University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Emerik Leaković

APPLICATION OF MULTIENZYME SYSTEMS IN THE PRODUCTION OF NUTRACEUTICALS FROM RENEWABLE SOURCES

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025

Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMISKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Emerik Leaković

PRIMJENA MULTIENZIMSKIH SUSTAVA U PROIZVODNJI NUTRACEUTIKA IZ OBNOVLJIVIH IZVORA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025

University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Emerik Leaković

APPLICATION OF MULTIENZYME SYSTEMS IN THE PRODUCTION OF NUTRACEUTICALS FROM RENEWABLE SOURCES

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof. Ana Vrsalović Presečki, PhD

Zagreb, 2025

Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMISKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Emerik Leaković

PRIMJENA MULTIENZIMSKIH SUSTAVA U PROIZVODNJI NUTRACEUTIKA IZ OBNOVLJIVIH IZVORA

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki

Zagreb, 2025

Dissertation topic was accepted on session of Council of the Faculty of Chemical Engineering and Technology, University of Zagreb, held on 20 March 2024, and approved at the session of the Senate of the University of Zagreb held on 14 May 2024.

Abstract

Nutraceuticals are naturally derived food components that provide medical or health benefits, including the prevention and treatment of various diseases. Owing to their natural origin, they typically exhibit a more favourable safety profile compared to conventional pharmaceuticals. Among these, raspberry ketone has gained increasing attention due to its potential physiological benefits. As a dietary supplement, raspberry ketone is known for promoting weight loss by enhancing metabolic rate, increasing fat oxidation, and suppressing appetite. Additionally, it functions as a natural antioxidant and anti-inflammatory agent, and has shown promise for pulmonary and hepatoprotective applications.

This doctoral research focuses on optimizing and developing a sustainable and efficient biocatalytic process for the production of raspberry ketone from renewable sources, specifically from the inner bark of *Betula pubescens*. The core objective is to optimize multienzyme process which consist of two key enzymatic reactions: the hydrolysis of rhododendrol glycosides (betuloside and apiosylrhododendrin) to rhododendrol, and the subsequent oxidation of rhododendrol to raspberry ketone using enantioselective alcohol dehydrogenases (ADHs), coupled with a coenzyme regeneration system. To identify the most efficient process design, both sequential and simultaneous reaction approaches were systematically evaluated. The simultaneous approach integrates both enzymatic activities into a single reaction system, aiming to streamline processing, minimize intermediate handling, and potentially improve overall conversion efficiency. Conversely, in the sequential configuration, hydrolysis and oxidation reactions are performed in separate stages, allowing precise optimization of conditions for each enzymatic step and facilitating the stabilization of intermediates. Comparative analysis of these two strategies provides insight into their relative advantages and limitations, guiding the selection of an optimal enzymatic pathway for efficient and sustainable raspberry ketone biosynthesis.

The first phase of the study investigates the enzymatic hydrolysis of biogenic rhododendrol glycosides. Betuloside and apiosylrhododendrin, which are found in varying proportions in birch bark extracts, were hydrolysed using β-glucosidase and the commercial enzyme preparation RAPIDASE. Betuloside is directly hydrolysed to rhododendrol and glucose by β-glucosidase. Apiosylrhododendrin undergoes a two-step enzymatic breakdown, initially cleaved by RAPIDASE into betuloside and apiose, followed by further conversion into rhododendrol. After screening nearly fifty enzymes, RAPIDASE was selected as the most efficient catalyst for

apiosylrhododendrin hydrolysis. The process was optimized through kinetic studies and the development of a mathematical model, enabling the prediction of optimal reaction parameters. Validation in a batch reactor demonstrated high productivity, ranging from 83.9 to 94.5 g L^{-1} day^{-1}, depending on the glycoside composition.

The second phase of the research addresses the oxidation of rhododendrol to raspberry ketone, a step complicated by the presence of S- and R- enantiomers resulting from the hydrolysis step. Enantiomer-specific ADHs were employed to ensure efficient conversion. Moreover, an optimal strategy for coenzyme regeneration was developed, allowing for cost-effective and continuous $NAD(P)^+$ recycling via acetone reduction catalyzed by the same ADHs. A model-based approach was again used to optimize the process and validate it under optimal conditions in a batch reactor. The highest observed productivity of raspberry ketone reached 1.49 kg L^{-1} day^{-1} in a one-pot sequential reaction system with integrated coenzyme regeneration.

A particularly notable and novel finding emerged during the kinetic analysis of the S-selective ADH-catalyzed oxidation of S-rhododendrol. The enzyme displayed atypical biphasic kinetic behaviour. Two distinct kinetic regimes were identified: one followed standard Michaelis-Menten kinetics, while the other exhibited substrate inhibition, implying the existence of two separate substrate binding sites. Furthermore, product inhibition was observed to affect these sites differentially—one being significantly inhibited, the other much less so. In contrast, coenzyme binding was consistent with a single-site model. These findings provided deep mechanistic insight into the enzyme's function and highlighted the value of advanced bioreaction engineering in uncovering such complex behaviours.

Throughout the study, mathematical modelling played a central role in optimizing biocatalytic performance. Independent kinetic and enzyme stability studies informed the development of robust, predictive models for both hydrolysis and oxidation steps. These models have been experimentally validated and used for process simulations, enabling the finding of optimal conditions.

This work presents a comprehensive and innovative approach to the sustainable production of raspberry ketone through biocatalysis. It integrates enzymology, reaction engineering, and mathematical modelling to deliver a scalable and high-yielding process. The findings not only contribute to the valorisation of renewable biomass but also provide a strong foundation for future interdisciplinary research in enzyme engineering, drug development, and industrial biotechnology.

Keywords: raspberry ketone, rhododendrol glycosides, rhododendrol, multienzymatic cascade, coenzyme regeneration, biphasic kinetic, mathematical modelling, process simulations

Sažetak

Nutraceutici su prirodno dobivene prehrambene komponente koje pružaju medicinske ili zdravstvene koristi, uključujući prevenciju i liječenje raznih bolesti. Zbog svog prirodnog podrijetla, obično pokazuju povoljniji sigurnosni profil u usporedbi s konvencionalnim farmaceutskim proizvodima. Među njima, keton maline privukao je sve veću pozornost zbog svojih potencijalnih fizioloških koristi. Kao nutraceutik, keton maline poznat je po tome što potiče gubitak tjelesne mase poticanjem metabolizma, povećanjem oksidacije masti i suzbijanjem apetita. Osim toga, djeluje kao prirodni antioksidant i protuupalno sredstvo te se pokazuje obećavajuća svojstva za zaštitu pluća i jetre.

Ovo doktorsko istraživanje usredotočeno je na optimiziranje i razvoj održivog i učinkovitog biokatalitičkog procesa za proizvodnju ketona maline iz obnovljivih izvora, posebno iz unutarnje kore Betula pubescens. Glavni cilj je optimizirati dvije ključne sekvencijalne enzimske reakcije: hidrolizu rododendrol glikozida (betulozida i apiozilrododendrina) u rododendrol i naknadnu oksidaciju rododendrola u keton maline korištenjem enantioselektivnih alkohol dehidrogenaza (ADH), korištenjem sustava za regeneraciju koenzima. Kako bi se identificirao najučinkovitiji dizajn procesa, procijenjeni su i sekvencijalni i simultani pristup reakcijama. Simultani pristup integrira obje enzimske aktivnosti u jedan reakcijski sustav, s ciljem pojednostavljenja provedbe procesa, smanjiti rukovanje između koraka i potencijalnog poboljšanja ukupne učinkovitosti konverzije. Suprotno tome, u sekvencijalnoj konfiguraciji, reakcije hidrolize i oksidacije provode se u odvojenim fazama, što omogućuje preciznu optimizaciju uvjeta za svaki enzimski korak i olakšava stabilizaciju međuprodukata. Usporedba ove dvije strategije pruža uvid u njihove relativne prednosti i ograničenja, pomažući u odabiru optimalnog enzimskog puta za učinkovitu i održivu biosintezu ketona maline.

Prva faza studije istražuje enzimsku hidrolizu biogenih rododendrol glikozida. Betulozid i apiozilrododendrin, koji se nalaze u različitim omjerima u ekstraktu unutarnje kore breze, hidrolizirani su β-glukozidazom i komercijalnim enzimskim pripravkom RAPIDASE-om. Betulozid se izravno hidrolizira u rododendrol i glukozu uz β-glukozidazu. Apiozilrododendrin prolazi kroz dvostupanjsku enzimsku razgradnju, u početku ga RAPIDASE-a cijepa na betulozid i apiozu, nakon čega slijedi konverzija betulozida u rododendrol. Nakon probira gotovo pedeset enzima, RAPIDASE je odabran kao najučinkovitiji katalizator za hidrolizu apiozilrododendrina. Proces je optimiziran kinetičkim ispitivanjem i razvojem matematičkog modela, što omogućuje

predviđanje optimalnih parametara reakcije. Validacija u šaržnom reaktoru pokazala je visoku produktivnost, u rasponu od 83,9 do 94,5 g L^{-1} dan^{-1}, ovisno o sastavu glikozida.

Druga faza istraživanja bavi se oksidacijom rododendrola u keton maline, korakom koji uključuje oksidaciju S- i R- enantiomera koji nastaju u koraku hidrolize. Korištene su alkohol dehidrogenaze specifične za svaki enantiomer, kako bi se osigurala učinkovita konverzija. Nadalje, razvijena je optimalna strategija za regeneraciju koenzima, koja omogućuje isplativo i kontinuirano recikliranje NAD(P)+ putem redukcije acetona katalizirane istim ADH. Pristup temeljen na modelu ponovno je korišten za optimizaciju procesa i njegovu validaciju pod optimalnim uvjetima u šaržnom reaktoru. Najveća uočena produktivnost ketona maline dosegla je 1,49 kg L^{-1} dan^{-1} u sekvencijalnom reakcijskom sustavu bez izolacije međuprodukta (rododendrola) i integriranom regeneracijom koenzima.

Posebno značajno i novo otkriće pojavilo se tijekom kinetičke analize S-selektivne ADH-katalizirane oksidacije S-rododendrola. Enzim je pokazao atipično dvofazno kinetičko ponašanje. Identificirana su dva različita kinetička režima: jedan je slijedio standardnu Michaelis-Menteninu kinetiku, dok je drugi pokazao inhibiciju supstrata, što implicira postojanje dva odvojena mjesta vezanja supstrata. Nadalje, uočeno je da inhibicija produkta različito utječe na ta mjesta - jedno je značajno inhibirano, a drugo mnogo manje. Nasuprot tome, vezanje koenzima bilo je u skladu s modelom jednog mjesta. Ovi nalazi pružili su dubok mehanistički uvid u funkciju enzima i istaknuli vrijednost naprednog inženjerstva bioreakcija u otkrivanju takvih složenih ponašanja.

Tijekom cijelog istraživanja, matematičko modeliranje igralo je središnju ulogu u optimizaciji biokatalitičkog procesa dobivanja ketona maline iz prirodnih izvora. Neovisne kinetičke i enzimske studije stabilnosti utjecale su na razvoj robusnih, prediktivnih modela za korake hidrolize i oksidacije. Ti su modeli eksperimentalno validirani i korišteni su za simulacije procesa, omogućujući pronalazak optimalnih uvjeta.

Ovaj rad predstavlja sveobuhvatan i inovativan pristup održivoj proizvodnji malinovog ketona biokatalitičkim putem. Integrira enzimologiju, reakcijsko inženjerstvo i matematičko modeliranje kako bi se osigurao optimalan proizvodni proces. Pronalasci doprinose valorizaciji obnovljive biomase te pružaju snažnu osnovu za buduća interdisciplinarna istraživanja u enzimskom inženjerstvu, razvoju lijekova i industrijskoj biotehnologiji.

Ključne riječi: keton maline, rododendrol glikozidi, rododendrol, multienzimatske kaskade, regeneracija koenzima, dvofazna kinetika, matematičko modeliranje, simulacija procesa