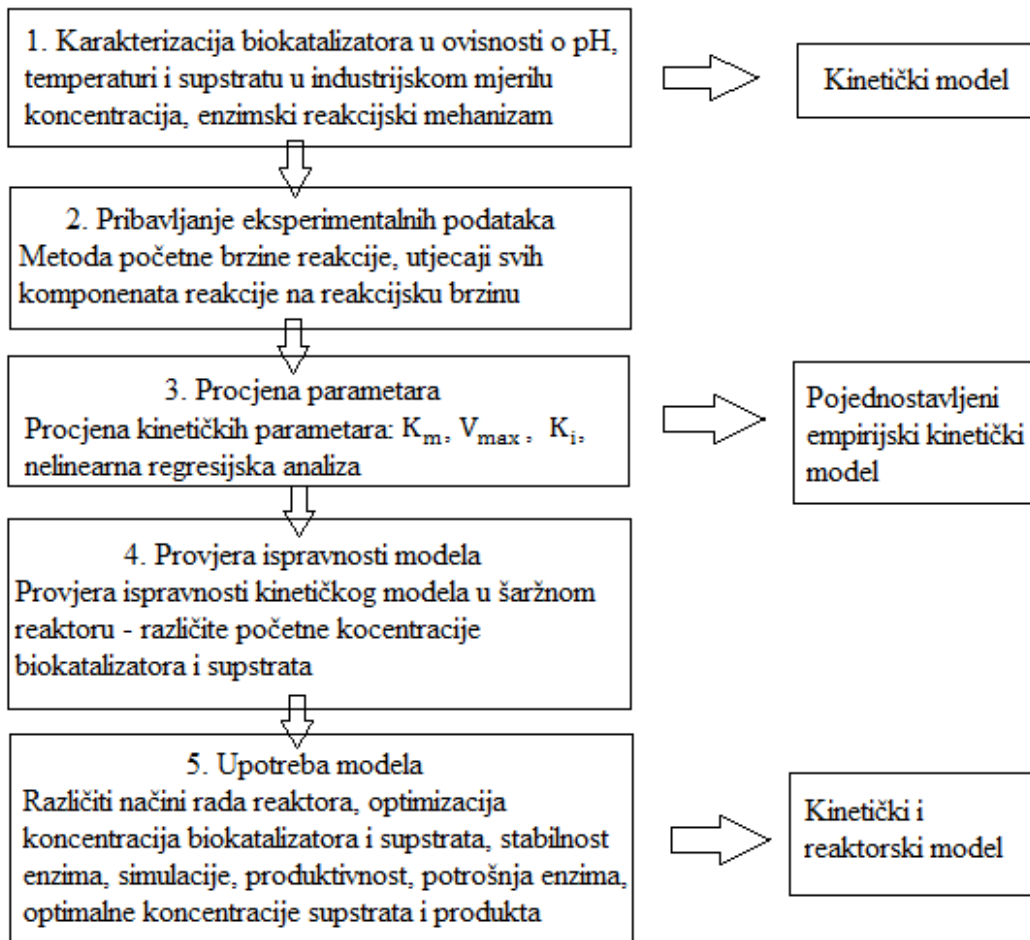
Razvoj modela enzimskog reaktora sastoji se od [6]:

- 1) enzimskog kinetičkog modeliranja



- 2) reaktorskog modeliranja koje povezuje enzimsku kinetiku s bilancom mase kako bi se predvidjela izvedba reaktora i olakšalo prepoznavanje najučinkovitijeg načina rada reaktora

Na slici 4. je sažeto prikazan način na koji se razvija model enzimskog reaktora.



**Slika 4.** Strategija razvijanja modela za enzimski reaktor

Izvor: prilagođeno prema izvoru [6]

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

#### **3.1. APARATURA**

##### **3.1.1. Analitička Vaga**

Za odvagu svih potrebnih tvari korištena je laboratorijska analitička vaga proizvođača *Shimadzu* s preciznošću 0,0001 g (slika 5).



**Slika 5.** Analitička vaga

##### **3.1.2. Homogenizator**

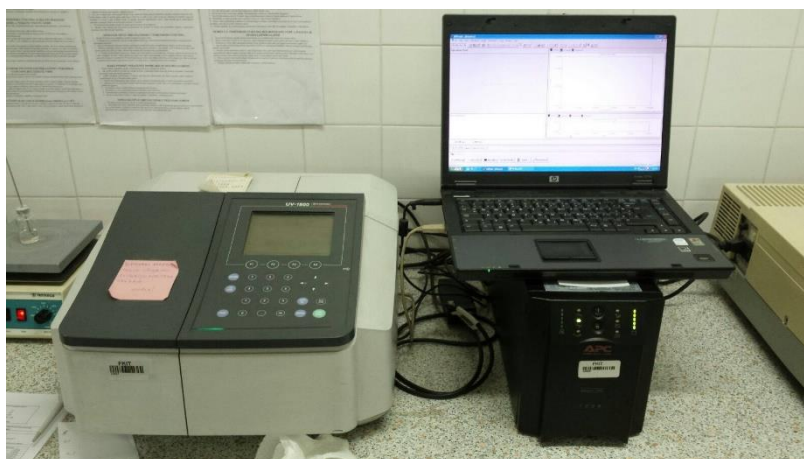
Homogenizator *MS2 Minishaker IKA* korišten je za homogeniziranje otopina prilikom njihove pripreme, prije svakog korištenja otopina, kao i prilikom uzorkovanja (derivatizacije) za daljnje ispitivanje na kapljevinskom kromatografu visokog učinka, odnosno HPLC-u (slika 6).



**Slika 6.** Homogenizator

### 3.1.3. Spektrofotometar

Uz pomoć spektrofotometra *UV-1800 240 V*, proizvođača *Shimadzu*, analizirani su uzorci pripremljeni za određivanje specifične aktivnosti enzima (slika 7).



**Slika 7.** Spektrofotometar

### 3.1.4. Tresilica

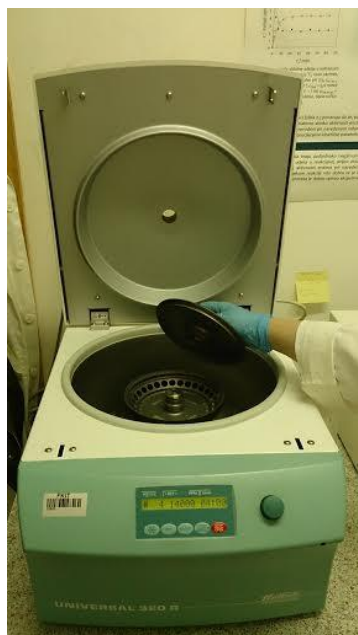
Prilikom provođenja reakcije u kotlastom reaktoru korištena je tresilica *Vibromix 203 EVT*, proizvođača *Tehnica*, pri čemu je održavana stalna temperatura sustava 25°C i brzina od 1000 okr min<sup>-1</sup> (slika 8).



**Slika 8.** Tresilica

### 3.1.5. Centrifuga

Centrifuga *Hettich*, model *Universal 320 R*, korištena je kako bi se odvojio enzim i veće čestice, odnosno eventualne nečistoće, s dna Eppendorf epruvete (slika 9).



**Slika 9.** Centrifuga

### **3.1.6. Uređaj za kapljevinsku kromatografiju visokog učinka (HPLC)**

Koncentracije supstrata i produkata praćene su uz pomoć HPLC uređaja *Shimadzu* (Japan) opremljenog s UV i RI detektorima istog proizvođača (slika 10).



**Slika 10.** HPLC uređaj

## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. Provođenje derivatizacije – priprema uzorka za HPLC

Prije mjerenja koncentracija reaktanata i produkata kapljevinskom kromatografijom visokog učinka, odnosno HPLC-om, potrebno je provesti derivatizaciju i time pripremiti uzorak za HPLC. To se čini zato da bi se dobile vidljive molekule na valnoj duljini na kojoj se provodi mjerenje. Koriste se dvije vrste derivatizacija, opisane pod a) i b).

#### a) derivatizacija s BnONH<sub>2</sub>

Ova derivatizacija se koristi za analizu supstrata formaldehida (FA) i propanala (PA). Reakcijski uzorak (5 µL) pomiješa se s 50 µL BnONH<sub>2</sub> derivatizacijske otopine. BnONH<sub>2</sub> derivatizacijska otopina sastoji se od *O*-benzilhidroksilamin hidroklorida otopljenog u piridinu, metanolu i vodi u omjeru 33:15:2 (*c*=0,13mM). Reakcija derivatizacije je vrlo brza te se postiže miješanjem Eppendorf epruvete na Vortex homogenizatoru otprilike 30 sekundi (gustoća otopine BnONH<sub>2</sub> je veća od gustoće uzorka). Nakon što tako pripremljen uzorak odstoji na sobnoj temperaturi minimalno 5 minuta, dodaje se 500 µL metanola, kratko miješa na Vortexu i potom centrifugira 5 minuta pri 14000 okr min<sup>-1</sup> kako bi se enzim i eventualne nečistoće zadržale na dnu epruvete. Otpipetira se 400 µL otopine s vrha u vijalu i tako pripremljen uzorak je spreman za analizu na HPLC-u.

#### b) derivatizacija 2,4-dibromo-acetofenonom

Ova derivatizacija se koristi za analizu produkta reakcije oksidacije PA katalizirane aldehid dehidrogenazom. Derivatizacijska otopina se sastoji od 2,4-dibromo-acetofenona otopljenog u acetonitrilu. Korištena je otopina koncentracije 0,1 M zato što je koncentracija β-hidroksibutirata (produkta ove reakcije) u reakcijskoj smjesi do 0,1 M. Reakcijski uzorak (20 µL) promiješa se s 80 µL derivatizacijske otopine na Vortex homogenizatoru. Otopina se zatim termostatira 1 sat na temperaturi od 60 °C. Dodaje se 400 µL metanola, kratko miješa na Vortexu i potom centrifugira 5 minuta pri 14000 okr min<sup>-1</sup>. Otpipetira se 300 µL otopine s vrha u vijalu i dalje analizira na HPLC-u.

### 3.2.2. Mjerenje koncentracije reaktanata i produkata kapljevinskom kromatografijom visokog učinka

Mjerenje koncentracija aldehida i nastalih odgovarajućih kiselina provedeno je kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC-om). U tu svrhu je korištena

*LiChrospher RP-18* kolona, 100Å (5µm) 250x4,0 mm, uz mobilne faze A (ultračista voda i TFA (0,1% v/v)) i B (acetonitril, ultračista voda i TFA (80:20:0.095 v/v)). Pritom su korištene dvije metode analize opisane u nastavku pod a) i b).

a) Metoda u trajanju od 46 minuta

Analiza je provedena pri temperaturi od 30°C. To je učinjeno kombinacijom gradijentne i izokratne metode mijenjanjem koncentracije eluenta B od 10 do 100% prvih 30 minuta, zatim pri njegovoj konstantnoj koncentraciji od 100% idućih 5 minuta te ponovnim mijenjanjem koncentracije od 100 do 10% posljednjih 11 minuta. Protok eluenta iznosio je 1 mL min<sup>-1</sup>, a valna duljina 215 nm.

Kromatogram provedene analize metodom u trajanju od 46 minuta nalazi se u prilogu 1.

b) Metoda u trajanju od 66 minuta

Analiza je provedena vrlo slično kao i kod metode 46 minuta, uz tu razliku što je produženo vrijeme prve promjene koncentracije eluenta B od 10 do 100% na 50 minuta. Kao i kod prethodne metode, slijedi izokratni period od 5 minuta u kojem se održava 100% koncentracije eluenta B te zatim smanjenje koncentracije od 100 do 10% idućih 11 minuta. Temperatura je također 30°C, valna duljina 215 nm, a protok eluenta 1 mL min<sup>-1</sup>. Ova se metoda koristi kako bi se pik produkta bolje odvojio od pika koji mu prethodi.

Kromatogram provedene analize metodom u trajanju od 66 minuta nalazi se u prilogu 2.

Primjer baždarnog pravca za formaldehid nalazi se u prilogu 3, a primjer baždarnog pravca za propanal nalazi se u prilogu 4.

### **3.2.3. Određivanje aktivnosti aldehid dehidrogenaze (ALDH) spektrofotometrijskom metodom**

Aktivnost enzima ALDH određena je spektrofotometrijskom metodom praćenjem porasta koncentracije NADH nastalog u reakciji. Provedena reakcija je enzimatska oksidacija aldehida (formaldehida, odnosno propanala) katalizirana enzimom ALDH uz pomoć koenzima NAD<sup>+</sup>. Mjerenje je provedeno pri valnoj duljini od 340 nm u trajanju od 200 sekundi. Aktivnost enzima računata je prema jednadžbama (4) i (5). Promjena apsorbancije u vremenu na početku reakcije (kada je konverzija supstrata manja od 10%) koristi se za izračun volumne aktivnosti enzima.

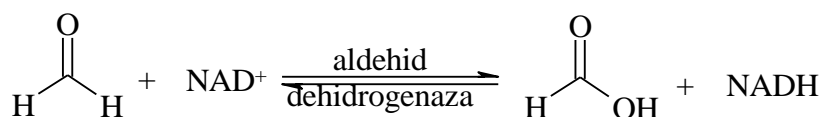
$$V.A. = \frac{\frac{dABS}{dt} V_{uk}}{V_{enz} d \varepsilon_{340,NADH}} \quad [U \text{ mL}^{-1}] \quad (4)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_{enz}} \quad [U \text{ mg}^{-1}] \quad (5)$$

U navedenim jednadžbama (4) i (5),  $V.A.$  označava volumnu aktivnost enzima,  $S.A.$  specifičnu aktivnost enzima,  $dABS/dt$  je nagib pravca dobiven spektrofotometrijskom analizom,  $V_{uk}$  volumen kivete,  $V_{enz}$  volumen enzima ALDH,  $d$  je vrijednost udaljenosti kroz koju prolazi svjetlost u kiveti (1 cm),  $\varepsilon$  je ekstinkcijski koeficijent za NADH pri valnoj duljini od 340 nm ( $6,22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), a  $\gamma_{enz}$  je koncentracija enzima ( $\text{mg mL}^{-1}$ ).

### 3.2.3.1. Ispitivanje kinetike oksidacije formaldehida

Ispitan je utjecaj koncentracije formaldehida,  $\text{NAD}^+$  i NADH na početnu reakcijsku brzinu pomoću ranije opisane spektrofotometrijske metode. Reakcija se odvija prema shemi prikazanoj na slici 11.



**Slika 11.** Shema reakcije enzimatske oksidacije formaldehida

Ispitivanje utjecaja koncentracije oba supstrata (FA i  $\text{NAD}^+$ ) na početnu reakcijsku brzinu se provelo tako da se varirala koncentracija jednog supstrata, a koncentracija drugoga držala konstantnom (tablice 1 i 2).

**Tablica 1.** Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem FA

| Otopina        | $V$ [ $\mu\text{L}$ ] | $C_{\text{temeljna otopina}}$ [mM] | $C_u$ kiveti [mM]        |
|----------------|-----------------------|------------------------------------|--------------------------|
| FA             | X                     | 12,95                              | X                        |
| $\text{NAD}^+$ | 150                   | 65,24                              | 9,79                     |
| Pufer          | 1000-x                | 50,00                              | 50,00                    |
| ALDH           | 10                    | 5,00 $\text{mg mL}^{-1}$           | 0,05 $\text{mg mL}^{-1}$ |



**Tablica 2.** Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem  $\text{NAD}^+$

| Otopina        | V [ $\mu\text{L}$ ] | $c_{\text{temeljna otopina}}$ [mM] | $c_{\text{u kiveti}}$ [mM] |
|----------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------|
| FA             | 30                  | 12,95                              | 30,00                      |
| $\text{NAD}^+$ | X                   | 65,03                              | X                          |
| Pufer          | 1000-x              | 50,00                              | 50,00                      |
| ALDH           | 10                  | 5,00 $\text{mg mL}^{-1}$           | 0,05 $\text{mg mL}^{-1}$   |

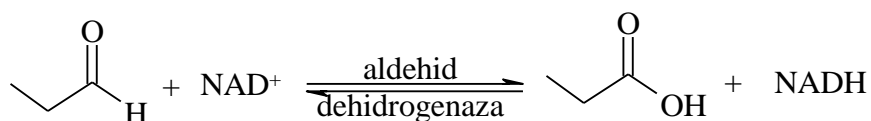
Također je ispitan utjecaj koncentracije produkta NADH na brzinu napredne reakcije kako bi se vidjelo da li dolazi do inhibicije produktom (tablica 3).

**Tablica 3.** Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem NADH

| Otopina        | V [ $\mu\text{L}$ ] | $c_{\text{temeljna otopina}}$ [mM] | $c_{\text{u kiveti}}$ [mM] |
|----------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------|
| FA             | 30                  | 12,95                              | 30,00                      |
| $\text{NAD}^+$ | 150                 | 65,03                              | 9,75                       |
| NADH           | X                   | 1,34                               | X                          |
| Pufer          | 1000-x              | 50,00                              | 50,00                      |
| ALDH           | 10                  | 5,00 $\text{mg mL}^{-1}$           | 0,05 $\text{mg mL}^{-1}$   |

### 3.2.3.2. Ispitivanje kinetike oksidacije propanala

Na isti način kako je prikazano u poglavlju 3.2.3.1., mjerena je kinetika oksidacije propanala kataliziranom enzimom aldehyd dehidrogenazom, pri čemu se ispitaio utjecaj koncentracije oba supstrata (propanala i  $\text{NAD}^+$ ) te produkta (NADH) na brzinu reakcije. Sastavi mjerenja su prikazani u tablicama 4, 5 i 6. Shema prema kojoj se odvija ova reakcija prikazana je na slici 12.



**Slika 12.** Shema reakcije enzimatske oksidacije propanala

**Tablica 4.** Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem PA

| Otopina          | V [ $\mu\text{L}$ ] | $C_{\text{temeljna otopina}}$ [mM] | $C_{\text{u kiveti}}$ [mM] |
|------------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------|
| PA               | X                   | 13,33                              | X                          |
| NAD <sup>+</sup> | 150                 | 65,21                              | 9,78                       |
| Pufer            | 1000-x              | 50,00                              | 50,00                      |
| ALDH             | 10                  | 5,00 mg mL <sup>-1</sup>           | 0,05 mg mL <sup>-1</sup>   |

**Tablica 5.** Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem NAD<sup>+</sup>

| Otopina          | V [ $\mu\text{L}$ ] | $C_{\text{temeljna otopina}}$ [mM] | $C_{\text{u kiveti}}$ [mM] |
|------------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------|
| PA               | 150                 | 13,33                              | 299,87                     |
| NAD <sup>+</sup> | X                   | 65,18                              | X                          |
| Pufer            | 1000-x              | 50,00                              | 50,00                      |
| ALDH             | 10                  | 5,00 mg mL <sup>-1</sup>           | 0,05 mg mL <sup>-1</sup>   |

**Tablica 6.** Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem NADH

| Otopina          | V [ $\mu\text{L}$ ] | $C_{\text{temeljna otopina}}$ [mM] | $C_{\text{u kiveti}}$ [mM] |
|------------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------|
| PA               | 150                 | 13,33                              | 299,87                     |
| NAD <sup>+</sup> | 150                 | 65,18                              | 9,78                       |
| NADH             | X                   | 1,34                               | X                          |
| Pufer            | 1000-x              | 50,00                              | 50,00                      |
| ALDH             | 10                  | 5,00 mg mL <sup>-1</sup>           | 0,05 mg mL <sup>-1</sup>   |

### 3.3. OPIS PROVEDBE EKSPERIMENTA U KOTLASTOM REAKTORU

Provedene su dvije reakcije enzimatske oksidacije aldehida u kotlastom reaktoru. Upotrijebljeni kotlasti reaktor je prikazan na slici 13. Reakcija je provedena za formaldehid i propanal. Obje reakcije su katalizirane enzimom aldehyd dehidrogenazom (ALDH) uz

prisutstvo koenzima  $\text{NAD}^+$ . U reakciji je sudjelovao i enzim NADH oksidaza (NOX) uz pomoć kojeg se odvija regeneracija koenzima  $\text{NAD}^+$ .



**Slika 13.** Kotlasti reaktor

a) Enzimatska oksidacija formaldehida

Reakcija enzimatske oksidacije formaldehida provodila se pri sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje na tresilici pri  $1000 \text{ okr min}^{-1}$ . Pri tome je korišten pufer TEA HCl 50 mM pH 8. Navedena se reakcija počela provoditi, međutim ubrzo se uvidjelo kako produkt nastaje u zanemarivo malim koncentracijama. Iz tog razloga ova reakcija nije praćena i promatrana do kraja.

b) Enzimatska oksidacija propanala

Reakcija enzimatske oksidacije propanala je praćena pri sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje na tresilici pri  $1000 \text{ okr min}^{-1}$ . Reakcija je praćena 24 sata pri čemu su se u početku uzorci uzimali u kraćim vremenskim intervalima, a kasnije sve rjeđe te je uzet jedan uzorak nakon 24 sata. Uzorci su zatim analizirani na HPLC-u metodom 46 i 66 minuta. Ukupni volumen reakcijske otopine iznosio je  $1600 \mu\text{L}$ , a sastav otopine prikazan je u tablici 7. Reakcija je provedena u 50 mM TEA HCl puferu pH 8,0.

**Tablica 7.** Sastav otopine u reaktoru za provođenje enzimatske oksidacije propanala

| Otopina          | V [ $\mu\text{L}$ ] | $c_{\text{temeljna otopina}}$ [mM] | $c_{\text{u kivetu}}$ [mM] |
|------------------|---------------------|------------------------------------|----------------------------|
| PA               | 160,07              | 13,33                              | 100,00                     |
| NAD <sup>+</sup> | 219,23              | 7,30                               | 1,00                       |
| Pufer            | 857,88              | 50,00                              | 50,00                      |
| NOX              | 166,04              | 48,18 mg mL <sup>-1</sup>          | 5,00 mg mL <sup>-1</sup>   |
| ALDH             | 196,79              | 81,30 mg mL <sup>-1</sup>          | 10,00 mg mL <sup>-1</sup>  |

## 4. MATEMATIČKI MODEL

Reakcija oksidacije propanala katalizirana enzimom aldehid dehidrogenazom je ireverzibilna reakcija pa je potrebno odrediti kinetiku reakcije samo u jednom smjeru.

Kinetika enzimatske oksidacije aldehida katalizirane aldehid dehidrogenazom opisuje se dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednađbom (6). Reakcija regeneracije koenzima  $\text{NAD}^+$  enzimom  $\text{NADH}$  oksidazom (NOX-om) opisana je jednađbom (7). Bilancne jednađbe u kotlastom reaktoru za propanal i produkt dane su jednađbama (8) i (9) te za supstrat  $\text{NAD}^+$  bez regeneracije (10) i uz regeneraciju (11). Bilance tvari za  $\text{NADH}$  bez i uz regeneraciju su prikazane jednađbama (12) i (13).

$$r_1 = \frac{V_{m2} \cdot \gamma_{\text{AIDH}} \cdot c_{\text{PA}} \cdot c_{\text{NAD}^+}}{\left(K_m^{\text{PA}} + c_{\text{PA}}\right) \cdot \left(K_m^{\text{NAD}^+} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NADH}}}{K_i^{\text{NADH}}}\right) + c_{\text{NAD}^+}\right)} \quad (6)$$

$$r_2 = \frac{V_{m3} \cdot \gamma_{\text{NOX}} \cdot c_{\text{NADH}}}{\left(K_m^{\text{NADH}} + c_{\text{NADH}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NAD}^+}}{K_i^{\text{NAD}^+}}\right)\right)} \quad (7)$$

$$\frac{dc_{\text{PA}}}{dt} = -r_1 \quad (8)$$

$$\frac{dc_{\text{KIS}}}{dt} = r_1 \quad (9)$$

bez regeneracije:

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = -r_1 \quad (10)$$

uz regeneraciju:

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad (11)$$

bez regeneracije:

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = r_1 \quad (12)$$

uz regeneraciju:

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad (13)$$

#### 4.1. OBRADA PODATAKA

Kako bi se procijenili kinetički parametri matematičkog modela te simulirao eksperiment u kotlastom reaktoru, korišten je programski paket *Scientist*. *Scientist* sadrži metodu najmanjih kvadrata i simpleks metode za procjenu parametara.

Kinetički parametri procijenjeni su metodom nelinearne regresije iz rezultata mjerenja ovisnosti početne brzine reakcije o koncentracijama propanala,  $\text{NAD}^+$ ,  $\text{NADH}$  te su uz matematički model dan u prethodnom poglavlju korišteni za simulaciju eksperimenta u reaktoru (jednadžbe 6-13).

Odstupanje matematičkog modela od eksperimentalnih podataka dano je kao suma kvadrata razlike između eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih pomoću modela. Optimiranje parametara provodilo se dok se nije postigla minimalna suma kvadrata razlike između eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih pomoću modela koji je zadan u programu *Scientist*.

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

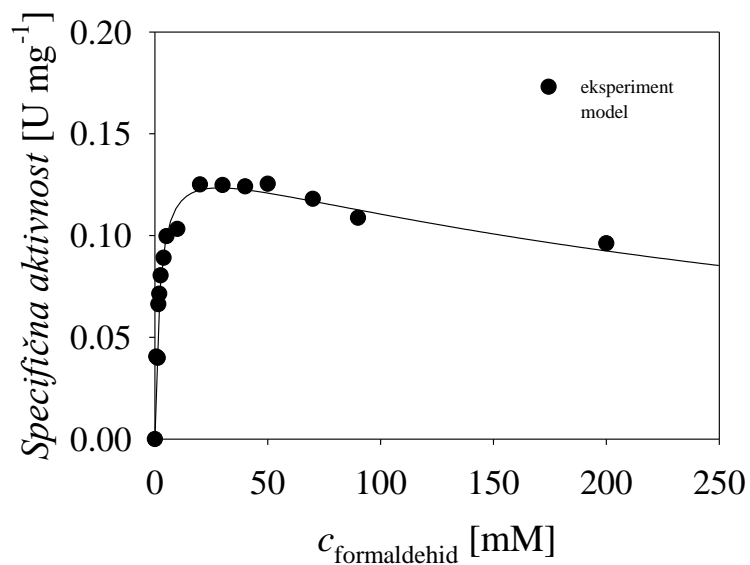
U ovom je radu provedena enzimatska oksidacija dvaju aldehida: formaldehida (FA) i propanala (PA). Enzim koji katalizira navedene reakcije je aldehyd dehidrogenaza (ALDH). Reakcije su provedene u kotlastom reaktoru. U tim reakcijama sudjeluje i koenzim  $\text{NAD}^+$ , a potrebna je i NADH oksidaza koja služi za regeneraciju  $\text{NAD}^+$ . Ispitane su kinetike oksidacije FA i PA pri čemu su u oba slučaja konkretno promatrani utjecaji koncentracija supstrata (FA/PA i  $\text{NAD}^+$ ) te nastalog NADH na početnu brzinu reakcije. Određena je aktivnost enzima ALDH spektrofotometrijskom metodom te su izmjerene koncentracije reaktanata i produkata kapljevinskom kromatografijom visokog učinka.

### 5.1. KINETIKA OKSIDACIJE ALDEHIDA

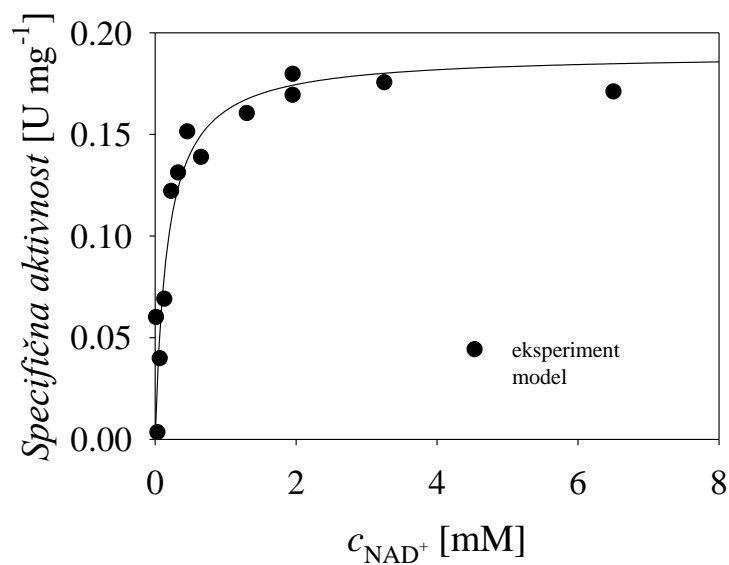
Kinetika oksidacije katalizirana enzimom aldehyd dehidrogenazom određena je za formaldehyd i propanal. U idućim poglavljima prikazani su rezultati mjerenja te su tablično prikazani procijenjeni kinetički parametri.

#### 5.1.1. Kinetika oksidacije formaldehida

Ispitan je utjecaj koncentracije supstrata FA i  $\text{NAD}^+$  te produkta NADH na specifičnu aktivnost enzima ALDH. Rezultati su prikazani na slikama (14-16). Rezultati pokazuju vrlo dobro podudaranje eksperimentalnih podataka s Michaelis-Menteničinim modelom. U tablici 8. navedeni su procijenjeni kinetički parametri modela. Porastom koncentracije NADH opada specifična aktivnost enzima, iz čega se može zaključiti da NADH inhibira enzim u reakciji oksidacije što je vidljivo na slici 16. Vrijednost inhibicijske konstante za NADH je vrlo niska, što pokazuje da je inhibicija enzima jaka.

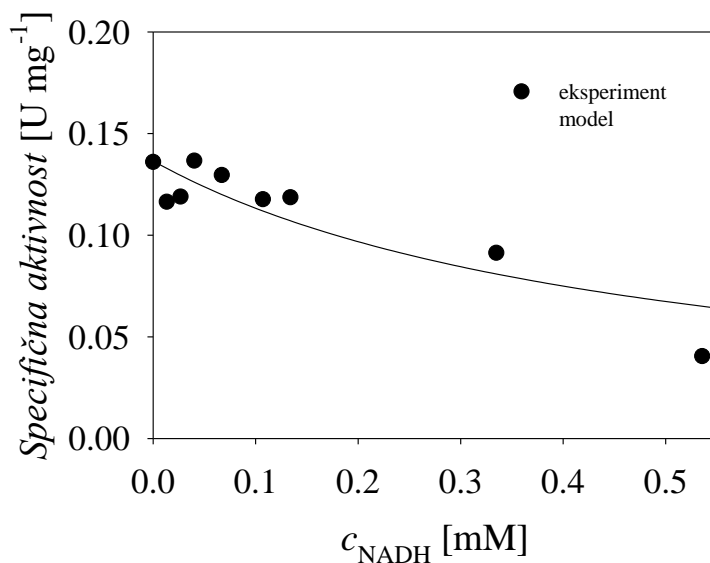


**Slika 14.** Utjecaj koncentracije formaldehida na specifičnu aktivnost enzima ( $25^{\circ}\text{C}$ ,  $50 \text{ mM}$  TEA HCl pufer pH 8,0,  $\gamma_{\text{ALDH}} = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+} = 9,79 \text{ mM}$ )



**Slika 15.** Utjecaj koncentracije  $\text{NAD}^+$  na specifičnu aktivnost enzima ( $25^{\circ}\text{C}$ ,  $50 \text{ mM}$  TEA HCl pufer pH 8,0,  $\gamma_{\text{ALDH}} = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+} = 30,00 \text{ mM}$ )





**Slika 16.** Utjecaj koncentracije NADH na specifičnu aktivnost enzima (25°C, 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0,  $\gamma_{\text{ALDH}} = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+} = 9,75 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{FA}} = 30,00 \text{ mM}$ )

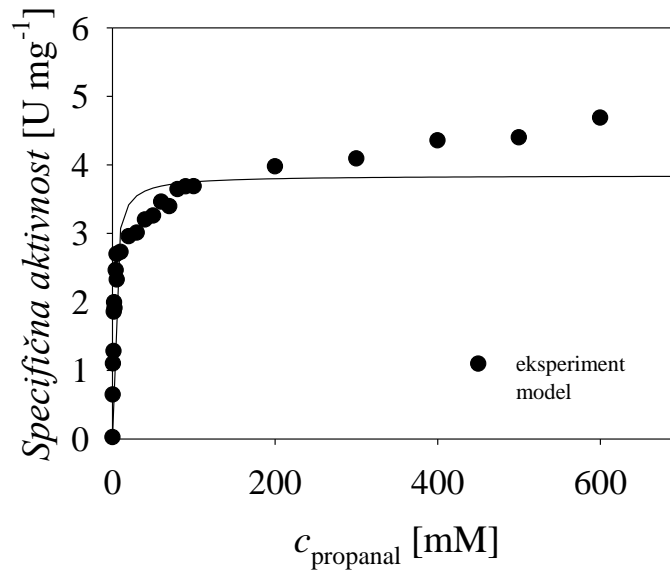
**Tablica 8.** Kinetički parametri procijenjeni iz eksperimentalnih rezultata prikazanih na slikama 14-16

| Parametar                  | Jedinica           | Vrijednost           |
|----------------------------|--------------------|----------------------|
| $V_{ml}$                   | $\text{U mg}^{-1}$ | $0.190 \pm 0.010$    |
| $K_m^{\text{formaldehid}}$ | Mm                 | $2.136 \pm 0.234$    |
| $K_i^{\text{formaldehid}}$ | mM                 | $381.517 \pm 65.204$ |
| $K_m^{\text{NAD}^+}$       | mM                 | $0.174 \pm 0.043$    |
| $K_i^{\text{NADH}}$        | mM                 | $0.009 \pm 0.002$    |

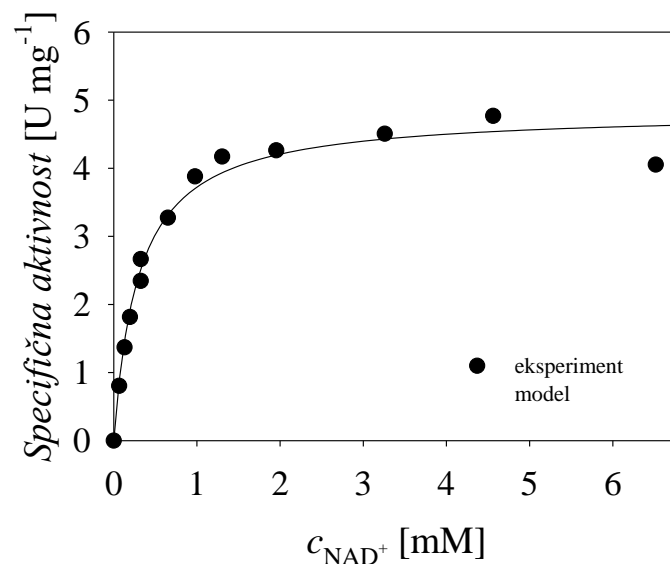
### 5.1.2. Kinetika oksidacije propanala

Ispitan je i utjecaj PA kao supstrata,  $\text{NAD}^+$  i  $\text{NADH}$  na specifičnu aktivnost enzima u reakciji oksidacije katalizirane enzimom ALDH. Rezultati ovih mjerenja prikazani su na slikama 17-19. Iz rezultata je vidljivo da odabrani model Michaelis-Menteničine kinetike dobro opisuje eksperimentalne podatke. U tablici 9. su prikazani procijenjeni kinetički parametri modela. Prisutna je blaga inhibicija enzima produktom  $\text{NADH}$ , što je vidljivo na slici 19. Povećanjem koncentracije  $\text{NADH}$ , dolazi do laganog pada specifične aktivnosti

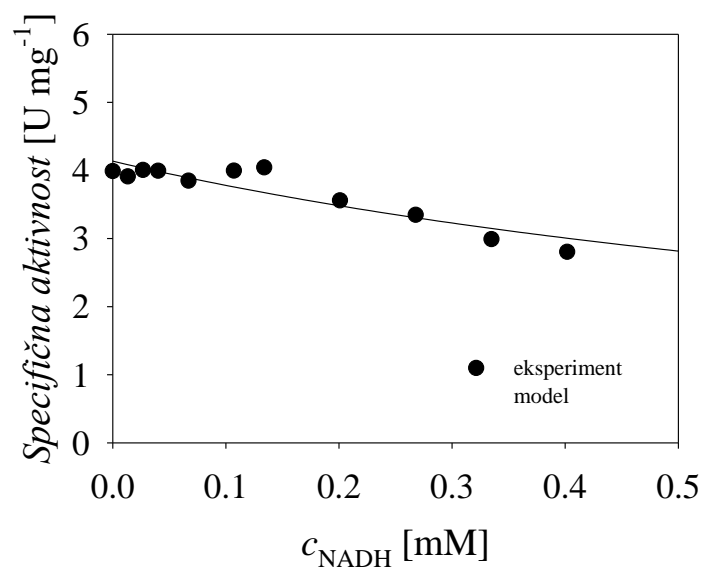
enzima. Značajniji pad bio je uočljiv kod promatranja kinetike formaldehida gdje je bila prisutna jača inhibicija enzima. Kao još jedna usporedba može poslužiti i procijenjena vrijednost konstante inhibicije NADH dana u tablici 9. Ta je vrijednost nešto viša u odnosu na konstantu inhibicije NADH kod FA, što znači da je inhibicija enzima manja.



**Slika 17.** Utjecaj koncentracije propanala na specifičnu aktivnost enzima (25°C, 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0,  $\gamma_{\text{ALDH}} = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{NAD}^+} = 9,78 \text{ mM}$ )



**Slika 18.** Utjecaj koncentracije  $\text{NAD}^+$  na specifičnu aktivnost enzima (25°C, 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0,  $\gamma_{\text{ALDH}} = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{PA}} = 299,87 \text{ mM}$ )



**Slika 19.** Utjecaj koncentracije NADH na specifičnu aktivnost enzima (25°C, 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0,  $\gamma_{\text{ALDH}} = 0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{PA}} = 299,87 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NAD}^+} = 9,78 \text{ mM}$ )

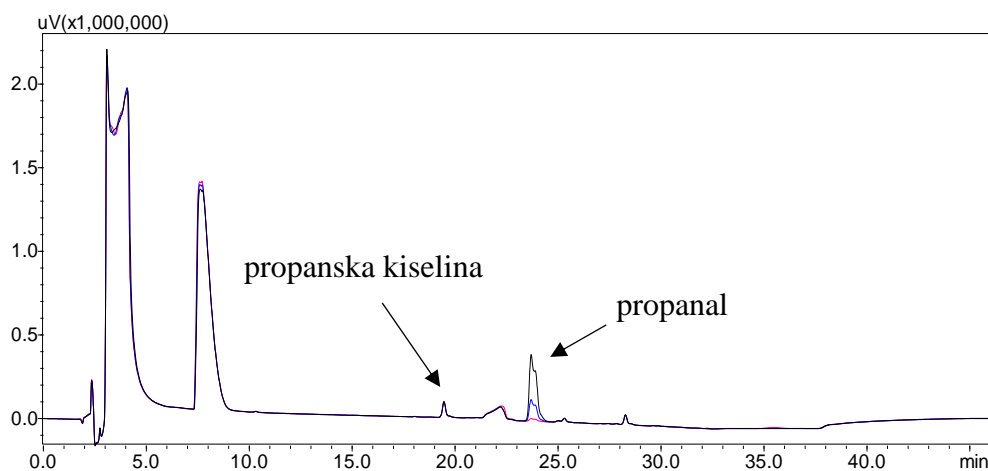
**Tablica 9.** Kinetički parametri procijenjeni iz eksperimentalnih rezultata prikazanih na slikama 17-19

| Parametar               | Jedinica           | Vrijednost        |
|-------------------------|--------------------|-------------------|
| $V_{m2}$                | $\text{U mg}^{-1}$ | $4.835 \pm 0.140$ |
| $K_m^{\text{propanal}}$ | mM                 | $2.513 \pm 0.409$ |
| $K_m^{\text{NAD}^+}$    | mM                 | $0.299 \pm 0.034$ |
| $K_i^{\text{NADH}}$     | mM                 | $0.032 \pm 0.003$ |

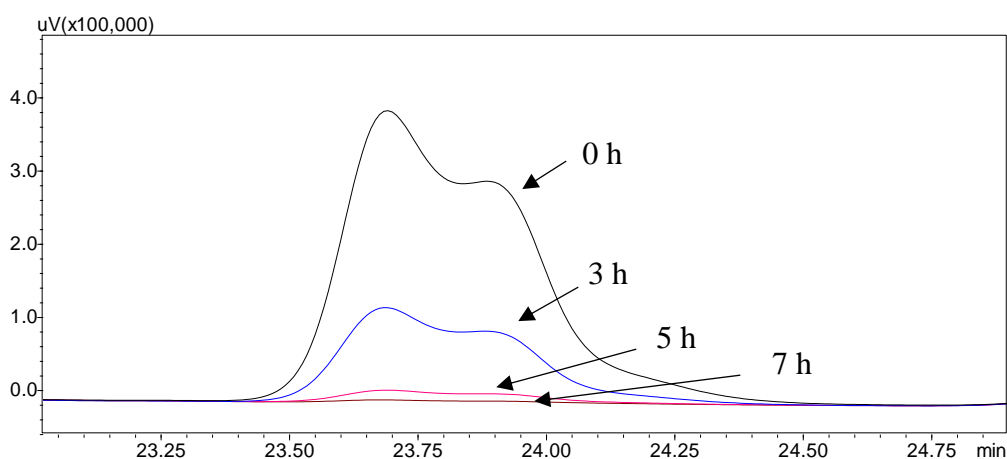
## 5.2. REAKCIJA ENZIMATSKE OKSIDACIJE PROPANALA U KOTLASTOM REAKTORU

Oksidacija propanala katalizirana je enzimom ALDH, a prisutan je i enzim NOX koji služi za regeneraciju koenzima  $\text{NAD}^+$ . Kao produkt reakcije nastaje propanska kiselina. Kromatogram mjeren metodom 46 minuta (slika 20.) prikazuje promjene koncentracije supstrata i produkta u uzorcima uzetim nakon 0, 3 i 5h. Pik koji se pojavljuje u 19,5 minuti označava nastanak propanske kiseline kao produkta. Na piku propanala vidljiv je njegov pad koncentracije tijekom vremena. Na slici 21. prikazan je isti kromatogram s time da je uvećan

pik propanala kako bi se istaknuo pad njegove koncentracije. Uzet je još jedan uzorak u 7 h od početka reakcije gdje je vidljiv pad koncentracije propanala na 0.

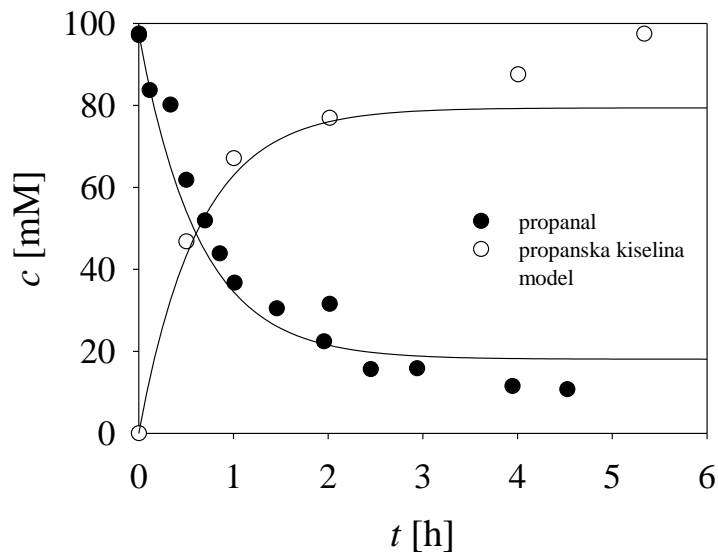


**Slika 20.** Kromatogram uzoraka tijekom enzimatske oksidacije propanala mjerenih metodom 46 minuta (crna linija - uzorak u 0 h, plava linija - uzorak u 3 h, roza linija - uzorak u 5 h)



**Slika 21.** Kromatogram uzoraka tijekom enzimatske oksidacije propanala mjerenih metodom 46 minuta (crna linija - uzorak u 0 h, plava linija - uzorak u 3 h, roza linija - uzorak u 5 h, donja crna linija – uzorak u 7 h)

Na slici 22. jasno se vidi kako s povećanjem vremena reakcije opada koncentracija supstrata – propanala, a raste koncentracija nastale propanске kiseline.



**Slika 22.** Koncentracije propanala (supstrata) i propanske kiseline (produkta) tijekom enzimatske oksidacije u kotlastom reaktoru ( $25^{\circ}\text{C}$ , 50 mM TEA HCl puffer pH 8,0,  $c_{\text{PA}}=100,00$  mM,  $c_{\text{NAD}^+}=1,00$  mM,  $\gamma_{\text{NOX}}= 5,00$  mg mL $^{-1}$ ,  $\gamma_{\text{ALDH}}= 10,00$  mg mL $^{-1}$ )

U reakciji oksidacije propanala, kako je već ranije spomenuto, sudjeluje i enzim NOX čija je svrha regeneracija koenzima  $\text{NAD}^+$ . U tablici 10. prikazani su procijenjeni kinetički parametri regeneracije  $\text{NAD}^+$  koji su preuzeti iz drugog rada. Važno je spomenuti da razvijeni matematički model (jednadžbe 6-13) dobro opisuje eksperimentalne podatke, uz napomenu da je bilo potrebno uzeti u obzir gubitak operacijske stabilnosti enzima koji je opisan kinetikom prvoga reda. Procijenjene konstante za aldehid dehidrogenazu i NADH oksidazu iznose  $0.026$  i  $0.010$  min $^{-1}$ .

**Tablica 10.** Kinetički parametri regeneracije  $\text{NAD}^+$  uz pomoć NOX-a procijenjeni iz eksperimentalnih rezultata

| Parametar            | Jedinica     | Vrijednost        |
|----------------------|--------------|-------------------|
| $V_{m3}$             | U mg $^{-1}$ | $1.761 \pm 0.115$ |
| $K_m^{\text{NADH}}$  | mM           | $0.075 \pm 0.011$ |
| $K_i^{\text{NAD}^+}$ | mM           | $0.476 \pm 0.034$ |

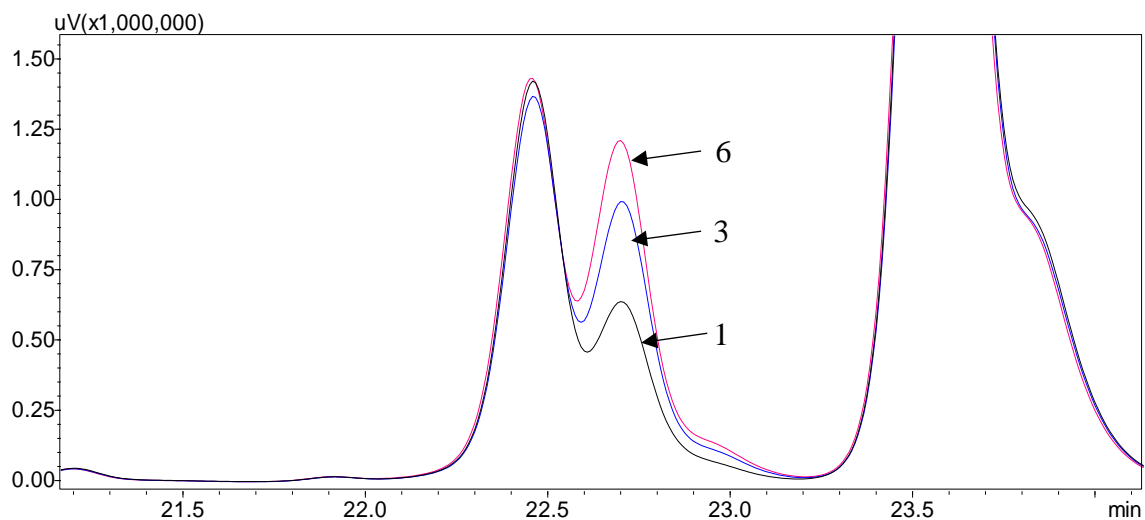
## 6. ZAKLJUČAK

Određena je kinetika enzimatske oksidacije formaldehida i propanala. Iz dobivenih kinetičkih parametara vidi se da postoji značajna inhibicija enzima produktom (NADH) u oba slučaja, s time da je inhibicija izraženija kod oksidacije formaldehida gdje je vrijednost inhibicijske konstante manja. Relativno niske vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante kod oba supstrata govore o visokom afinitetu enzima prema formaldehidu i propanalu kao supstratima.

Reakcija enzimatske oksidacije aldehida katalizirana aldehyd dehidrogenazom je općenito ireverzibilna reakcija. Reakcija enzimatske oksidacije formaldehida u kotlastom reaktoru nije bila uspješna zbog nastanka iznimno malih količina produkta što je pak posljedica inhibicije supstratom i deaktivacije enzima pod utjecajem supstrata. Ta se reakcija stoga dalje nije niti promatrala. Reakcija enzimatske oksidacije propanala je međutim bila uspješna i opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom. Promatrana je i regeneracija  $\text{NAD}^+$  koenzima enzimom NADH oksidazom (NOX-om). Matematički model koji se sastoji od kinetičkih i bilancnih jednadžbi u kotlastom reaktoru dobro je opisao eksperimentalno dobivene podatke.

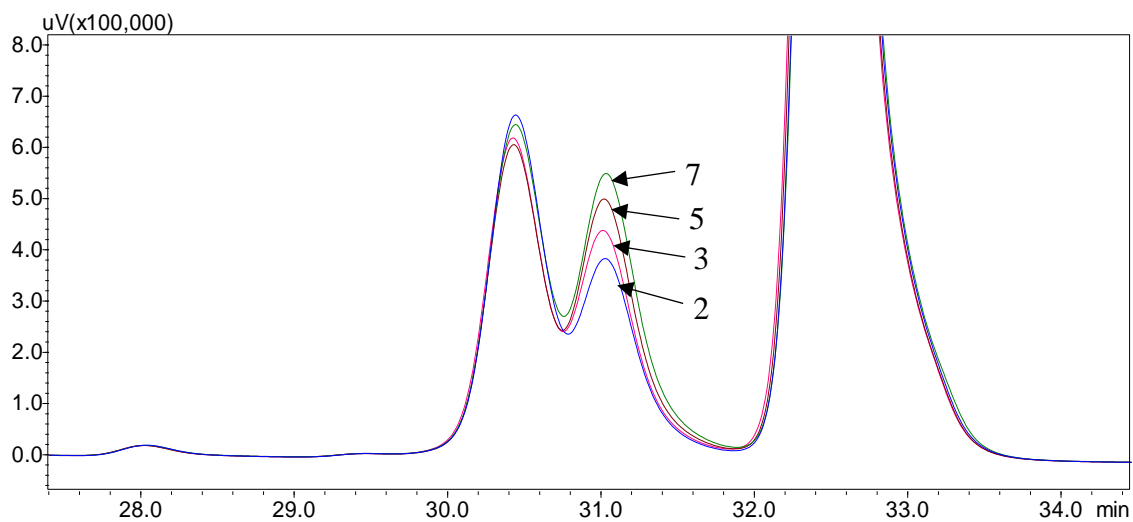
## 7. PRILOZI

### PRILOG 1. – Rezultat provedene analize metodom 46 minuta na HPLC-u



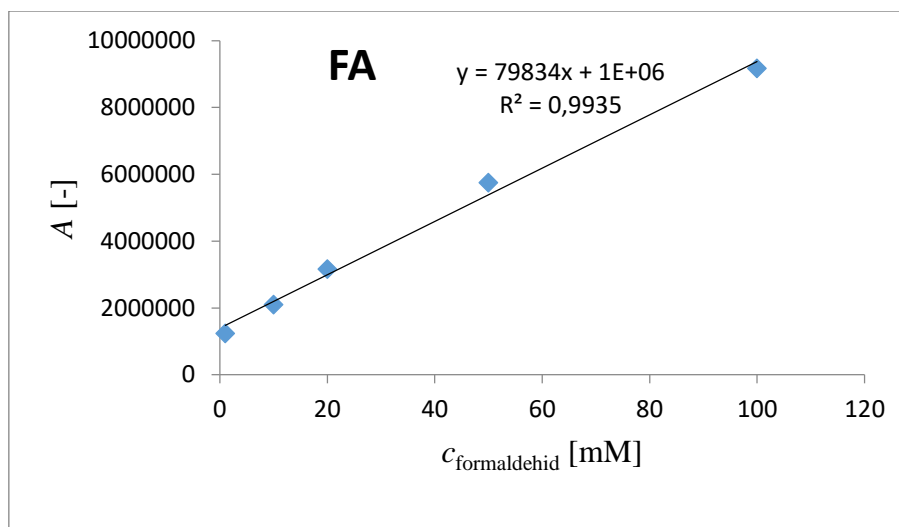
**Slika 23.** Dobiveni kromatogram metodom 46 minuta nakon 1, 3 i 6h od početka reakcije

### PRILOG 2. - Rezultat provedene analize metodom 66 minuta na HPLC-u



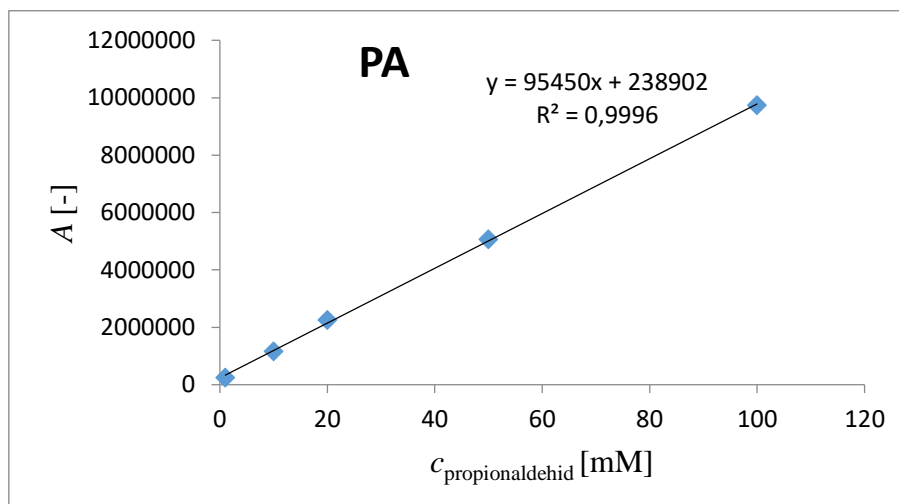
**Slika 24.** Dobiveni kromatogram metodom 66 minuta nakon 2, 3, 5 i 7h od početka reakcije

### PRILOG 3. – Baždarni pravac za određivanje koncentracije formaldehida



Slika 25. Baždarni pravac za određivanje koncentracije formaldehida na HPLC-u

### PRILOG 4. – Baždarni pravac za određivanje koncentracije propanala



Slika 26. Baždarni pravac za određivanje koncentracije propanala na HPLC-u



## 8. POPIS SIMBOLA

|                                      |  |                        |
|--------------------------------------|--|------------------------|
| <i>ABS</i>                           | apsorbancija   |                        |
| ADH                                  | alkohol dehidrogenaza                                  |                        |
| ALDH                                 | aldehid dehidrogenaza                                  |                        |
| BnONH <sub>2</sub>                   | <i>O</i> -benzilhidroksilamin hidroklorid              |                        |
| <i>c</i>                             | molarna koncentracija                                  | [mM]                   |
| <i>c</i> <sub>temeljna otopina</sub> | molarna koncentracija temeljne otopine                 | [mM]                   |
| <i>c</i> <sub>u kiveti</sub>         | molarna koncentracija otopine u kiveti                 | [mM]                   |
| <i>d</i>                             | put koji prelazi svjetlost u kiveti                    | [cm]                   |
| <i>dABS/dt</i>                       | nagib pravca dobiven spektrofotometrijskom metodom     |                        |
| E                                    | enzim  |                        |
| ES                                   | enzim-supstrat kompleks                                |                        |
| $\epsilon_{340:NADH}$                | specifična konstanta za NADH pri valnoj duljini 340 nm |                        |
| FA                                   | formaldehid  |                        |
| FAD <sup>+</sup>                     | flavin adenin dinukleotid                              |                        |
| $\gamma$                             | masena koncentracija                                   | [mg mL <sup>-1</sup> ] |
| HCl                                  | klorovodična kiselina                                  |                        |
| HPLC                                 | tekućinska kromatografija visokog učinka               |                        |
| <i>K<sub>i</sub></i>                 | konstanta inhibicije                                   | [mM]                   |
| <i>K<sub>m</sub></i>                 | Michaelis – Menteničina konstanta                      | [mM]                   |
| <i>m</i>                             | masa   | [g] ili [mg]           |
| NAD <sup>+</sup>                     | nikotinamid adenin dinukleotid                         |                        |
| NADH                                 | nikotinamid adenin dinukleotid – reducirani oblik      |                        |
| NOX                                  | NADH oksidaza  |                        |
| P                                    | produkt  |                        |
| PA                                   | propanal   |                        |
| RI                                   | refrakcijski indeks                                    |                        |
| S                                    | supstrat   |                        |
| <i>S.A.</i>                          | specifična aktivnost enzima                            | [U mg <sup>-1</sup> ]  |
| <i>T</i>                             | temperatura  | [°C]                   |
| <i>t</i>                             | vrijeme  | [min] ili [h]          |
| TFA                                  | trifluorocena kiselina                                 |                        |

|                  |                            |                            |
|------------------|----------------------------|----------------------------|
| UV               | ultraljubičasto svjetlo    |                            |
| V                | volumen                    | [ $\mu\text{L}$ ] ili [mL] |
| V.A.             | volumna aktivnost enzima   | [U mL <sup>-1</sup> ]      |
| V <sub>enz</sub> | volumen dodanog enzima     | [ $\mu\text{L}$ ]          |
| V <sub>m</sub>   | maksimalna brzina reakcije | [U mg <sup>-1</sup> ]      |
| V <sub>uk</sub>  | ukupni volumen u kiveti    | [ $\mu\text{L}$ ]          |

## 9. LITERATURA

- [1] J. Choi, S. Han, H. Kim (2015), Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnology Advances*, 33(7):1443-1454
- [2] M. T. Reetz (2013), Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future, *Journal of the American Chemical Society*, 135(34):12480-12496
- [3] S. Shoda, H. Uyama, J. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi (2016), Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis, *Chemical Reviews*, 116(4):2307-2413
- [4] A. Illanes (2008), *Enzyme Biocatalysis, Principles and Applications*, Springer, str. 1-2
- [5] I. Chorkendorff, J.W. Niemantsverdriet (2003), Concepts of modern catalysis and kinetics, Wiley-VCH., str. 4-6, 23
- [6] D. Vasić-Rački, Z. Findrik, A. Vrsalović Presečki (2011), Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91:845-856
- [7] A. S. Bommarius (2015), Biocatalysis: A Status Report, School of Chemical and Biomolecular Engineering, Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering, 6:319-345
- [8] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer (2002), *Biochemistry*, 5th edition, W.H. Freeman and company, str.326
- [9] H. Wulf, M. Perzborn, G. Sievers, F. Scholz, U. T. Bornscheuer (2012), Kinetic resolution of glyceraldehyde using an aldehyde dehydrogenase from *Deinococcus geothermalis* DSM 11300 combined with electrochemical cofactor recycling, *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 74:144-150
- [10] K. Kitagawaa, T. Kawamotoa, N. Kunugitaa, T. Tsukiyamab, K. Okamoto, A. Yoshidada, K. Nakayamab, K. Nakayamab (2000), Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 2 associates with oxidation of methoxyacetaldehyde; in vitro analysis with liver subcellular fraction derived from human and Aldh2 gene targeting mouse, *FEBS Lett*, 476:306-311
- [11] X. Li, Y. Li, D. Wei, P. Li, L. Wang, L. Feng (2010), Characterization of a broad-range aldehyde dehydrogenase involved in alkane degradation in *Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2, *Microbiology Research*, 165(8):706-712

[12] H. Werner Goedde, D. P. Agarwal (1990), Pharmacogenetics of aldehyde dehydrogenase (ALDH), *Pharmacology & Therapeutics*, 45(3):345-371

[13] W. Jelski, M. Szmitkowski (2008), Alcohol dehydrogenase (ADH) and aldehyde dehydrogenase (ALDH) in the cancer diseases, *Clinica Chimica Acta*, 395(1-2):1–5

