

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**

Zvezdana Findrik

**BIOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-DOPE**

MAGISTARSKI RAD

Zagreb, 2004.

**UDK:** 66.094.37:577.152:681.5.015 (043.2)=862

**Znanstveno područje:** tehničke znanosti

**Znanstveno polje:** kemijsko inženjerstvo

**Institucija:** Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

**Voditelj rada:** dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof.

**Broj stranica:** 74

**Broj slika:** 47

**Broj tablica:** 10

**Broj literaturnih referenci:** 102

**Datum obrane:** 30. lipnja 2004.

**Sastav povjerenstva za obranu:**

1. dr. sc. Željko Knez, red. prof. FKKT-a (Maribor)
2. dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof. FKIT-a
3. dr. sc. Bruno Zelić, doc. FKIT-a

**Institucije u kojima je rad pohranjen:**

1. Knjižnica Fakulteta kemijskog inženjerstva tehnologije u Zagrebu, Marulićev trg 20.
2. Nacionalna i sveučilišna biblioteka u Zagrebu, Hrvatske bratske zajednice bb.

Tema rada “Biokatalitička oksidacija L-DOPE” prihvaćena je na sjednici Znanstveno nastavnog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, održanoj dana 26. veljače 2004.

*Zahvaljujem Ministarstvu znanosti obrazovanja i športa na financijskoj potpori tijekom poslijediplomskog studija.*

*Najtoplije zahvaljujem dr.sc. Đurđi Vasić-Rački, red. prof. koja mi je svojim stručnim znanjem i zalaganjem omogućila realizaciju ovog rada.*

*Posebno se zahvaljujem kolegama mr.sc. Ani Vrsalović Presečki, dipl. inž, Mireli Poljanac, dipl. inž. i dr.sc. Bruni Zeliću, doc. na podršci tijekom izrade ovog rada..*

*Zahvaljujem se također dr. sc. Željku Knez, red. prof., dr. sc. Maji Habulin, izv. prof., i mr.sc. Mateji Primožić, dipl. inž. sa Fakulteta za kemiju in kemijsko tehnologiju u Mariboru na gostoprimstvu i ugodnoj atmosferi tijekom rada u njihovom laboratoriju.*

*Najtoplije se zahvaljujem svojim roditeljima i sestri Žaneti za svu pomoć i podršku pruženu tijekom školovanja.*

## SAŽETAK

Oksidaze L-amino kiselina (L-AAO) su poznate po svojoj specifičnosti prema nizu različitih supstrata. U ovom su radu kinetički karakterizirane oksidaze L-amino kiselina iz dva različita izvora, komercijalni enzim iz zmijskog otrova kobre roda *Crotalus adamanteus*, te novog enzima iz bakterije roda *Rhodococcus opacus*. Kao supstrat je korišten 3,4-dihidroksifenil-L-alanin (L-DOPA). L-DOPA je u prisustvu navedenih enzima bila oksidativno deaminirana u odgovarajuću  $\alpha$ -keto kiselinu uz nastanak vodikovog peroksida i amonijaka kao nusprodukata. Obzirom da je prisustvo vodikovog peroksida nepoželjno u reakcijskoj otopini, korištena je katalaza iz goveđe jetre za njegovo uklanjanje.

Osim mjerenja aktivnosti oba enzima u ovisnosti o temperaturi i različitim pH vrijednostima, istražena je kinetika enzimske reakcije u nekoliko različitih pufera. Iz kinetičkih podataka ovisnosti specifične aktivnosti enzima o početnoj koncentraciji supstrata L-DOPE (metoda početnih brzina) nelinearnom regresijom su procijenjene kinetičke konstante oba enzima ( $V_m$  i  $K_m^{L-DOPA}$ ).

Rezultati pokazuju da obje oksidaze mogu oksidirati L-DOPU u odgovarajuće produkte. Pokazalo se da je L-AAO iz *R. opacus* specifičnija prema L-DOPI kao supstratu (manja  $K_m^{L-DOPA}$  vrijednost), te aktivnija (veća  $V_m$  vrijednost) od L-AAO iz *C. adamanteus*. Katalitička konstanta,  $k_3$ , procijenjena je Levenspiel-ovom metodom za obje oksidaze L-amino kiselina. Pokazalo se da je ona oko 10 puta veća za L-AAO iz *R. opacus* od one procijenjene za L-AAO iz *C. adamanteus*.

Biotransformacija L-DOPE katalizirana oksidazama L-amino kiselina je provedena u šaržnom enzimskom membranskom reaktoru (EMR), te u ponovljivom šaržnom EMR. Postavljen je matematički model koji se sastoji od kinetičkih jednadžbi, te od bilanci tvari u reaktoru. Parametri modela su procijenjeni diferencijalnom i integralnom metodom pomoću programskog paketa SCIENTIST.

**Ključne riječi:** oksidaza L-amino kiselina, L-DOPA, enzimski membranski reaktor, modeliranje

## ABSTRACT

L-amino acid oxidases (L-AAO) are well known for their broad substrate specificity. In this work two L-AAO-s from different sources are kinetically characterized: from snake venom *Crotalus adamanteus*, and a new enzyme from a bacteria *Rhodococcus opacus*. 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine (L-DOPA) was used as a substrate. In the presence of L-AAO-s L-DOPA was oxidized to a corresponding  $\alpha$ -keto acid (3,4-dihydroxyphenylpyruvic acid) with hydrogen peroxide and ammonia forming as by-products. Since presence of hydrogen peroxide is unwanted in the reaction solution, catalase from beef liver was used to decompose it.

Dependence of enzyme activity on the change of temperature and pH was measured. Besides that, enzyme kinetics was measured in several different buffers. Kinetic constants of both enzymes were determined by non-linear regression from the dependence of specific activity on the initial concentration of substrate.

Results show that both L-AAO-s are able to oxidize L-DOPA to corresponding products. It was shown that L-AAO from *R. opacus* is more specific to L-DOPA as a substrate (lower  $K_m^{L-DOPA}$  value), and more active (higher  $V_m$  value) than L-AAO from *C. adamanteus*. The value of catalytic constant,  $k_3$ , was estimated by Levenspiel's method for both L-AAO-s. It was shown that the catalytic constant for L-AAO from *R. opacus* is about 10 fold higher than the one estimated for L-AAO from *C. adamanteus*.

Biotransformation of L-DOPA catalysed by L-AAO's was carried out in enzyme membrane reactor (EMR), and in repetitive batch EMR. A mathematical model, which consists of kinetic equations and mass balance equations, was written. Model parameters were estimated by differential and integral method by using software package SCIENTIST.

**Key words:** L-amino acid oxidase, L-DOPA, enzyme membrane reactor, modeling

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO.....	4
2.1. ENZIMI.....	4
2.1.1. Oksidaze amino kiselina.....	5
2.1.2. Katalaza.....	7
2.2. ENZIMSKE REAKCIJE U SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA.....	8
2.3. L-DOPA.....	10
2.4. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA.....	11
2.5. PREGLED KINETIČKIH MODELA.....	13
3. MATERIJALI I METODE.....	19
3.1. APARATURA.....	19
3.1.1. Enzimski membranski reaktor (EMR).....	19
3.1.2. Visokotlačni šaržni reaktor.....	20
3.1.3. Spektrofotometar.....	21
3.1.4. Visokotlačni tekućinski kromatograf (HPLC).....	21
3.1.5. Visokotlačna tekućinska kromatografija sa masenim detektorom (LC-MS).....	21
3.2. ANALITIČKE METODE.....	21
3.2.1. Određivanje aktivnosti enzima oksidaze L-amino kiselina (L-AAO).....	21
3.2.2. Određivanje aktivnosti katalaze iz goveđe jetre.....	23
3.2.3. Mjerenje brzine raspada vodikovog peroksida uz katalazu.....	23
3.2.4. Praćenje promjena koncentracija L-DOPE i produkata.....	24
3.2.5. Analiza i identifikacija produkata.....	25
3.2.6. Određivanje koncentracije proteina.....	25
3.2.7. Provedba šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-DOPE u enzimskom membranskom reaktoru (EMR).....	26
3.2.8. Provedba ponovljivog šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-DOPE u enzimskom membranskom reaktoru (EMR).....	26
4. MODELIRANJE PROCESA BOKATALITIČKE OKSIDACIJE L-DOPE.....	27
4.1. KINETIKA REAKCIJE BOKATALITIČKE OKSIDACIJE L-DOPE.....	27
4.2. BILANCE TVARI U ŠARŽNOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU (EMR).....	28
4.3. MODELI VREMENSKE DEAKTIVACIJE ENZIMA.....	28
4.4. OBRADA PODATAKA.....	29
5. REZULTATI I RASPRAVA.....	30
5.1. ISPITIVANJE KINETIKE REAKCIJE BOKATALITIČKE OKSIDACIJE L-DOPE KATALIZIRANE OKSIDAZOM L-AMINO KISELINA (L-AAO).....	30
5.1.1. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti enzima L-AAO o pH.....	30
5.1.2. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti enzima L-AAO o temperaturi.....	32
5.1.3. Ispitivanje stabilnosti otopine enzima L-AAO prilikom čuvanja.....	34
5.1.4. Ispitivanje kinetike enzimске oksidacije L-DOPE katalizirane sa L-AAO iz <i>Crotalus adamanteus</i> .....	35
5.1.5. Ispitivanje kinetike enzimске oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz <i>Rhodococcus opacus</i> .....	36
5.1.6. Inhibicija L-AAO vodikovim peroksidom.....	40
5.2. KINETIKA REAKCIJE DEGRADACIJE VODIKOVOG PEROKSIDA KATALIZIRANE KATALAZOM IZ GOVEĐE JETRE.....	40

5.2.1. Aktivnost katalaze i kinetika reakcije katalizirane katalazom iz goveđe jetre .....	40
5.2.2. Inhibicija katalaze s L-DOPOM .....	42
5.3. BOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-DOPE .....	43
5.3.1. Spontani raspad L-DOPE u EMR .....	43
5.3.2. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u šaržnom sustavu bez katalaze uz L-AAO iz <i>Crotalus adamanteus</i> .....	44
5.3.3. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u šaržnom sustavu sa katalazom i L-AAO iz <i>Crotalus adamanteus</i> .....	45
5.3.4. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u ponovljivom šaržnom sustavu sa katalazom i L-AAO iz <i>Crotalus adamanteus</i> .....	48
5.3.5. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u kontinuiranom sustavu sa katalazom u sustavu uz L-AAO iz <i>Crotalus adamanteus</i> .....	49
5.3.6. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u šaržnom sustavu bez katalaze u sustavu uz L-AAO iz <i>Rhodococcus opacus</i> .....	50
5.3.7. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u šaržnom sustavu sa katalazom i L-AAO iz <i>Rhodococcus opacus</i> .....	52
5.3.8. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u ponovljivom šaržnom sustavu sa katalazom i L-AAO iz <i>Rhodococcus opacus</i> .....	54
5.3.9. Ispitivanje operacijske stabilnosti enzima L-AAO iz <i>Rhodococcus opacus</i> .....	55
5.3.10. Biokatalitička oksidacija L-DOPE pri visokoj koncentraciji katalaze .....	56
5.3.11. Praćenje reakcije biokatalitičke oksidacije L-DOPE preko promjene koncentracije produkta .....	57
5.4. BOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-DOPE U SUPERKRITIČNOM CO <sub>2</sub> .....	58
5.4.1. Ispitivanje ponašanja L-DOPE u superkritičnom CO <sub>2</sub> .....	58
5.4.2. Ispitivanje ponašanja enzima L-AAO iz <i>Crotalus adamanteus</i> u superkritičnom CO <sub>2</sub> .....	58
5.4.3. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u superkritičnom CO <sub>2</sub> .....	59
5.4.4. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u superkritičnom CO <sub>2</sub> u sustavu bez katalaze .....	59
5.4.5. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u superkritičnom CO <sub>2</sub> u sustavu sa katalazom .....	60
5.4.6. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u sustavu bez pufera sa katalazom .....	61
5.5. KARAKTERIZACIJA PRODUKTA .....	62
5.5.1. Praćenje nastanka produkta visokotlačnom tekućinskom kromatografijom .....	62
6. ZAKLJUČAK .....	66
7. LITERATURA .....	67
8. PRILOZI .....	74
SIMBOLI .....	75
SKRAĆENICE .....	76
ŽIVOTOPIS .....	77



## 1. UVOD

Kemijska industrija predstavlja jedan od najvećih ekonomskih sektora širom svijeta, a europske kompanije imaju na tržištu dominantnu ulogu. Iako je europska kemijska industrija vrlo razvijena, uvođenje novih tehnologija se nastavlja, uključujući i tehnologije koje se temelje na primjeni biokatalize. To dopušta ulaz na nove segmente tržišta, kao i nastanak novih produkata raznih analitičkih i sintetičkih primjena [80]. Isto tako, na tradicionalna kemijska tržišta dolazi sve više proizvoda dobiveno u bioprocima ili u procesima koji uključuju kemijsku i biokatalitičku pretvorbu. Biokatalitički koraci se pojavljuju u velikom broju sinteza poljoprivrednih i organskih kemikalija, lijekova i plastičnih materijala. Osim naglo rastućeg broja komercijaliziranih bioprocisa, djelomična procjena buduće potrošnje enzima upućuje na porast njihove zastupljenosti u europskoj kemijskoj industriji [80].

U 2000-toj godini je procijenjeno da postoji preko 100 komercijalnih procesa kataliziranih enzimima [101]. Primjena enzima se uglavnom nalazi u područjima proizvodnje organskih spojeva, lijekova i sredstava za čišćenje. Očekuje se brzi razvoj u području polimera (proizvodnja 1,3-propandiola) te širenje u sva ostala područja kemijske industrije. Naravno tu se isključuju proizvodi čija je cijena ispod 1\$ / kg [89]. Tržište za osnovne, srednje, "fine" i specijalne kemikalije proizvedene bioprocima iznosi samo 2 % ukupnog tržišta kemijske industrije, pri čemu su isključene kemikalije poput etanola koji se dobiva fermentativnim putem [2].

Održivost procesa u industriji ovisi o korištenju energije i sirovine, stvaranju otpada, sigurnosti procesa i kvaliteti produkta [80]. Ovi faktori direktno ukazuju na smanjenje troškova proizvodnje i doprinose kompetitivnosti, osobito u zemljama sa strogim zakonima. Poboljšanja procesa povećanjem iskorištenja ili smanjenjem utroška sirovine, smanjenje emisija i otpada rezultiraju uštedama u procesu, te mogu dati prednost bioprocisu pred klasičnim kemijskim procesom [59]. To je pokazala "Ciba" (UK) pri sintezi akrilne kiseline uz enzim nitrilazu u jednom pilot postrojenju. Slično je "Budel Zink" iz Nizozemske pokazao pri proizvodnji cinka. Naime, u proizvodnji nastaje otpadna voda bogata sulfatom. Kako bi se voda pročistila prije ispuštanja u okoliš upotrijebljena je bakterija sposobna reducirati sulfate, za obradu  $30 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$  sumporne kiseline za pranje kolone, te je na taj način, osim što je pročišćena otpadna voda, vraćeno u proces 8,5 tona/danu ZnS. Danas su zahvaljujući genetskom inženjeringu izvedivi procesi sa genetski izmijenjenim mikroorganizmima. Uspješan primjer takvog procesa je novo postrojenje "Biochemie" iz 2001 (Frankfurt, Njemačka) za proizvodnju 7-aminocefalosporanske kiseline (7-ACA). Taj bioprocis ne koristi toksične sirovine, provodi se pri blagim uvjetima, te daje znatno manje otpada. Drugi primjer je jednostupnjevita proizvodnja riboflavina iz glukoze –

"Hoffman La Roche" (Grenzach, Njemačka) pomoću genetski modificiranog mikroorganizma *Bacillus subtilis*.

**Tablica 1.1.** Predviđanja potreba za enzimima sada i u budućnosti.

<b>Primjena enzimske tehnologije u kemijskoj industriji</b>			
<b>Industrijski sektor</b>	<b>Procijenjeni učinak</b>		
	Danas	Bliska budućnost	Daleka budućnost
<b>Organski proizvodi</b>			
Hrana i dodaci hrani	+++	+++	++
Posebne kemikalije	+	++	+++
Lijekovi (antibiotici, intermedijeri)	++	++	++
Plastični materijali i sintetika	+	++	++
Sapuni, sredstva za čišćenje, proizvodi za osobnu njegu (lipase, proteaze)	+	++	++
<b>Anorganske tvari</b>			
Razni kemijski proizvodi (adhezivi, pulpa, obrada otpadnih voda, tekstil i nafta)	+	+	++
Poljoprivredne kemikalije (herbicidi, intermedijeri)	+	+	++

U tablici 1.1. je dan kratki prikaz primjena enzima u industriji danas i procjena za budućnost [98].

Današnji bioprocesi prisutni u industriji su većinom hidrolitički, ili procesi temeljeni na fermentacijama jeftinog polaznog materijala kao što je glukoza. Mehanističke iznimke su hidroksilacije trimetilaminobutirata i heteroaromske kemikalije koje proizvodi "Lonza", koristeći kisik dobiven iz vode [62]. DSM koristi liazu amonijaka za proizvodnju L-aspartamske kiseline i implementira proces za enantioselektivnu proizvodnju cijanohidrina [16]. Niz procesa radi na nivou nekoliko stotina ili tisuća tona na godinu, što upućuje na tehnološku izvedivost i opću prihvaćenost biokatalize u industrijskoj organskoj sintezi.

Nove reakcije koje se procjenjuju trenutno u industriji uključuju oksidacije [14;72], te stvaranje C-C veza [23], koje su obično inhibirane produktom. Zbog potrebe za visokim koncentracijama produkta u komercijalnim procesima, primjenjuje se *in situ* ekstrakcija organskim otapalom u organsko vodenom reakcijskom mediju na razini pilot postrojenja. Primjene izoliranih oksidaza (za razliku od procesa sa mikroorganizmima) u sintezama zahtijevaju tehnike regeneracije koenzima.

Biotransformacije su sve uobičajenije kao metoda za dobivanje optički čistih spojeva, te za proizvodnju drugih ciljnih komponenti. Većina korisnih biotransformacija (otprilike dvije trećine objavljenih) se provodi enzimima iz klase hidrolaza. Tu su uključene proteaze, esteraze ili

lipaze, a reakcije koje one kataliziraju jesu hidrolize estera, hidroliza amida, rezolucija enantiomera, esterifikacija, sinteza amida, transesterifikacija, stvaranje fosfata, epoksida, kondenzacijska polimerizacija i mnoge druge. Nakon hidrolaza, nešto manje se koriste oksidoreduktaze, dok se preostale klase enzima koriste još manje [63].

Priroda i različite vrste organizama i mikroorganizama u njoj predstavljaju veliki izvor još neiskorištenih, ali industrijski vrlo interesantnih enzima. Različitost prirodnih spojeva ukazuje na postojanje još neotkrivenih, potencijalnih biokatalizatora funkcionalnih grupa. Karakterizacija i primjena novih enzima koji mogu katalizirati reakcije s komercijalnim potencijalom će znatno proširiti spektar industrijske biokatalize.

Proširena uporaba enzima u kemijskoj industriji će ovisiti o sposobnosti kombinacije enzimskih i kemijskih koraka u sintezi. Danas se puno istražuje uporaba enzima u nekovencionalnim medijima poput superkritičnih fluida [4;17;46;64;71;79], ionskih kapljevina [50] ili organskih otapala [26;36;39;61], te plinskih reakcijskih sustava [53;55].

Cilj ovog rada je bila kinetička karakterizacija enzima oksidaze L-amino kiselina iz *Crotalus adamanteus* i *Rhodococcus opacus*, provedba oksidacije L-DOPE navedenim enzimima, modeliranje čitavog sustava u šaržnom enzimskom membranskom reaktoru, te optimiranje i procjena parametara modela.

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. ENZIMI

Enzimi su neophodni dijelovi bioloških sustava s funkcijom kataliziranja kemijskih reakcija neophodnih za život. Bez učinkovite pomoći enzima biokemijski bi se procesi događali znatno manjom brzinom, ili se uopće ne bi događali [54].

Do danas je pronađen velik broj enzima. Izolirani su i pročišćeni, te su proučena njihova kemijska i fizikalna svojstva. Prvi je enzim izoliran još davne 1926. godine, a izolirao ga je Sumner. Bila je to ureaza kojom je on pokazao da se radi o čistom proteinu. Osnovna strukturna jedinica proteina je dugi lanac koji nastaje kondenzacijom  $\alpha$ -amino kiselina. Ovisno o broju amino kiselina u proteinu, razlikujemo enzime molekulske mase od nekoliko tisuća do nekoliko milijuna. Isto tako ovisno o njihovoj molekulskoj masi ih je moguće razdvojiti (gel filtracija, centrifugiranje pri različitim brzinama). Pri različitim pH vrijednostima će se proteini različito ponašati jer posjeduju karboksilnu i amino skupinu. Zbog preraspodjele naboja na molekulama proteina moguće ih je razdvojiti pod utjecajem električnog polja, odnosno elektroforezom.

Neobično svojstvo enzima u odnosu na standardne katalizatore jest njihova specifičnost. Pri tome razlikujemo više vrsta specifičnosti. Ako enzim katalizira reakciju samo sa jednim određenim supstratom, kažemo da pokazuje apsolutnu specifičnost. Ako pak katalizira reakciju u kojoj se pojavljuje supstrat sa određenom atomskom skupinom, kažemo da se radi o grupnoj specifičnosti. Najniži stupanj specifičnosti je opisan reakcijskom specifičnošću koji označava da enzim katalizira određeni tip reakcije bez obzira na grupe atoma koje se nalaze u okolišu. Poznato je da pojedini enzimi kataliziraju reakcije samo sa određenom stereokemijskom formom supstrata. Takvi su enzimi poznati kao stereospecifični.

Prema International Union of Biochemistry enzimi se mogu podijeliti u šest osnovnih skupina [63]: (1) oksidoreduktaze koje kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije, oksidacije C-H, C-C i C=C veza, te uklanjanja vodikovih atoma. (2) transferaze koje premještaju grupe atoma kao što su akrilna, fosforilna i karbonilna. (3) hidrolaze kataliziraju reakcije hidrolize glikozida, anhidrida, estera, amida, peptida i ostalih spojeva sa C-N vezom. (4) liaze kataliziraju reakcije kao što su adicije HX na dvostruku vezu C=C, C=N ili C=O, te obratni proces. (5) izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije kao što su migracija C=C veze, cis-trans izomerizacija i racemizacija. (6) ligaze kataliziraju formiranje C-O, C-S, C-N, C-C veze, te veze fosfatnog estera.

Osim u otopljenom obliku, enzimi se vrlo često koriste u imobiliziranom obliku radi povećanja stabilnosti, mogućnosti višestruke uporabe, lakšeg izdvajanja iz reakcijskog medija, te

moгуćnosti korištenja u kontinuiranim procesima. Zanimljivi su sa ekonomskog, ekološkog i toksikološkog stajališta [45].

Razlikujemo fizikalne i kemijske metode imobilizacije, od adsorpcije na kruti nosilac, kovalentnog vezanja na kruti materijal nosioca, pa do kemijskog vezanja između enzima i spojeva kao što je glutardialdehid. Najčešće je zastupljeno kovalentno vezanje jer se time stvara ireverzibilna veza između nosioca i enzima koja podnosi promjene sastava reakcijskog medija bez desorpcije enzima s nosioca [1], ali se pri tome gubi i najviše enzimске aktivnosti.

Općenito je pravilo da se jeftini enzimi ne koriste u imobiliziranom obliku jer je to preskupo za industrijsku uporabu [45].

### 2.1.1. Oksidaze amino kiselina

Oksidaze su enzimi velikog biotehnološkog interesa zbog svoje jedinstvene mogućnosti da kataliziraju vrlo selektivne oksidacije organskih molekula pri blagim uvjetima koristeći pri tome molekularni kisik kao jedinstveno oksidacijsko sredstvo [20]. To im omogućuje kompleks između enzima i kofaktora koji se reoksidira kisikom iz zraka i snažnom adsorpcijom kofaktora (FAD, FMN, itd.) na aktivni centar enzima.

Oksidaze amino kiselina pripadaju u vrlo zanimljivu skupinu oksidaza zbog svoje mogućnosti oksidacije tj. oksidativne deaminacije širokog spektra amino kiselina pri čemu nastaju odgovarajuće  $\alpha$ -keto-kiseline, amonijak i vodikov peroksid. Razlikuju se oksidaze amino kiselina s izraženom specifičnošću prema određenom supstratu [41;44;47;48;75;93] i one koje prihvaćaju velik broj amino kiselina kao supstrat [13;88].

Postoji značajan interes za uporabom  $\alpha$ -keto kiselina prirodnih amino kiselina u zdravstvene svrhe [87]. Te kiseline imaju ulogu u tretmanu bolesnika koji pate od kronične uremije, kao i u terapiji bolesnika koji pate od poremećaja u akumulaciji dušika u organizmu [92]. Isto tako imaju važnu primjenu kao nutraceutici [77].

Osim za pripravu  $\alpha$ -keto-kiselina, oksidaze amino kiselina se mogu u industrijskom mjerilu koristiti i za rezoluciju racemičnih smjesa, odnosno pročišćavanje L i D amino kiselina [29;34;40;69]. U tu se svrhu često koriste u farmaceutskoj industriji. Važno je napomenuti da su oksidaze L-amino kiselina još uvijek neistraženi enzimi, iako već imaju industrijsku primjenu. Oksidaze D-amino kiselina su međutim dobro istraživana skupina enzima, te su upravo zbog dostupnosti informacijama o njima već i upotrebljene u industriji [30;56]. Primjerice, oksidaza D-amino kiselina se koristi za oksidaciju cefalosporina C [15].

Oksidaze amino kiselina su pronašle svoju uporabu i pri proizvodnji biosenzora za određivanje amino kiselina. Naime, poznato je da su vrlo selektivne prema amino kiselinama, ali uglavnom prema širokom spektru amino kiselina. To ih čini idealnim za detekciju amino kiselina, pogotovo zato što su optički specifične prema D i L izomerima [102]. Većina se senzora temelji na amperometrijskoj i potenciometrijskoj detekciji ili pak kemiluminometrijskoj detekciji vodikovog peroksida ili amonijaka koji nastaje u reakciji.

Usprkos brojnim prednostima pri korištenju oksidaza, postoje i određeni nedostaci koje ne valja zaobići. Naime, kvantitativna enzimaska oksidacija visokih koncentracija supstrata zahtijeva kontinuiranu dobavu drugog supstrata – kisika u reaktor [33]. U ovim uvjetima interakcija između enzima i međufazne površine plina i kapljevine može uzrokovati vrlo brzu ireverzibilnu inaktivaciju enzima [5]. Vodikov peroksid, koji je nusprodukt reoksidacije kofaktora molekularnim kisikom, može pak uzrokovati vrlo brzu inaktivaciju enzima oksidacijom metionina, cisteina i drugih osjetljivih dijelova proteina [82], ili može uzrokovati nespecifične oksidacije reakcijskih produkata, odnosno reakcije koje nisu poželjne u reakcijskom sustavu [15]. Kvantitativna oksidacija organskih spojeva katalizirana oksidazama zahtijeva pažljivo oblikovanje biokatalizatora [20].

Oksidaze amino kiselina su flavoproteini (E.C. 1.4.3.x) koji se nalaze u peroksisomima raznih eukariotskih stanica [24]. Enzim pronađen u zmijskom otrovu je dostupan, no preskup za širu uporabu [73]. Osim u zmijskom otrovu, L-AAO se mogu pronaći i u nizu mikroorganizama kao što su: bakterije [10;13;25;28;37;48], cijanobakterije [76] i gljivice [52]. Također ju sadrže i crvene alge (*Amphiora crassissima*) [41], a pronađena je i u sastavu jajašaca morskog zeca [42] u kojima je odgovorna za jaku antimikrobiološku aktivnost.  $K_m$  vrijednost za taj enzim je do sada najniža poznata u oksidaza L-amino kiselina, a karakterizira ju i činjenica da za razliku od ostalih poznatih oksidaza amino kiselina ne preferira hidrofobne amino kiseline kao supstrate.

### 2.1.1.1. Oksidaza L-amino kiselina [E.C. 1.4.3.2]

Oksidaza L-amino kiselina (L-AAO) je dimerni flavoprotein koji sadrži ne-kovalentno vezan flavin adenin dinukleotid kao kofaktor [74]. Molekulska masa joj se kreće oko 140 kDa za L-AAO iz *C. adamanteus*, te oko 109 kDa za L-AAO iz *R. opacus* [27;29]. Dimerne su strukture kao i većina oksidaza L-amino kiselina. L-AAO-e izolirane iz zmijskog otrova pripadaju u skupinu najbolje istraženih u ovoj skupini enzima. Obzirom da je ovaj enzim prisutan u značajno visokoj koncentraciji u zmijskom otrovu, pretpostavljeno je da je on uzrokom njegove toksičnosti [58;86;90]. Svaka molekula enzima sadrži 2 molekule FAD koenzima.

L-AAO pokazuju znatnu sklonost prema hidrofobnim amino kiselinama uključujući fenilalanin, triptofan, tirozin i leucin. Posebnost L-AAO iz *C. adamanteus* je njegova reverzibilna inaktivacija prilikom smrzavanja (-20 °C) ili podizanja pH iznad neutralnosti [74]. Reaktivacija enzima se postiže zagrijavanjem pri pH 5. Ovaj reverzibilni proces je povezan sa malim promjenama apsorpcijskog spektra FAD kofaktora bez promjena u CD spektru proteina (*circular dichroism spectropolarimetry* - služi za proučavanje strukture proteina, a mjeri razlike u apsorpciji lijevog i desnog polarizirajućeg svjetla do koje dolazi zbog strukturne asimetrije molekule). Strukturni temelj za inaktivaciju/reaktivaciju enzima L-AAO iz *C. adamanteus* je još uvijek neobjašnjen. Pokazalo se da je L-AAO iz *C. adamanteus* jako glikoziliran. Proučavanjem glikoziliranih mjesta je otkriveno da ugljikohidrati vezani na određena mjesta na proteinu leže na površini molekule. FAD prostetička skupina je vezana duboko unutar enzima i karakterizirana je brojnim interakcijama s atomima proteina i zadržanim molekulama vode. Aktivno mjesto enzima je smješteno unutar baze dubokog "tunela" u unutrašnjosti proteina [74]. Ovaj je enzim apsolutno specifičan za L-izomere. Za razliku od oksidaza L-amino kiselina, oksidaze D-amino kiselina nisu glikozilirane. Pokazalo se da je glikozilacija neophodna za antibakterijski učinak enzima, koji je karakteristika L-AAO [31].

Za razliku od L-AAO iz *C. adamanteus*, o L-AAO iz *R. opacus* je dostupan samo ograničen broj informacija, jer se radi o novom enzimu. Karakteriziraju ga niske  $K_m$  vrijednosti za pojedine supstrate što ga čini posebno interesantnim za razdvajanje racemata. Strogo je specifičan na L-amino kiseline što su potvrdila testiranja na 44 prirodne amino kiseline i njihove derivate. Poznato je da mu stabilnost prilikom čuvanja i temperaturna stabilnost znatno ovise o odabranom puferu [29]. Eksperimentalno je dokazano da može oksidirati velik broj aromatskih, alifatskih, lužnatih i kiselih L-amino kiselina, te L-amino kiselina koje sadrže kisik i sumpor, pa se može zaključiti da ima vrlo fleksibilno aktivno mjesto [29].

### 2.1.2. Katalaza

Katalaza ( $H_2O_2$  oksidoreduktaza EC. 1.11.1.6.) je vrlo aktivan i sveprisutan enzim. Može se pronaći u gotovo svim aerobnim organizmima u peroksomima stanica, a funkcija mu je zaštita stanica od štetnog utjecaja vodikovog peroksida [65]. Vodikov peroksid nastaje kao nusprodukt prilikom oksidacije masnih kiselina ili kao produkt bijelih krvnih stanica koje ga koriste za ubijanje bakterija. Aerobne bakterije proizvode vodikov peroksid kao produkt metabolizma. To se svojstvo koristi za identifikaciju bakterija. Iako katalaza nije oksidirajući enzim, klasificiran je tako zbog svoje povezanosti sa oksidazama, te zato jer sudjeluje u disanju. Jedan je od

najaktivnijih poznatih enzima sa mogućnošću da konvertira šest milijuna molekula vodikovog peroksida svake minute.

Katalaza iz goveđe jetre se sastoji od četiri identične podjedinice, molekularne mase 57 000 i svaka sadrži visokospinski Fe (III)-protoporfirin [78].

U reakciji oksidacije L-DOPE, koja je opisana i provedena u ovom radu, nastaje vodikov peoksid. Za njegovo uklanjanje je korištena katalaza iz goveđe jetre koja razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik. Za nju je karakteristična prilično visoka vrijednost Michaelis-Menten-ove konstante od  $1,1 \text{ mol dm}^{-3}$  [8], što upućuje na njenu nespecifičnost prema prirodnom supstratu vodikovom peroksidu.

Neki autori napominju da se uporabom katalaze ne može postići potpuno uklanjanje negativnog utjecaja vodikovog peroksida [81;92] zbog toga što katalaza djeluje u reakcijskoj otopini, a ne na samom aktivnom katalitičkom centru oksidaze L-amino kiselina gdje vodikov peroksid nastaje. Zbog toga razgradnja  $\alpha$ -keto kiselina vodikovim peroksidom započinje već na samom katalitičkom centru. S druge strane, neki autori uspoređuju katalaze različitog porijekla u reakcijama kataliziranim oksidazom L-amino kiselina, te su uporabom onih iz mikrobiološkog izvora dobili konverzije vodikovog peroksida i do 100 % [91]. Usprkos navedenom, valja uzeti u obzir da katalaza iz goveđe jetre nije najučinkovitiji izbor.

### 2.2. ENZIMSKE REAKCIJE U SUPERKRITIČNIM FLUIDIMA

Superkritični fluidi (SC) su definirani kao fluidi koji iznad svoje kritične temperature i tlaka imaju manji otpor prijenosu tvari u usporedbi sa uobičajenim kapljevitim otapalima [17]. Valja uz to napomenuti da je topljivost većine organskih spojeva u superkritičnim fluidima veća od one u plinskoj fazi, te je usporediva s topljivošću u kapljevitim otapalima [43].

U blizini kritične točke transportni koeficijenti čistih fluida se bitno mijenjaju. Konkretno, toplinska difuzivnost superkritičnog fluida teži prema nuli, dok izotermna kompresibilnost teži u beskonačnost. Kako slijedi, superkritični fluidi su slične gustoće kao kapljevine, a mnogo kompresibilniji od plinova. Superkritični fluidi, posebice CO<sub>2</sub>, predstavljaju vrlo pogodan i zanimljiv sustav za provođenje enzimskih reakcija. U posljednje se vrijeme sve više istražuju enzimske katalizirane reakcije u superkritičnim fluidima zbog njihovih povoljnih transportnih svojstava koja mogu ubrzati prijenos tvari u reakcijama koje su limitirane prijenosom tvari [71]. Osim toga, postoje dokazi da tretiranje nepročišćenog enzima superkritičnim CO<sub>2</sub> dovodi do njegovog pročišćavanja i povećanja aktivnosti ukoliko se radi o nečistoćama koje je moguće



ekstrahirati u SC-CO<sub>2</sub> [4]. Isto tako, vrlo je povoljno provoditi enzimsku reakciju ukoliko se produkt otapa u SC-CO<sub>2</sub> i time omogućava integrirani proces bez dodatnih troškova separacije produkta [64].

Usprkos navedenim činjenicama, nije moguće unaprijed govoriti o stabilnosti enzima u superkričnom CO<sub>2</sub>, obzirom da se radi o individualnom svojstvu proteina, već je potrebno provesti eksperimente.

Prema konvencionalnom pristupu poznato je da su enzimi aktivni samo u prisustvu vode. Većina enzima sadrži molekule vode, ponekad u vezanom obliku. Obzirom da voda nije pogodno otapalo za organske reakcije, dugi se niz godina pokušavao naći pogodan organski ili vodenorganski sustav u kojem bi enzimi zadržali svoju aktivnost. Enzimske reakcije u nevodenom mediju nude brojne mogućnosti za biotehnošku proizvodnju korisnih kemikalija, čije sinteze nisu izvedive u vodenom mediju [38]. Obrada enzima sa čistim CO<sub>2</sub> dovodi do uklanjanja vode, koja je topiva u CO<sub>2</sub> ovisno o temperaturi i tlaku. U slučaju da se vezana voda ekstrahira u CO<sub>2</sub>, enzim gubi svoju aktivnost i biva denaturiran. Stoga se može zaključiti da je bolje da u superkričnom CO<sub>2</sub> već na početku postoji određeni postotak vlage. Optimalna koncentracija vode za svaki se enzim mora odrediti eksperimentalno. Isto tako, voda može inhibirati enzim, što se posebno odnosi na reakcije esterifikacije u kojima nastaje voda u reakciji, pa ju je potrebno odvoditi iz reaktora kako bi se spriječila inhibicija enzima.

Poznato je da stabilnost enzima znatno ovisi o temperaturi. Visoke temperature u pravilu dovode do inaktivacije i denaturacije enzima. Temperaturna granica pri kojoj enzim znatno gubi aktivnost je individualna i ovisi o vrsti enzima.

Vrlo popularni sustavi za proučavanje reakcija u superkričnim fluidima su reakcije hidrolize, esterifikacije, transesterifikacije i interesterifikacije katalizirane lipazama. Osim tih reakcija postoji u literaturi niz radova u kojima se govori o reakcijama enzimске oksidacije i enantioselektivne sinteze u superkričnim fluidima [46].

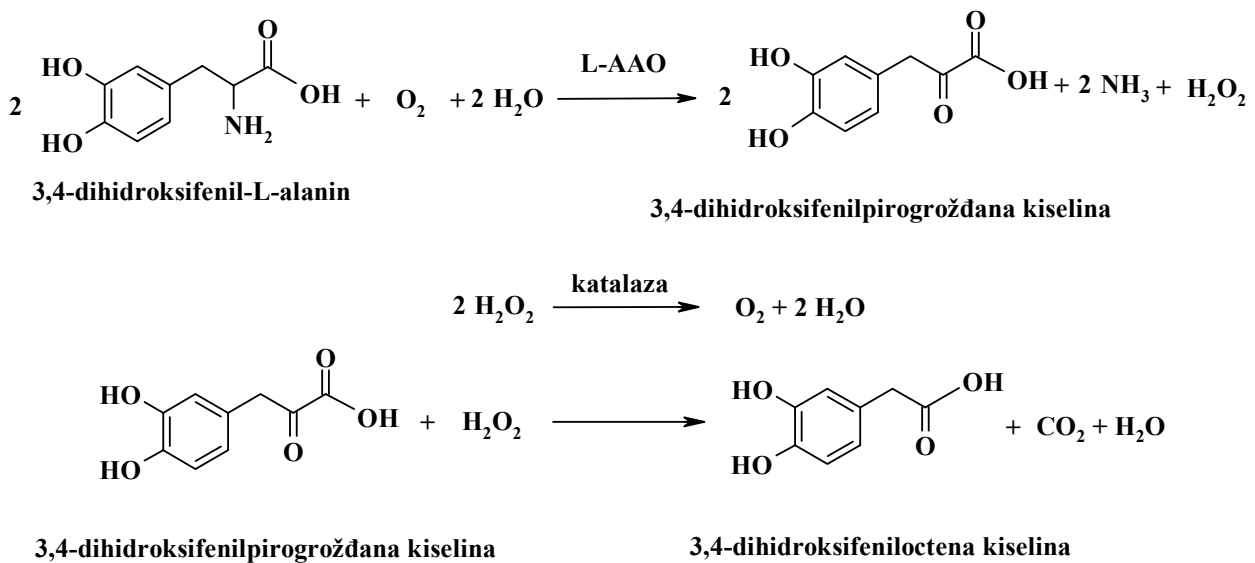
Osnovna istraživanja bi se u budućnosti trebala orijentirati prema novijim materijalima za uporabu u superkričnim otapalima. Ti materijali bi mogli imati vrlo važnu primjenu u sintezi polimera, farmaceutika, i drugih kemikalija. Potpun razvoj ovih primjena bi rezultirao u bitnoj redukciji hlapivih emisija u okoliš, te u redukciji vodenog i organskog otpada u proizvodnji. Procesi proizvodnje u tekućim i superkričnim fluidima imaju također prednost u smislu redukcije potrošnje energije, jednostavnosti izdvajanja produkta, te redukciji popratnih reakcija [46].

Oksidaze pripadaju u skupinu enzima čije ponašanje u SC-CO<sub>2</sub> nije puno istraživano. Najviše je članaka u području prehrambene tehnologije gdje se obradom hrane u superkričnom

CO<sub>2</sub> može postići inaktivacija oksidaza zaslužnih za kvarenje hrane, primjerice voćnih sokova [3].

### 2.3. L-DOPA

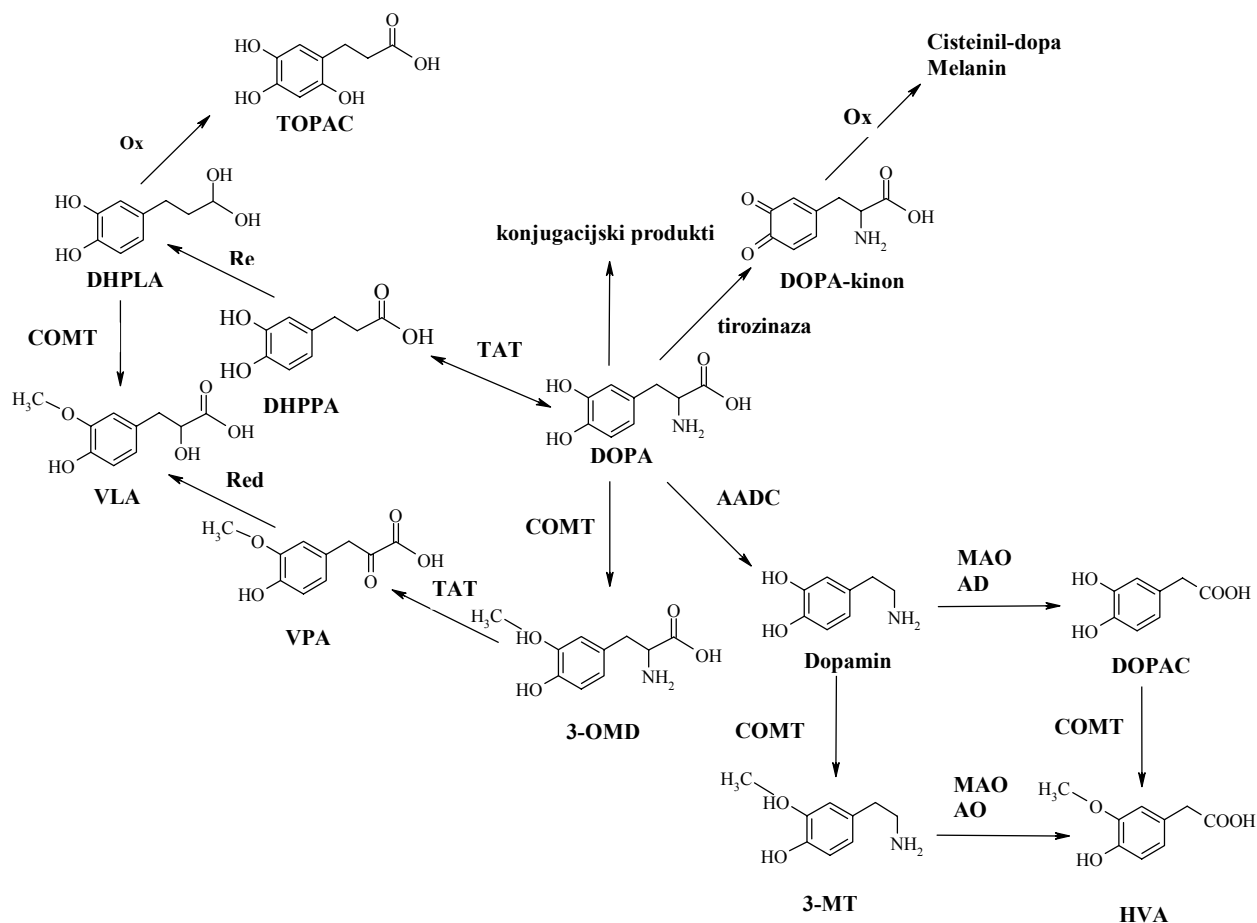
L-DOPA je prirodna amino kiselina, te je važan intermedijer u metaboličkim putovima, kao i prekursor svih kateholaminskih neuroprijenosnika i hormona, te melanina [9]. Radi se o farmakološki aktivnoj komponenti, koja je toksična u velikim količinama [84], a koristi se za



Slika 2.1. Shema enzimske oksidacije L-DOPE i pretpostavljena jednadžba raspada produkta.

uklanjanje simptoma Parkinsonove bolesti [22]. Oksidira se u alkalnim uvjetima te pri visokim temperaturama, a raspadom daje crne komponente koje otopinu čine heterogenom. Vodene otopine su joj stabilne 8 h na 22 °C, a 2 dana na 2 °C [84]. Dakle, radi se o relativno nestabilnom spoju. Kao mogući produkt njene spontane oksidacije u vodenoj otopini se spominje 2,4,5-trihidroksifenilalanin [67].

Oksidativnom deaminacijom L-DOPE u prisustvu oksidaze L-amino kiselina nastaje 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina, te vodikov peroksid i amonijak (Slika 2.1.). Obzirom da u reakciji nastaje vodikov peroksid, koji osim svog negativnog utjecaja na enzime, ima i negativan utjecaj na reakcijski produkt (uzrokuje kemijsku dekarboksilaciju α-keto kiselina), potrebno ga je uklanjati [24;91]. Radi nepotpunog uklanjanja vodikovog peroksida u reakciji dolazi do dekarboksilacije dobivene 3,4-dihidroksifenilpirogroždane kiseline u 3,4-dihidroksifeniloctenu kiselinu. U čistom stanju je 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina bijeli prah [60].



**Slika 2.2.** Shematska ilustracija metabolizma L-DOPE (AD, aldehyd dehidrogenaza; Ox, reakcije oksidacije; Red, reakcije redukcije; TAT, tirozin aminotransferaza; TOPAC, 2,4,5-trihidroksifeniloktenu kiselina; AADC, aromatska dekarboksilaza amino kiselina; COMT, katehol-O-metiltransferaza; DHPPA, 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina; HVA, homovaniljska kiselina; MAO, monoaminoksidaza; 3-OMD, 3-O-metildopa; VPA, vanilpirogroždana kiselina; DHPLA, 3,4-dihidroksifenilmlječna kiselina; VLA, vanilmlječna kiselina; DOPAC, 3,4-dihidroksifeniloktenu kiselina; 3-MT, 3-metoksitiramin).

L-DOPA se brzo metabolizira i zahtijeva topljivi transportni sustav za prijenos kroz gastrointestinalne i krv-mozak barijere. Kao posljedica toga ima vrlo kompleksnu farmakokinetiku. Četiri su osnovna puta kojima se L-DOPA metabolizira (Slika 2.2.): dekarboksilacija, O-metilacija, transaminacija i oksidacija [9].

## 2.4. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA

Matematički modeli kombinirani sa modernim kompjuterskim tehnikama su se pokazali vrlo učinkovitim u traženju optimalnih radnih uvjeta te stvaranju optimalnog mikrookoliša za

biokatalizator [94]. Modeliranje kao princip reakcijskog inženjerstva pronalazi važnu ulogu u proučavanju enzimskih reakcija [85], te je za očekivati da će se njegova uloga povećati sa povećanom uporabom biokatalize. Dobivanje informacija o kinetičkim parametrima enzima je veoma važno za razvoj lijekova, kao i za kliničke dijagnoze (analitički enzimi) [68]. Kinetički parametri su važni zbog proučavanja:

- metabolizma lijekova pomoću enzima *in vivo* i inhibicije ili indukcije enzima koji metaboliziraju lijek
- enzima kao lijeka i njihove interakcije sa ostalim molekulama, enzimima i lijekovima *in vivo*
- i predviđanja farmakokinetičkih posljedica izlaganja organizma pojedinom lijeku
- i postavljanja dijagnoze pojedinih oboljenja, pri kojima se aktivnost enzima mijenja
- inhibitora pojedinih enzima [68].

Enzimski kinetički parametri se procjenjuju iz izraza za brzinu reakcije koji se temelje na matematičkoj obradi eksperimentalnih podataka dobivenih provođenjem enzimski katalizirane reakcije. Kinetika enzimski katalizirane reakcije se uobičajeno određuje prateći promjenu početne brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata. Isto tako, kinetički parametri se mogu procijeniti iz parova eksperimentalnih podataka koncentracija - vrijeme. Obzirom da na kinetiku enzimski katalizirane reakcije mogu utjecati akumulacija produkta, nestajanje supstrata, te promjene pH vrijednosti u vremenu, metoda procjene kinetičkih parametara iz serije eksperimentalnih podataka koncentracija-vrijeme nije najbolje rješenje.

Modeliranje reakcijske kinetike kao alata reakcijskog inženjerstva ima ključnu ulogu u razvoju enzimski kataliziranih procesa [12]. Ono olakšava pronalaženje najučinkovitijeg načina rada reaktora [95].

Kontinuirani procesi općenito imaju visoku produktivnost kao rezultat dugotrajnog rada bez potrebe za zaustavljanjem, pražnjenjem i ponovnim punjenjem reaktora. Omogućuju dobivanje produkta konstantne kvalitete, a rad u stacionarnom stanju omogućuje olakšanu kontrolu procesa [51;95]. Protočni kotlasti reaktor predstavlja povoljnu konfiguraciju za reakcijske sustave inhibirane supstratom jer radi pri uvjetima izlazne koncentracije kod koje je koncentracija supstrata kod visokih konverzija niska. Ovaj je tip reaktora s druge strane nepovoljan za reakcije inhibirane produktom [49].

## 2.5. PREGLED KINETIČKIH MODELA

Osim što modeliranje omogućuje bolje razumijevanje problema, ono isto tako pomaže prilikom dizajna eksperimenta. Modeli se mogu koristiti za dizajn i vođenje procesa, te za optimiranje uvjeta provedbe procesa [18].

Brzina reakcije katalizirane otopljenim enzimom se obično može opisati Michaelis-Menten-ovim kinetičkim izrazom [66]. Ova se jednadžba može izvesti iz prihvaćenog Briggs-Haldane-ovog mehanizma za jednostavnu enzimsku reakciju, koji je vrlo sličan onom za kemijsku katalizu. Taj se mehanizam može ukratko opisati jednadžbama 2.1. i 2.2.:



gdje je E enzim, S supstrat, P produkt, a ES predstavlja kompleks između enzima i supstrata. Bilance tvari za supstrat S i kompleks enzim-supstrat ES u šaržnom procesu su dane jednadžbama 2.3. i 2.4.

$$\frac{dc_S}{dt} = -k_1 \cdot c_S \cdot c_E + k_2 \cdot c_{ES} \quad (2.3.)$$

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = k_1 \cdot c_S \cdot c_E - (k_2 + k_3) \cdot c_{ES} \quad (2.4.)$$

Uz početni uvjet  $t = 0$  slijedi da je  $c_S = c_{S0}$ , a  $c_{ES} = 0$ . Koncentracija enzima je obično puno niža od koncentracije supstrata, pa je većina enzima prisutna tijekom reakcije vezana u obliku kompleksa enzim-supstrat. Analitičko rješenje jednadžbi 2.3. i 2.4. je moguće pretpostavivši stacionarno stanje za kompleks enzim-supstrat, odnosno:

$$\frac{dc_{ES}}{dt} = 0 \quad (2.5.)$$

što vrijedi ako je koncentracija enzima puno manja od početne koncentracije supstrata. Koristeći ukupnu bilancu tvari (Jed. 2.6.) gornje jednadžbe se mogu riješiti za nepoznate koncentracije enzima i kompleksa enzim-supstrat.

$$c_{E0} = c_E + c_{ES} \quad (2.6.)$$

Kao rezultat se dobiju jednadžbe 2.7. i 2.8.

$$c_{ES} = \frac{k_1 \cdot c_S \cdot c_E}{k_2 + k_3} \quad (2.7.)$$

$$c_E = c_{E0} - \frac{k_1 \cdot c_S \cdot c_E}{k_2 + k_3} = c_{E0} \frac{k_2 + k_3}{k_2 + k_3 + k_1 \cdot c_S} \quad (2.8.)$$

Supstitucijom  $c_S$  i  $c_{ES}$  bilanca supstrata postaje:

$$-\frac{dc_S}{dt} = \frac{k_3 \cdot c_S \cdot c_{E0}}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + c_S} \quad (2.9.)$$

iz čega slijedi Michaelis-Menten-ov kinetički izraz dan jednadžbom 2.10.

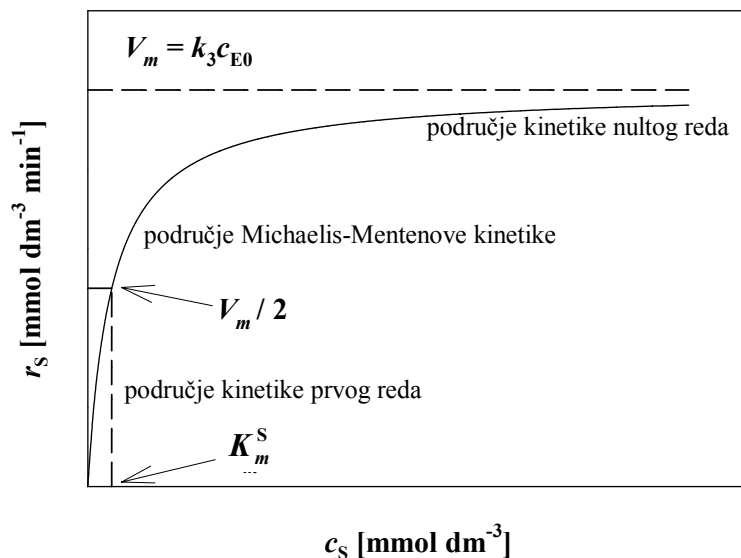
$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S} \quad (2.10.)$$

gdje je  $r_S$  brzina potrošnje supstrata,  $c_S$  koncentracija supstrata ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ),  $V_m$  maksimalna brzina reakcije ( $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ), a  $K_m^S$  Michaelis-Menten-ova konstanta ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ).

Parametar  $V_m$  pokazuje ovisnost o koncentraciji enzima (Jed. 2.11.), a  $K_m^S$  ovisi o konstantama brzina reakcije danih u jednadžbama 2.1. i 2.2.

$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad (2.11.)$$

$$K_m^S = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (2.12.)$$



**Slika 2.3.** Ovisnost reakcijske brzine o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menten-ove kinetike.

Michaelis-Menten-ova jednadžba pokazuje tri različita područja brzine reakcije (Slika 2.3.). Pri vrlo niskim i vrlo visokim koncentracijama supstrata krivulja ovisnosti reakcijske brzine  $r_s$  o koncentraciji supstrata  $c_s$  je linearna.

Područje niskih koncentracija supstrata ( $c_s \ll K_m^S$ ) se može stoga aproksimirati kinetikom reakcije prvog reda, a područje visokih koncentracija supstrata ( $c_s \gg K_m^S$ ) se može aproksimirati kinetikom reakcije nultog reda.

Mehanizam enzimske katalize može biti vrlo kompleksan, što ima za posljedicu kompleksan kinetički izraz. Jedna od jednostavnijih jednadžbi je i Michaelis-Menten-ova jednadžba za dvosupstratnu reakciju dana jednadžbom 2.13. [18].

$$r_{S1} = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1})(K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (2.13.)$$

Prethodno navedeni modeli ne uključuju postojanje inhibicije supstratom i produktom. Do inhibicije dolazi kada pojedini kemijski spoj, inhibitor, svojom prisutnošću smanjuje brzinu enzimske katalizirane reakcije, obično zbog svog vezanja na aktivno mjesto enzima. Općenito postoje tri tipa inhibicije koji uključuju kompetitivnu inhibiciju (Jed. 2.14.), nekompetitivnu inhibiciju (Jed. 2.15.) i antikompetitivnu inhibiciju (Jed. 2.16.) [18], iako se posljednja u literaturi uglavnom ne spominje jer je kombinacija kompetitivne i nekompetitivne inhibicije. Koncentracija inhibitora je dana sa  $c_i$ , pri čemu to može biti i supstrat i produkt.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S \cdot (1 + c_i/K_i) + c_s} \quad (2.14.)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S + c_s \cdot (1 + c_i/K_i)} \quad (2.15.)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(1 + c_i/K_i) \cdot (K_m^S + c_s)} \quad (2.16.)$$

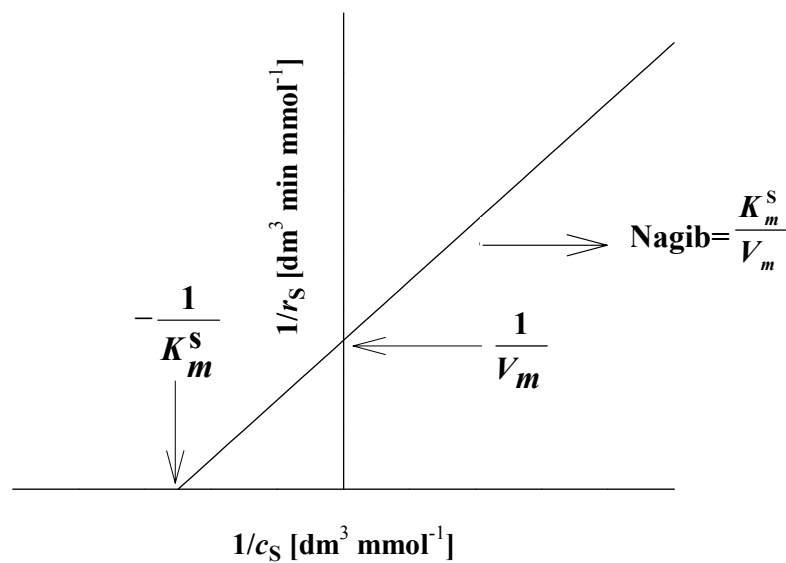
Kompetitivna inhibicija uključuje natjecanje kemijskog spoja sa supstratom za aktivno mjesto enzima. Kod nekompetitivne inhibicije inhibitor se ireverzibilno veže na aktivno mjesto enzima ili može promijeniti oblik enzimu, povezivanjem na mjesto različito od aktivnog mjesta, te na taj način ometati vezanje supstrata za aktivno mjesto [19].

Vrijednosti parametara u navedenim kinetičkim jednadžbama se mogu procijeniti linearnom i nelinearnom regresijom. Linearna regresija zahtijeva linearizaciju kinetičkog modela čime se dobiva Lineweaver - Burk-ov pravac (Slika 2.4.).

Osim na taj način, konstante se mogu procijeniti i Levenspiel-ovom metodom [57]. Taj se postupak sastoji od integracije Michaelis-Menten-ove jednačbe (Jed. 2.17.) i njene linearizacije koja daje jednačbu 2.18.

$$K_m^S \ln \frac{c_{S0}}{c_S} + (c_{S0} - c_S) = k_3 c_{E0} t \quad (2.17.)$$

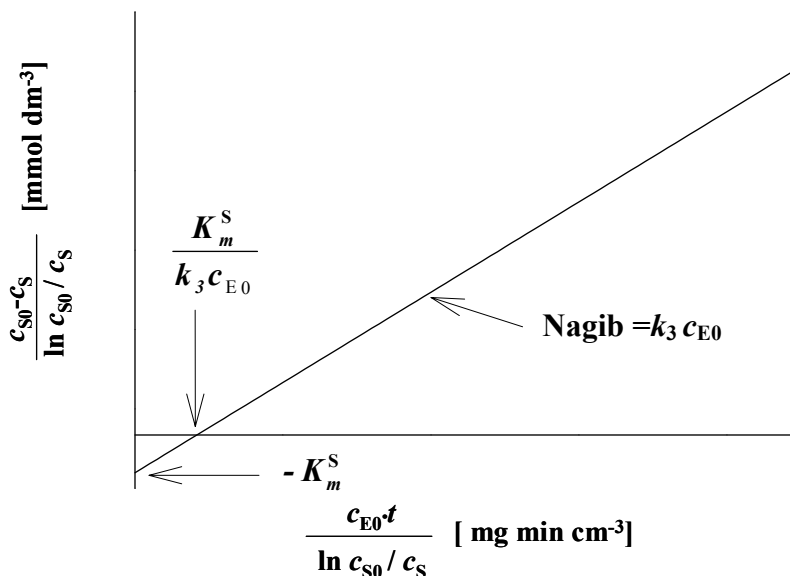
$$\frac{c_{S0} - c_S}{\ln \frac{c_{S0}}{c_S}} = -K_m^S + k_3 c_{E0} \frac{t}{\ln \frac{c_{S0}}{c_S}} \quad (2.18.)$$



**Slika 2.4.** Princip procjene kinetičkih parametara Michaelis-Menten-ove kinetike linearizacijom (Lineweaver - Burk-ov pravac).

Ako se eksperimentalni podaci mogu opisati Michaelis-Menten-ovom kinetikom, tada se iz grafičkog prikaza jednačbe 2.18. (iz ovisnosti  $\frac{c_{S0} - c_S}{\ln c_{S0}/c_S}$  o  $\frac{c_{E0} \cdot t}{\ln c_{S0}/c_S}$  - Slika 2.5.) mogu procijeniti Michaelis-Menten-ova konstanta,  $K_m^S$ , te katalitička konstanta enzima,  $k_3$  [57]. Katalitička konstanta enzima,  $k_3$ , je jednaka nagibu pravca, a Michaelis-Menten-ova konstanta odsječku na osi y. Na ovaj se način mogu odrediti i prividna Michaelis-Menten-ova konstanta ako u reakciji postoji inhibicija jer je tada inhibicija uključena u vrijednost prividne Michaelis-Menten-ove konstante.





**Slika 2.5.** Levenspiel-ova metoda određivanja katalitičke konstante enzima i Michaelis-Menten-ove konstante iz eksperimentalnih podataka dobivenih u šaržnom sustavu.

Nelinearna regresija obuhvaća procjenu vrijednosti parametara iz eksperimentalnih podataka uporabom modela u kojem je procjenjivana vrijednost odzivne varijable nelinearna funkcija jedne ili više nezavisnih varijabli (poput početne brzine enzimski katalizirane reakcije o koncentraciji supstrata). Pri tome se može koristiti više metoda, primjerice simpleks metoda i metoda najmanjih kvadrata.

Simpleks metoda je ugrađena u minimizirajući algoritam za općenite nelinearne funkcije po Nelder-u i Mead-u [70]. Algoritam je učinkovit za numerička rješavanja problema minimiziranja za nekoliko varijabli. Brza konvergencija i inteligentan izbor linearizacije funkcije koju je potrebno minimizirati su od ključne važnosti u općenitim minimizacijskim algoritmima. Metoda pokušava ograničiti minimum unutar nepravilnog volumena definiranog simpleksom ( $n$ -dimenzionalni konveksni volumen ograničen s  $(n-1)$ -dimenzionalnom hiper-ravninom i definiran sa  $(n+1)$  linearno zavisnih uglova, npr. tetrahedron za  $n=3$ ). Veličina simpleksa se kontinuirano smanjuje, tako da na kraju postane dovoljno mala da sadrži minimum sa zadanom točnošću. Operacije koje optimalno mijenjaju simpleks u odnosu na minimalnu ili maksimalnu vrijednost funkcije, pronađene na uglovima simpleksa, su kontrakcija, ekspanzija i refleksija. Svaka od njih određuje novi ugao simpleksa linearnom kombinacijom odabranih postojećih uglova simpleksa [70]. Metoda je uobičajeno ugrađena u standardne optimizacijske programske pakete.

Metoda najmanjih kvadrata pretpostavlja da je najbolja krivulja danog tipa ona koja ima minimalnu sumu kvadratnih devijacija od eksperimentalnih podataka. Ako se pretpostavi niz

eksperimentalnih točaka  $(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_n, y_n)$ , gdje su  $x$  nezavisne, a  $y$  zavisne varijable, tada je suma kvadrata pogrešaka dana jednadžbom 2.19. u kojoj  $d$  označava razliku između eksperimentalne vrijednosti i vrijednosti procijenjene pomoću modela.

$$\Pi = d_1^2 + d_2^2 + \dots + d_n^2 = \sum_{i=1}^n d_i^2 = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2 = \text{minimum} \quad (2.19.)$$

Prilikom nelinearnog optimiranja mogu se koristiti različite vrste integratora, ovisno o postojećem problemu. U SCIENTIST-u su ponuđeni Eulerova metoda, metoda Runge-Kutta, Bulirsch-Stoer metoda i Episode metoda.

Episode algoritam nudi izbor ovisno radi li se o sustavu krutih ili običnih diferencijalnih jednadžbi. Pronađeno je da je najpouzdanija za rješavanje kompleksnih problema.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. APARATURA

Aparatura na kojoj je provedena biokatalitička oksidacija L-DOPE je prikazana na slici 1. Sastojala se od enzimskog membranskog reaktora (1), magnetske miješalice (2), termostata (3), peristaltičke pumpe (4) i septuma za uzimanje uzoraka (5).

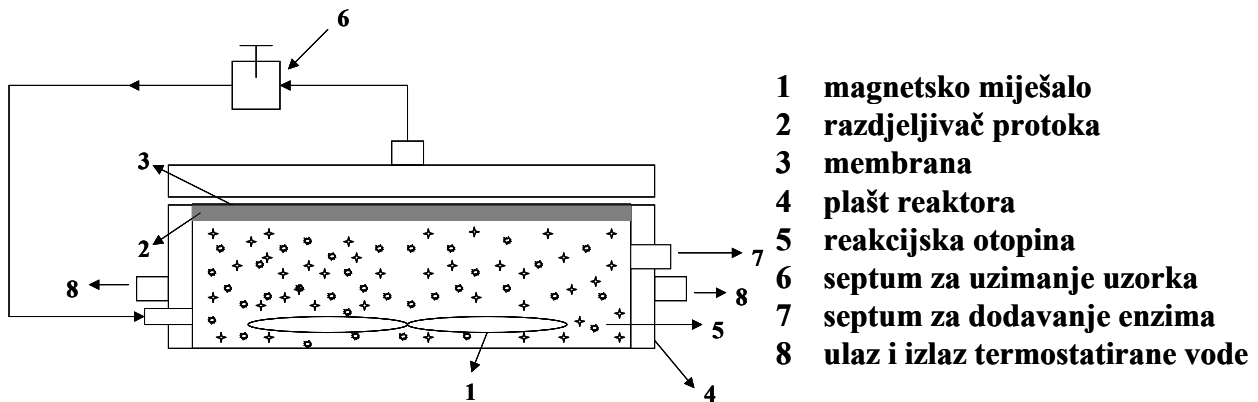


Slika 3.1. Aparatura za provedbu biokatalitičke oksidacije L-DOPE.

##### 3.1.1. Enzimski membranski reaktor (EMR)

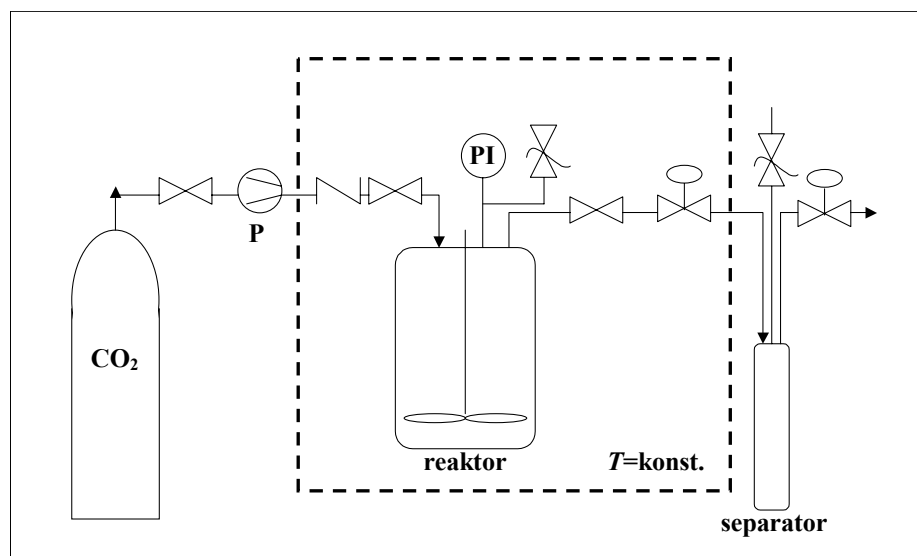
Reakcija oksidacije L-DOPE je provedena u šaržnom enzimskom membranskom reaktoru (EMR) [96;97;99;100] čija je shema prikazana na slici 3.2. Reaktor volumena 10 cm<sup>3</sup> je izrađen od nehrđajućeg čelika. U unutrašnjosti je smještena polimerna membrana veličina pora 50 kDa koja omogućava zadržavanje enzima unutar reaktora tijekom provođenja reakcije. Tijekom pokusa reaktor je bio termostatiran na temperature 25 ili 40 °C. Miješanje je omogućeno

magnetskim miješalom unutar reaktora, a razdjeljivač protoka omogućuje jednoliku raspodjelu protoka po membrani.



Slika 3.2. Enzimski membranski reaktor.

#### 3.1.2. Visokotlačni šaržni reaktor



Slika 3.3. Visokotlačni šaržni reaktor (PI mjerilo tlaka, P kompresor).

Biokatalitička oksidacija L-DOPE u superkritičnom CO<sub>2</sub> provedena je u visokotlačnom šaržnom reaktoru od nehrđajućeg čelika, volumena 88 cm<sup>3</sup>. Reaktor je dimenzioniran za tlakove do 500 bara (Slika 3.3.).

Tijekom provođenja pokusa se reaktor nalazio na magnetskoj miješalici u uljnoj kupelji temperature 40 °C. Prije iniciranja reakcije u reaktor su stavljene reakcijske komponente, reaktor je zatvoren i dopunjen s CO<sub>2</sub> do željenog tlaka.

### 3.1.3. Spektrofotometar

Mjerenje aktivnosti enzima L-AAO provedeno je uporabom enzimskog testa [6;7] na dvozračnom spektrofotometru SHIMADZU UV-1601 (Japan).

### 3.1.4. Visokotlačni tekućinski kromatograf (HPLC)

Koncentracije supstrata i reakcijskih produkata su određivane HPLC-om (Sykam, SHIMADZU) sa UV detektorom (Sykam S3300) na 280 nm i temperaturi od 40 °C. Uređaj je bio opremljen integratorom (C-RCA) i termostatom istog proizvođača.

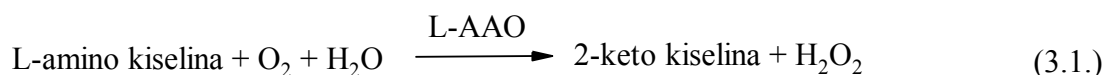
### 3.1.5. Visokotlačna tekućinska kromatografija sa masenim detektorom (LC-MS)

Karakterizacija produkata je osim HPLC-om provedena i visokotlačnom tekućinskom kromatografijom sa masenim detektorom. Mjerenja su provedena u Istraživačkom institutu Plive. HPLC je bio proizvođača Agilent 1100, a maseni detektor MS Zorbax.

## 3.2. ANALITIČKE METODE

Aktivnost enzima oksidaze L-amino kiselina iz *C. adamanteus* i *R. opacus* je određivana spektrofotometrijski, a aktivnost katalaze iz goveđe jetre titracijskom metodom. Osim kinetičkih mjerenja, provedeno je određivanje koncentracije supstrata L-DOPE i produkata visokotlačnom tekućinskom kromatografijom sa UV detektorom i visokotlačnom tekućinskom kromatografijom sa masenim detektorom (LC-MS).

### 3.2.1. Određivanje aktivnosti enzima oksidaze L-amino kiselina (L-AAO)



Određivanje aktivnosti enzima L-AAO se temelji na reakcijama prikazanimi jednadžbama 3.1. i 3.2. U reakciji oksidativne deaminacije L-amino kiseline koju katalizira enzim oksidaza L-

amino kiselina nastaje vodikov peroksid. Njegova je koncentracija u sustavu proporcionalna koncentraciji L-amino kiseline, pa se stoga mjerenjem brzine njegova nestajanja mjeri brzina prve reakcije, odnosno aktivnost enzima L-AAO. U sustavu se nalazi otopina o-dianizidina, označena sa  $DH_2$ , koji je u ovom slučaju redukcijsko sredstvo, te se oksidira stvarajući pri tome smeđe obojenje čiji se intenzitet prati pri  $\lambda = 436 \text{ nm}$ , a tu reakciju katalizira enzim peroksidaza. Važno je naglasiti da koncentracija peroksidaze mora biti u zasićenju, odnosno dovoljno visoka kako bi prva reakcija (oksidacije amino kiselina) bila ona sporija. Test je opisan u Boehringerovom priručniku [6]. Otopine potrebne za test su: trietanolamin-hidroklorid pufer (TEA), pH 7,6,  $c_{\text{pufera}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , otopina o-dianizidina,  $23,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ; suspenzija peroksidaze u amonijevom sulfatu koncentracije  $3,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , otopina supstrata, L-DOPE, u TEA puferu,  $0-5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , otopina enzima L-AAO,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ . Kinetička su mjerenja provedena pri sobnoj temperaturi od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , osim ako u rezultatima nije drugačije navedeno.

Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti volumena  $3 \text{ cm}^3$ . Sastav testa je prikazan u tablici 3.1.

**Tablica 3.1.** Sastav testa za određivanje aktivnosti L-AAO.

Otopina	$V [\text{cm}^3]$
L-DOPA otopljena u TEA puferu	2,97
o-dianizidin	0,02
Peroksidaza	0,01
L-AAO	0,01

Dani sastav vrijedi za enzim L-AAO iz *Crotalus adamanteus*, dok je u testu za L-AAO iz *Rhodococcus opacus* volumen dodane otopine enzima bio  $0,05 \text{ cm}^3$ . Provedenim mjerenjem je dobiven pad aktivnosti s vremenom, iz kojeg je onda izračunata volumna ili specifična aktivnost prema jednadžbama 3.3. i 3.4.

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon_{340} \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3.3.)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{c_{L-AAO}} \quad (3.4.)$$

gdje je:

- $V_r$  - ukupni volumen uzorka u kiveti,  $\text{cm}^3$ ;
- $V_E$  - volumen dodanog enzima,  $\text{cm}^3$ ;
- $\varepsilon_{340}$  - ekstincijski koeficijent pri valnoj duljini  $\lambda = 340 \text{ nm}$ ,  $\text{cm}^2 \mu\text{m}^{-1}$ , ( $8,1 \text{ cm}^2 \mu\text{m}^{-1}$ );
- $d$  - promjer kivete, cm, ( $d = 1 \text{ cm}$ );

- $\frac{\Delta A}{\Delta t}$  - promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca),  $\text{min}^{-1}$ ;  
 $V.A.$  - volumna aktivnost,  $\text{U cm}^{-3}$ ;  
 $S.A.$  - specifična aktivnost,  $\text{U mg}^{-1}$ ;  
 $c_{L-AAO}$  - koncentracija enzima,  $\text{mg cm}^{-3}$ .

### 3.2.2. Određivanje aktivnosti katalaze iz goveđe jetre

Određivanje aktivnosti katalaze se temelji na reakciji njegovog raspada na vodu i kisik prikazanoj jednadžbom 3.5.



Test je opisan u Boehringerovom priručniku [7]. Otopine potrebne za mjerenje aktivnosti su otopina vodikovog peroksida ( $10,5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) u fosfatnom puferu ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,0), te otopina katalaze ( $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ mg cm}^{-3}$ ) u fosfatnom puferu. Mjerenja su provedena na spektrofotometru pri valnoj duljini  $\lambda = 240 \text{ nm}$  i temperaturi od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , u kvarcnoj kiveti volumena  $3 \text{ cm}^3$ . Mjereno je vrijeme potrebno da apsorbancija otopine vodikovog peroksida padne s 0,450 na 0,400. Koncentracija katalaze je podešena tako da to vrijeme bude oko 20 sekundi. Sastav testa je prikazan u tablici 3.2, a aktivnost je računata iz izraza 3.1. uz napomenu da je ekstincijski koeficijent vodikovog peroksida pri valnoj duljini 240 nm jednak  $0,040 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ .

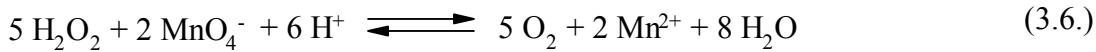
**Tablica 3.2.** Sastav enzimskog testa za određivanje aktivnosti katalaze.

otopina	$V [\text{cm}^3]$
$\text{H}_2\text{O}_2$ u fosfatnom puferu	3,00
katalaza	0,02

### 3.2.3. Mjerenje brzine raspada vodikovog peroksida uz katalazu

Promjena koncentracije vodikovog peroksida nastala raspadom kataliziranim katalazom je mjerena titracijom uz standardnu otopinu kalijevog permanganata,  $c_{\text{KMnO}_4} = 0,02 \text{ mol dm}^{-3}$ . Početna koncentracija vodikovog peroksida je iznosila  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , a radilo se u 2 pufera, TEA i

fosfatnom puferu,  $c_{\text{pufera}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6, kako bi se oponašali uvjeti kojima će katalaza biti izložena u reaktoru. Određivanje vodikovog peroksida se temeljilo na reakciji prikazanoj jednadžbom 3.6.



Kako bi se dobila krivulja smanjenja koncentracije vodikovog peroksida u vremenu, svaka je otopina puštena da reagira točno određeno vrijeme uz miješanje na magnetskoj miješalici. Nakon željenog vremena reakcija je zaustavljena jakim zakiseljavanjem sumpornom kiselinom, te je titrirana standardnom otopinom kalijevog permanganata. Titrirani su alikvoti otopine vodikovog peroksida od  $100 \text{ cm}^3$ . U svaki je alikvot dodana jednaka koncentracija katalaze ( $1,6 \cdot 10^{-5}$  i  $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mg cm}^{-3}$ ). Prema jednadžbi reakcije je vidljivo da je za titraciju potreban kiseli medij, pa je sumporna kiselina dodana za zaustavljanje reakcije bila potrebna i za titriranje. U suprotnom reakcija ne ide do  $\text{Mn}^{2+}$ , nego do  $\text{MnO}_2$ . Dakle za krivulju od 10 točaka je titrirano 10 alikvota.

#### 3.2.4. Praćenje promjena koncentracija L-DOPE i produkata

Koncentracija L-DOPE je praćena visokotlačnom tekućinskom kromatografijom (HPLC) sa UV detektorom pri valnoj duljini od 280 nm [91] na koloni za amino kiseline LiChrospher 100, RP-18 (5mm). Korištena mobilna faza se sastojala od: redestilirane vode, metanola i fosforne kiseline u volumnom omjeru 975,5: 19,5: 1,0. Standardne otopine L-DOPE su pripravljene otapanjem određenih masa standarda u klorovodičnoj kiselini,  $c_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Na taj je način dobivena kalibracijska krivulja (Prilog 1).

Uzorci uzeti iz enzimskog membranskog reaktora su također otopljeni u klorovodičnoj kiselini,  $c_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Na taj je način osigurana veća stabilnost uzorka, kao i dobra topljivost.

Osim L-DOPE, na kromatogramu su se mogla vidjeti još dva pika: 3,4-dihidroksifenilpiruvat i 3,4-dihidroksifenilacetat (potvrđen standardom). Obzirom da 3,4-dihidroksifenilacetat nastaje dekarboksilacijom glavnog produkta enzimske reakcije 3,4-dihidroksifenilpiruvata u prisustvu vodikovog peroksida, dobiven je svojevrsan dokaz da je prvi produkt 3,4-dihidroksifenilpiruvat. To je potvrđeno i daljnjom analizom LC-MS-om. Vremena zadržavanja navedenih komponenata (L-DOPA, 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina, 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina) na koloni su iznosila 3,8, 5,8 i 13,6 min.



U jednom je eksperimentu reakcija praćena na koloni za organske kiseline LiChrosorb 100, RP-18 (5mm). Korištena mobilna faza se sastojala od oktilamina ( $0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ ) i acetonitrila u volumnom omjeru 80:20. Također su detektirana 2 produkta sa vremenima zadržavanja 4,0 i 4,9 minuta (3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina i 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina).

### 3.2.5. Analiza i identifikacija produkata

Reakcijska otopina je analizirana LC-MS-om na istoj koloni za amino kiseline koja je korištena i za HPLC analizu. Sastav eluenta je izmjenjen. Umjesto fosforne kiseline je korištena mravlja kiselina, pa su stoga i retencijska vremena pomaknuta u odnosu na kromatograme dobivene na HPLC-u. Kao rezultat analize dobiven je spektar molarnih masa reakcijske otopine koja je omogućila identifikaciju produkta.

### 3.2.6. Određivanje koncentracije proteina

U uzorku otopine enzima L-AAO iz *R. opacus* određena je koncentracija proteina spektrofotometrijskim testom po Bradfordu [11].

Reagens za određivanje proteina se priprema tako da se pomiješa 100 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 reagensa proizvođača Fluka s  $50 \text{ cm}^3$  etanola,  $100 \text{ cm}^3 \text{ H}_3\text{PO}_4$  (85 %-tna) i  $850 \text{ cm}^3$  redestilirane vode. Tako dobiveni reagens je korišten za određivanje apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini 595 nm.

Prije samog određivanja koncentracije proteina u uzorcima enzima napravljen je baždarni pravac mjerenjem apsorpcije otopina albumina iz goveđeg seruma (BSA) poznate koncentracije pri valnoj duljini 595 nm. Koncentracije standardnih otopina BSA su bile:  $1 \mu\text{g cm}^{-3}$ ;  $2,5 \mu\text{g cm}^{-3}$ ;  $5 \mu\text{g cm}^{-3}$ ;  $7,5 \mu\text{g cm}^{-3}$ ;  $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ , a pripremljene su razrjeđivanjem otopine BSA koncentracije  $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ . Iz ovisnosti apsorpcije o vremenu dobivena je jednadžba pravca potrebna za preračunavanje koncentracije proteina u uzorcima.

Koncentracija proteina je određena na slijedeći način:  $0,8 \text{ cm}^3$  uzorka enzima je pomiješano s  $0,2 \text{ cm}^3$  reagensa, te se nakon inkubacije od 5 minuta na sobnoj temperaturi razvije plava boja. Pri valnoj duljini 595 nm se mjeri apsorpcija tog uzorka, a uz pomoć baždarnog pravca se izračuna koncentracija proteina u uzorku (Prilog 2).

Koncentracija osnovne otopine enzima L-AAO iz *R. opacus* određena opisanim testom je iznosila  $0,387 \text{ mg cm}^{-3}$ .

### **3.2.7. Provedba šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-DOPE u enzimskom membranskom reaktoru (EMR)**

Reakcijska otopina je upumpana u reaktor. Nakon toga je pušteno da se uspostavi tok kroz petlju sa vanjske strane reaktora, koja sadrži septum za uzimanje uzorka (Slika 3.1.; (5)). Prije započinjanja reakcije dodatkom enzima, uzet je početni uzorak kroz injekcijski septum (Slika 3.2.; (6)). Nakon analize početnog uzorka dodana je katalaza, a potom i oksidaza kroz injekcijski septum koji se nalazi na plaštu reaktora. Tijekom reakcije su uzimani uzorci (20-200  $\mu\text{L}$ , te analizirani na HPLC-u sa UV detektorom. Na kraju pokusa je uzet uzorak za LC-MS analizu.

### **3.2.8. Provedba ponovljivog šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-DOPE u enzimskom membranskom reaktoru (EMR)**

Sam postupak provedbe pokusa se ne razlikuje od provedbe šaržnog pokusa u (EMR). Nakon što je koncentracija L-DOPE pala na nulu, u reaktor je dodana svježa L-DOPA otopljena u fosfatnom puferu u kojem se reakcija provodila. Masa L-DOPE koja je otopljena je odvagana tako da koncentracija u reaktoru bude oko 5  $\text{mmol dm}^{-3}$ . Volumen pufera u kojem je L-DOPA otopljena je uzet tako da nadoknadi gubitak volumena radi uzimanja uzorka tijekom prethodnog ciklusa, da se volumen ne mijenja bitno tijekom pokusa. Volumen uzoraka koji su uzimani iz reaktora iznosio je 20-200  $\mu\text{L}$ .

## 4. MODELIRANJE PROCESA BOKATALITIČKE OKSIDACIJE L-DOPE

### 4.1. KINETIKA REAKCIJE BOKATALITIČKE OKSIDACIJE L-DOPE

Kinetika reakcije biokatalitičke oksidacije L-DOPE katalizirane enzimom L-AAO je opisana Michaelis-Menten-ovom jednačbom (Jed. 4.1.), Michaelis-Menten-ovom jednačbom sa kompetitivnom inhibicijom supstratom (Jed. 4.2.), Michaelis-Menten-ovom jednačbom sa kompetitivnom inhibicijom produktom (Jed. 4.3.) ili Michaelis-Menten-ovom jednačbom sa kompetitivnom inhibicijom supstratom i produktom (Jed. 4.4.).

Pri tome valja napomenuti da su jednačbe 4.1. i 4.2. korištene za opis kinetike enzima L-AAO u kivetu, gdje ne dolazi do izražaja inhibicija produktom pri čemu se mjeri samo početna brzina reakcije. Jednačbe 4.3. i 4.4. su korištene za opis kinetike u enzimskom membranskom reaktoru (EMR) kada osim inhibicije supstratom, do izražaja dolazi inhibicija vodikovim peroksidom zbog njegovog nakupljanja u sustavu radi neučinkovitosti katalaze.

$$r_1 = \frac{V_m \cdot c_{L-AAO} \cdot c_{L-DOPA}}{K_m^{L-DOPA} + c_{L-DOPA}} \quad (4.1.)$$

$$r_2 = \frac{V_m \cdot c_{L-AAO} \cdot c_{L-DOPA}}{K_m^{L-DOPA} + c_{L-DOPA} + c_{L-DOPA}^2 / K_i^{L-DOPA}} \quad (4.2.)$$

$$r_3 = \frac{V_m \cdot c_{L-AAO} \cdot c_{L-DOPA}}{K_m^{L-DOPA} \cdot \left(1 + c_{H_2O_2} / K_i^{H_2O_2}\right) + c_{L-DOPA}} \quad (4.3.)$$

$$r_4 = \frac{V_m \cdot c_{L-AAO} \cdot c_{L-DOPA}}{K_m^{L-DOPA} \left(1 + c_{H_2O_2} / K_i^{H_2O_2}\right) + c_{L-DOPA} + c_{L-DOPA}^2 / K_i^{L-DOPA}} \quad (4.4.)$$

$$r_5 = \frac{V_{m0} \cdot e^{(-k_d \cdot t)} \cdot c_{L-AAO} \cdot c_{L-DOPA}}{K_m^{L-DOPA} \cdot \left(1 + c_{H_2O_2} / K_i^{H_2O_2}\right) + c_{L-DOPA}} \quad (4.5.)$$

$$r_6 = \frac{V_{m0} \cdot e^{(-k_d \cdot t)} \cdot c_{L-AAO} \cdot c_{L-DOPA}}{K_m^{L-DOPA} \left(1 + c_{H_2O_2} / K_i^{H_2O_2}\right) + c_{L-DOPA} + c_{L-DOPA}^2 / K_i^{L-DOPA}} \quad (4.6.)$$

Jednačbe 4.5. i 4.6. su korištene za opis enzimske kinetike biotransformacije L-DOPE u ponovljivom šaržnom eksperimentu. Pri tome je u kinetički model uključena vremenski ovisna deaktivacija enzima.

Kinetika reakcije katalizirane katalazom je opisana kinetičkim izrazom za reakciju prvog reda (Jed. 4.7.), obzirom na nisku koncentraciju vodikovog peroksida u odnosu na Michaelis-Menten-ovu konstantu katalaze iz govede jetre.

$$r_7 = -k \cdot c_{H_2O_2} \quad (4.7.)$$

## 4.2. BILANCE TVARI U ŠARŽNOM ENZIMSKOM MEMBRANSKOM REAKTORU (EMR)

Matematički model za sustav enzimske oksidacije L-DOPE u šaržnom EMR-u uključuje kinetičke jednadžbe (Jed. 4.3. i 4.7. za reakciju sa L-AAO iz *C. adamanteus*; Jed. 4.4 i 4.7. za L-AAO iz *R. opacus*) i bilance tvari za svaku komponentu (Jed. 4.8., 4.9. i 4.10.). Rezultati eksperimenta u šaržnom EMR sa L-AAO iz *C. adamanteus* su analizirani kinetičkom jednadžbom 4.3., koja uključuje inhibiciju produktom, uklopljenom u bilancne jednadžbe 4.8., 4.9. i 4.10.

Rezultati eksperimenta u šaržnom EMR sa L-AAO iz *R. opacus* su analizirani kinetičkom jednadžbom 4.4., koja uključuje inhibiciju supstratom i produktom, uklopljenom u bilancne jednadžbe 4.8., 4.9. i 4.10. Jednadžba 4.10., kojom je iskazana bilanca vodikovog peroksida u šaržnom EMR-u, koristila se u slučajevima kada je u eksperimentima korištena katalaza.

$$\frac{dc_{L-DOPA}}{dt} = -r_3 \text{ (ili } r_4 \text{)} \quad (4.8.)$$

$$\frac{dc_{H_2O_2}}{dt} = r_3 \text{ (ili } r_4 \text{)} \quad (4.9.)$$

$$\frac{dc_{H_2O_2}}{dt} = r_3 \text{ (ili } r_4 \text{)} - r_7 \quad (4.10.)$$

## 4.3. MODELI VREMENSKE DEAKTIVACIJE ENZIMA

Tijekom provođenja ponovljivog šaržnog eksperimenta u EMR sa L-AAO iz *R. opacus* praćena je aktivnost enzima u reaktoru uzimanjem uzorka i analiziranjem enzimskim testom za aktivnost L-AAO. Dobivena je ovisnost aktivnosti enzima L-AAO u vremenu. Eksperimentalni rezultati su opisani s dva modela (napisani u integriranom obliku): vremenskom deaktivacijom prvog (Jed. 4.11.) i vremenskom deaktivacijom drugog reda (Jed. 4.12.).

$$V_m = V_{m0} \cdot e^{-k \cdot t} \quad (4.11.)$$

$$V_m = \frac{V_{m0}}{1 + V_m \cdot k \cdot t} \quad (4.12.)$$

Modeli su uspoređeni, a jedan od kriterija usporedbe (*MSC* – kriterij odabira modela) je definiran jednadžbom 4.13. Također su korišteni i suma kvadrata odstupanja eksperimentalnih podataka od izračunatih pomoću modela i koeficijent korelacije.

$$MSC = \ln \left( \frac{\sum_{i=1}^n w_i (Y_{obsi} - \bar{Y}_{obs})^2}{\sum w_i (Y_{obsi} - Y_{cali})^2} \right) - \frac{2p}{n} \quad (4.13.)$$

#### 4.4. OBRADA PODATAKA

Na temelju eksperimentalnih podataka koji su dobiveni u obliku ovisnosti aktivnosti enzima (ili reakcijske brzine) o koncentraciji supstrata (ispitivanje enzimske kinetike), ili kao ovisnost koncentracije supstrata u vremenu (eksperimenti u EMR) procijenjeni su parametri modela.

Parametri modela su procijenjeni nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu i metodu najmanjih kvadrata koje su sadržane u programskom paketu SCIENTIST [83]. Rezultati dobiveni pomoću matematičkog modela su uspoređeni sa eksperimentalnim podacima, ponovno proračunati u optimizacijskom potprogramu sve dok nije postignuta minimalna pogreška između eksperimentalnih i procijenjenih vrijednosti. Razlika između vrijednosti eksperimentalnih podataka i onih proračunatih pomoću modela je dana kao suma kvadrata. Za simulacije pomoću modela je korišten algoritam Episode za rješavanje krutih diferencijalnih jednadžbi kojeg sadrži programski program SCIENTIST.

Osim pomoću SCIENTIST-a, parametri modela su procijenjeni linearnom regresijom koristeći Levenspiel-ovu metodu [57]. Time je dobivena prividna vrijednost Michaelis-Menten-ove konstante, kao i katalitička konstanta enzima,  $k_3$ . Prividna vrijednost Michaelis-Menten-ove konstante uključuje eventualne inhibicije, pa ukoliko inhibicija u sustavu postoji, procijenjena vrijednost prividne Michaelis-Menten-ove konstante ne odgovara vrijednosti procijenjenoj na temelju kinetičkih mjerenja početne brzine u kivetu spektrofotometra.

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

Provedeno je 6 serija pokusa. U prvoj seriji pokusa je ispitana ovisnost aktivnosti enzima oksidaze L-amino kiselina (L-AAO) iz *C. adamanteus* i *R. opacus* o pH i temperaturi, te stabilnost u uvjetima čuvanja, mjerenjem u kiveti spektrofotometra. Rezultati su prikazani na slikama 5.1.-5.6.

U drugoj seriji pokusa je diferencijalnom metodom ispitivana kinetika enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *C. adamanteus* i *R. opacus* mjerenjem u kiveti spektrofotometra. Rezultati su prikazani na slikama 5.7.-5.12. i tablici 5.1.

U trećoj seriji pokusa je integralnom metodom ispitana kinetika reakcije razgradnje vodikovog peroksida kataliziranog katalazom iz jetra goveda mjerenjem u šaržnom reaktoru. Rezultati su prikazani na slikama 5.13.-5.15. i tablici 5.2.

U četvrtoj je seriji pokusa integralnom metodom ispitivana kinetika enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *C. adamanteus* i *R. opacus* mjerenjem u šaržnom enzimskom membranskom reaktoru. Rezultati su prikazani na slikama 5.17., 5.19., 5.20., 5.25., 5.27., 5.31 i 5.32 te tablici 5.3. Parametri u ovim eksperimentima su procijenjeni i Levenspiel-ovom metodom linearizacije modela, a rezultati su prikazani na slikama 5.18., 5.21., 5.22., 5.26., 5.28. i u tablici 5.4. Također je provedena oksidacija L-DOPE sa L-AAO iz *C. adamanteus* u kontinuiranom enzimskom membranskom reaktoru, a rezultati su prikazani na slici 5.24.

U petoj seriji pokusa provedena je reakcija oksidacije L-DOPE katalizirana s L-AAO iz *C. adamanteus* i *R. opacus* u reaktoru koji je radio kao šaržni reaktor s ponovljivom dobavom svježeg reaktanta. Rezultati su prikazani na slikama 5.23. i 5.29., te tablici 5.5. Mjerena je i operacijska stabilnost L-AAO iz *R. opacus*. Rezultati su prikazani na slici 5.30.

U šestoj seriji pokusa je ispitivana aktivnost enzima L-AAO iz *C. adamanteus* u superkritičnom CO<sub>2</sub>, kao i topljivost L-DOPE u istim uvjetima. Također je provedena reakcija oksidacije L-DOPE u superkritičnim uvjetima. Rezultati su prikazani u tablicama 5.6. i 5.7.

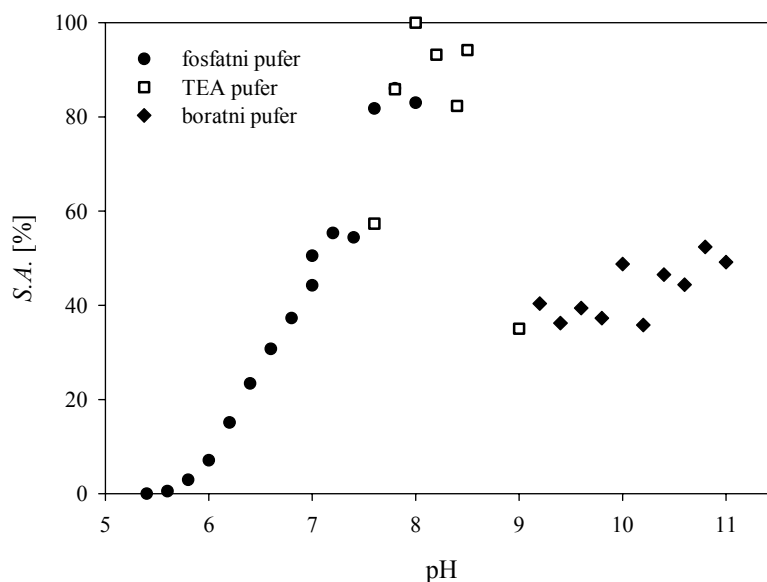
Karakterizacija produkta je prikazana na slikama 5.33.-5.37.

### 5.1. ISPITIVANJE KINETIKE BIOKATALITIČKE OKSIDACIJE L-DOPE KATALIZIRANE OKSIDAZOM L-AMINO KISELINA (L-AAO)

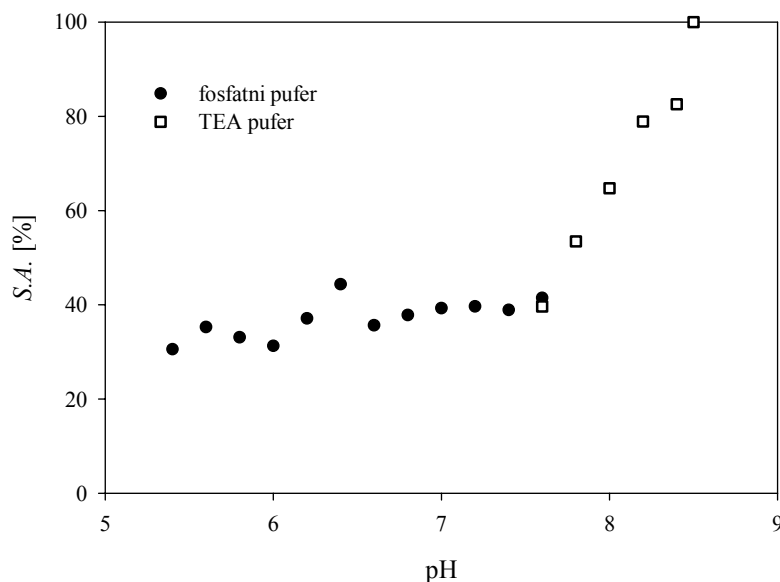
#### 5.1.1. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti enzima L-AAO o pH

Ispitana je ovisnost aktivnosti enzima L-AAO o pH vrijednosti. Mjerenja za oba enzima su provedena pri koncentraciji L-DOPE od 5 mmol dm<sup>-3</sup> što je koncentracija zasićenja za enzim L-

AAO iz *C. adamanteus*. To znači da daljnjim povećanjem koncentracije L-DOPE ne dolazi do znatnog povećanja aktivnosti enzima. Za razliku od L-AAO iz *C. adamanteus*, L-AAO iz *R. opacus* pokazuje inhibiciju ovim supstratom pri navedenoj koncentraciji, no mjerenja su ipak provedena pri istim uvjetima.



**Slika 5.1.** Promjena aktivnosti enzima L-AAO iz *C. adamanteus* pri različitim pH vrijednostima ( $c_{L-DOPA} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{L-AAO} = 0,033 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).



**Slika 5.2.** Promjena aktivnosti enzima L-AAO iz *R. opacus* pri različitim pH vrijednostima ( $c_{L-DOPA} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{L-AAO} = 0,006 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Eksperimentalni rezultati su prikazani na slici 5.1. i 5.2. Može se zaključiti da L-AAO iz *C. adamanteus* (Slika 5.1.) ne pokazuje aktivnost pri pH vrijednostima nižim od 5,4. Na višim vrijednostima pH se može uočiti nagli porast aktivnosti enzima. Maksimalna vrijednost aktivnosti se nalazi između pH 7,8 i 8,0. U lužnatom području, iznad pH 9, mjerenja su provedena u boratnom puferu. Uočene su interferencije ovog pufera sa enzimskim testom. Čini se da dolazi do određene reakcije prije dodatka enzima jer se pojavljuje smeđe obojenje, koje je inače mjera brzine reakcije prilikom dodatka enzima L-AAO, tako da se prava brzina reakcije na taj način ne može odrediti. U literaturi [21] se navodi da reakcijom borata i vodikovog peroksida dolazi do nastajanja perborata čiji su kristali slabo topljivi. Obzirom da u reakciji oksidativne deaminacije L-DOPE nastaje vodikov peroksid, koji može reagirati sa boratom, ovaj pufer se ne može upotrijebiti za provođenje ove reakcije. U literaturi je također pronađeno da kod L-AAO iz *C. adamanteus* dolazi do reverzibilne inaktivacije u lužnatom pH području [74], pa je za očekivati daljnji pad aktivnosti enzima sa povećanjem pH vrijednosti. Iz mjerenja se može odrediti optimum pri pH 7,8. Osim toga, više pH vrijednosti nisu pogodne za supstrat L-DOPU jer je ona sklonija autooksidaciji u lužnatim uvjetima [67].

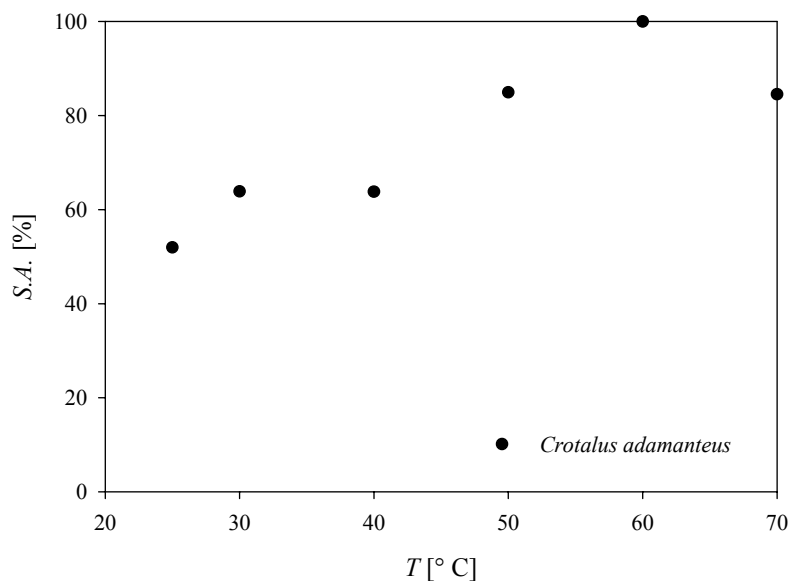
L-AAO iz *R. opacus* (Slika 5.2.) pokazuje aktivnost u širokom pH području, tj. i pri vrlo niskim pH (kiselo). Od najnižeg pH 5,4 pri kojem je aktivnost mjerena, pa do vrijednosti pH 8,5 ovaj enzim pokazuje stalni porast aktivnosti. Obzirom da više pH vrijednosti (lužnato) ne pogoduju istraživanoj reakciji, nije tražena dalje optimalna vrijednost, već je reakcija sa ovim enzimom također provedena pri pH 7,8. U literaturi je naveden optimum aktivnosti ovog enzima pri pH vrijednosti oko 8,6 [28;29]. Isti autori mjerili su aktivnost i pri nižim pH vrijednostima, te je ustanovljeno da je ovaj enzim aktivan i nešto ispod pH 3.

### 5.1.2. Ispitivanje ovisnosti aktivnosti enzima L-AAO o temperaturi

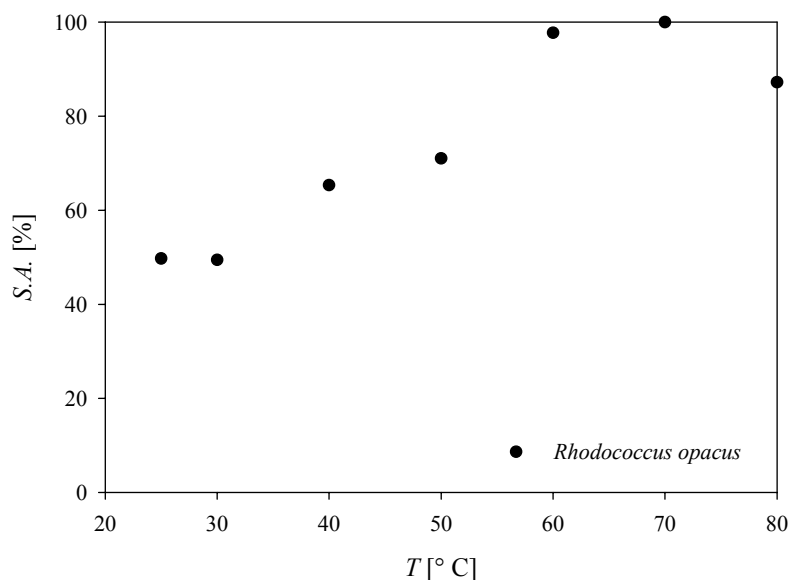
Da se odredi utjecaj temperature na početnu brzinu enzimske reakcije, otopine su termostahirane na određenim temperaturama u rasponu od 25 °C do 70 °C za L-AAO iz *C. adamanteus* i od 25 °C do 80 °C za *R. opacus*. Tako termostahirane otopine su korištene za enzimski test iz kojeg su određivane početne brzine reakcije. Na slici 5.3. i 5.4. su prikazani dobiveni rezultati. Rezultati pokazuju da povišenjem temperature dolazi do povećanja aktivnosti oba enzima, sve do temperature od oko 63 °C za L-AAO iz *C. adamanteus* (Slika 5.3.) i od oko 67 °C za L-AAO iz *R. opacus* (Slika 5.4.) kada je dostignut maksimum aktivnosti. Ovi rezultati se odnose samo na početnu aktivnost enzima. Za očekivati je da bi nakon duljeg boravka na višim



temperaturama aktivnost enzima naglo počela padati zbog deaktivacije uzrokovane toplinskom denaturacijom proteina. Za L-AAO iz *R. opacus* je to i pokazano [29]. Praćen je pad aktivnosti



**Slika 5.3.** Početna aktivnost enzima L-AAO iz *C. adamanteus* pri različitim temperaturama u TEA puferu ( $c_{L-DOPA} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{L-AAO} = 0,033 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6).

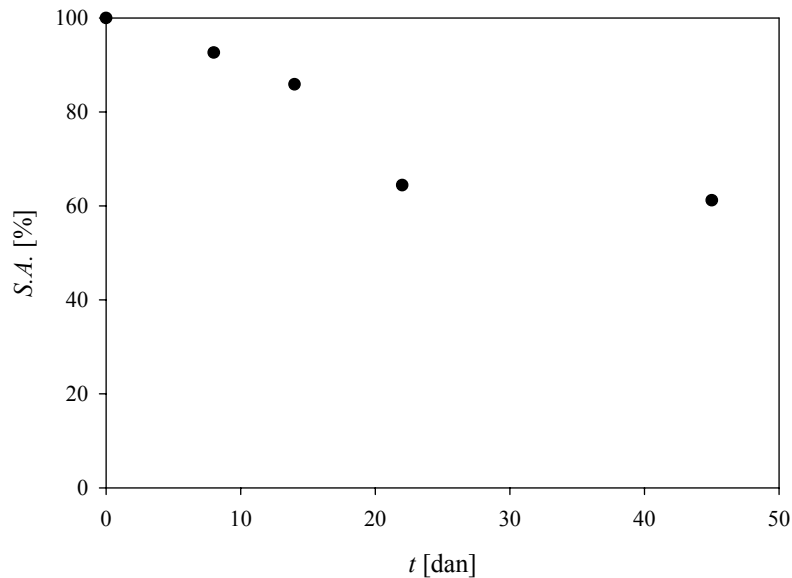


**Slika 5.4.** Početna aktivnost enzima L-AAO iz *R. opacus* pri različitim temperaturama u TEA puferu ( $c_{L-DOPA} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{L-AAO} = 0,006 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6).

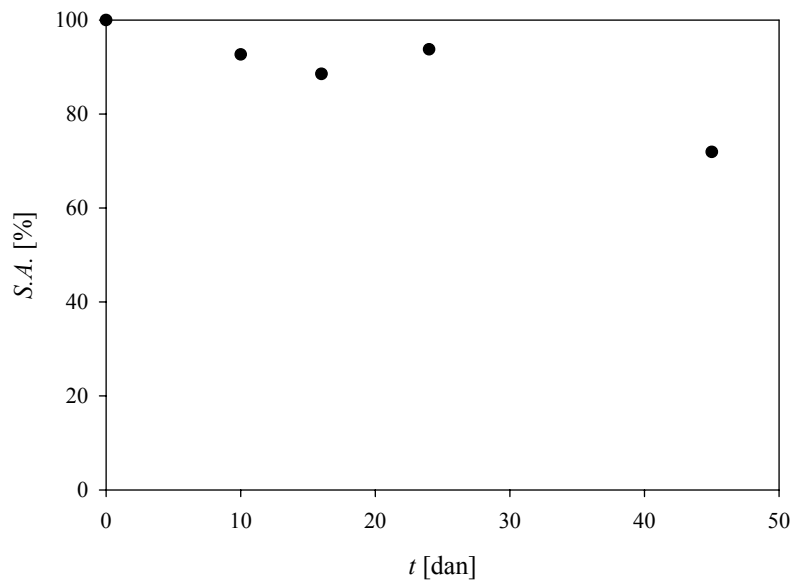
enzima pri optimalnom pH 8,6 u različitim puferkim sustavima: TEA i glicin/NaOH pri 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C, 50 °C. Rezultati su pokazali da je enzim potpuno stabilan 150 minuta na 25 i 30 °C u oba pufera. Pri temperaturi 37 °C u TEA puferu je došlo do deaktivacije, koja je bila brža

pri višim temperaturama. Pri 50 °C je deaktivacija bila gotovo trenutna. Stabilnost enzima je bila nešto bolja u glicin/NaOH puferu, u kojem je znatnija deaktivacija zamijećena pri 45 °C, dok je trenutačna bila pri 50 °C. Za L-AAO iz *C. adamanteus* takvi podaci nisu pronađeni.

### 5.1.3. Ispitivanje stabilnosti otopine enzima L-AAO prilikom čuvanja



**Slika 5.5.** Promjena početna aktivnost enzima L-AAO iz *C. adamanteus* prilikom čuvanja ( $c_{L-DOPA} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{L-AAO} = 0,033 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 4 \text{ °C}$ ).

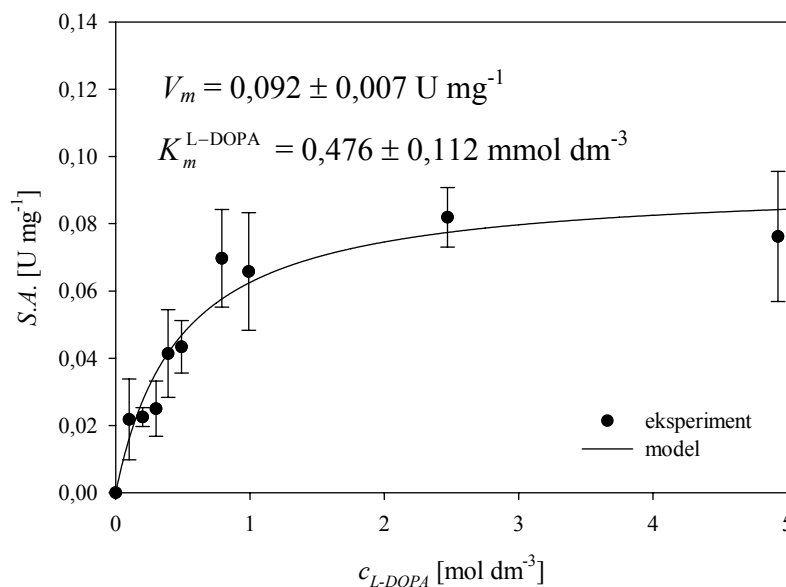


**Slika 5.6.** Promjena početna aktivnost enzima L-AAO iz *R. opacus* kroz duži period ( $c_{L-DOPA} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{L-AAO} = 0,006 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 4 \text{ °C}$ ).

Da se ispita stabilnost enzima pri čuvanju praćena je aktivnost oba enzima u periodu od 45 dana. Ispitivana je stabilnost otopine enzima koja je čuvana u hladnjaku na temperaturi od oko + 4 °C. L-AAO iz *C. adamanteus* je otopljen u redestiliranoj vodi. Pripremljena je otopina koncentracije 10 mg cm<sup>-3</sup>. L-AAO iz *R. opacus* je bio otopljen u TEA puferu pH 7,6.

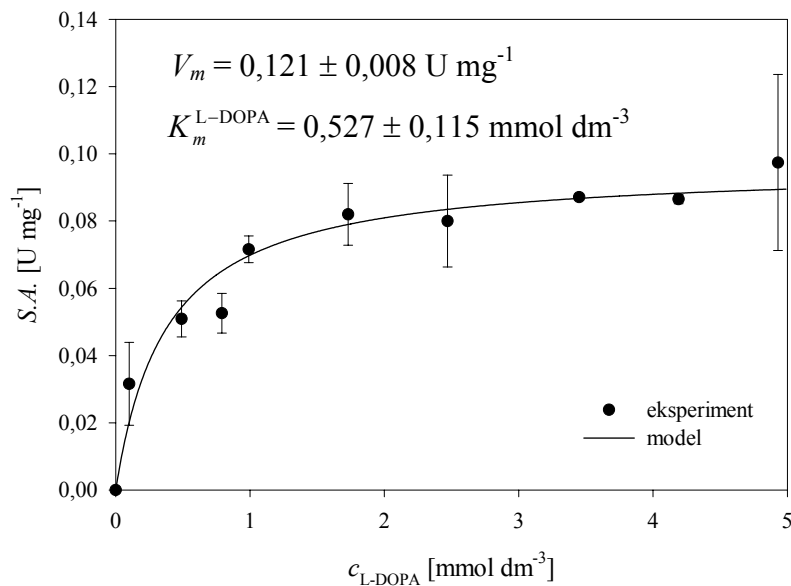
Rezultati eksperimenta su prikazani na slikama 5.5. i 5.6. Otopina enzima iz *C. adamanteus* je nakon 45 dana izgubila oko 40 % (Slika 5.5.), a otopina enzima iz *R. opacus* oko 30 % aktivnosti (Slika 5.6.).

#### 5.1.4. Ispitivanje kinetike enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane sa L-AAO iz *Crotalus adamanteus*



**Slika 5.7.** Rezultati ispitivanja kinetike enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *C. adamanteus* u TEA puferu ( $c_{L-AAO} = 0,033 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sa procijenjenim parametrima Michaelis-Menten-ove kinetike (Jed. 4.1.).

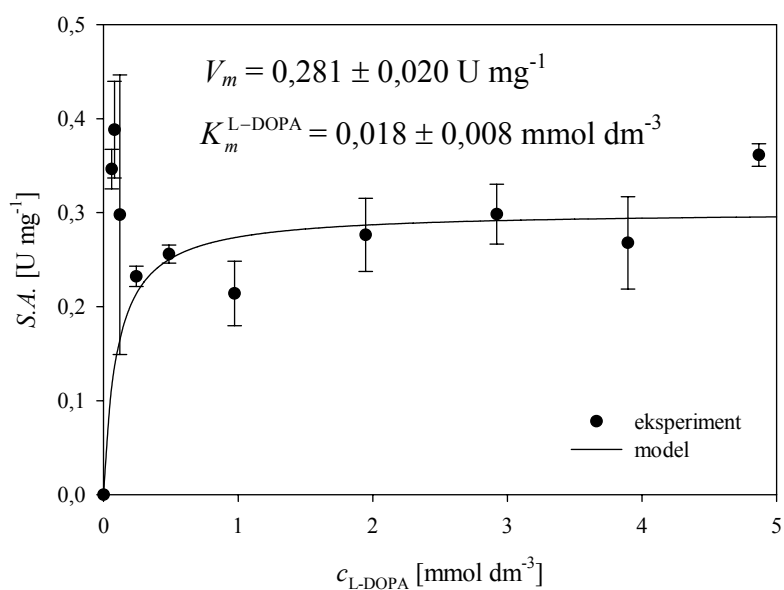
Kinetika enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO je mjerena u TEA puferu i u fosfatnom puferu ( $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6). Na slikama 5.7. i 5.8. su prikazani rezultati ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji supstrata, te parametri Michaelis-Menten-ovog kinetičkog izraza (Jed. 4.1.) procijenjeni nelinearnom regresijom. Zbog slabijeg otapanja L-DOPE u vodi, svako je mjerenje ponovljeno 3 puta, te je izračunat interval pouzdanosti iskazan sa 2 standardne devijacije. Manja odstupanja su dobivena u fosfatnom puferu (Slika 5.8.). Međutim, parametri se u oba pokusa slažu unutar procijenjene pogreške.



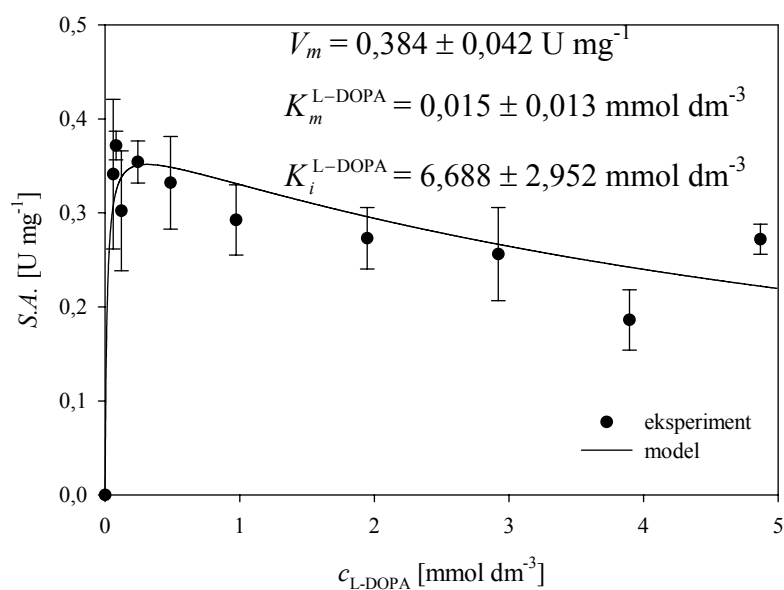
**Slika 5.8.** Rezultati ispitivanja kinetike enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *C. adamanteus* u fosfatnom puferu ( $c_{L-AAO} = 0,033 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) sa procijenjenim parametrima Michaelis-Menten-ove kinetike (Jed. 4.1.).

#### 5.1.5. Ispitivanje kinetike enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *Rhodococcus opacus*

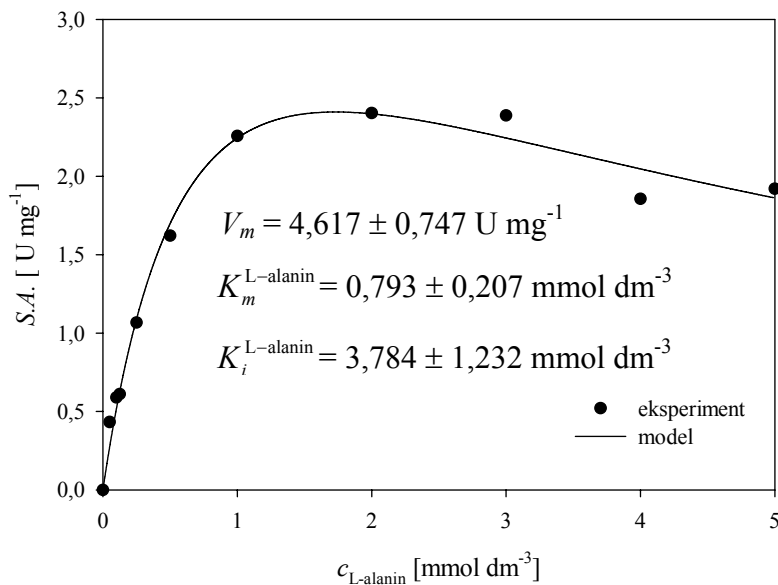
Rezultati ispitivanja kinetike enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *R. opacus* su prikazani na slikama 5.9.-5.12., a kao supstrati su upotrijebljeni L-DOPA i L-alanin. Kao što se vidi na slici 5.9., rezultati mjerenja u TEA puferu ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6) su opisani Michaelis-Menten-ovom kinetikom. Svako je mjerenje ponovljeno 3 puta, te je prikazan interval pouzdanosti dan sa dvije standardne devijacije. Rezultati kinetike enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *R. opacus* (Slika 5.10.) u fosfatnom puferu ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6) pokazuju dobro slaganje s rezultatima dobivenim pomoću kinetičkog modela koji uključuje inhibiciju supstratom (L-DOPA). Na slici 5.10. su dani procijenjeni kinetički parametri i njihovi intervali pouzdanosti. Iz prikazanih se rezultata može zaključiti da je enzim porijeklom iz *R. opacus* aktivniji (veća  $V_m$  vrijednost) i specifičniji (manja  $K_m^{L-DOPA}$  vrijednost) na L-DOPU (Slika 5.7., 5.8., 5.9. i 5.10., Tablica 5.1.)



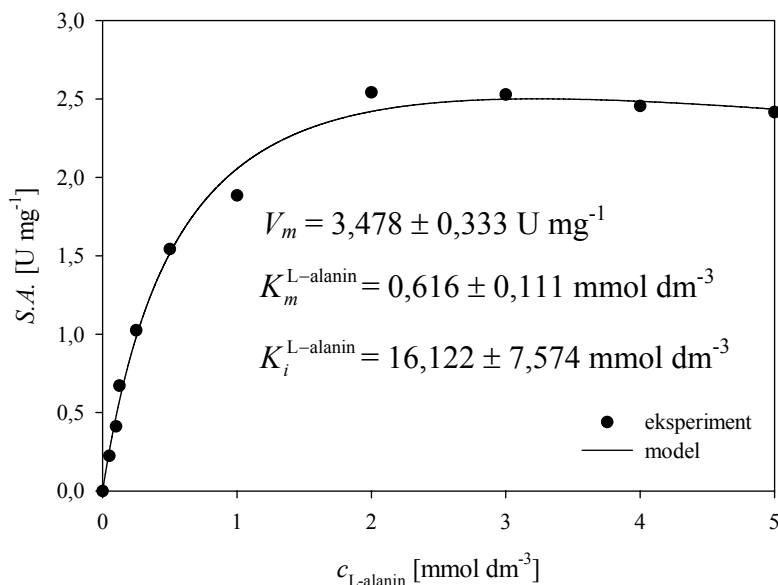
**Slika 5.9.** Rezultati ispitivanja kinetike enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *R. opacus* u TEA puferu ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,006 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sa procijenjenim parametrima Michaelis-Menten-ove kinetike (Jed. 4.1.).



**Slika 5.10.** Rezultati ispitivanja kinetike enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *R. opacus* u fosfatnom puferu ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,006 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sa procijenjenim parametrima modela kinetičkog modela koji uključuje inhibiciju supstratom (Jed. 4.2.).



**Slika 5.11.** Rezultati ispitivanja kinetike enzimske oksidacije L-alanina katalizirane s L-AAO iz *R. opacus* u TEA puferu ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,006 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sa procijenjenim parametrima modela koji uključuje inhibiciju supstratom (Jed. 4.2.).



**Slika 5.12.** Rezultati ispitivanja kinetike enzimske oksidacije L-alanina katalizirane s L-AAO iz *R. opacus* u HEPES puferu ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,006 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sa procijenjenim parametrima modela koji uključuje inhibiciju supstratom (Jed. 4.2.).

Obzirom na rasipanje rezultata dobivenih u TEA puferu ispitana je kinetika enzimske oksidacije L-DOPE katalizirane s L-AAO iz *R. opacus* u različitim puferkim otopinama,

upotrebljavajući njegov prirodni supstrat L-alanin. Ovaj enzim nije komercijalan, već je doniran [28;29], te o njemu nema puno dostupnih informacija. Mjerenja su provedena u TEA puferu, te u HEPES puferu, pri istom pH i koncentraciji pufera kao u svim prethodnim mjerenjima do sada ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6). Kao što se može vidjeti na slikama 5.11. i 5.12., oba eksperimenta su analizirana pomoću modela koji uključuje inhibiciju supstratom, te se već iz oblika teorijske krivulje može vidjeti da je inhibicija jača u TEA puferu, što na kraju dokazuju i parametri dobiveni optimiranjem (Tablica 5.1.). Ovaj enzim je oko 12 puta aktivniji (parametar  $V_m$ ) na L-alanin kao supstrat u usporedbi sa L-DOPOM.  $K_m^{\text{L-alanin}}$  vrijednost ( $0,793 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) je nešto veća od literaturne vrijednosti koja iznosi  $0,274 \text{ mmol dm}^{-3}$  [28], pri čemu se inhibicija L-alaninom ne spominje, no općenito se navodi da je za ovaj enzim karakteristična pojava inhibicije supstratom kod velikog broja amino kiselina kao supstrata. Karakteristika ovog enzima koju valja naglasiti kao prednost su izrazito male  $K_m$  vrijednosti koje čine ovaj enzim izrazito zanimljivim jer pokazuje izrazitu specifičnost te se može koristiti za razdvajanje racemata [28]. To potvrđuje i procijenjena  $K_m^{\text{L-DOPA}}$  vrijednost koja iznosi  $0,015 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

Također je ispitana aktivnost L-AAO iz *C. adamanteus* na L-alanin, međutim nije bilo reakcije što pokazuje da ovaj enzim ne prihvaća L-alanin kao supstrat. Prirodni supstrat za L-AAO iz *C. adamanteus* je L-fenilalanin. Ovaj enzim je komercijalan, te ima aktivnost  $0,5 \text{ U mg}^{-1}$  na taj supstrat.

Procijenjeni kinetički parametri dobiveni ispitivanjem kinetike enzima L-AAO iz *C. adamanteus* i *R. opacus* navedeni su u tablici 5.1.

**Tablica 5.1.** Pregled kinetičkih parametara procijenjenih diferencijalnom metodom iz eksperimentalnih podataka dobivenih mjerenjem u kiveti.

Supstrat	Podrijetlo enzima	Pufer	$V_m$ [U mg <sup>-1</sup> ]	$K_m^{\text{L-DOPA}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$K_i^{\text{L-DOPA}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]
L-DOPA	<i>C. adamanteus</i>	TEA	$0,092 \pm 0,007$	$0,476 \pm 0,112$	-
		Fosfatni	$0,121 \pm 0,008$	$0,527 \pm 0,115$	-
L-alanin	<i>C. adamanteus</i>	TEA	Nema aktivnosti	-	-
L-DOPA	<i>R. opacus</i>	TEA	$0,281 \pm 0,020$	$0,018 \pm 0,008$	-
		Fosfatni	$0,384 \pm 0,042$	$0,015 \pm 0,013$	$6,688 \pm 2,952$
L-alanin	<i>R. opacus</i>	TEA	$4,617 \pm 0,747$	$0,793 \pm 0,207$	$3,784 \pm 1,232$
		HEPES	$3,478 \pm 0,333$	$0,616 \pm 0,111$	$16,122 \pm 7,574$

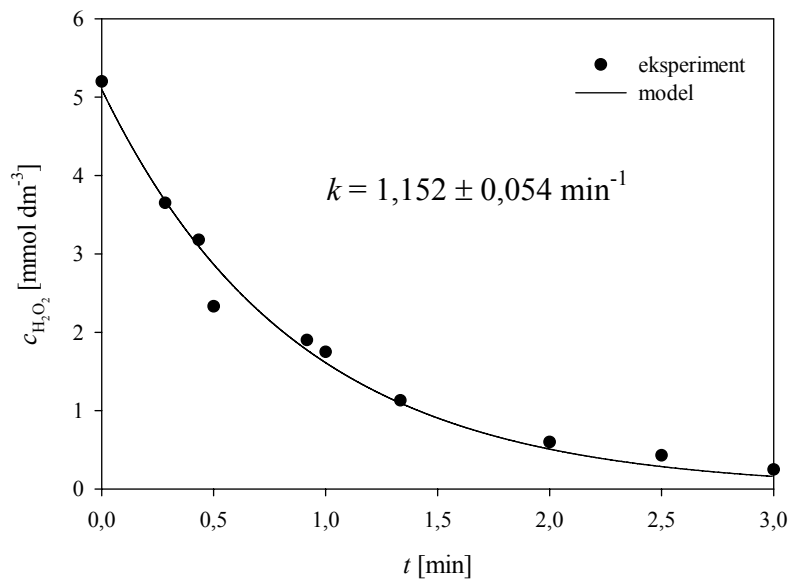
### 5.1.6. Inhibicija L-AAO vodikovim peroksidom

Inhibicija enzima L-AAO vodikovim peroksidom nije mogla biti mjerena standardnim enzimskim testom za određivanje aktivnosti L-AAO zbog enzima peroksidaze koji se nalazi u sastavu testa, a čija je funkcija razgradnja vodikovog peroksida

Zbog toga je jedini način za određivanje konstante inhibicije L-AAO vodikovim peroksidom provođenje reakcije oksidacije L-DOPE u reaktoru bez katalaze, te procjena inhibicijske konstante integralnom metodom iz mjerenja vremenske promjene koncentracije L-DOPE.

## 5.2. KINETIKA RASPADA VODIKOVOG PEROKSIDA KATALIZIRANOG KATALAZOM IZ GOVEĐE JETRE

### 5.2.1. Aktivnost katalaze i kinetika reakcije katalizirane katalazom iz goveđe jetre



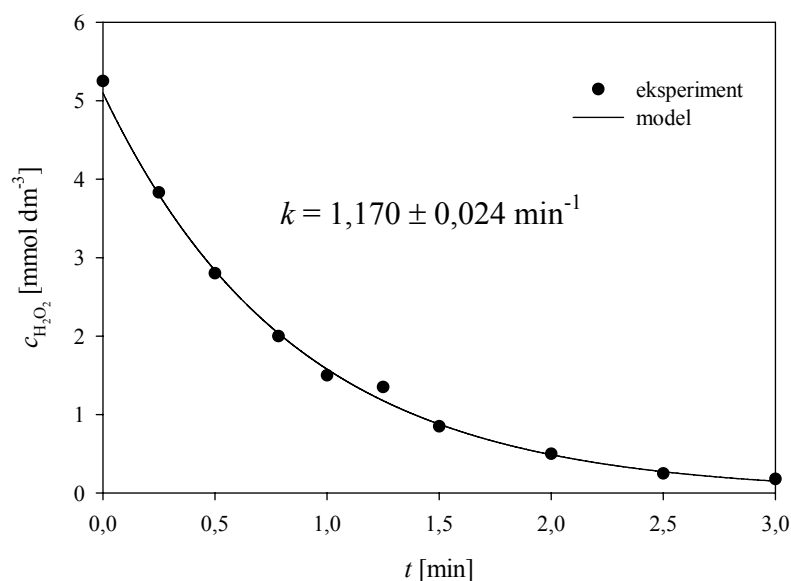
**Slika 5.13.** Raspad vodikovog peroksida u prisustvu katalaze u TEA puferu ( $c_{\text{katalaza}} = 1,6 \cdot 10^{-5} \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sa procijenjenim parametrom kinetičkog modela reakcije prvog reda (Jed. 4.7.).

Katalaza je vrlo specifičan enzim obzirom na supstrat na koji ima katalitičku aktivnost. Poznato je da vodikov peroksid, koji je prirodni supstrat za katalazu ima negativan učinak na proteine jer uzrokuje njihovu deaktivaciju, oksidirajući pojedine amino kiseline koje enzimi, odnosno proteini sadrže [91]. Zbog toga nije moguće provesti uobičajeno ispitivanje kinetike enzimske reakcije s tim enzimom jer se može raditi samo s izrazito malim koncentracijama



vodikovog peroksida, koji i pri tim koncentracijama ima snažno negativno djelovanje. Ipak, enzimskim testom je moguće odrediti aktivnost katalaze, mjerenjem pri jednoj koncentraciji vodikovog peroksida, a ona je za ovaj enzim iznosila  $87\,909\text{ U mg}^{-1}$ .

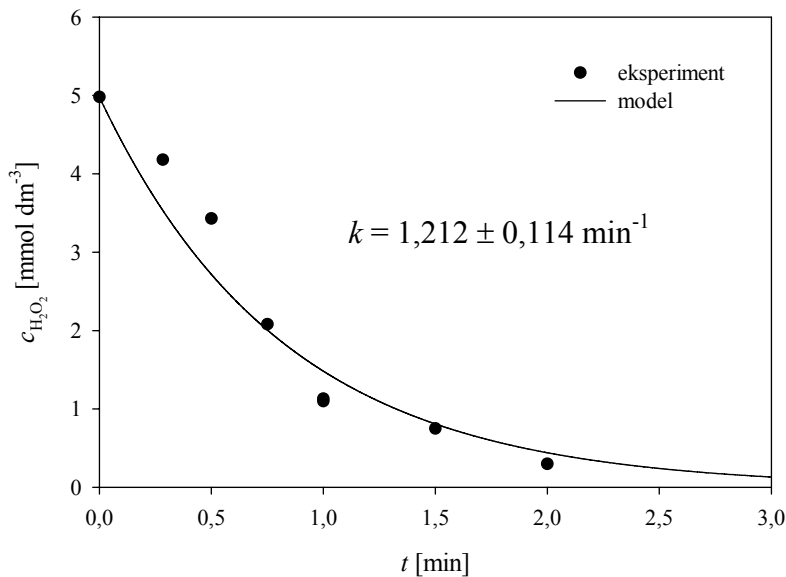
Rezultati ispitivanja katalitičkog raspada vodikovog peroksida su prikazani na slikama 5.13., 5.14. i 5.15. Praćena je promjena koncentracije vodikovog peroksida u vremenu pri dvije koncentracije katalaze,  $1,6 \cdot 10^{-5}$  i  $2,0 \cdot 10^{-5}\text{ mg cm}^{-3}$ , i u dva različita pufera, TEA i fosfatnom puferu ( $0,2\text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6). Procijenjena je kinetička konstanta brzine reakcije prvog reda, a rezultati mjerenja pokazuju izvrsno slaganje sa rezultatima izračunatim pomoću modela za kemijsku reakciju prvog reda (Slika 5.13., 5.14. i 5.15.). U literaturi je pronađena  $K_m^{\text{H}_2\text{O}_2}$  vrijednost za ovaj enzim i ona iznosi  $1,1\text{ mol dm}^{-3}$  [8]. Ona ukazuje na nisku specifičnost katalaze prema vodikovom peroksidu. Obzirom da je maksimalna koncentracija vodikovog peroksida korištena prilikom ispitivanja kinetike katalaze  $5\text{ mmol dm}^{-3}$  (jasno je da se radi o koncentraciji koja je daleko niža od Michaelis-Menten-ove konstante tj. daleko od zasićenja) za očekivati je da će se eksperimentalni podaci dobro moći opisati kinetikom prvog reda (Slika 2.3.).



**Slika 5.14.** Raspad vodikovog peroksida u prisustvu katalaze u fosfatnom puferu ( $c_{\text{katalaza}} = 1,6 \cdot 10^{-5}\text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2\text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 25\text{ }^\circ\text{C}$ ) sa procijenjenim parametrom kinetičkog modela reakcije prvog reda (Jed. 4.7.).

Može se zaključiti da promjena puferskog sustava ne utječe na aktivnost katalaze, a povećanje koncentracije katalaze smanjuje vrijeme potrebno za raspad vodikovog peroksida, što

je bilo i za očekivati. Međutim, povećanjem koncentracije katalaze u beskonačnost ne može se postići beskonačno velika brzina reakcije. Kao i u svim enzimskim sustavima, povećanjem koncentracije biokatalizatora može se utjecati na brzinu reakcije do određene granice, jer kada sve molekule supstrata zaposjednu aktivne katalitičke centre enzima, daljnje povećanje koncentracije biokatalizatora, nema više utjecaja na brzinu reakcije.



**Slika 5.15.** Raspad vodikovog peroksida u prisustvu katalaze u fosfatnom puferu ( $c_{\text{katalaza}} = 2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) sa procijenjenim parametrom kinetičkog modela reakcije prvog reda.

**Tablica 5.2.** Pregled kinetičkih parametara katalaze.

Pufer	$c_{\text{katalaza}}$ [mg cm <sup>-3</sup> ]	$k$ [min <sup>-1</sup> ]
TEA	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,152 \pm 0,054$
Fosfatni	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$1,170 \pm 0,024$
Fosfatni	$2,0 \cdot 10^{-5}$	$1,212 \pm 0,114$

### 5.2.2. Inhibicija katalaze s L-DOPOM

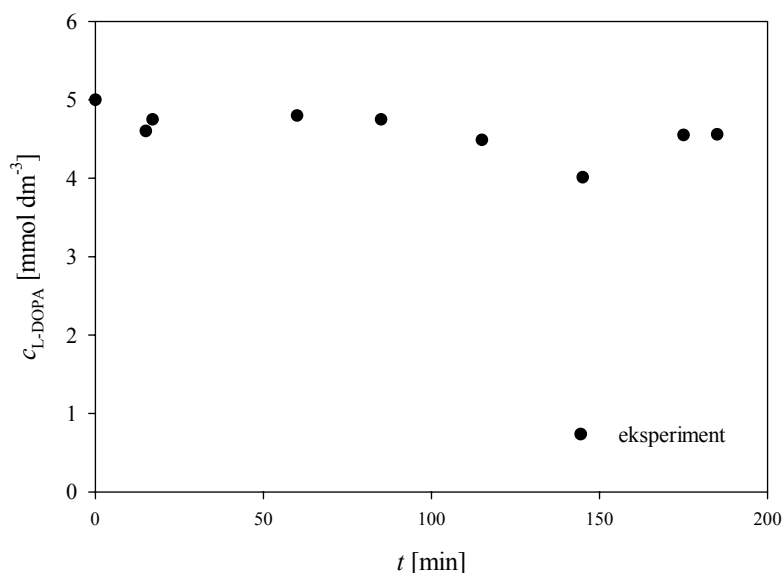
Postoje određeni dokazi da L-DOPA inhibira katalazu, no nema dovoljno eksperimentalnih podataka [35]. Zbog toga je proveden eksperiment u kojem je otopina vodikovog peroksida u koju je dodana određena koncentracija L-DOPE titrirana sa standardnom otopinom kalijevog permanganata. Međutim, kalijev permanganat, jako oksidacijsko sredstvo, je

vrlo brzo oksidirao L-DOPU. Na taj način nije bilo moguće vidjeti završnu točku titracije jer je promjena obojenja nastala već dodatkom prve kapi kalijevog permanganata. Može se zaključiti da primijenjena metoda nije dobra za određivanje inhibicije katalaze L-DOPOM. Obzirom da je prema literaturi [35] inhibicija moguća, upotrijebljena je koncentracije katalaze u eksperimentima u reaktoru bila vrlo visoka.

### 5.3. BOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-DOPE

#### 5.3.1. Spontani raspad L-DOPE u EMR

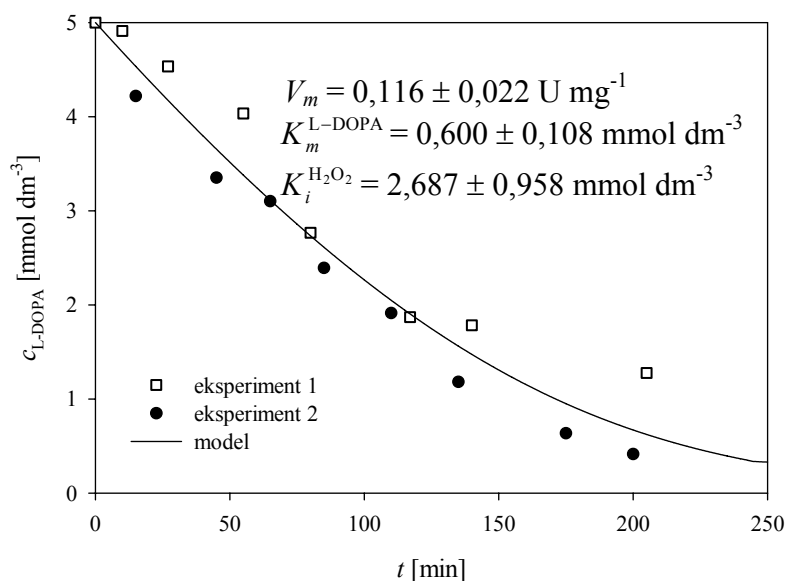
Kako je poznata nestabilnost L-DOPE u otopinama [84], to je ispitana brzina njezinog raspada u reaktoru, da se procijeni utjecaj spontanog raspada na brzinu enzimske reakcije koja će se provoditi u enzimskom membranskom reaktoru. Stoga je pripravljena otopina L-DOPE koncentracije  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  u fosfatnom puferu ( $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8), te je praćena promjena njezine koncentracije u vremenskom periodu od 3 sata. Rezultati su prikazani na slici 5.16, a pokazuju neznatan spontani raspad supstrata u danom vremenu. Stoga je zaključeno da spontani raspad L-DOPE neće imati znatan utjecaj na brzinu enzimske reakcije, te može biti zanemaren.



**Slika 5.16.** Spontani raspad L-DOPE u EMR ( $c_{\text{L-DOPA}} = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

### 5.3.2. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u šaržnom sustavu bez katalaze uz L-AAO iz *Crotalus adamanteus*

Biokatalitička oksidacija L-DOPE je provedena u enzimskom membranskom reaktoru uz početnu koncentraciju L-DOPE od  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  u fosfatnom puferu ( $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8) pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ . Kako je stvarna koncentracija L-DOPE bila vrlo blizu  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , to su sve vrijednosti normirane na  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  kako bi se različiti pokusi mogli uspoređivati. Pri tome je koncentracija L-AAO bila  $0,3075 \text{ mg cm}^{-3}$ , a katalaza u ovom pokusu nije dodana. Eksperiment je ponovljen 2 puta, a rezultati su prikazani na slici 5.17. Valja primijetiti da je tijekom reakcije praćena kvantitativno samo koncentracija L-DOPE, dok koncentracija produkta nije mogla biti određena kvantitativno zbog nepostojanja standarda jer 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina nije dostupna na tržištu.



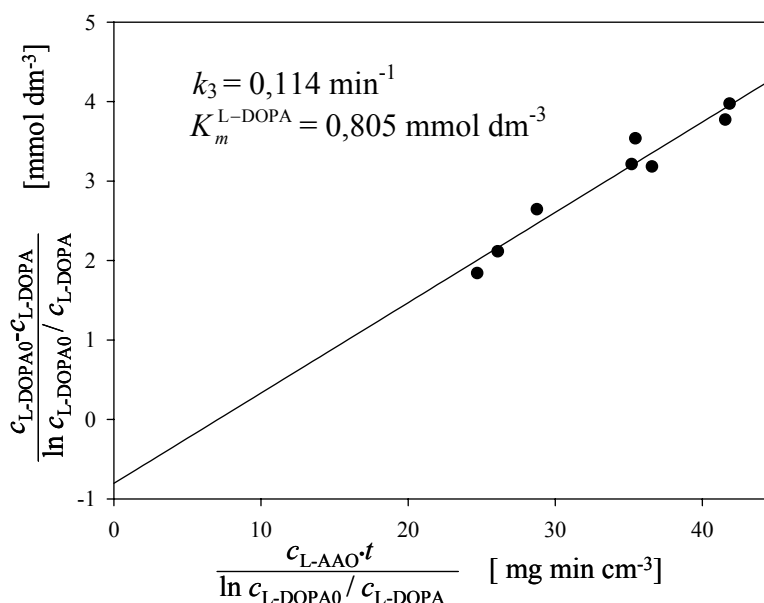
**Slika 5.17.** Biokatalitička oksidacija L-DOPE bez katalaze u sustavu ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,3075 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Za opis biokatalitičke oksidacije L-DOPE je predložen model enzimske kinetike uz inhibiciju produktom (vodikovim peroksidom). Parametri modela su optimirani i dobiveno je dobro slaganje eksperimentalnih podataka i podataka izračunatih pomoću modela (Slika 5.17.).

Parametri modela procijenjeni integralnom metodom iz podataka koncentracija-vrijeme (Slika 5.17.) se dobro slažu sa parametrima procijenjenim diferencijalnom metodom iz

eksperimentalnih podataka dobivenih u kiveti i testiranih na ovisnost reakcijska brzina-koncentracija (Slika 5.8.).

Parametri modela su procijenjeni i Levenspiel-ovom metodom [57]. Rezultati su prikazani na slici 5.18. i tablici 5.4. Na ovaj je način dobivena vrijednost katalitičke konstante enzima,  $k_3$ , te vrijednost prividne Michaelis-Menten-ove konstante. U njenu je vrijednost uključena inhibicija vodikovom peroksidom, te se stoga vrijednost ne slaže sa dosada navedenim vrijednostima procijenjenim iz mjerenja u kiveti spektrofotometra i mjerenja u EMR.

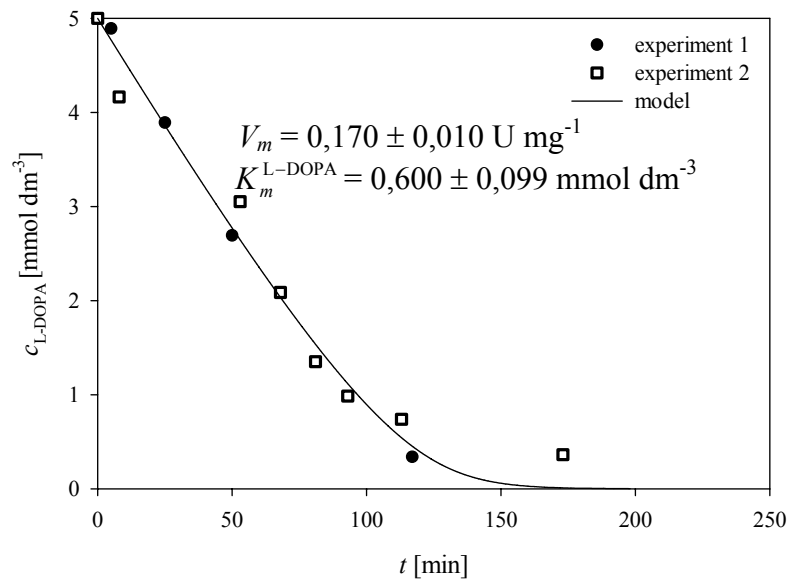


Slika 5.18. Procjena kinetičkih parametara Levenspiel-ovom metodom.

### 5.3.3. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u šaržnom sustavu sa katalazom i L-AAO iz *Crotalus adamanteus*

Biokatalitička oksidacija L-DOPE je provedena u fosfatnom puferu u sustavu sa katalazom radi *in situ* uklanjanja vodikovog peroksida koji djeluje kao kompetitivni inhibitor enzima. Obzirom da je ranije navedeno da postoje naznake o inhibiciji katalaze s L-DOPOM [35], katalaza je dodana u visokoj koncentraciji ( $c_{katalaza} = 1 \cdot 10^{-4}$  mg cm<sup>-3</sup>), kako bi se osiguralo njeno katalitičko djelovanje za vrijeme trajanja čitavog eksperimenta (Slika 5.19.). Ako se dobiveni rezultati usporede sa onima dobivenim u sustavu bez katalaze (Slika 5.17.), može se reći da je uporaba katalaze opravdana. Konverzija L-DOPE u sustavu sa katalazom je gotovo 100 %-tna nakon 150 minuta, dok je u eksperimentu bez katalaze u istom vremenu konverzija 93 %. Osim

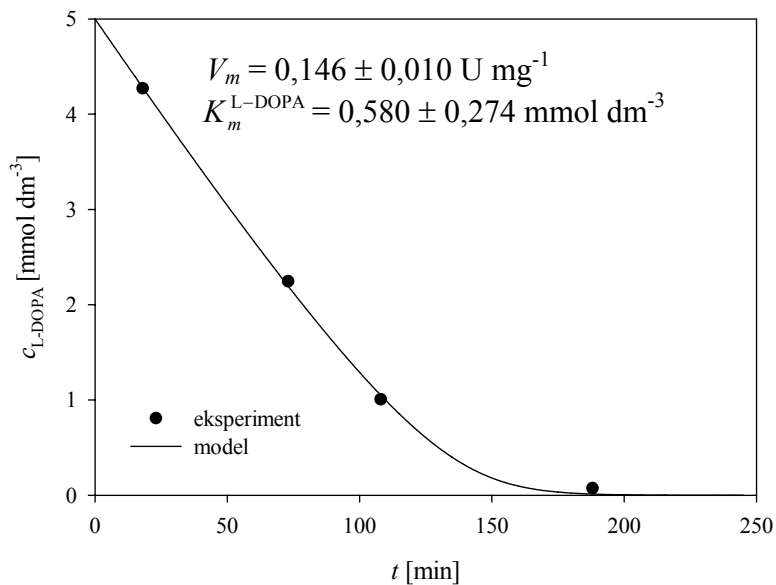
toga, katalazu treba dodati u sustav jer vodikov peroksid uzrokuje dekarboksilaciju  $\alpha$ -keto kiselina u odgovarajuće karboksilne kiseline, što bi u ovoj reakciji oksidacije L-DOPE značilo raspad dobivenog produkta u 3,4-dihidroksifeniloctenu kiselinu već u reaktoru. Parametri procijenjeni optimiranjem iz podataka koncentracija-vrijeme dobro se slažu sa parametrima procijenjenim pomoću podataka dobivenih ispitivanjem kinetike enzima u kiveti (Slika 5.8 i 5.19., Tablica 5.1 i 5.3.).



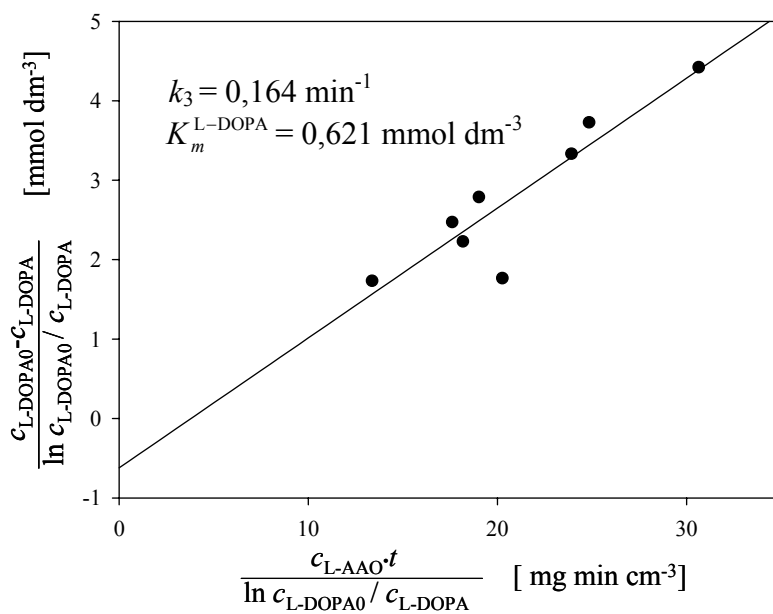
**Slika 5.19.** Biokatalitička oksidacija L-DOPE sa katalazom u sustavu ( $c_{L-AAO} = 0,3075 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{katalaza}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{puf}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Za razliku od svih dosadašnjih eksperimenata koji su provedeni u EMR, na slici 5.20. je prikazan pokus proveden pri  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Svi su ostali uvjeti eksperimenta zadržani jednakima kao i u prethodno spomenutom šaržnom pokusu sa katalazom. Dobivene koncentracije su normirane na početnu koncentraciju od  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , kako bi se pokusi mogli međusobno uspoređivati. Može se zaključiti da je reakcija provedena pri  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  nešto sporija, što potvrđuje i optimiranjem dobiveni parametar  $V_m$ , koji je nešto manji od onog dobivenog za eksperiment proveden pri  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

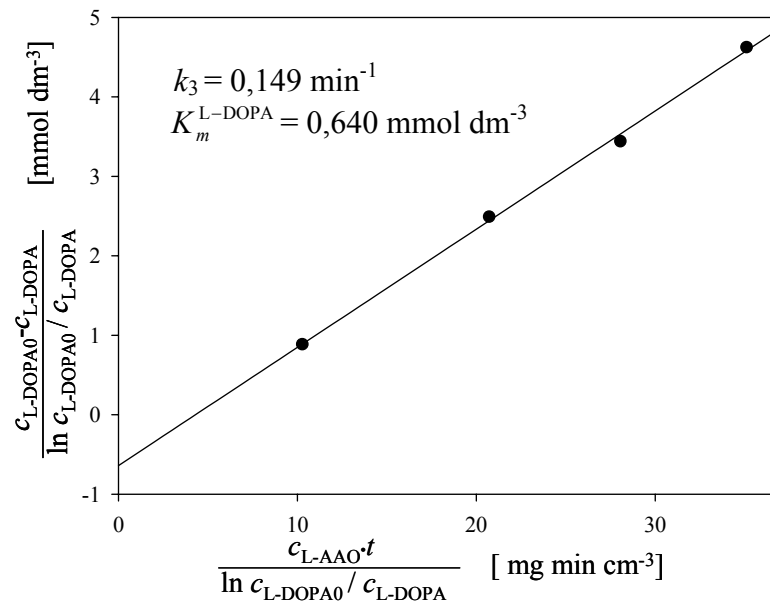
Na slikama 5.21. i 5.22. su prikazani rezultati procjene parametara Michaelis-Mentenovog kinetičkog modela Levenspiel-ovom metodom. Procijenjena  $K_m^{L-DOPE}$  vrijednost pokazuje dobro slaganje sa parametrima procijenjenima iz serija podataka koncentracija-vrijeme (Slika 5.19. i 5.20.) i podataka dobivenim mjerenjima u kiveti spektrofotometra (Slika 5.8.). Parametri su uspoređeni u tablicama 5.3 i 5.4.



**Slika 5.20.** Biokatalitička oksidacija L-DOPE sa katalazom u sustavu ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,3075 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{katalaza}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{puf}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

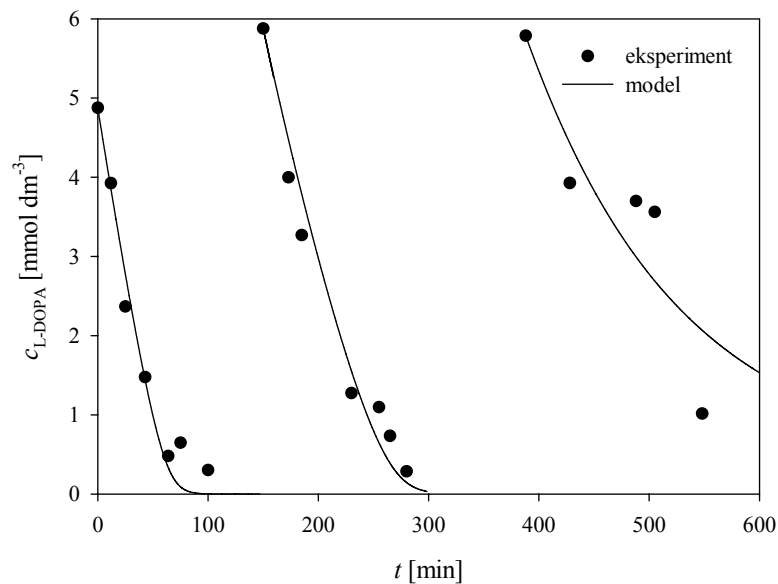


**Slika 5.21.** Procjena parametara Levenspiel-ovom metodom za pokus pri  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ .



Slika 5.22. Procjena parametara Levenspiel-ovom metodom za pokus pri  $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 5.3.4. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u ponovljivom šaržnom sustavu sa katalazom i L-AAO iz *Crotalus adamanteus*



Slika 5.23. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u ponovljivom šaržnom pokusu ( $c_{L-AAO} = 0,6150 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{katalaza}} = 1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Osim šaržnih eksperimenata u EMR proveden je i ponovljivi šaržni pokus biokatalitičke oksidacije L-DOPE. Dobiveni rezultati praćenja koncentracije L-DOPE tijekom eksperimenta su

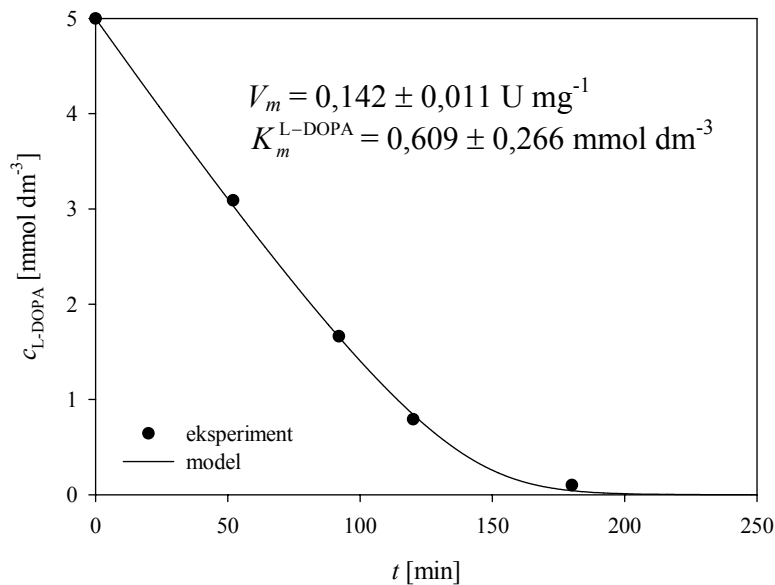


prikazani su na slici 5.23. Može se vidjeti da je u prvom ciklusu postignuta 100 %-tna konverzija nakon 100 minuta. U drugom je ciklusu reakcija bila nešto sporija. Ista konverzija je postignuta nakon 150 minuta. U trećem ciklusu 100 %-tna konverzija nije postignuta niti nakon 200 minuta što znači da je aktivnost enzima pala zbog deaktivacije enzima. Eksperimentalni rezultati su opisani pomoću kinetičkog modela koji uključuje brzinu deaktivacije enzima, te inhibiciju produktom. Optimalno procijenjeni parametri (Tablica 5.5.) u prvom ciklusu ukazuju da inhibicije produktom nema (vrijednost parametra je bila jako velika). Parametri procijenjeni za drugi ciklus ukazuju da postoji vremenska deaktivacija enzima, dok parametri procijenjeni za treći ciklus pokazuju da postoji i kompetitivna inhibicija produktom. To se može tumačiti time da je katalaza izgubila svoju aktivnost, pa se vodikov peroksid ne uklanja, ili da su se u reakcijskoj otopini pojavili neki drugi neželjeni produkti reakcije koji uzrokuju inhibiciju enzima oksidaze L-amino kiselina.

### 5.3.5. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u kontinuiranom sustavu sa katalazom u sustavu uz L-AAO iz *Crotalus adamanteus*

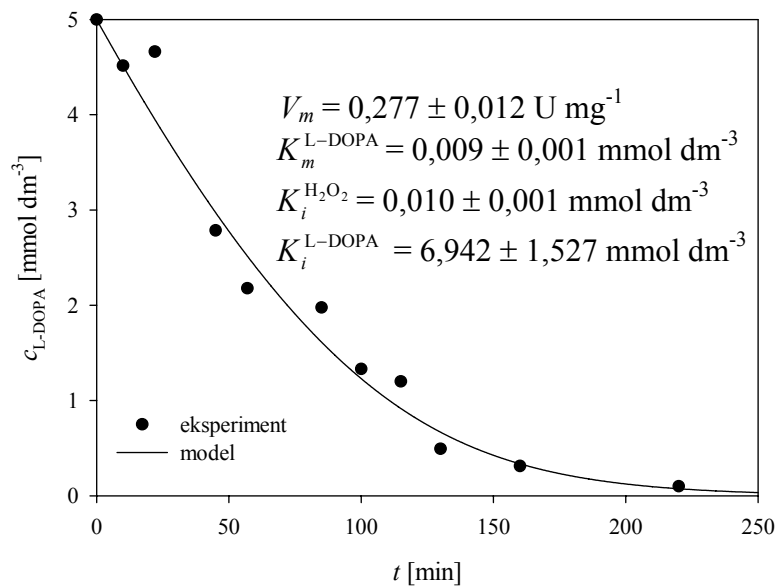
Reakciju oksidacije L-DOPE je bilo teško provesti u enzimskom membranskom reaktoru koji radi kao protočni kotlasti reaktor. Za kontinuiranu provedbu reakcije bilo je potrebno pripremiti veliku količinu otopina supstrata. Međutim, otopina supstrata u puferu je stabilna samo kroz određeno kratko vrijeme. Duljim stajanjem otopine u prisustvu zraka se sam supstrat, L-DOPA, oksidira, te otopina osim što mijenja svoj sastav, postaje heterogena jer nastaje crni netopljivi pigment nepoznatog sastava. Zbog toga dolazi do nakupljanja taloga na sterilnom filtru, te u klipovima pumpe, što naposljetku dovodi do začepljenja pumpe i do pucanja cijevi aparature. Osim toga, dio crnog pigmenta koji dospije u reaktor stvara dodatni otpor na membrani EMR-a, a isto tako deaktivira enzime. Pokazalo se da je produkt 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina vrlo nestabilna u takvoj otopini, pa bi trebalo izdvajati produkt *in situ*. Čuvanje otopine produkata u hladnjaku na  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  također ne pomaže, jer se analizom uzoraka visokotlačnom tekućinskom kromatografijom pokazalo da se kromatogram uzorka znatno mijenja nakon njegova zaleđivanja. Pri malom protoku supstrata je došlo do raspada otopine supstrata unutar klipova pumpe. Otopina supstrata je čuvana u ledu na  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  kako bi se usporio raspad reaktanta. Uz sve navedene probleme došlo je do kristalizacije fosfatnog pufera pri toj temperaturi. Pri početnoj koncentraciji L-DOPE  $5\text{ mmol dm}^{-3}$ , koncentracija enzima L-AAO je bila  $0,3075\text{ mg cm}^{-3}$ , a koncentracija katalaze  $2 \cdot 10^{-3}\text{ mg cm}^{-3}$ . Provedena su mjerenja pri nekoliko protoka (podaci nisu pokazani) i dostignuto je stacionarno stanje pri protoku od  $2,56\text{ cm}^3\text{ h}^{-1}$ ,  $\tau = 234\text{ min}$  (Slika 5.24.). Pri navedenom protoku

ostvorena je kratko vrijeme konverzija reaktanta od 100 % koja se može usporediti sa rezultatima dobivenim u šaržnom sustavu sa katalazom.



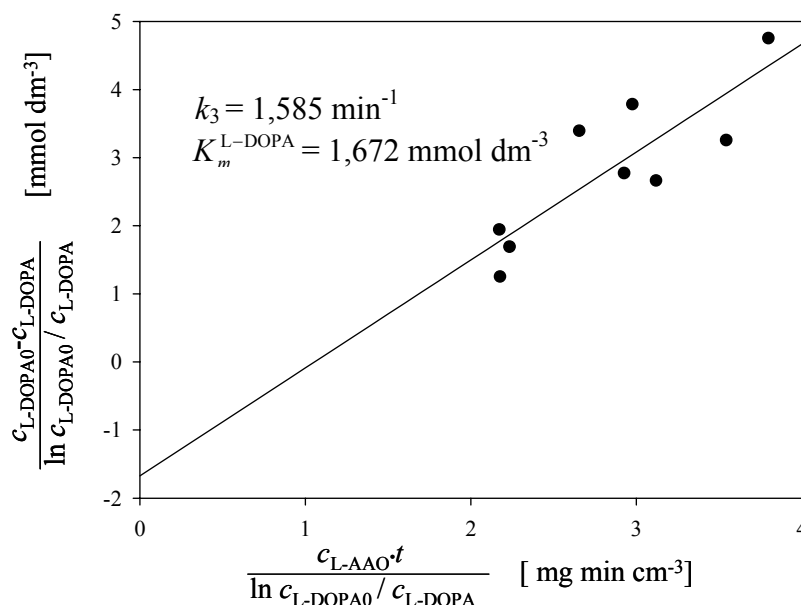
**Slika 5.24.** Biokatalitička oksidacija L-DOPE u kontinuiranom pokusu ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,3075 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{katalaza}} = 2,0 \cdot 10^{-3} \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $q_V = 2,56 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$ ,  $\tau = 234 \text{ min}$ ).

### 5.3.6. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u šaržnom sustavu bez katalaze uz L-AAO iz *Rhodococcus opacus*



**Slika 5.25.** Biokatalitička oksidacija L-DOPE bez katalaze u sustavu ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,0964 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Biokatalitička oksidacija L-DOPE je provedena sa L-AAO iz *R. opacus* u šaržnom sustavu. Rezultati eksperimenta bez katalaze u sustavu su prikazani na slici 5.25. Eksperimentalni rezultati su uspoređeni s rezultatima izračunatim pomoću modela enzimske kinetike koji uključuje kompetitivnu inhibiciju produktom (vodikovim peroksidom) i supstratom (Slika 5.25., Tablica 5.3.). Parametri modela su procijenjeni nelinearnom regresijom. Dobiveno je dobro slaganje eksperimentalnih podataka i rezultata izračunatih pomoću modela. Početna koncentracija L-DOPE je normirana na vrijednost  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$  kako bi se ovaj pokus mogao usporediti sa pokusom u kojem je dodana katalaza. Vrijednost Michaelis-Menten-ove konstante se dobro poklapa s vrijednošću koja je dobivena mjerenjima u kiveti spektrofotometra (Slika 5.10., Tablica 5.1.), dok je vrijednost parametra  $V_m$ , dobivena u reaktoru, nešto manja što se može pripisati deaktivaciji enzima koju uzrokuje povećana koncentracija vodikovog peroksida.

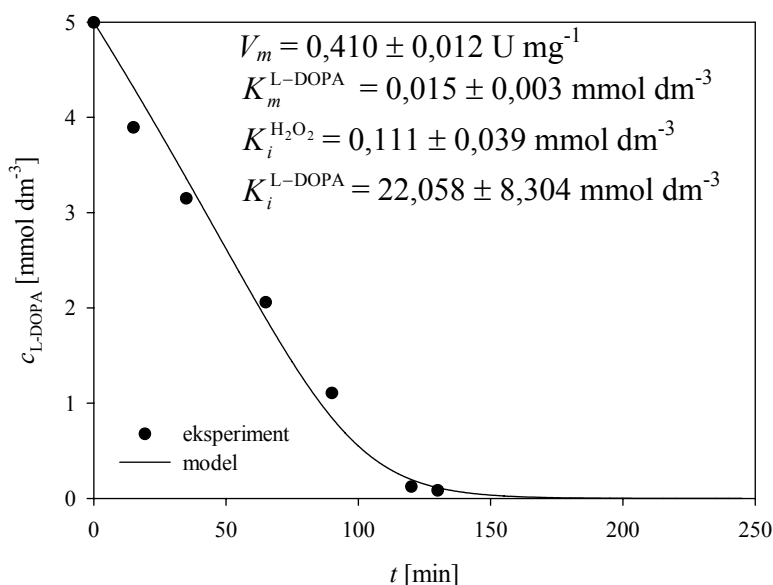


**Slika 5.26.** Procjena parametara Levenspiel-ovom metodom.

Na slici 5.26. su prikazani rezultati procjene parametara Levenspiel-ovom metodom koji ukazuju na visoku aktivnost enzima L-AAO iz *R. opacus* u odnosu na L-AAO iz *C. adamanteus*. Naime, katalitička konstanta enzima,  $k_3$ , je oko 10 puta veća za L-AAO iz *R. opacus* (Tablica 5.4.). Što se tiče prividne vrijednosti Michaelis-Menten-ove konstante procijenjene za L-AAO iz *R. opacus*, može se reći da je ona znatno veća od procijenjene kinetičkim mjerenjima u kiveti spektrofotometra (Slika 5.10., Tablica 5.1.) što ukazuje na postojanje znatne inhibicije enzima produktom.

### 5.3.7. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u šaržnom sustavu sa katalazom i L-AAO iz *Rhodococcus opacus*

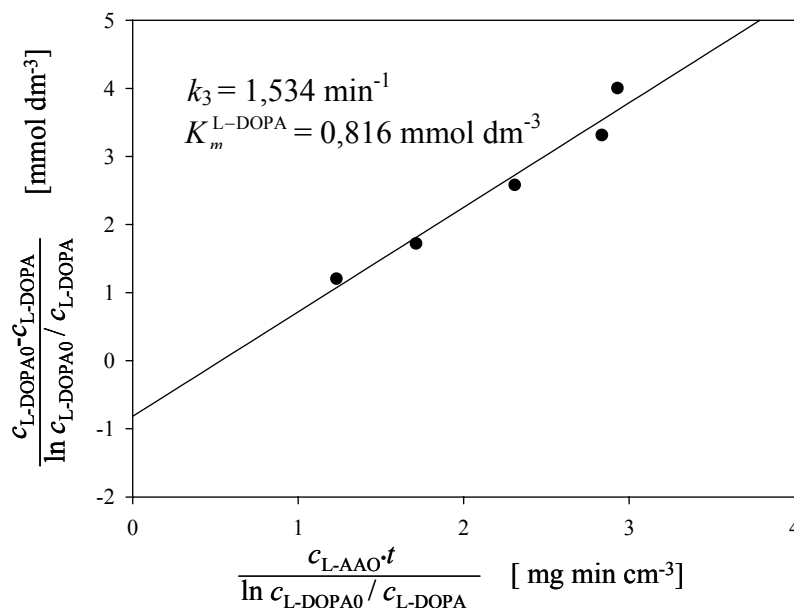
Na slici 5.27. su prikazani rezultati eksperimenta sa katalazom u sustavu. Ako se usporede sa rezultatima na slici 5.25., može se vidjeti da je u sustavu sa katalazom nakon 120 minuta postignuta približno 100 %-tna konverzija, dok je u sustavu bez katalaze za to vrijeme konverzija iznosila oko 85 %. Osim toga, bez obzira na prisustvo katalaze, čija je koncentracija bila znatno viša nego u sustavu sa *C. adamanteus*, iz procijenjenih se parametara daje zaključiti da inhibicija produktom i dalje postoji, što ukazuje ili na prenisku koncentraciju katalaze, ili nastajanje drugih produkata reakcije koji inhibiraju enzim.



**Slika 5.27.** Biokatalitička oksidacija L-DOPE sa katalazom u sustavu ( $c_{L-AAO} = 0,0964 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{katalaza} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{puffer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Na slici 5.28. su prikazani parametri procijenjeni Levenspiel-ovom metodom. Katalitička konstanta enzima se odlično poklapa sa vrijednošću procijenjenom za ovaj enzim u sustavu bez katalaze. Što se tiče vrijednosti prividne Michaelis-Menten-ove konstante, ona je veća od vrijednosti procijenjene u kiveti spektrofotometra za ovaj enzim (Slika 5.10, Tablica 5.1.), no znatno manja od vrijednosti procijenjene Levenspiel-ovom metodom u eksperimentu provedenom bez katalaze (Slika 5.26., Tablica 5.3.). To upućuje na zaključak da postoji inhibicija enzima, iako je katalaza prisutna.

Parametri procijenjeni Levenspiel-ovom metodom su za sve eksperimente prikazani i uspoređeni u tablici 5.4.



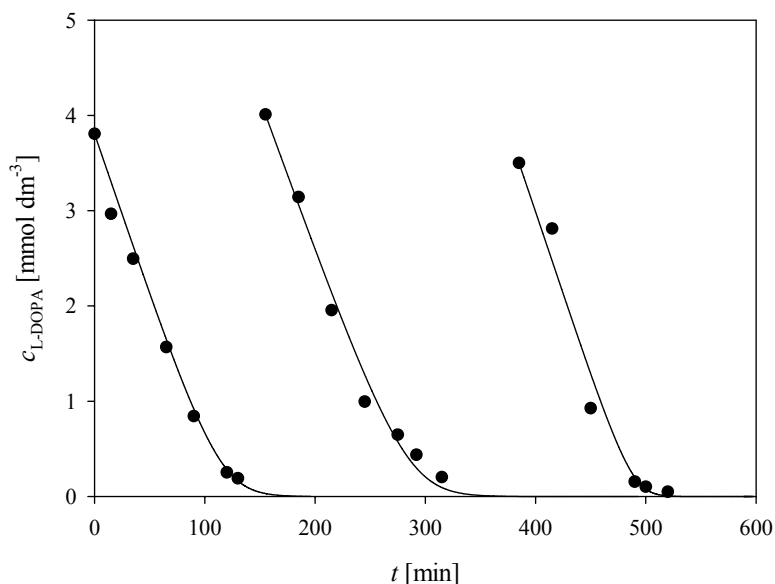
**Slika 5.28.** Procjena parametara Levenspiel-ovom metodom.

Kako bi se pokazalo je li katalaza razgradila sav vodikov peroksid na kraju reakcije, proveden je slijedeći eksperiment. Krajnji uzorak jednog šaržnog eksperimenta u kojem je korištena katalaza je profiltriran, čime su uklonjeni enzimi. HPLC-om je ispitivana stabilnost tog uzorka u vremenu praćenjem promjena na kromatogramima. Pokazalo se da se izgled kromatograma vrlo brzo mijenjao u vremenu, što ukazuje na prisustvo vodikovog peroksida u otopini, koji je katalizirao kemijsku dekarboksilaciju 3,4-dihidroksifenilpirogroždane kiseline u 3,4-dihidroksifeniloctenu kiselinu, koja je dokazana u otopini. Posljedica su 2 pika na HPLC kromatogramu krajnjeg uzorka.

U drugom eksperimentu je krajnjem uzorku nakon uklanjanja enzima filtriranjem dodana svježa katalaza. Promatrana je promjena izgleda HPLC kromatograma. Pokazalo se da je u ovom slučaju stabilnost otopine daleko veća, odnosno izgled kromatograma se mijenjao sporije.

### 5.3.8. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u ponovljivom šaržnom sustavu sa katalazom i L-AAO iz *Rhodococcus opacus*

Ponovljivi šaržni eksperiment u kojem je provedena oksidacija L-DOPE sa L-AAO iz *R. opacus* ukazuje na visoku stabilnost ovog enzima. L-DOPA je dodavana u 3 ciklusa po 5 mmol dm<sup>-3</sup> (Slika 5.29.). Pokus je proveden uz katalazu u sustavu kako bi se uklonio vodikov peroksid. Prilikom ovog eksperimenta je praćena operacijska stabilnost enzima u reaktoru. Naime, uzorak reakcijske smjese je uziman direktno iz reaktora, te je u kiveti mjerena aktivnost L-AAO uobičajenim enzimskim testom.



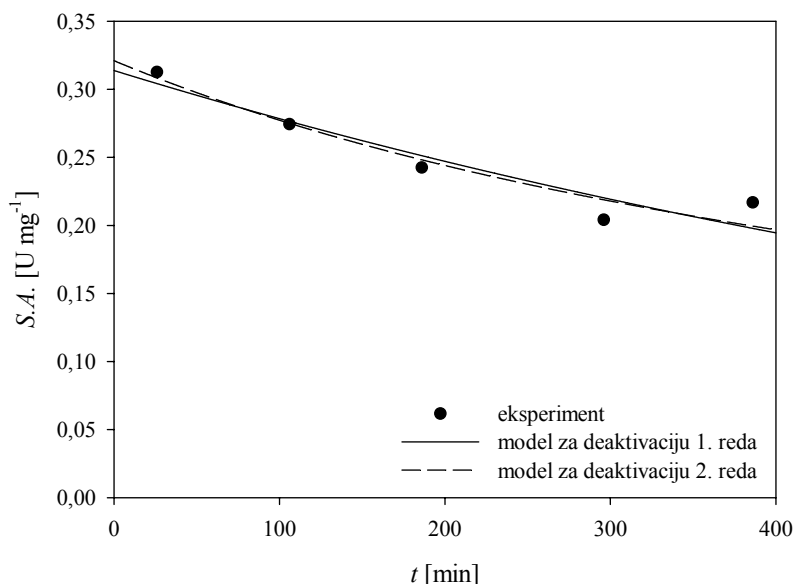
**Slika 5.29.** Biokatalitička oksidacija L-DOPE u ponovljivom šaržnom pokusu ( $c_{L-AAO} = 0,0964 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{katalaza} = 4 \cdot 10^{-3} \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{pufner} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Rezultati ispitivanja operacijske stabilnosti enzima L-AAO iz *R. opacus* su prikazani na slici 5.30. Pokazuju da aktivnost enzima neznatno opada, pa se može zaključiti da se radi o relativno stabilnom enzimu. U tri ciklusa je nakon gotovo istog reakcijskog vremena od oko približno 120 minuta ostvarena 100 %-tna konverzija reaktanta. Procijenjeni su parametri modela enzimске kinetike uz inhibiciju supstratom i produktom, te uz vremensku deaktivaciju enzima (Tablica 5.5.).

Tijekom provedbe oksidacije L-DOPE dolazi do obojenja reakcijske otopine u lagano žućkastu boju što ukazuje na raspad željenog produkta 3,4-dihidroksifenilpirogroždane kiseline, i nastajanje nusprodukta koji stvara obojenje reakcijske otopine – 3,4-dihidroksifeniloctene kiseline koja je smeđkasti prašak u čistom stanju. Prisutno obojenje otežava točno mjerenje aktivnosti

enzima u reaktoru, pa je mjerenje operacijske stabilnosti enzima bilo moguće samo u prvih 400 minuta reakcije dok je čitav pokus trajao oko 600 minuta.

### 5.3.9. Ispitivanje operacijske stabilnosti enzima L-AAO iz *Rhodococcus opacus*



#### deaktivacija 1. reda

$$V_{m0} = 0,313 \pm 0,027 \text{ U mg}^{-1}$$

$$k = 1,20 \cdot 10^{-3} \pm 2,3 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$$

$$\text{MSC} = 2,00$$

$$\text{Korelacija} = 0,96$$

$$\text{Suma kvadrata odstupanja} = 0,419$$

#### deaktivacija 2. reda

$$V_{m0} = 0,321 \pm 0,015 \text{ U mg}^{-1}$$

$$k = 4,91 \cdot 10^{-3} \pm 1,16 \cdot 10^{-3} \text{ mg min U}^{-1}$$

$$\text{MSC} = 1,81$$

$$\text{Korelacija} = 0,96$$

$$\text{Suma kvadrata odstupanja} = 0,503$$

Slika 5.30. Rezultati ispitivanja operacijske stabilnosti enzima L-AAO iz *R. opacus* pri 25 °C.

Tablica 5.3. Pregled parametara procijenjenih integralnom metodom iz eksperimentalnih podataka dobivenih u EMR.

Podrijetlo L-AAO	$T$ [°C]	katalaza	$V_m$ [U mg <sup>-1</sup> ]	$K_m^{\text{L-DOPA}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$K_i^{\text{H}_2\text{O}_2}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]	$K_i^{\text{L-DOPA}}$ [mmol dm <sup>-3</sup> ]
<i>C. adamanteus</i>	25	-	0,116 ± 0,022	0,600 ± 0,108	2,687 ± 0,958	-
	25	+	0,170 ± 0,010	0,600 ± 0,099	-	-
	40	+	0,146 ± 0,010	0,580 ± 0,274	-	-
<i>R. opacus</i>	25	-	0,277 ± 0,012	0,009 ± 0,001	0,010 ± 0,001	6,942 ± 1,527
	25	+	0,410 ± 0,012	0,015 ± 0,003	0,111 ± 0,039	22,058 ± 8,304

Eksperimentalni rezultati prikazani na slici 5.30. su uspoređeni sa rezultatima izračunatim pomoću dva modela; vremenske deaktivacije prvog i vremenske deaktivacije drugog reda. Osim konstante deaktivacije, procijenjena je i početna aktivnost otopine enzima dana parametrom  $V_{m0}$ . Ova vrijednost se vrlo dobro podudara sa vrijednošću dobivenom ispitivanjem kinetike za ovaj enzim u kivetu (Tablica 5.1.). Oba modela dobro opisuju eksperimentalne rezultate, međutim vrijednost kriterija za odabir modela za model deaktivacije prvog reda je iznosio 2,00 i veći je od

istog kriterija za model deaktivacije drugog reda koji je iznosio 1,81. Isto tako suma kvadrata odstupanja je nešto veća za model deaktivacije drugog reda.

**Tablica 5.4.** Pregled parametara procijenjenih Levenspiel-ovom metodom.

Podrijetlo L-AAO	$T$ [°C]	katalaza	$k_3$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$K_m^{\text{L-AAO}}$ [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]
<i>C. adamanteus</i>	25	-	0,114	0,805
	25	+	0,164	0,621
	40	+	0,149	0,640
<i>R. opacus</i>	25	-	1,585	1,672
	25	+	1,534	0,816

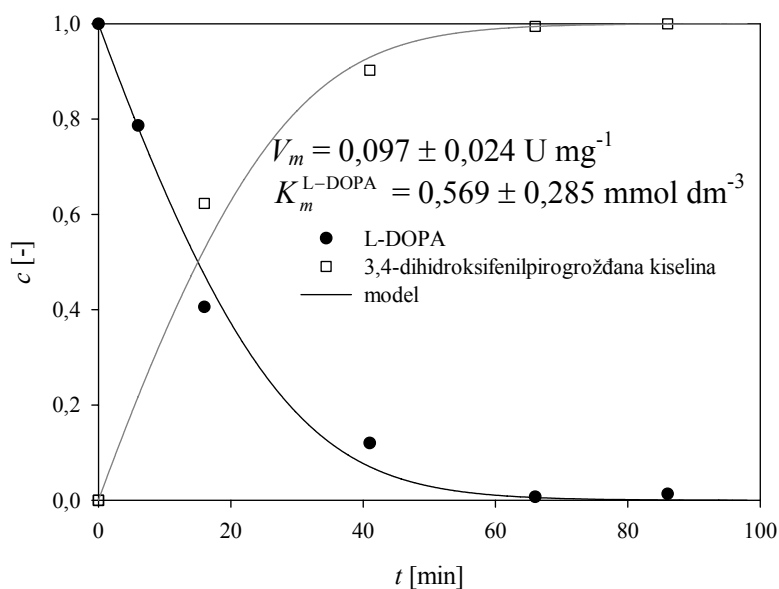
**Tablica 5.5.** Pregled parametara procijenjenih integralnom metodom za ponovljive šaržne eksperimente.

<i>C. adamanteus</i>					
	$V_m$ [ $\text{U mg}^{-1}$ ]	$K_m^{\text{L-DOPA}}$ [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]	$K_i^{\text{H}_2\text{O}_2}$ [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]	$K_i^{\text{L-DOPA}}$ [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ]	$k_d$ [ $\text{min}^{-1}$ ]
<b>1. ciklus</b>	$0,161 \pm 0,010$	$0,560 \pm 0,215$	-	-	-
<b>2. ciklus</b>	$0,165 \pm 0,010$	$0,530 \pm 0,179$	-	-	$0,00253 \pm 0,0003$
<b>3. ciklus</b>	$0,152 \pm 0,030$	$0,523 \pm 0,356$	$0,771 \pm 0,728$	-	$0,00204 \pm 0,0004$
<i>R. opacus</i>					
<b>1. ciklus</b>	$0,410 \pm 0,012$	$0,015 \pm 0,003$	$0,111 \pm 0,039$	$22,058 \pm 8,304$	-
<b>2. ciklus</b>	$0,410 \pm 0,027$	$0,015 \pm 0,008$	$0,111 \pm 0,059$	$22,058 \pm 19,617$	$0,00034 \pm 0,00027$
<b>3. ciklus</b>	$0,410 \pm 0,030$	$0,015 \pm 0,007$	$0,118 \pm 0,054$	$22,058 \pm 18,529$	$4,0 \cdot 10^{-7} \pm 1,7 \cdot 10^{-7}$

### 5.3.10. Biokatalitička oksidacija L-DOPE pri visokoj koncentraciji katalaze

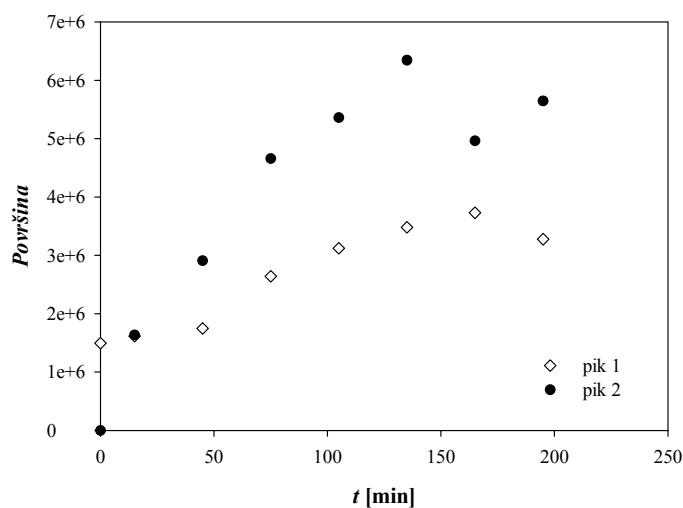
Proveden je eksperiment biokatalitičke oksidacije L-DOPE pri početnoj koncentraciji L-DOPE  $3,83 \text{ mmol dm}^{-3}$  u fosfatnom puferu ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8). Koncentracija L-AAO iz *C. adamanteus* u reaktoru je bila  $0,6150 \text{ mg cm}^{-3}$ , a koncentracija katalaze  $0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ . Pri navedenim uvjetima je praćena promjena koncentracije L-DOPE i produkata HPLC-om. Dobiveni rezultati (Slika 5.31.) pokazuju da u navedenim uvjetima na HPLC-u vidljiv samo jedan produkt, 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina. Eksperimentalni rezultati su opisani modelom Michaelis-Menten-ove enzimске kinetike sa uključenom kompetitivnom inhibicijom vodikovim peroksidom. Parametri modela se odlično slažu sa vrijednostima procijenjenim ranije za ovaj enzim (Tablica 5.3.).





**Slika 5.31.** Biokatalitička oksidacija L-DOPE u fosfatnom puferu ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $c_{\text{L-AAO}} = 0,6150 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{katalaze}} = 0,1 \text{ mg cm}^{-3}$ ).

### 5.3.11. Praćenje reakcije biokatalitičke oksidacije L-DOPE preko promjene koncentracije produkta



**Slika 5.32.** Praćenje nastanka produkata reakcije visokotlačnom tekućinskom kromatografijom u eksperimentu u EMR-u sa L-AAO iz *C. adamanteus* ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,3690 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{katalaza}} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8,  $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$ ).

Obzirom da kolona koja se koristila za detekciju L-DOPE nije bila pogodna za detekciju produkta ili produkata reakcije, proveden je pokus u kojem se pratila samo koncentracija produkata. Eksperiment je proveden pri početnoj koncentraciji L-DOPE  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ , u fosfatnom puferu ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,8), uz enzim L-AAO iz *C. adamanteus* koncentracije  $0,369 \text{ mg cm}^{-3}$  i koncentraciji katalaze  $1 \cdot 10^{-3} \text{ mg cm}^{-3}$ . Ovdje je korištena kolona za organske kiseline LiChrosorb 100, C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ ).

Na slici 5.32. je prikazana promjena površina pikova kromatograma tijekom pokusa. Retencijska vremena su bila 4 i 4,9 minuta. Ta dva pika ukazuju da reakcijom oksidacije L-DOPE ne nastaje samo jedan produkt 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina, već i 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina, koja je i identificirana uz postojeći standard.

### 5.4. BOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-DOPE U SUPERKRITIČNOM CO<sub>2</sub>

#### 5.4.1. Ispitivanje ponašanja L-DOPE u superkritičnom CO<sub>2</sub>

Jedan od prvih koraka kod ispitivanja reakcijskih sustava u superkritičnim fluidima (SC) je promatranje topljivosti supstrata u superkritičnom fluidu, te ispitivanje aktivnosti i stabilnosti enzima. Obzirom da je L-DOPA slabo topljiva u čitavom nizu otapala, bilo da se radi o polarnim ili nepolarnim, bilo je za očekivati da će biti slabo topljiva i u nepolarnom superkritičnom CO<sub>2</sub>. Eksperiment je proveden pri 40 °C, pri čemu se tlak postepeno povećavao do oko 200 bara, jer pojedini kemijski spojevi pokazuju različitu topljivost ovisno o tlaku, pa je bilo potrebno ispitati hoće li tlak utjecati na otapanje L-DOPE u superkritičnom CO<sub>2</sub>. Mjerenje je provedeno u optičkoj ćeliji koja omogućava promatranje mješljivosti kroz safirno okno ili kamerom. Dobiveni rezultati su pokazali da je L-DOPA netopljiva u superkritičnom CO<sub>2</sub>, bez obzira na promjenu tlaka u sustavu.

#### 5.4.2. Ispitivanje ponašanja enzima L-AAO iz *Crotalus adamanteus* u superkritičnom CO<sub>2</sub>

Pretraživanje literature je pokazalo da je ponašanje L-AAO u superkritičnom CO<sub>2</sub> neistraženo. Stoga je bilo zanimljivo ispitati kako će se L-AAO ponašati u superkritičnim uvjetima jer u literaturi postoji niz radova u kojima se govori o reakcijama enzimske oksidacije i enantioselektivne sinteze u superkritičnim fluidima [46].

Ispitivanje je provedeno za L-AAO iz *C. adamanteus* jer je on bio dostupan u praškastom obliku i dovoljnoj količini. L-AAO iz *C. adamanteus* je bio izložen tlaku od 110 bara i temperaturi 40 °C 24 sata. Rezultati mjerenja aktivnosti pokazali su da superkritični CO<sub>2</sub> nema

negativnog utjecaja na aktivnost enzima, odnosno aktivnost enzima prije i poslije izlaganja ovim uvjetima se nije bitno promijenila. Aktivnost enzima od  $0,087 \text{ U mg}^{-1}$  je bila izmjerena prije i  $0,100 \text{ U mg}^{-1}$  poslije izlaganja superkritičnom  $\text{CO}_2$  (Tablica 5.6.). Aktivnosti su određene već opisanim enzimskim testom uz L-DOPU kao supstrat pri njenoj koncentraciji od  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ . Do razlike u ovim aktivnostima je došlo vjerojatno zbog pročišćavanja enzima u superkritičnom  $\text{CO}_2$ . Naime, poznato je da se superkritični  $\text{CO}_2$  može koristiti za pročišćavanje uzoraka enzima [32], kada su prisutna onečišćenja topljiva u supekritičnom  $\text{CO}_2$ . Enzimi, naime, nisu topljivi u superkritičnom  $\text{CO}_2$ . Ovim se eksperimentom potvrdilo da L-AAO iz *C. adamanteus* dobro podnosi superkritične uvjete te zadržava katalitičku aktivnost, pa se može upotrijebiti za provođenje enzimske reakcije u superkritičnom  $\text{CO}_2$ .

**Tablica 5.6.** Specifična aktivnost enzima prije i nakon izlaganja enzima L-AAO iz *C. adamanteus* superkritičnim uvjetima ( $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $110 \text{ bar}$ ,  $24 \text{ h}$ ).

	S.A. [ $\text{U mg}^{-1}$ ]
Prije izlaganja SC- $\text{CO}_2$	0,087
Poslije izlaganja SC- $\text{CO}_2$	0,100

#### 5.4.3. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u superkritičnom $\text{CO}_2$

Prednost provođenja enzimske sinteze u superkritičnom fluidu je mogućnost izdvajanja produkta *in situ* nakon reakcije ukoliko je on topiv u SC- $\text{CO}_2$ . Stoga su provedena tri eksperimenta: u fosfatnom puferu bez katalaze i sa katalazom, te bez pufera sa katalazom. Rezultati su pokazani u tablici 5.7.

#### 5.4.4. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u superkritičnom $\text{CO}_2$ u sustavu bez katalaze

Reakcija je provedena pri tlaku od  $100 \text{ bara}$  i temperaturi  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  u vremenu od  $3 \text{ sata}$ . Obzirom da tijekom reakcije iz reaktora nije bilo moguće vaditi uzorke, uzorak je uzet samo na kraju pokusa, te je obzirom na početnu koncentraciju L-DOPE proračunata njena konverzija. Mjerena je aktivnost enzima nakon reakcije. U reaktor je dodano  $20 \text{ cm}^3$  fosfatnog pufera ( $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$  i pH 7,8) i masa L-DOPE  $0,0203 \text{ g}$  ( $c_{\text{L-DOPA}} = 5,15 \text{ mmol dm}^{-3}$ , preračunato na  $20 \text{ cm}^3$  pufera), te masa enzima L-AAO od  $14,2 \text{ mg}$  ( $c_{\text{L-AAO}} = 0,71 \text{ mg cm}^{-3}$ , preračunato na  $20 \text{ cm}^3$ ).

pufera). U reaktor je uvođen CO<sub>2</sub> sve dok nije postignut tlak od 100 bara. Reaktor je termostatiran na uljnoj kupelji na 40 °C.

Analizom krajnjeg uzorka visokotlačnom tekućinskom kromatografijom dobiven je kromatogram (Slika 5.35.) koji se podudara sa onima dobivenim u EMR (Slika 5.33.). Time je pokazano da se reakcija u SC-CO<sub>2</sub> dogodila, te nastaju isti produkti kao i u EMR-u. Kako bi se isključila mogućnost pogreške analize uzorka napravljena su različita razrjeđenja krajnjeg uzorka u 0,1 mol dm<sup>-3</sup> HCl, no sva su pokazala jednaku krajnju vrijednost koncentracije L-DOPE, koja je iznosila 2 mmol dm<sup>-3</sup>. Iz toga se može izračunati da se radi o 61 % -tnoj konverziji. Ako se taj rezultat uspoređi sa onim dobivenim u EMR-u s istim enzimom, valja primijetiti da je konverzija u SC-CO<sub>2</sub> manja. Razlog tome može biti nedostatak kisika, koji je jedan od supstrata u reakciji, a čije je otapanje u otopini, kao i u SC-CO<sub>2</sub> ograničeno (općenito je koncentracija kisika u boci CO<sub>2</sub> neznatna). Stoga je nedostatak jednog od supstrata, u ovom slučaju kisika, bio limitirajući za ovu reakciju.

Aktivnost enzima L-AAO u reakcijskoj otopini je mjerena 10 sati nakon početka reakcije u SC-CO<sub>2</sub>, jer je reakcijska otopina stajala još oko 7 sati pri uvjetima normalnog tlaka i temperature od oko 0 °C. Izmjerena je aktivnost od 0,121 U mg<sup>-1</sup>, što ukazuje na činjenicu da enzim nije kroz 10 sati izgubio aktivnost.

### 5.4.5. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u superkritičnom CO<sub>2</sub> u sustavu sa katalazom

U reaktor za provedbu oksidacije L-DOPE u SC-CO<sub>2</sub> je dodan volumen fosfatnog pufera 20 cm<sup>3</sup> (0,2 mol dm<sup>-3</sup> i pH 7,8), masa L-DOPE 0,0243 g ( $c_{L-DOPA} = 6,16 \text{ mmol dm}^{-3}$ , preračunato na 20 cm<sup>3</sup> pufera), masa enzima L-AAO 14,2 mg ( $c_{L-AAO} = 0,71 \text{ mg cm}^{-3}$ , preračunato na 20 cm<sup>3</sup> pufera), te katalaza u koncentraciji od 0,02 mg cm<sup>-3</sup> (preračunato na 20 cm<sup>3</sup> pufera). Reakcija je provedena u vremenu od 3 sata. Dobiveni rezultati analize uzorka nakon 3 sata pokazuju da je ostvarena 51 %-tna konverzija L-DOPE. Bilo je za očekivati da će konverzija u reakciji sa katalazom biti nešto veća od one u reakciji bez katalaze. To se nije dogodilo jer se nije moglo utvrditi točno vrijeme reakcije u oba slučaja, zbog ispuštanja CO<sub>2</sub> iz sustava, odnosno spuštanja tlaka koje traje određeno vrijeme, a za to vrijeme reakcija i dalje napreduje. Kromatogram dobiven analizom uzorka iz reaktora je prikazan na slici 5.36. i iz njega se može vidjeti da je produkt isti kao i onaj dobiven u EMR-u (Slika 5.33.).

Aktivnost enzima je također mjerena nakon reakcije. Reakcijska je otopina pri tome stajala oko 20 sati na hladnom (oko 0°C). Izmjerena aktivnost enzima 0,084 U mg<sup>-1</sup> je nešto manja zbog eksperimentalne pogreške.

#### 5.4.6. Biokatalitička oksidacija L-DOPE u sustavu bez pufera sa katalazom

U reaktor je dodano 0,2346 g L-DOPE i 32,2 mg enzima L-AAO. Kako bi se osigurala barem malena količina vode potrebna za reakciju, dodana je katalaza u volumenu od 60  $\mu\text{L}$  ( $c_{\text{katalaza}} = 20 \text{ mg cm}^{-3}$ ), jer je upravo taj volumen vode moguće otopiti u SC- $\text{CO}_2$ . Reakcija je provedena kroz 3 sata pri tlaku od 100 bara i 40 °C (proračunato iz opće plinske jednadžbe). Obzirom da je na kraju dobiven suhi produkt koji se prilikom ispuštanja  $\text{CO}_2$  iz reaktora raspršio po reaktoru, količinu proreagirale L-DOPE, odnosno njenu konverziju, je bilo nemoguće kvantificirati. Valja uzeti u obzir, da je u ovom sustavu, reakcija bila limitirana količinom vode, te količinom kisika, pa je bilo za očekivati da će konverzija biti niska. Međutim kako je u reakciji bila prisutna katalaza, dio kisika i vode je nastao raspadom vodikovog peroksida. Mjerena je aktivnost enzima L-AAO nakon provedenog pokusa i ustanovljeno je da je zadržao aktivnost.

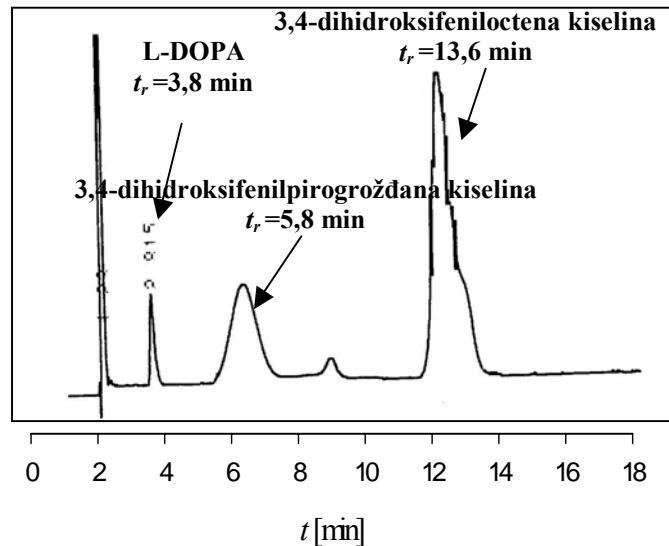
Rezultati analize tekućinskom kromatografijom (Slika 5.37.) pokazuju da je produkt reakcije 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina. Obzirom da ona nastaje reakcijom vodikovog peroksida sa primarnim reakcijskim produktom, 3,4-dihidroksifenilpirogroždanom kiselinom, za očekivati je da je u otopini morala postojati i 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina u manjoj koncentraciji, koju nije moguće detektirati na ovaj način. Moguće je da se 3,4-dihidroksifenilpirogroždana kiselina otapa u superkritičnom  $\text{CO}_2$ , te da je prilikom njegovog ispuštanja iz sustava, došlo do ispuštanja 3,4-dihidroksifenilpirogroždane kiseline.

**Tablica 5.7.** Rezultati oksidacije L-DOPE u SC- $\text{CO}_2$  i usporedba s pokusom u EMR-u pri 40 °C.

Sustav	Pufer	Katalaza	S. A. [ $\text{U mg}^{-1}$ ]	$X_{\text{L-DOPA}}$ [%]
EMR	Fosfatni	+	0,146	100
Superkritični $\text{CO}_2$	Fosfatni	-	0,121	61
Superkritični $\text{CO}_2$	Fosfatni	+	0,084	51
Superkritični $\text{CO}_2$	-	+	Aktivan	Nije mjereno

## 5.5. KARAKTERIZACIJA PRODUKTA

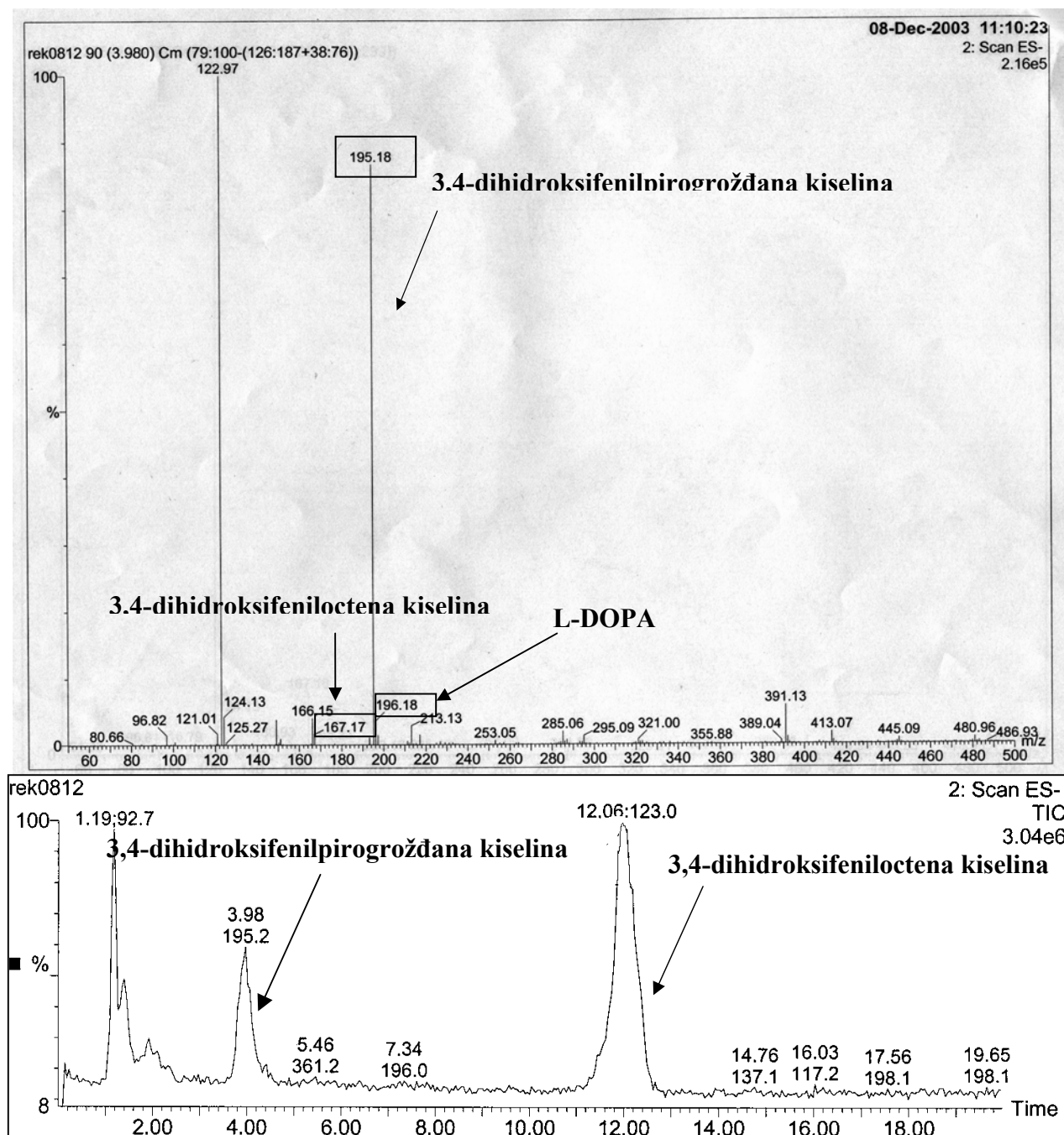
## 5.5.1. Praćenje nastanka produkta visokotlačnom tekućinskom kromatografijom



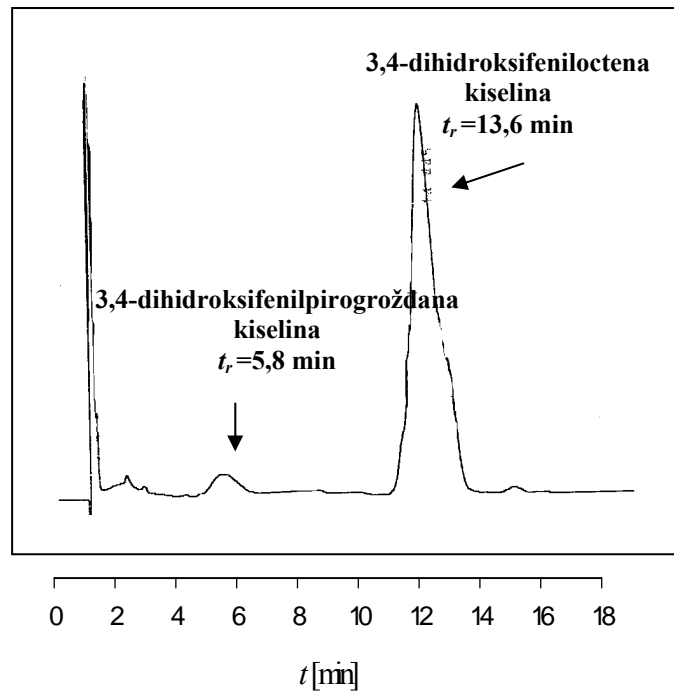
**Slika 5.33.** Kromatogram krajnjeg uzorka dobiven iz eksperimenta provedenog u EMR sa katalazom (kolona LiChrosfer 100 – praćena koncentracija L-DOPE).

Na slici 5.33. je prikazan kromatogram uzorka na kraju reakcije oksidacije L-DOPE koja je provedena u enzimskom membranskom reaktoru uz prisustvo katalaze. Na slici se može vidjeti da u krajnjem uzorku, osim neproreagirane L-DOPE postoje još dva pika. Prvi, s retencijskim vremenom 5,8 minuta je keto-DOPA, što je potvrdila analiza pomoću tekućinske kromatografije sa masenim detektorom (LC-MS) (slika 5.34.), a drugi pik je 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina koja nastaje raspadom 3,4-dihidroksifenilpirogroždane kiseline u prisustvu vodikovog peroksida.

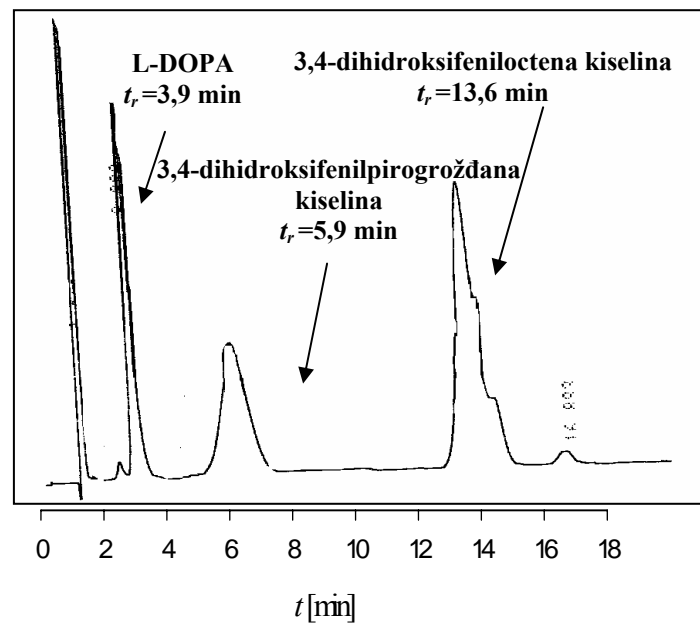
Što se pak tiče rezultata analize uzoraka dobivenih reakcijom u superkritičnom CO<sub>2</sub>, čiji su kromatogrami prikazani na slikama 5.35. i 5.36., vidi se da se ne razlikuju bitno od onog dobivenog u EMR-u (Slika 5.33.). Razlika ipak postoji među uzorcima u reakcijama sa i bez katalaze. Naime, obzirom da se radi o koncentriranim uzorcima, čije bi koncentracije trebale biti vrlo bliske, može se primjetiti da je pik 3,4-dihidroksifenilpirogroždane kiseline u uzorku iz reakcije sa katalazom znatno veći, što bi značilo da katalaza stabilizira 3,4-dihidroksifenilpirogroždanu kiselinu jer se uklanja vodikov peroksid. Valja isto tako uzeti u obzir da su ova dva uzorka stajala na hladnom oko 7 sati nakon reakcije, pa je sigurno i to utjecalo na rezultate analize.



**Slika 5.34.** Kromatogram krajnjeg uzorka reakcijske otopine iz eksperimenta provedenog u EMR i prisustvu katalaze (LC-MS).

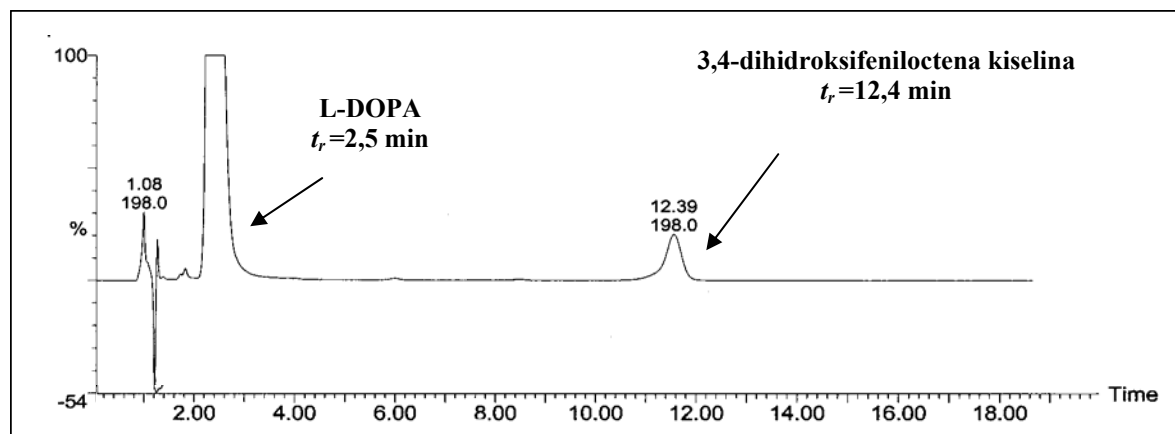


**Slika 5.35.** Kromatogram krajnjeg koncentriranog uzorka keto-DOPE iz eksperimenta provedenog u superkritičnom  $\text{CO}_2$  bez katalaze (kolona LiChrosfer 100 – praćena koncentracija L-DOPE).



**Slika 5.36.** Kromatogram krajnjeg koncentriranog uzorka keto-DOPE iz eksperimenta provedenog u superkritičnom  $\text{CO}_2$  sa katalazom (kolona LiChrosfer 100 – praćena koncentracija L-DOPE).





**Slika 5.37.** Kromatogram krajnjeg koncentriranog uzorka keto-DOPE iz eksperimenta provedenog u superkritičnom CO<sub>2</sub> bez pufera (kolona LiChrosfer 100 – praćena koncentracija L-DOPE-zbog eluenta sa mravljom kiselinom su vremena zadržavanja komponenti na koloni manja).

Na slici 5.37. je prikazan kromatogram krajnjeg uzorka iz eksperimenta provedenog u superkritičnom CO<sub>2</sub> bez pufera. Osim pika L-DOPE, čija veličina ukazuje na nisku reakcijsku konverziju, prisutan je pik 3,4-dihidroksifenilactene kiseline. Prisustvo 3,4-dihidroksifenilactene kiseline u uzorku direktno ukazuje na prisustvo primarnog produkta 3,4-dihidroksifenilpirogroždane kiseline čija je koncentracija bila preniska da bi se mogla detektirati na ovaj način.

## 6. ZAKLJUČAK

Ispitana je aktivnost dvije oksidaze L-amino kiselina iz *C. adamanteus* i *R. opacus* na L-DOPU kao supstrat. Pokazalo se da su oba enzima aktivna na ovaj supstrat. L-AAO iz *R. opacus* je specifičnija na L-DOPU od L-AAO iz *C. adamanteus* jer je  $K_m^{L-DOPA}$  procijenjena za taj enzim manja ( $0,015 \text{ mmol dm}^{-3}$ ) od vrijednosti procijenjene za L-AAO iz *C. adamanteus* ( $0,527 \text{ mmol dm}^{-3}$ ). Također je pokazano da je L-AAO iz *R. opacus* aktivnija na L-DOPU jer je procijenjena vrijednost  $V_m$  veća ( $0,384 \text{ U mg}^{-1}$ ) od vrijednosti procijenjene za L-AAO iz *C. adamanteus* ( $0,121 \text{ U mg}^{-1}$ ).

Za uklanjanje vodikovog peroksida iz sustava je korištena katalaza iz govede jetre. Osim negativnog utjecaja na enzime (uzrokujući njihovu deaktivaciju i denaturaciju), vodikov peroksid utječe i na raspad primarnog produkta 3,4-dihidroksifenilpirogroždane kiseline u odgovarajuću karboksilnu kiselinu, koja je u ovom slučaju 3,4-dihidroksifeniloctena kiselina.

Visoka vrijednost Michaelis-Menten-ove konstante,  $K_m^{H_2O_2}$ , onemogućava katalazu iz govede jetre da bude u potpunosti učinkovita pri uklanjanju vodikovog peroksida što je i pokazano rezultatima jer je produkt raspada osnovnog produkta 3,4-dihidroksifenilpirogroždane kiseline uvijek prisutan u sustavu.

Parametri modela procijenjeni iz eksperimentalnih podataka dobivenih mjerenjima u kiveti spektrofotometra se odlično slažu sa parametrima modela procijenjenih iz eksperimentalnih podataka dobivenih u enzimskom membranskom reaktoru.

Parametri procijenjeni Levenspiel-ovom metodom omogućavaju procjenu katalitičke konstante enzima,  $k_3$ , koja se u slučaju L-AAO iz *R. opacus* pokazala deseterostruko većom od vrijednosti procijenjene za L-AAO iz *C. adamanteus*, što ukazuje na već spomenutu veću aktivnost L-AAO iz *R. opacus*. Procijenjene vrijednosti prividne Michaelis-Menten-ove konstante ukazuju na prisustvo ili odsustvo inhibicije produktom, koja je pretpostavljena kinetičkim modelom. U ovom se slučaju vrijednosti konstanti također dobro poklapaju sa vrijednostima procijenjenim pomoću modela integralnom metodom iz ovisnosti koncentracija-vrijeme.

Izlaganje L-AAO iz *C. adamanteus* superkričnom  $CO_2$  je rezultiralo povećanom aktivnosti enzima. Provedba biokatalitičke oksidacije L-DOPE u SC- $CO_2$  je moguća uz produkte jednake onima dobivenim u EMR.

---

## 7. LITERATURA

1. **Asther M., Meunier J.C.:** Immobilization as a tool for the stabilization of lignin produced by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12, *Appl Biochem Biotechnol* 38 (1993) 57.
2. **Bachmann R., Bastianelli E., Riese J., Schlenzka W.:** Using plants as plants, *McKinsley Quarterly* (2000) 93.
3. **Balaban M.O., Marshall M.R., Wicker L.:** Inactivation of enzymes in foods with pressurized CO<sub>2</sub>, U.S. Patent 5,393,547, 1989.
4. **Bauer C., Steinberger D.-J., Schlauer G., Gamse T., Marr R.:** Activation and denaturation of hydrolases in dry and humid supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>), *J of Supercrit Fluids* 19 (2000) 79.
5. **Bes T., Gomez-Moreno C., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R.:** Selective oxidations: Stabilization by multipoint covalent attachment of ferredoxin NADP-reductase, an interesting cofactor recycling enzyme, *J Mol Catal A-Chem* 98 (1995) 161.
6. *Biochemica information I*, Boehringer Mannheim, GmbH, Germany, 1973, pp. 41.
7. *Biochemica information II*, Boehringer Mannheim, GmbH, Germany, 1973, pp. 45.
8. **Blanch H.W., Clark D.S.:** *Biochemical Engineering*, Marcel Dekker Inc., New York 1996, pp.22.
9. **Bonifati V., Meco G.:** New, selective catechol-o-methyltransferase inhibitors as therapeutic agents in Parkinson's disease, *Pharmacol. Ther.* 81 (1999) 1.
10. **Böhmer A., Müller A., Passarge M., Liebs P., Honeck H., Müller H.-G.:** A novel L-glutamate oxidase from *Streptomyces endus*. Purification and properties *Eur J Biochem* 182 (1989) 327.
11. **Bradford M.M.:** A rapid and sensitive metoda for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* 72 (1976) 248.
12. **Brass J.M., Hoeks F.W.J.M.N., Rohner M.:** Application of modeling techniques for the improvement of industrial bioprocesses, *J Biotechnol* 59 (1997) 63.
13. **Brearley G.M., Price C.P., Atkinson T., Hammond P.M.:** Purification and partial characterization of a broad range L-amino acid oxidase from *Bacillus carotarum* 2Pfa isolate from soil, *Appl Microbiol Biotechnol* 41 (1994) 670.
14. **Bühler B., Witholt B., Hauer B., Schmid A.:** Characterization and application of xylene monooxygenase for multistep biocatalysis, *Appl Environ Microbiol* 68 (2002) 560.

15. **Dey E.S., Miller J.R., Kovacevic S., Mosbach K.:** Characterization of D-amino acid oxidase with high activity against cephalosporin C from the yeast *Trigonopsis variabilis*, *Biochem Mol Biol Int* 20 (1990) 1169
16. DSM-fine chemicals URL: <http://www3.dsm.com/dfc/>
17. **Dumont T., Barth D., Corbier C., Branlant G.:** Enzyme reaction kinetic: comparison in an organic solvent and in supercritical carbon dioxide, *Biotechnol Bioeng* 40 (1992) 329.
18. **Dunn I.J., Heinzle E., Ingham J., Přenosil J.E.:** *Biological Reaction Engineering*, Weinheim VCH, 1992.
19. **Duraković S.:** *Opća mikrobiologija, Prehrambeno-tehnološki inženjering*, Zagreb, 1996.
20. **Fernández-Lafuente R., Rodríguez V., Guisán J. M.:** The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into  $\alpha$ -keto acids (phenylpyruvic acid), *Enzyme Microb Technol* 23 (1998) 28.
21. **Filipović I., Lipanović S.:** *Opća i anorganska kemija II, Školska knjiga*, Zagreb, 1995, str. 874.
22. **Fisher A., Biggs C.S., Eradiri O., Starr M.S.:** Dual effects of L-3,4-dihydroxyphenylalanine on aromatic L-amino acid decarboxylase, dopamine release and motor stimulation in the reserpine-treated rat: Evidence that behaviour is dopamine independent, *Neuroscience* 95 (2000) 97.
23. **Fressner W.-D., Helaine V.:** Biocatalytic synthesis of hydroxylated natural products using aldolases and related enzymes, *Curr Opin Biotechnol* 12 (2001) 574.
24. **Gabler M., Hensel M., Fischer L.:** Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases, *Enzyme Microb Technol* 27 (2000) 605.
25. **Gamati S., Luong J.H.T.:** *Bioseparations* 2 (1991) 147.
26. **Gerrits P.J., Willeman W.F., Straathof A.J.J., Heijnen J.J., Brussee J., van der Gen A.:** Mass transfer limitation as a tool to enhance the enantiomeric excess in the enzymatic synthesis of chiral cyanohydrins, *J Mol Catal B: Enzym* 15 (2001) 111.
27. **Geueke B.:** *Neue Aminosäureoxidasen aus Rhodococcus opacus und Athrobacter protophormiae*, Dissertation, Universität Düsseldorf, 2002.
28. **Geueke B., Hummel W., Bommarius A.:** L-amino acid oxidase from *Rhodococcus* species, United States Patent 6 461 841, 2002.
29. **Geueke B., Hummel W.:** A new bacterial L-amino acid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization, *Enzyme Microb Technol* 31 (2002) 77.

30. **Geueke B., Hummel W.:** Heterologous expression of *Rhodococcus opacus* L-amino acid oxidase in *Streptomyces lividans*, *Protein Express Purif* 28 (2003) 309.
31. **Geyer A., Fitzpatrick T.B., Pawelek P.D., Kitzing K., Vrielink A., Ghisla S., Macheroux P.:** Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*, *Eur J Biochem* 268 (2001) 4044.
32. **Gießauf A., Gamse T.:** A simple process for increasing the specific activity of porcine pancreatic lipase by supercritical carbon dioxide, *J of Mol Catal B: Enzym* 9 (2000) 57.
33. **Golini P., Bianchi D., Battistel E., Cesti P., Tassinari R.:** Immobilization of D-amino acid oxidase from different yeast: Characterization and application in the deamination of cephalosporin C, *Enzyme Microb Technol* 17 (1995) 324.
34. **Groeger U., Bommarius A.S.:** Hydrolysis of N-acyl amino acids, in Drauz K., Waldmann H. (Eds.), *Handbook of Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH Verlag, Weinheim, 1995, 393.
35. **Han S.-K., Cohen G.:** inhibition of catalase in mesencephalic cultures by L-DOPA and dopamine, *Neurochem Int* 29 (1996) 645.
36. **Hanefeld U., Straathof A.J.J., Heijnen J.J.:** Enzymatic formation and esterification of (S)-mandelonitrile, *J Mol Catal B: Enzym* 11 (2001) 213.
37. **Hanson R.L., Bembenek K.S., Patel R.N., Szarka L.J.:** Transformation of N $\epsilon$ -CBZ-L-oxyllysine using L-amino acid oxidase from *Providencia alcalifaciens* and L-2-hydroxyisocaproate dehydrogenase from *Lactobacillus confusus*, *Appl Microbiol Biotechnol* 37 (1992) 599.
38. **Hari Krishna S.:** Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media, *Biotechnol Adv* 20 (2002) 239.
39. **Hollander J.L., Zomerdijk M., Straathof A.J.J., van der Wielen L.A.M.:** Continuous enzymatic penicillin G hydrolysis in countercurrent water-butyl acetate biphasic systems, *Chem Eng Sci* 57 (2002) 1591.
40. **Huh J.W., Yokoigawa K., Esaki N., Soda K.:** Total conversion of racemic pipercolic acid into the L-enantiomer by a combination of enantiospecific oxidation with D-amino acid oxidase and reduction with sodium borohydride, *Biosci Biotechnol Biochem* 56 (1992) 2081.
41. **Ito K., Hori K., Miyazawa K.:** Purification and some properties of L-amino acid oxidase from *Amphiroa crassissima* Yendo, *Hydrobiologica* 151/152 (1987) 563.

42. **Jimbo M., Nakanishi F., Sakai R., Muramoto K., Kamiya H.:** Characterization of L-amino acid oxidase and antimicrobial activity of aplysianin A, a sea hare-derived antitumor-antimicrobial protein, *Fisheries Sci* 69 (6) (2003) 1240.
43. **Kamat S.V., Beckman E.J., Russel A.J.:** Enzyme activity in supercritical fluids, *CRC Crit Rev Biotechnol* 15 (1995) 41.
44. **Kamei T., Asano K., Kondo H., Matsuzaki M., Nakamura S.:** L-glutamate oxidase from *Streptomyces violascens* II Properties, *Chem Pharm Bull* 31 (1983) 3609.
45. **Katchalski-Katzir E., Kraemer D.M.:** Eupergit<sup>®</sup> C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential, *J Mol Catal B: Enzym* 10 (2000) 157.
46. **Knez Ž., Habulin M.:** Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review, *J Supercrit Fluids* 23 (2002) 29.
47. **Koyama H.:** Further characterization of a novel L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501, *J Biochem (Tokyo)* 93 (1983) 1313.
48. **Koyama H.:** Purification and characterization of a novel L-phenylalanine oxidase (deaminating and decarboxylating) from *Pseudomonas* sp. P-501, *J Biochem (Tokyo)* 92 (1982) 1235.
49. **Kragl U., Dreisbach C.:** *Angew Chem, Int Ed Engl*, 35 (1996) 642.
50. **Kragl U., Ekstein M., Kaftzig N.:** Enzyme catalysis in ionic liquids, *Curr Opin Biotechnol* 13 (2002) 565.
51. **Kragl U., Vasić-Rački Đ., Wandrey C.:** Continuous production of L-*tert*-leucine in series of two enzyme membrane reactor, *Bioproc Eng* 14 (1996) 291.
52. **Kusakabe H., Kodama K., Kuninaka A., Yoshino H., Misono H., Soda K.:** A new antitumor enzyme, L-lysine alpha-oxidase from *Trichoderma viride*. Purification and enzymological properties, *J Biol Chem* 255 (1980) 976.
53. **Lamare S., Legoy M.-D.:** Biocatalysis in the gas phase, *Trends Biotechnol* 11 (1993) 413.
54. **Leidler K.J., Bunting P.S.:** The chemical kinetics of enzyme action, Clarendon Press Oxford, 2nd Edition, 1973.
55. **Létisse F., Lamare S., Legoy M.-R., Graber M.:** Solid/gas biocatalysis: an appropriate tool to study the influence of organic components on kinetics of lipase-catalyzed alcoholysis, *Biochim Biophys Acta* 1652 (2003) 27.
56. **Leuchtenberger W., Karrenbauer M., Plöcker U.:** Scale-up of an enzyme membrane reactor process for the manufacture of L-enantiomeric compounds, *Enzyme Eng, Part 7, Ann. N.Y. Acad. Sci.* 434 (1984) 78.
57. **Levenspiel O.:** *Chemical Reaction Engineering*, 2002, str.612.

58. **Li Z.Y., Yu R.F., Lian E.C.:** Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus Hannah*) venom and its effect on human platelet aggregation, *Toxicon* 32 (1994) 1349.
59. **Liese A., Seelbach K., Wandrey C.:** Industrial biotransformations, Wiley-VCH, 2000, pp.95.
60. **Linden I.-B., Karlsson M., Niemi S., Penttila A.:** Transamination and other methabolic pathways of 3,4-dihydroxyphenylpyruvic acid in rats when simultaneously administrated with L-DOPA, *J. Pharm. Pharmacol* 34 (1982) 719.
61. **Litjens M.J.J., Straathof A.J.J., Jongejan J.A., Heijnen J.J.:** Exploration of lipase catalysed direct amidation of free carboxylic acids with ammonia in organic solvents, *Tetrahedron* 55 (1999) 12411.
62. Lonza: biotransformations URL: <http://www.lonzabiotec.com/biotec/en/areas/0.html>
63. **Loughlin W.A.:** Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technol* 74 (2000) 49.
64. **Martins J.F., Borges de Carvalho I., Correa de Sampaio T., Barreiros S.:** Lipase-catalyzed enantioselective esterification of glycidol in supercritical carbon dioxide, *Enzyme Microb Technol* 16 (1994) 785.
65. **Masters C., Pegg M., Crane D.:** On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver, *Mol Cell Biochem* 70 (1986) 113.
66. **Michaelis L., Menten M.L.,** *Biochem Z* 49 (1913) 333.
67. **Miyamae, T., Goshima, Y., Shimizu M., Shibata T., Koichiro K., Ohshima E., Suzuki F., Misu Y.:** Some interactions of L-DOPA and its related compounds with glutamate receptors, *Life Sci*, 64, 12 (1999) 1045.
68. **Murphy E.F., Gilmour S.G., Crabbe M.J.C.:** Effective experimental design: enzyme kinetics in the bioinformatics era, *Drug discov today* 7 (20) (2002) 187.
69. **Nakajima N., Esaki N., Soda K.:** Enzymatic conversion of racemic methionine to the L-enantiomer, *J Chem Soc Chem Commun* 13 (1990) 947.
70. **Nelder J.A., Mead R.:** A Simplex Method for Function Minimization, *Comput J* 7 (1965) 308.
71. **Oliviera J.V., Oliviera D.:** Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>, *Ind Eng Chem Res* 39 (12) (2000) 4450.
72. **Panke S., Held M., Wubbolts M.G., Witholt B., Schmidt A.:** Pilot-scale production of (S)-styrene by recombinant *Escherichia coli* synthesizing styrene monooxygenase, *Biotechnol Bioeng* 80 (1) (2002) 33.

73. **Pantaleone D.P., Geller A.M., Taylor P.P.:** Purification and characterization of an L-amino acid deaminase used to prepare unnatural amino acids, *J Mol Catal B: Enzym* 11 (2001) 795.
74. **Pawelek P.D., Cheah J., Coulombe R., Macheroux P., Ghisla S., Vrieling A.:** The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site, *EMBO J* 19 (2000) 4204.
75. **Piedras P., Pineda M., Munoz J., Cardenas J.:** Purification and characterization of an L-amino acid oxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Planta* 188 (1992) 13.
76. **Pistorius E.K., Voss H.:** Some properties of a basic L-amino-acid oxidase from *Anacystis nidulans*, *Biochim Biophys Acta* 611 (1980) 227.
77. **Pszczola D.E.:** The ABCs of nutraceutical ingredients, *Food Technol* 52 (1998) 30.
78. **Reid III T.J., Mathur R.N.M., Sicignano A., Tanaka N., Musick W.D.L., Rossmann M.G.:** Structure and heme environment of beef liver catalase at 2.5 Å resolution, *Proc Natl Acad Sci USA* 78 (1981) 4767.
79. **Russell A.J., Beckman E.J.:** Views and comment: Should the high diffusivity of a supercritical fluid increase the rate of an enzyme-catalyzed reaction?, *Enzyme Microb. Technol.* 13 (1991) 1007.
80. **Schmid A., Hollman F., Park J.B., Bühler B.:** The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Curr Opin Biotechnol* 13 (2002) 359.
81. **Schröder T., Andreesen J. R.,** Studies on the inactivation of the flavoprotein D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*, *Appl Microbiol Biotechnol* 45 (1996) 458.
82. **Schussel L.J., Atwater J.E.:** A continuous alcohol oxidase bioreactor for regenerative life support, *Enzyme Microb Technol* 18 (1996) 229.
83. SCIENTIST handbook, Micromath<sup>®</sup>, Salt Lake City, 1986-1995.
84. **Siddhuraju P., Becker K.:** Rapid reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the quantification of L-DOPA, *Food Chemistry*, 72 (2001) 389.
85. **Straathof A.J.J.:** Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting, *J Mol Catal B: Enzym* 11 (2001) 991.
86. **Suhr S.-M., Kim D.S.:** Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide, *J Biochem* 125 (1999) 305.
87. **Szwajcer E., Brodelius P., Mosbach K.:** Production of  $\alpha$ -keto acids: 2. Immobilized whole cells of *Providencia* sp. PCM 1298 containing L-amino acid oxidase, *Enzyme Microb Technol* 4 (1982) 409.



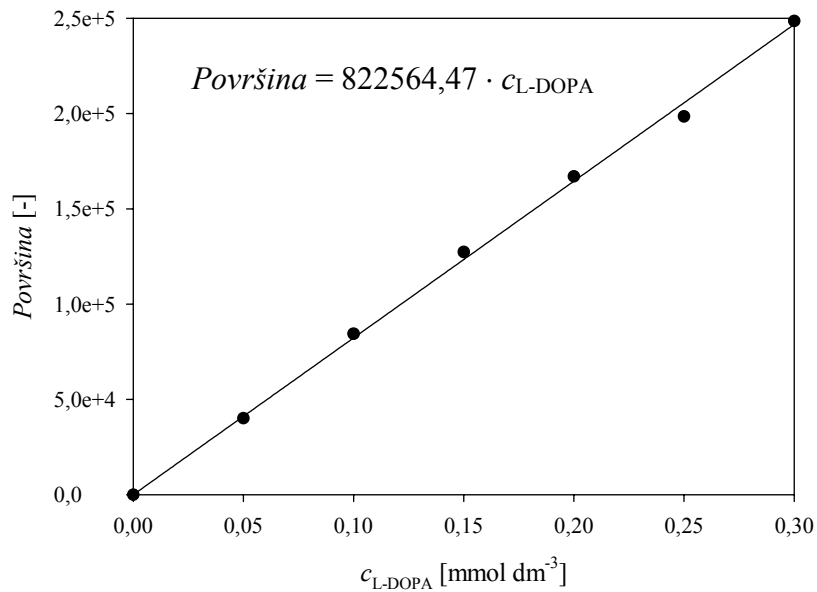
88. **Tan N.H., Saifuddin M.N.:** Substrate specificity of king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase, *Int J Biochem* 23 (1991) 967.
89. **Thayer A.M.:** Biocatalysis, *Chem Eng News* 79 (2001) 27.
90. **Torii S., Naito M., Tsurup T.:** Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom, *J Biol Chem* 272 (1997) 9539.
91. **Trost E-M., Fischer L.:** Minimization of by-product formation during D-amino acid oxidase catalyzed racemate resolution of D/L-amino acids, *J Mol Catal B: Enzym*, 19-20 (2002) 189.
92. **Upadhy R., Nagajyothi H., Bath S.G.:** Stabilization of D-amino acid oxidase and catalase in permeabilized *Rhodotorula gracilis* cells and its application for the preparation of  $\alpha$ -keto acids, *Biotechnol Bioeng* 68 (2000) 430.
93. **Vallon O., Bulte L., Kuras R., Olive J., Wollman F.A.:** Extensive accumulation of an extracellular L-amino acid oxidase during gametogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Eur J Biochem* 215 (1993) 351.
94. **Vasić-Rački Đ., Bongs J., Schörken U., Sprenger G.A., Liese A.:** Modeling of reaction kinetics for reaction selection in the case of L-erythrulose synthesis, *Bioprocess Biosyst Eng* 25 (2003) 285.
95. **Vasić-Rački Đ., Kragl U., Liese A.:** Benefits of enzyme kinetics modeling, *Chem Biochem Eng Q* 17 (1) (2003) 7.
96. **Wandrey C.:** Flaschel in: Ghose T.K., Fiechter A., Blakebrough (Eds.), *Advanced Biochemical Engineering*, Springer, Berlin 12 (1979) 147.
97. **Wandrey C., Wichmann R., Leuchtenberger W., Kula M.R.:** U.S. Patent No. 4,304,858 (1981), Degussa AG/GBF.
98. **Witcoff H.A., Reuben B.G.:** *Industrial Organic Chemicals*, New York: John Wiley and Sons, 1996.
99. **Wöltinger J., Bommarius A.S., Drauz K., Wandrey C.:** The Chemzyme Membrane reactor in the Fine Chemicals Industry, *Org Process Res Dev* 5 (2001a) 241.
100. **Wöltinger J., Karlheinz D., Bommarius A.S.:** The membrane reactor in the fine chemical industry, *Appl Catal A: Gen* 221 (2001) 171.
101. **Woodley J.M.:** Advances in enzyme technology: UK contributions. *Adv Biochem Eng Technol* 70 (2000) 93.
102. **Yao T., Takashima K., Nanjyo Y.:** Dual enzyme electrode with optical specificity for L- and D- amino acids, *Anal Sci* 18 (2002) 1039.

## 8. PRILOZI

PRILOG 1.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije L-DOPE.

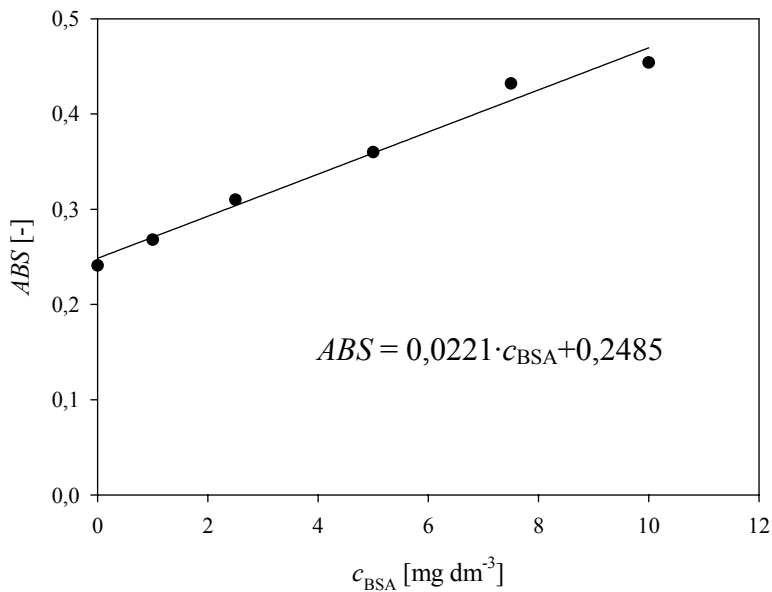
PRILOG 2.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina.

PRILOG 1.



Slika 8.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije L-DOPE

PRILOG 2.



Slika 8.2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina

**SIMBOLI**

$A$	apsorbancija, -
$c$	koncentracija, $\text{mmol dm}^{-3}$ ili $\text{mg cm}^{-3}$
$d$	promjer kivete spektrofotometra, cm
$d_i$	razlika između eksperimentalne vrijednosti i vrijednosti procijenjene modelom
$k$	konstanta brzine reakcije, $\text{min}^{-1}$
$k_d$	konstanta deaktivacije enzima, $\text{min}^{-1}$
$K_i$	konstanta inhibicije, $\text{mmol dm}^{-3}$
$K_m$	Michaelis-Menten-ova konstanta, $\text{mmol dm}^{-3}$
$MSC$	kriterij odabira modela, -
$n$	broj eksperimentalnih podataka, -
$p$	nivo važnosti, -
$V$	volumen, $\text{cm}^3$
$V.A.$	volumna aktivnost enzima, $\text{U cm}^{-3}$
$V_m$	maksimalna reakcijska brzina, $\text{U mg}^{-1}$
$S.A.$	specifična aktivnost enzima, $\text{U mg}^{-1}$
$t$	vrijeme, min
$T$	temperatura, $^{\circ}\text{C}$
$w$	težinski faktor, -
$x$	vrijednost nezavisne varijable eksperimentalne točke
$y$	vrijednost zavisna varijabla eksperimentalne točke
$Y_{obs}$	srednja vrijednost podataka
$Y_{cal}$	srednja vrijednost podataka izračunatih pomoću modela

**Grčki simboli**

$\varepsilon_{340}$	ekstincijski koeficijent o-dianizidina pri 340 nm, $\text{cm}^2 \mu\text{m}^{-1}$ ( $\varepsilon_{340} = 8,1 \text{ cm}^2 \mu\text{m}^{-1}$ )
$\Delta$	promjena, -
$\Pi$	suma kvadratnih devijacija eksperimentalnih podataka i modela

## **SKRAĆENICE**

D	o-dianizidin
E	enzim
EMR	enzimski membranski reaktor
ES	kompleks enzima i supstrata
L-AAO	oksidaza L-amino kiselina
L-DOPA	3,4-dihidroksifenil-L-alanin
P	produkt
POD	peroksidaza
TEA	trietanolamin hidroklorid
S	supstrat
SC	superkritični
0	početni uvjeti

## **ŽIVOTOPIS**

Zvezdana Findrik je rođena 24. svibnja 1979. u Zagrebu. Završila je XV. Gimnaziju u Zagrebu 1997. godine sa odličnim uspjehom. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu je upisala 1997. godine. Dobitnica je Rektorove nagrade za najbolji studentski rad 2002. Tijekom studija je primala Državnu stipendiju koju dodjeljuje Ministarstvo znanosti i tehnologije za studente koji pripadaju među 10 % najboljih studenata. Na posljednjoj godini studija dobiva Stipendiju Grada Zagreba koja se dodjeljuje najboljim studentima u Zagrebu. Svake godine studija je nagrađena nagradom fakulteta za najboljeg studenta godine. Diplomski rad je napravila na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, te je diplomirala 27. lipnja 2002. Zaposlila se u srpnju 2002. na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, kao znanstveni novak – mlađi asistent na projektu dr. sc. Đurđe Vasić-Rački, red. prof. U kolovozu i rujnu 2002. provodi dva mjeseca na studijskom boravku u Rostocku, Universität Rostock, Fachbereich Chemie.