

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Marijana Drmač

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, svibanj 2005.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Smjer: kemijsko inženjerstvo

Marijana Drmač

Biotransformacija L-fenilalanina katalizirana oksidazom L-amino kiselina

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Članovi ispitnog povjerenstva: Dr. sc. Bruno Zelić, docent

Dr. sc. Đurđa Vasić-Rački, red. prof.

Dr. sc. Marija Šindler, red. prof.

Zagreb, svibanj 2005.

Najtoplije zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Bruni Zeliću, doc. koji mi je svojim stručnim znanjem i zalaganjem omogućio realizaciju ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Đurđi Vasić-Rački, red. prof. na stručnoj potpori i pomoći u izradi ovog rada.

Velika hvala mr. sc. Zvezdani Findrik na nesebičnom trudu i pomoći u izradi ovog rada, te mr. sc. Ani Vrsalović Presečki na pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela.

Posebno se zahvaljujem kolegici Ivani Roksa na nesebičnom prijateljstvu, potpori i pomoći tijekom studiranja i izrade ovog rada.

Najtoplije se zahvaljujem svojim roditeljima, sestri Ani i bratu Josipu 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 radu je kinetički karakteriziran enzim oksidaza L-amino kiselina, izoliran iz zmijskog otrova kobre roda *Crotalus adamanteus*. Kao supstrat je korišten L-fenilalanin (L-Phe). L-fenilalanin se u prisustvu enzima L-AAO oksidativno deaminira u odgovarajuću α -keto kiselinu (fenilpirogrožđanu kiselinu) uz nastanak vodikovog peroksida i amonijaka kao sporednih produkata. Prisustvo vodikovog peroksida je nepoželjno u reakcijskoj otopini, a za njegovo uklanjanje je korištena katalaza porijeklom iz goveđe jetre.

Iz eksperimentalno određene ovisnosti specifične aktivnosti enzima o početnoj koncentraciji supstrata L-fenilalanina, odnosno produkta fenilpirogrožđane kiseline (metoda početnih brzina) nelinearnom regresijom su procijenjeni parametri Michaelis-Menten-ovog izraza, V_m i K_m^{L-Phe} , kao i konstanta inhibicije produktom, K_i .

Biotransformacija L-fenilalanina katalizirana oksidazom L-amino kiselina je provedena u šaržnom reaktoru, šaržnom reaktoru bez dodatka katalaze, ponovljivom šaržnom reaktoru, te u protočnom kotlastom enzimskom membranskom reaktoru (EMR). Postavljen je matematički model procesa biotransformacije L-fenilalanina u fenilpirogrožđanu kiselinu kataliziranog oksidazom L-amino kiselina. Parametri modela su procijenjeni simpleks metodom ili metodom najmanjih kvadrata pomoću programskog paketa SCIENTIST. Rezultati simulacije procesa pomoću modela su uspoređeni sa eksperimentalnim rezultatima te je ustanovljeno njihovo dobro slaganje.

Ključne riječi: oksidaza L-amino kiselina, *Crotalus adamanteus*, L-fenilalanin, matematički model procesa

SUMMARY

L-amino acid oxidases (L-AAO) are well known for their broad substrate specificity. In this work enzyme L-AAO from snake venom *Crotalus adamanteus* was kinetically characterized. L-Phenylalanine (L-Phe) was used as a substrate. In the presence of L-AAO L-Phenylalanine was oxidized to a corresponding α -keto acid (phenylpyruvic acid) with hydrogen peroxide and ammonia as by-products. Presence of hydrogen peroxide was unwanted in the reaction solution and for its decomposition catalase from beef liver was used.

Parameters of Michaelis-Menten's equation, V_m and K_m^{L-Phe} and product inhibition constant, K_i were determined by non-linear regression from the experimentally observed dependence of the specific activity of enzyme on the initial concentration of substrate L-Phenylalanine and product phenylpyruvic acid (method of initial rates).

Biotransformation of L-Phenylalanine catalysed by L-AAO was carried out in batch reactor, batch reactor without presence of catalase, repetitive fed-batch reactor and in continuous enzyme membrane reactor (EMR). A mathematical model of L-Phenylalanine biotransformation process was developed. Model parameters were estimated by simplex or least squares method by using software package SCIENTIST. Model applicability was demonstrated by comparing the experimental results with results obtained from model simulations.

Key words: L-amino acid oxidase, *Crotalus adamanteus*, L-Phenylalanine, mathematical model of the process

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. ENZIMI	3
2.1.1. Oksidaze amino kiselina	4
2.1.1.1. Oksidaza L-amino kiselina	6
2.1.2. Katalaza	7
2.2. L-FENILALANIN	7
2.3. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA	8
2.4. PREGLED KINETIČKIH MODELA	9
2.5. MATEMATIČKI MODEL PROCESA OKSIDACIJE L-FENILALANINA UZ ENZIM L-AAO	12
2.5.1. Kinetika reakcije oksidacije L-fenilalanina uz enzim L-AAO	12
2.5.2. Bilance tvari u šaržnom reaktor	12
2.5.3. Bilance tvari u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru (EMR)..	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Kemikalije	14
3.1.2. Priprema otopina	14
3.2. APARATURA	15
3.2.1. Šaržni reaktor	16
3.2.2. Enzimski membranski reaktor (EMR)	16
3.2.3. Spektrofotometar	17
3.2.4. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)	17
3.3. ANALITIČKE METODE	17
3.3.1. Određivanje aktivnosti enzima oksidaze L-amino kiselina (L-AAO)	17
3.3.2. Određivanje koncentracije L-fenilalanina i fenilpirogroždane kiseline	19
3.4. BIOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-FENILALANINA	19
3.4.1. Provedba šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina bez dodatka katalaze	19

3.4.2. Provedba šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina.....	20
3.4.3. Provedba ponovljivog šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina ...	20
3.4.4. Provedba kontinuirane biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina u enzimskom membranskom reaktoru (EMR).....	20
3.5. OBRADA PODATAKA	21
4. REZULTATI I RASPRAVA	22
4.1. ISPITIVANJE KINETIKE BIOKATALITIČKE OKSIDACIJE L-FENILALANINA KATALIZIRANE OKSIDAZOM L-AMINO KISELINA (L-AAO)	22
4.1.1. Ispitivanje kinetike enzimске oksidacije L-fenilalanina katalizirane sa L-AAO ...	22
4.1.2. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO produktom fenilpirogrožđanom kiselinom.	23
4.2. BIOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-FENILALANINA	24
4.2.1. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u šaržnom sustavu bez katalaze uz enzim L-AAO	24
4.2.2. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u šaržnom sustavu sa katalazom uz enzim L-AAO	25
4.2.3. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u ponovljivom šaržnom sustavu sa katalazom uz enzim L-AAO	26
4.2.4. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u kontinuiranom sustavu sa katalazom uz enzim L-AAO	27
5. ZAKLJUČAK.....	30
6. LITERATURA	31
7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA.....	34
7.1. Simboli	34
7.1.1. Grčki simboli	34
7.2. Skraćenice	34
8. PRILOZI	35

ŽIVOTOPIS

1. UVOD

Kemijska industrija predstavlja jedno od najvećih ekonomskih područja u svijetu i europske kemijske tvrtke imaju dominantnu ulogu. Europska kemijska industrija je visoko razvijena, ali se nastavlja uvođenje novih tehnologija, uključujući i biokatalitičke procese, te se na taj način omogućava pristup novom tržištu segmenata i produkata za analitičke i sintetičke svrhe¹.

Enzimi, čije su primjene u različitim fazama razvoja, se koriste u proizvodnji organskih tvari (hrana, škrob, šećer, vino, pivo, alkohol, voćni sokovi, ulja, masti, koža, tekstil, papir), lijekova, "finih" kemikalija i sredstava za čišćenje. Očekuje se brzi razvoj u polju polimera (kao što je proizvodnja 1,3-propandiola), te maksimalna uporaba u svim područjima kemijske industrije, osim za proizvode čija je cijena ispod 1 \$/kg¹. Katalitičko djelovanje enzima je u odnosu na kemijske katalizatore iznimno učinkovito i selektivno; enzimi daju veće reakcijske brzine, blaži su reakcijski uvjeti i imaju veću stereospecifičnost. Njihova potencijalna primjena je dovela do razvoja u nekoliko tehnoloških sektora: (1) uvođenje mikroorganizama kao proizvođača specifičnih enzima; (2) razvoj tehnika pročišćavanja enzima; (3) razvoj bioinženjerskih tehnika imobilizacije enzima, i (4) dizajniranje učinkovitih proizvodnih procesa².

Primjenom biokatalizatora se povećava produktivnost procesa, smanjuje se potrošnja reaktanata, emisija u okoliš, te količina nastalog otpada, ne koriste se toksične sirovine i nastaju proizvodi visoke kakvoće². Sve ove prednosti rezultiraju smanjenjem troškova procesa i time povećanjem konkurentnosti proizvoda, te mogu dati prednost pred tradicionalnim kemijskim načinima proizvodnje¹.

Nove reakcije, koje se trenutno procjenjuju u industriji uključuju reakcije oksidacije i stvaranja ugljik-ugljik veza i obično su limitirane inhibicijom produktom. Primjene izoliranih oksidaza u sintezama zahtijevaju učinkovite tehnike regeneracije kofaktora¹.

Danas je primjena enzima u kemijskoj industriji već učvrstila svoje mjesto i prema trenutnom stupnju razvoja, broj biokatalitičkih procesa u praksi će se nastaviti ubrzano povećavati. Prva zapreka, pouzdanost u nove tehnologije, je savladana i što se više procesa, tehnologija i infrastrukture primjenjuje, povećavat će se i naponi u biokatalitičkim istraživanjima i razvoju. Ovo će dovesti do otkrića i primjene novih enzima i bioloških nadopuna tradicionalnim kemijskim reakcijama, te olakšati integraciju enzimskih procesa u višestupnjevite kemijske sinteze¹.

Cilj ovog rada je bila kinetička karakterizacija enzima oksidaze L-amino kiselina iz *Crotalus adamanteus* i provedba procesa oksidacije L-fenilalanina navedenim enzimom. Prilikom oksidacije L-fenilalanina nastaju fenilpirogroždana kiselina i vodikov peroksid, koji spontano dekarboksilira fenilpirogroždanu kiselinu u feniloctenu kiselinu i vodu. Zbog toga je biokatalitička oksidacija L-fenilalanina provedena u prisustvu katalaze s kojom je uklanjan vodikov peroksid. Proces biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina proveden je u šaržnom reaktoru sa i bez prisustva katalaze, u ponovljivom šaržnom reaktoru i u kontinuiranom enzimskom membranskom reaktoru. Postavljen je matematički model procesa, a parametri enzimskog kinetičkog modela procijenjeni su iz pokusa provedenih u kiveti.

Na kraju, rezultati simulacije procesa pomoću modela uspoređeni su sa rezultatima pokusa provedenih u kiveti, šaržnom reaktoru, ponovljivom šaržnom reaktoru i kontinuiranom enzimskom membranskom reaktoru.

2. OPĆI DIO

2.1. ENZIMI

Enzimi se mogu definirati kao proteinski katalizatori, koji su veoma specifični za kataliziranu reakciju i molekule koje sudjeluju u toj reakciji³. Učinkovitost i specifičnost enzima su nedostižni za većinu konvencionalnih industrijskih katalizatora. Enzimi kao industrijski biokatalizatori uvode koncept i razvoj čistije proizvodnje, konkurentne po troškovima i rizicima sa drugim tehnologijama. Nove tehnologije otkrivanja enzima i stvaranja tržišta su ključni razlozi ponovnog rađanja zanimanja za industrijsku primjenu enzima⁴.

Bez prisutnosti enzima, većina biokemijskih reakcija se odvija jako sporo ili se uopće ne odvija pri blagim uvjetima tlaka i temperature. Stanice sadrže tisuće različitih enzima, a do koje reakcije u stanici će doći ovisi prvenstveno od aktivnosti pojedinog enzima⁵. Aktivnost enzima se mijenja ovisno o uvjetima u njegovom okolišu, od kojih su najvažniji koncentracija supstrata, pH i temperatura. Pri ekstremnim vrijednostima pH i temperature, te utjecaju drugih čimbenika dolazi do denaturacije proteina i gubitka njegove aktivnosti³.

Jedna od prednosti enzima u odnosu na standardne katalizatore jest njihova specifičnost. Enzim pokazuje apsolutnu specifičnost ako katalizira reakciju samo sa jednim određenim supstratom, a grupnu specifičnost ako katalizira reakciju u kojoj se pojavljuje supstrat sa određenom atomskom grupom. Najniži stupanj specifičnosti je opisan reakcijskom specifičnošću koji označava da enzim katalizira određeni tip reakcije bez obzira na grupe atoma koji se nalaze u okolišu⁶.

Stereospecifični enzimi kataliziraju reakcije samo sa određenom stereokemijskom formom, i to je jedna od glavnih prednosti biokatalitičkih proizvodnih procesa⁴.

Enzimi se mogu podijeliti u šest osnovnih skupina³: (1) oksidoreduktaze koje kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije; (2) transferaze koje kataliziraju reakcije koje uključuju premještanje grupa atoma između molekula; (3) hidrolaze koje kataliziraju reakcije hidrolize molekula; (4) liaze koje kataliziraju reakcije uklanjanja grupa s ciljem formiranja dvostrukih veza ili reakcije adicije grupa na dvostruku vezu; (5) izomeraze koje kataliziraju reakcije izomerizacije; (6) ligaze koje kataliziraju formiranje veze između dvaju molekula upotrebom energije adenozin trifosfata (ATP-a).

Biokatalizatori (enzimi, mikroorganizmi i antitijela) se mogu koristiti: (1) suspendirani u otopini i odijeljeni membranom u reakcijskoj posudi ili (2) imobilizirani u ili na membrani

kao nosiocu. U prvoj metodi, sustav se sastoji od reaktora sa miješanjem povezanog sa membranskom separacijskom jedinicom. U drugoj metodi, membrana služi i kao nosioc katalizatora i kao separacijska jedinica².

Imobilizirani enzimi se mogu višekratno upotrebljavati u procesu, stabilniji su u reakcijskoj smjesi, lakše se izdvajaju iz reakcijske smjese, te omogućuju kontinuiranu provedbu procesa⁷. Razlikujemo fizikalne i kemijske metode imobilizacije, te uklapanje u gel i upotrebu ultrafiltracijske membrane kao metode odvajanja biokatalizatora od okolnog medija. Neke od metoda imobilizacije su kovalentna veza, adsorpcija na kruti nosioc, adsorpcija i umrežavanje, te kemijsko vezanje između enzima i spojeva pri čemu nastaju veze kao što su peptidna, triazinilkloridna, azo veza i glutardialdehidni most. U imobiliziranom obliku se uglavnom koriste samo skupi enzimi, jer se imobilizacijom omogućuje učinkovito odvajanje produkta, recikliranje i ponovna uporaba skupog enzima⁸.

2.1.1. Oksidaze amino kiselina

Oksidaze amino kiselina su flavoproteini (E.C.1.4.3.x) koji se nalaze u peroksisomima raznih eukariotskih stanica⁶.

Oksidaze su posebna skupina enzima velikog tehnološkog interesa jer mogu katalizirati veoma selektivne oksidacije organskih spojeva pri blagim uvjetima upotrebom kisika kao oksidirajućeg sredstva. Do ovoga dolazi zahvaljujući mogućnosti reoksidacije kompleksa enzim-kofaktor pomoću molekularnog kisika i snažne adsorpcije kofaktora (FAD, FMN, itd.) na aktivne centre enzima⁹.

Oksidaze D-amino kiselina su veoma zanimljiv primjer ove skupine enzima. One kataliziraju oksidativnu deaminaciju širokog spektra D-amino kiselina pri čemu nastaju odgovarajuće α -keto kiseline, amonijak i vodikov peroksid⁹.

Na ovaj način nastale stabilne α -keto kiseline imaju važnu primjenu kao nutraceutici i kao terapijska sredstva za liječenje kronične uremije i poremećaja nakupljanja dušika^{9, 10}.

Oksidaze D-amino kiselina se koriste u industriji za deaminaciju cefalosporina C u dva koraka enzimskim putem do 7-aminocefalosporanske kiseline, te za razdvajanje racemičnih smjesa amino kiselina. Kada tehnički proizvedena L-amino kiselina sadrži malu količinu D-enantiomera, ona se može ukloniti reakcijom s oksidazom D-amino kiselina, te se dobije optički čista L-amino kiselina. Za ovaj oblik primjene poželjno je da enzim ima nisku

Michaelisovu konstantu (K_m) prema supstratu budući da reakcijska brzina treba imati maksimum pri niskim koncentracijama D-enantiomera¹¹.

Oksidaze amino kiselina se koriste za proizvodnju biosenzora za određivanje koncentracije amino kiselina, budući da su selektivne za amino kiseline i optički specifične prema D i L izomerima. Većina predloženih enzimskih senzora je temeljena na amperometrijskom i potenciometrijskom određivanju ili kemiluminometrijskom određivanju vodikovog peroksida ili amonijaka proizvedenih oksidazama amino kiselina^{12, 13}.

Uporaba oksidaza u proizvodnji ipak ima i neke nedostatke koje je potrebno ukloniti: (1) kvantitativna enzimaska oksidacija visokih koncentracija supstrata zahtijeva kontinuiranu opskrbu kisikom puštanjem mjehurića u reaktor, pri čemu interakcija između enzima i plina na međufaznoj površini mjehurić/kapljevina može uzrokovati veoma brzu i ireverzibilnu inaktivaciju enzima; (2) vodikov peroksid koji nastaje kao sporedni produkt reakcije može prouzročiti veoma brzu inaktivaciju enzima zbog oksidacije nekih osjetljivih dijelova proteina (metionin, cistein, itd.) ili nespecifičnu oksidaciju reakcijskih produkata koja dovodi do smanjenja konačne produktivnosti i prisutnosti sporednih produkata u konačnoj reakcijskoj smjesi (npr. oksidativna dekarboksilacija α -keto kiselina)⁹.

Oksidaze L-amino kiselina mogu biti specifične prema samo jednoj vrsti supstrata, a postoje i one koje kataliziraju oksidaciju širokog spektra amino kiselina¹². Specifičnost prema širokom spektru supstrata su pokazale oksidaze L-amino kiselina izolirane iz crvene alge *Amphiora crassissima*, cijanobakterije *Anacystis nidulans*, gram negativnih bakterija *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris* i *Providencia sp.*, gram pozitivnih bakterija *Cellulomonas cellulans* i *Corynebacterium* i iz otrova dvaju otrovnih zmija, *Crotalus adamanteus* i *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Dok su prema određenom supstratu specifične L-cistein oksidaza iz *Neisseria meningitidis*, L-glutamat oksidaza iz *Streptomyces endus*, L-lizin oksidaza iz *Trichoderma viride* i L-fenilalanin oksidaza iz *Pseudomonas sp.*, iako zadnje dvije kataliziraju oksidaciju drugih L-amino kiselina ali na manjoj razini u odnosu na njihove primarne supstrate^{14, 15}.

Enzim pronađen u zmijskom otrovu je komercijalno dostupan, ali preskup za širu uporabu. Budući da se bakterijama može lakše genetski manipulirati, to su one povoljnije za dobivanje enzima¹⁵.

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 (FAD) kao kofaktor. Oksidaza L-amino kiselina katalizira oksidativnu deaminaciju supstrata L-amino kiselina u odgovarajuće α -keto kiseline uz nastanak amonijaka i vodikovog peroksida putem nastanka imino kiseline kao intermedijera^{16, 17}.

Budući da se enzim L-AAO nalazi u zmijskom otrovu u visokoj koncentraciji (oko 30 %), moguće ga je brzo i lako izolirati, pa su ovi enzimi najbolje proučeni u svojoj skupini^{16, 18}. Ovi enzimi pokazuju specifičnost prema hidrofobnim amino kiselinama uključujući fenilalanin, triptofan, tirozin i leucin¹⁶. Molekularna masa enzima L-AAO izoliranog iz *Crotalus adamanteus* se kreće oko 140 kDa, odnosno $150000 \text{ g mol}^{-1}$ ^{6, 16, 19}.

Posebnost L-AAO iz *Crotalus adamanteus* je reverzibilna inaktivacija uočena pri smrzavanju ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) ili povišenjem pH vrijednosti iznad neutralnosti u odsutnosti jednovalentnih aniona (kao što su kloridi), koji sprječavaju ovu vrstu inaktivacije. Brzina inaktivacije enzima pri smrzavanju ovisi o pH vrijednosti i sastavu pufera. Reaktivacija enzima za oba tipa inaktivacije se ostvaruje zagrijavanjem na $37 \text{ }^\circ\text{C}$ pri pH 5. Ovaj reverzibilni proces je popraćen malim promjenama apsorpcijskog spektra FAD kofaktora, ali ne dolazi do 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 je još uvijek neobjašnjen^{6, 20, 21}. Pokazalo se da je L-AAO iz *C. adamanteus* jako glikoliziran. Proučavanjem glikoliziranih mjesta je otkriveno da ugljikohidrati vezani za 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. Ovaj je enzim apsolutno specifičan za L-izomere. Za razliku od oksidaza L-amino kiselina, oksidaze D-amino kiselina nisu glikolizirane. Pokazalo se da je glikolizacija neophodna za antibakterijski učinak enzima, koji je karakteristika L-AAO^{6, 17, 22}.

L-AAO iz zmijskog otrova je mnogo aktivnija od L-AAO iz sisavaca i smatra se da doprinosi toksičnosti otrova²². L-AAO dobivene iz različitih izvora se međusobno razlikuju u specifičnosti, stabilnosti, te biološkim i toksikološkim učincima. Smatra se da je većina

bioloških učinaka ovog enzima posljedica, barem djelomično, sekundarnog djelovanja vodikovog peroksida. Međutim, još uvijek nisu dobro razjašnjeni niti toksikološki učinci niti strukturalna svojstva ove važne skupine enzima¹⁸.

2.1.2. Katalaza

Katalaza (H_2O_2 oksidoreduktaza E.C.1.11.1.6.) je enzim koji je svrstan u skupinu oksidoreduktaza i razgrađuje vodikov peroksid na molekularni kisik i vodu. Katalaza je pronađena u gotovo svim aerobnim organizmima i štiti stanice od toksičnog utjecaja vodikovog peroksida^{23,24}.

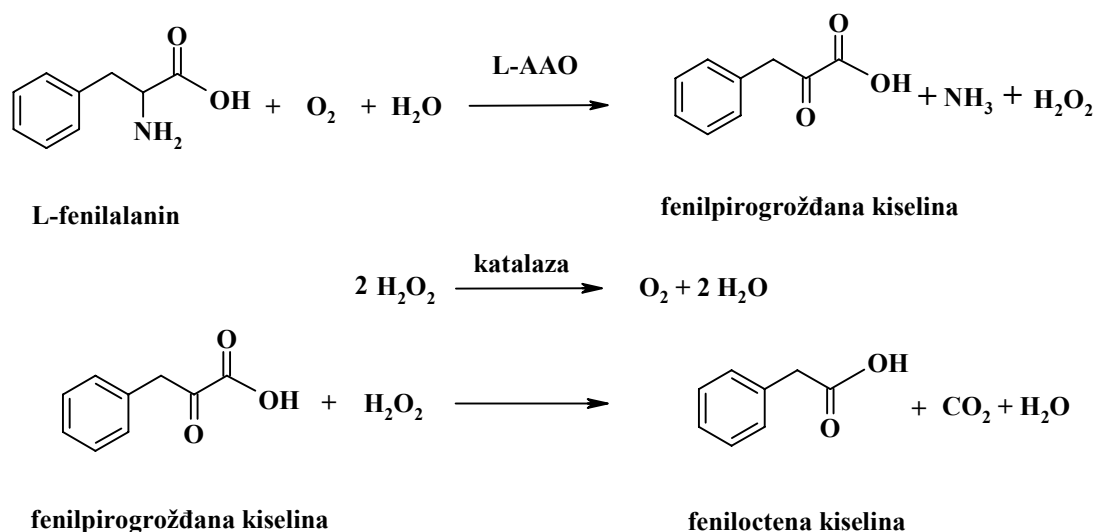
Katalaza iz goveđe jetre se unutar stanice nalazi u peroksisomima, i enzim je vjerojatno ugrađen u ove organele tijekom njihove biogeneze. Katalaza iz goveđe jetre sadrži četiri identične podjedinice, molekularne mase 57000 g mol^{-1} i svaka sadrži visokospinski Fe (III)-protoporfirin²⁴.

Ova katalaza je bila jedan od prvih kristaliziranih unutarstaničnih enzima. Kasnije je izolirana iz nekoliko izvora (eritrociti, jetra i bubrezi goveda, konja i čovjeka) i različitim metodama (selektivna precipitacija i kromatografija). Većina katalaza izoliranih iz različitih organizama ima molekularnu masu 240 kDa ²³.

U reakciji oksidacije L-fenilalanina, koja je opisana i provedena u ovom radu, nastaje vodikov peroksid, te je za njegovo uklanjanje korištena katalaza iz goveđe jetre. Budući da katalaza djeluje u reakcijskoj otopini, a ne na samom aktivnom katalitičkom centru oksidaze L-amino kiselina gdje vodikov peroksid nastaje, dolazi do razgradnje α -keto kiselina vodikovim peroksidom upravo na samom katalitičkom centru. Stoga, treba uzeti u obzir da katalaza iz goveđe jetre nije najučinkovitiji izbor⁶.

2.2. L-FENILALANIN

L-fenilalanin (L-Phe) je esencijalna amino kiselina i može se pronaći u prirodi, služi za sintezu proteina, te ima regulacijsku ulogu u metabolizmu. Može se pronaći u hrani, osobito u mesu i mliječnim proizvodima, a manje količine su pronađene u zobi i pšeničnim klicama²⁵. Važan je intermedijer u metaboličkim putovima i kao prekursor svih kateholaminskih neuroprijenosnika i hormona, te melanina. Koristi se za liječenje depresije, Parkinsonove bolesti, multiple skleroze, za smanjenje tjelesne težine, te pri liječenju anoreksije^{26,27}.



Slika 2.1. Shema enzimske oksidacije L-fenilalanina i pretpostavljena jednadžba dekarboksilacije produkta fenilpirogroždane kiseline.

Oksidativnom deaminacijom L-fenilalanina pomoću oksidaze L-amino kiselina iz *Crotalus adamanteus* nastaje fenilpirogroždana kiselina, amonijak i vodikov peroksid (Slika 2.1.). Nastali vodikov peroksid, osim što negativno utječe na enzim, izaziva i dekarboksilaciju α -keto kiseline, pa ga je potrebno uklanjati dodatkom katalaze²⁸. Zbog nepotpunog uklanjanja vodikovog peroksida u reakciji dolazi do dekarboksilacije fenilpirogroždane kiseline u fenilactenu kiselinu (Slika 2.1.).

2.3. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA

Modeliranje kao načelo reakcijskog inženjerstva je pronašlo ulogu i u enzimskim reakcijama i očekuje se da će ta uloga rasti s uporabom biokatalizatora. Matematički modeli, osobito kad su povezani sa modernim kompjuterskim tehnikama, su se pokazali veoma učinkovitim u traženju optimalnih radnih uvjeta i stvaranju optimalnog mikrookoliša za biokatalizator s ciljem optimiranja produktivnosti²⁹.

Za procjenu bilo kojeg enzima, koji bi se koristio u medicinskim istraživanjima, kliničkim dijagnozama, farmaceutskim istraživanjima ili razvoju lijekova potrebno je poznavati kinetiku tog enzima, jer ona daje osnovne informacije o tome kako će se enzim ponašati ili reagirati pri različitim radnim uvjetima²¹.

Enzimski kinetički model se razvija kroz sljedeće korake: eksperimentalno određivanje početne brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata, matematička obrada dobivenih rezultata i formuliranje izraza za brzinu reakcije, procjenjivanje parametara, matematičko formuliranje ukupne brzine reakcije, eksperimentalno potvrđivanje predviđanja modela, kombiniranje sa konfiguracijom reaktora kako bi se pronašla veza između brzine reakcije i koncentracije reaktanta, i napokon izračunavanje i predviđanje parametara na temelju razvijenog modela²¹. Kinetički parametri se mogu procijeniti i iz parova eksperimentalnih podataka koncentracija-vrijeme. Obzirom da na kinetiku enzimske katalizirane reakcije mogu utjecati akumulacija produkta, potrošnja supstrata, te promjene pH vrijednosti u vremenu, metoda procjene kinetičkih parametara iz serije eksperimentalnih podataka koncentracija-vrijeme nije najbolje rješenje.

Kako su izrazi za brzinu reakcije diferencijalne jednačbe, općenito se koriste dvije metode za određivanje konstanti brzine reakcije: diferencijalne i integralne metode³⁰.

Rješenja modela, koja pokazuju vladanje reaktora mogu poboljšati poznavanje procesa i izbor radnih uvjeta³¹.

Šaržni reaktor je općenito povoljna konfiguracija za reakcijske sustave koji nisu inhibirani niti supstratom niti produktom, jer konstrukcijski ne postoji mogućnost postepenog dovodenja supstrata niti odvođenja produkta. 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. 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 procesa⁶.

2.4. PREGLED KINETIČKIH MODELA

Razlikujemo enzimske reakcije s jednim ili više supstrata. One sa jednim supstratom su u biokemiji relativno rijetke. Smatra se da je oko 60 % svih enzimskih reakcija dvosupstratnih³².

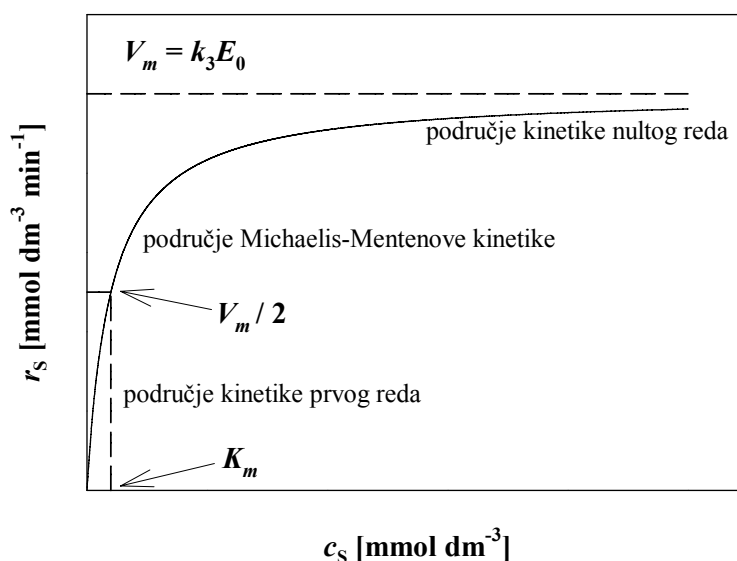
Brzina reakcije katalizirane otopljenim enzimom se obično može opisati Michaelis-Mentenovim kinetičkim izrazom:

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

gdje je r_s brzina potrošnje supstrata ($\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$), c_s koncentracija supstrata (mmol dm^{-3}), V_m maksimalna brzina reakcije ($\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$), a K_m^S Michaelis-Mentenova konstanta (mmol dm^{-3}). Parametar V_m pokazuje ovisnost o koncentraciji enzima, i dan je sljedećim izrazom:

$$V_m = k_3 \cdot E_0 \quad (2.2.)$$

gdje je k_3 katalitička konstanta enzima (min^{-1}), a E_0 početna koncentracija enzima (mmol dm^{-3}).



Slika 2.2. Ovisnost reakcijske brzine o početnoj koncentraciji supstrata kod Michaelis-Mentenove kinetike.

Michaelis-Mentenova jednadžba pokazuje tri različita područja brzine reakcije (Slika 2.2.). 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 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 kompleksne kinetičke izraze. Jedna od jednostavnijih jednadžbi je i Michaelis-Mentenova jednadžba za dvosupstratnu reakciju dana kao:

$$r_{S1} = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1})(K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (2.3.)$$

Prethodno navedeni model ne uključuju postojanje inhibicije supstratom i produktom. Do inhibicije dolazi kada pojedini kemijski spoj, inhibitor, svojom prisutnošću smanjuje brzinu enzimski katalizirane reakcije, obično zbog svog vezanja na aktivno mjesto enzima. Općenito postoje tri tipa inhibicije koji uključuju kompetitivnu inhibiciju (Jed. 2.4.), nekompetitivnu inhibiciju (Jed. 2.5.) i antikompetitivnu inhibiciju (Jed. 2.6.), 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.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s \cdot (1 + c_i/K_i) + c_s} \quad (2.4.)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^s + c_s \cdot (1 + c_i/K_i)} \quad (2.5.)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(1 + c_i/K_i) \cdot (K_m^s + c_s)} \quad (2.6.)$$

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 [12].

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, a koristi se i Levenspielova metoda u kojoj se Michaelis-Mentenova jednadžba integrira.

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 ili metoda najmanjih kvadrata.

2.5. MATEMATIČKI MODEL PROCESA OKSIDACIJE L-FENILALANINA UZ ENZIM L-AAO

2.5.1. Kinetika reakcije oksidacije L-fenilalanina uz enzim L-AAO

Kinetika reakcije biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina (L-Phe) katalizirane enzimom L-AAO je opisana Michaelis-Menten-ovom jednačbom (Jed. 2.7.) i Michaelis-Menten-ovom jednačbom sa kompetitivnom inhibicijom produktom fenilpirogrožđanom kiselinom (PhePyr) (Jed. 2.8.).

Jednačba 2.8. je korištena za opis kinetike enzima L-AAO u pokusima provedenim u kivetu, pri čemu je mjerena samo početna brzina reakcije, te predstavlja kinetički model procesa.

$$r_1 = \frac{V_m \cdot c_{L-AAO} \cdot c_{L-Phe}}{K_m^{L-Phe} + c_{L-Phe}} \quad (2.7.)$$

$$r_2 = \frac{V_m \cdot c_{L-AAO} \cdot c_{L-Phe}}{K_m^{L-Phe} \cdot \left(1 + c_{PhePyr} / K_i^{PhePyr}\right) + c_{L-Phe}} \quad (2.8.)$$

$$r_3 = \frac{V_{m0} \cdot e^{(-k_d \cdot t)} \cdot c_{L-AAO} \cdot c_{L-Phe}}{K_m^{L-Phe} \left(1 + c_{PhePyr} / K_i^{PhePyr}\right) + c_{L-Phe}} \quad (2.9.)$$

Jednačba 2.9. je korištena za opis enzimske kinetike biotransformacije L-fenilalanina u ponovljivom šaržnom eksperimentu. Pri tome je u kinetički model uključena vremenski ovisna deaktivacija enzima, koja je opisana modelom (napisana u integriranom obliku) prvog reda (Jed. 2.10.).

$$V_m = V_{m0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (2.10.)$$

2.5.2. Bilance tvari u šaržnom reaktoru

Šaržni (kotlasti ili *batch*) reaktor je zatvoreni sustav što znači da se za vrijeme reakcije sa okolinom ne razmjenjuje reakcijska smjesa. U reaktoru se ostvaruje približno idealno miješanje pa su vrijednosti svih parametara približno iste u bilo kojoj točki reaktorskog prostora. Budući da je kotlasti reaktor zatvoreni sustav, a samim time je i kemijska reakcija koja se odvija u njemu vremenski proces, to je ovaj reaktor uvijek u nestacionarnom radu³³.

Matematički model za sustav enzimske oksidacije L-fenilalanina u šaržnom reaktoru uključuje kinetičku jednačbu (Jed. 2.8.) i bilance tvari za L-fenilalanin i fenilpirogrožđanu kiselinu (Jed. 2.11. i 2.12.). Rezultati eksperimenta u šaržnom reaktoru i šaržnom reaktoru bez

dodatka katalaze su analizirani kinetičkom jednadžbom 2.8., koja uključuje inhibiciju produktom, uključenom u bilancne jednadžbe 2.11. i 2.12. Rezultati eksperimenta provedenog u ponovljivom šaržnom reaktoru su analizirani kinetičkom jednadžbom 2.9., koja osim inhibicije uključuje i vremensku deaktivaciju enzima, te su uključeni u bilancne jednadžbe 2.11. i 2.12.

$$\frac{dc_{L-Phe}}{dt} = -r_2 \text{ (ili } r_3) \quad (2.11.)$$

$$\frac{dc_{PhePyr}}{dt} = r_2 \text{ (ili } r_3) \quad (2.12.)$$

2.5.3. Bilance tvari u protočnom kotlastom enzimskom membranskom reaktoru (EMR)

Protočni kotlasti reaktor je otvoreni sustav, što znači da se za vrijeme reakcije sa okolinom razmjenjuje reakcijska smjesa. Reaktor je u stacionarnom radu, te su veličine unutar reaktora nezavisne o vremenu. Drugim riječima u takav reaktor stalno ulazi ista masa tvari i ista masa izlazi iz njega. Sadržaj reaktora se dobro miješa pa su vrijednosti veličina stanja nezavisne od položaja unutar reaktorskog prostora. Za vrijeme rada ne dolazi do promjene gustoće reakcijske smjese i prema tome volumen reakcijske smjese ostaje stalan. Budući da reakcijska masa stalno ulazi i izlazi iz reaktora u model se uvodi prostorno vrijeme (τ), koje je jednako srednjem vremenu zadržavanja molekula reakcijske smjese u reaktoru³³.

Osim navedenog pretpostavlja se da nema gubitka aktivnosti enzima tijekom provedbe pokusa, da je membrana selektivna za enzim, tj. da cjelokupna količina enzima tijekom pokusa ostaje u reakcijskom volumenu, te da je protok kroz membranu konvekcijski.

Matematički model za proces enzimске oksidacije L-fenilalanina u protočno-kotlastom EMR-u uključuje kinetičku jednadžbu (Jed. 2.8.) i bilance tvari za svaku komponentu (Jed. 2.13. i 2.14.).

$$\frac{dc_{L-Phe}}{dt} = \frac{c_{L-Phe,0} - c_{L-Phe}}{\tau} - r_2 \quad (2.13.)$$

$$\frac{dc_{PhePyr}}{dt} = \frac{c_{PhePyr,0} - c_{PhePyr}}{\tau} + r_2 \quad (2.14.)$$

3. MATERIJALI I METODE

U ovom radu je enzimskim testom određena kinetika reakcije oksidacije L-Phe u fenilpirogroždanu kiselinu pomoću enzima oksidaze L-amino kiselina iz *Crotalus adamanteus* i inhibicijska konstanta glavnog reakcijskog produkta fenilpirogroždane kiseline. Potom su provedeni šaržni pokus bez dodatka katalaze, šaržni pokus uz dodatak katalaze, ponovljivi šaržni pokus, te kontinuirani pokus u enzimskom membranskom reaktoru.

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Tijekom provedbe pokusa su korištene sljedeće kemikalije:

- amonijev sulfat, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (*Merck*),
- enzim L-AAO porijeklom iz *C. adamanteus*, (*Fluka*),
- fenilpiruvat, $\text{C}_9\text{H}_7\text{NaO}_3$, (*Sigma*),
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , (*Merck*),
- katalaza porijeklom iz goveđe jetre, (*Boehringer Mannheim GmbH*),
- klorovodična kiselina, HCl , (*Kemika*),
- L-fenilalanin, $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$, (*BioChemika*),
- metanol, CH_3OH , (*Alkaloid*),
- natrijev acetat, CH_3COONa , (*Merck*),
- natrijev hidrogenfosfat, Na_2HPO_4 , (*Kemika*)
- octena kiselina, CH_3COOH , (*Merck*),
- o-dianizidin, (*Fluka*),
- peroksidaza, (*Fluka*).

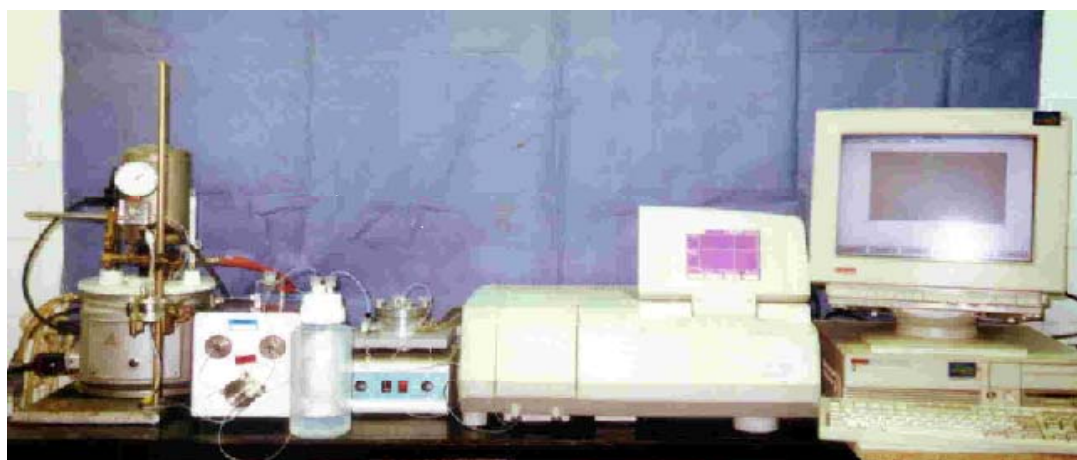
3.1.2. Priprema otopina

Pripremljene su otopine L-fenilalanina i fenilpiruvata u fosfatnom puferu pH vrijednosti 7,6. Fosfatni pufer (pH 7,6 i kapaciteta $0,2 \text{ mol dm}^{-3}$) pripremljen je otapanjem $37,89 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$ u 1 dm^3 redestilirane vode i $18,156 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ u $0,5 \text{ dm}^3$ redestilirane vode i njihovim miješanjem u volumnom omjeru 87:13. Pokretna faza (eluent) za kapljevinsku kromatografiju visokog učinka (HPLC) je pripremljena miješanjem otopine natrijeva acetata,

$c = 20 \text{ mmol dm}^{-3}$ i metanola u volumnom omjeru 3:1. Otopina natrijeva acetata koncentracije 20 mmol dm^{-3} je pripravljena otapanjem 1,64 g natrijeva acetata u redestiliranoj vodi, te joj je pH podešen na vrijednost 4,0 pomoću koncentrirane ledene octene kiseline. Priprema otopina za provedbu enzimskog testa je opisana u poglavlju koje opisuje određivanje kinetike enzima L-AAO (Poglavlje 3.3.1.).

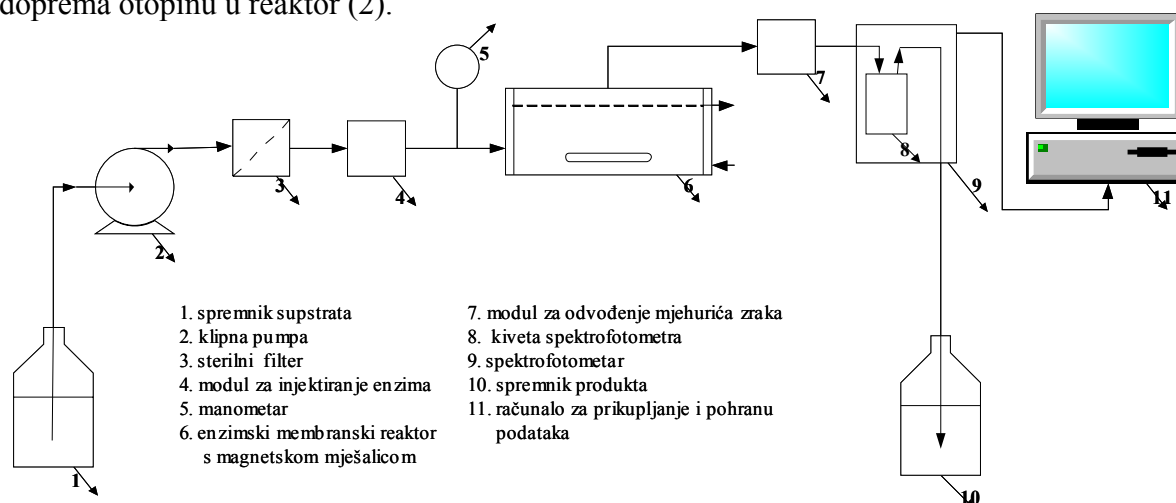
3.2. APARATURA

Aparatura na kojoj je provedena kontinuirana biokatalitička oksidacija L-fenilalanina prikazana je na slici 3.1.



Slika 3.1. Aparatura za provedbu kontinuirane oksidacije L-fenilalanina.

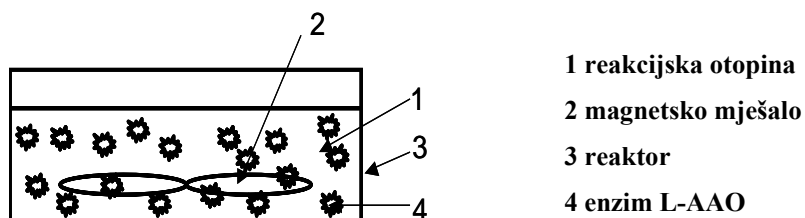
Schema aparature je prikazana na slici 3.2. Aparatura se sastoji od šaržnog ili enzimskog membranskog reaktora, ovisno o pokusu, smještenog na magnetskoj mješalici (6), termostata koji održava potrebnu temperaturu u reaktoru ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$) i klipne pumpe koja doprema otopinu u reaktor (2).



Slika 3.2. Shema aparature.

3.2.1. Šaržni reaktor

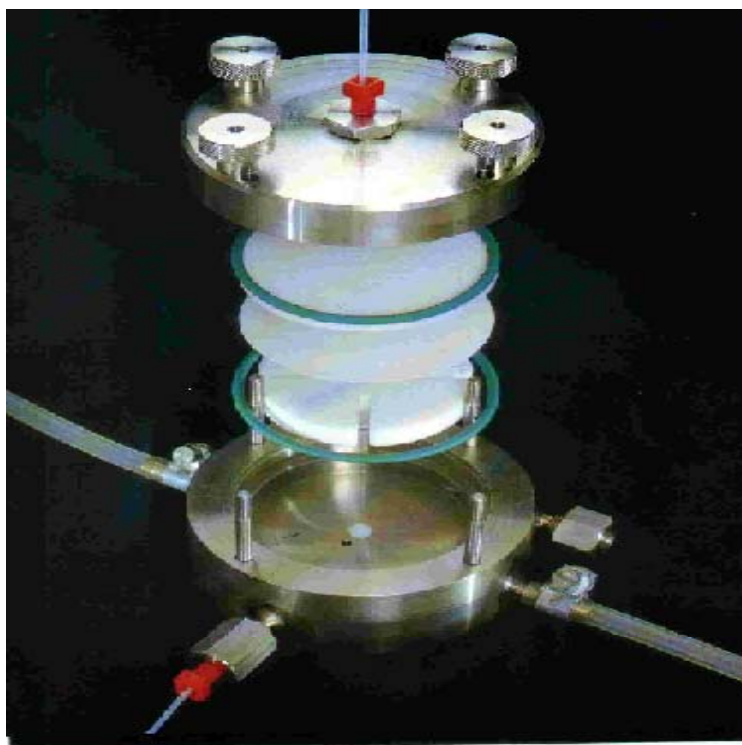
Šaržni reaktor je korišten za provedbu šaržnog pokusa oksidacije L-fenilalanina pomoću oksidaze L-AAO, ponovljivog šaržnog i šaržnog pokusa oksidacije L-fenilalanina bez dodatka katalaze. Sastoji se od reakcijske posude (Slika 3.3.) opremljene magnetskim mješalom smještene u termostatu za održavanje konstantne temperature.



Slika 3.3. Shema šaržnog reaktora.

3.2.2. Enzimski membranski reaktor (EMR)

Enzimski membranski reaktor je prikazan na slici 3.4.



Slika 3.4. Enzimski membranski reaktor (EMR).

Reakcija oksidacije L-fenilalanina je provedena i u protočno-kotlastom enzimskom membranskom reaktoru (EMR) koji je prikazan na slici 3.4. Na slici su vidljivi ulazni i izlazni tok otopine, te ulaz i izlaz vode iz termostata, kao i septum za uzimanje uzorka iz reaktora. U reaktoru se nalazi membrana koja veličinom svojih pora omogućava zadržavanje enzima u reaktoru, te normalan protok produkata manje molekulske mase. U ovom radu je korištena polimerna membrana veličine pora 50 kDa (*Amicon*). Reaktor također ima razdjeljivač protoka koji omogućava jednoliko raspoređivanje ulazne otopine po reaktoru, te magnetsko mješalo.

3.2.3. Spektrofotometar

Mjerenje aktivnosti enzima L-AAO provedeno je uporabom enzimskog testa³⁴ na dvoznačnom spektrofotometru (UV-1601, SHIMADZU).

3.2.4. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

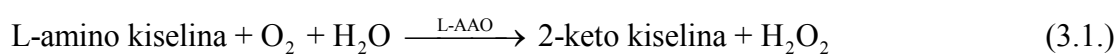
Koncentracije supstrata i produkata su određivane HPLC-om (Sykam, SHIMADZU) sa UV-VIS detektorom (SPD-10A, SHIMADZU) na 254 nm, pri temperaturi od 30 °C. Uređaj je bio opremljen integratorom (C-R6A, Sykam) i termostatom (4110, Sykam).

3.3. ANALITIČKE METODE

Aktivnost enzima oksidaze L-amino kiselina iz *C. adamanteus* je određivana spektrofotometrijski, a određivanje koncentracije supstrata L-fenilalanina i fenilpirogroždane kiseline provedeno je kapljevinskom kromatografijom visokog učinka.

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

Kinetika enzima oksidaze L-amino kiselina iz *C. adamanteus* je određena enzimskim testom koji se temelji na sljedećim jednadžbama:



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 nastajanja mjeri brzina prve reakcije (Jed. 3.1.), 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 $\lambda = 436$ nm, a tu reakciju katalizira enzim peroksidaza (POD). Važno je naglasiti da peroksidaza mora biti u suvišku, odnosno njena koncentracija mora biti dovoljno visoka kako bi prva reakcija (oksidacije amino kiselina) bila ona sporija. Test je opisan u Boehringovom priručniku³⁴. Otopine potrebne za test su: fosfatni pufer, 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-fenilalanina u fosfatnom puferu koncentracije 10 mmol dm^{-3} ; otopina enzima L-AAO, 10 mg cm^{-3} . Mjerenja se provode u kvarcnoj kiveti volumena 3 cm^3 , a sastav testa je prikazan u tablici 3.1.

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

Otopina	V [cm^3]
L-fenilalanin otopljen u fosfatnom puferu	2,97-x
o-dianizidin	0,02
peroksidaza	0,01
L-AAO	0,01
pufer	x

Provedenim mjerenjem je dobiven pad aktivnosti s vremenom, iz kojeg je izračunata volumna ili specifična aktivnost prema jednadžbama 3.3. i 3.4., te je na temelju rezultata testa određena K_m vrijednost supstrata L-fenilalanina za enzim L-AAO. Osim toga, istim je testom određena inhibicijska konstanta glavnog reakcijskog produkta fenilpirogroždane kiseline.

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

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

gdje je:

V_r – ukupni volumen uzorka u kiveti, cm^3 ;

V_E – volumen dodanog enzima, cm^3 ;

ϵ_{340} – ekstinkcijski koeficijent pri valnoj duljini $\lambda = 340$ nm, $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$, ($\epsilon_{340} = 8,1 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$);

d – promjer kivete, cm, ($d = 1$ cm);

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$ – promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca), min^{-1} ;

$V.A.$ – volumna aktivnost, U cm^{-3} ;

$S.A.$ – specifična aktivnost, U mg^{-1} ;

c_{L-AAO} – koncentracija enzima, mg cm^{-3} .

3.3.2. Određivanje koncentracije L-fenilalanina i fenilpirogroždane kiseline

Koncentracije L-fenilalanina i fenilpirogroždane kiseline su određene kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC) sa UV detektorom pri valnoj duljini od 254 nm na koloni za amino kiseline LiChrosper 100, RP-18 (5 μm). Kao mobilna faza je korištena otopina natrijeva acetata koncentracije 20 mmol dm^{-3} i pH vrijednosti 4,0 i metanola u volumnom omjeru 3:1 pri protoku 0,5 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$. Standardne otopine L-fenilalanina i fenilpiruvata su pripravljene otapanjem određenih masa standarda u klorovodičnoj kiselini, $c_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Na taj su način dobiveni baždarni pravci (Prilog 1. i 2.).

Uzorci uzeti pri provedbi šaržnog pokusa, ponovljivog šaržnog pokusa, šaržnog pokusa bez dodatka katalaze i protočnog kotlastog pokusa u enzimskom membranskom reaktoru su također otopljeni u klorovodičnoj kiselini, $c_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$. Time je osigurana veća stabilnost uzorka i dobra topljivost reaktanata i produkata.

Vremena zadržavanja L-fenilalanina i fenilpirogroždane kiseline su iznosila 3,69 i 4,50 min (Prilog 3.).

3.4. BIOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-FENILALANINA

3.4.1. Provedba šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina bez dodatka katalaze

25 cm^3 otopine L-fenilalanina u fosfatnom puferu koncentracije 15 mmol dm^{-3} je dodano u šaržni reaktor volumena 50 cm^3 i termostatirano pri temperaturi 30 °C. Prije započinjanja reakcije dodatkom enzima, uzet je početni uzorak iz reaktora i analiziran na HPLC-u. Nakon analize početnog uzorka dodana je oksidaza L-AAO tako da je koncentracija

enzima u reaktoru bila 1 mg cm^{-3} , te su uzimani uzorci (20-100 μL) u prethodno definiranim vremenskim intervalima i analizirani na prethodno navedeni način.

3.4.2. Provedba šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina

Otopina L-fenilalanina u fosfatnom puferu je dodana u reaktor volumena 25 cm^3 i termostatirana na temperaturu od $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon uzimanja i analiziranja početnog uzorka dodana je katalaza tako da joj je početna koncentracija u reaktoru bila $0,04 \text{ mg cm}^{-3}$, a potom i oksidaza tako da je njena koncentracija u reaktoru bila $0,7 \text{ mg cm}^{-3}$. Reakcija je praćena uzimanjem i analiziranjem uzoraka kao i u prethodno opisanom pokusu.

3.4.3. Provedba ponovljivog šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina

Sam postupak provedbe ponovljivog šaržnog pokusa se ne razlikuje od provedbe šaržnog pokusa. Nakon što je koncentracija L-fenilalanina pala na nulu, u reaktor je dodan svježi L-fenilalanin otopljen u fosfatnom puferu u kojem se reakcija provodila. Masa L-fenilalanina koja je otopljena je odvagana tako da mu je koncentracija u reaktoru bila oko 15 mmol dm^{-3} . Volumen pufera u kojem je L-Phe otopljen je uzet tako da se nadoknadi smanjenje volumena zbog uzimanja uzorka tijekom prethodnog ciklusa, kako se volumen ne bi bitno mijenjao tijekom pokusa. Volumen uzoraka koji su uzimani iz reaktora iznosio je 20-100 μL . Tijekom pokusa je bilo potrebno dodavati novu katalazu u reaktor zbog inhibicije oksidaze nastalim produktom.

3.4.4. Provedba kontinuirane biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina u enzimskom membranskom reaktoru (EMR)

Na početku pokusa je prvo osigurana kontinuirana dobava otopine L-Phe u puferu koncentracije 10 mmol dm^{-3} pomoću klipne pumpe i protjecanje kroz enzimski membranski reaktor, te je nakon stabilizacije protoka uzet početni uzorak. Nakon analize početnog uzorka, kroz injekcijski septum je dodana prvo katalaza tako da je njena početna koncentracija u reaktoru bila $0,2 \text{ mg cm}^{-3}$, a potom i oksidaza tako da je njena početna koncentracija u reaktoru bila 1 mg cm^{-3} . Tijek reakcije je praćen uzimanjem i analiziranjem uzoraka u određenim vremenskim intervalima.

3.5. 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 i produkta u vremenu (eksperimenti u šaržnom reaktoru i protočno-kotlastom EMR-u) procijenjeni su parametri modela.

Parametri modela su procijenjeni nelinearnom regresijom koristeći simpleks metodu ili metodu najmanjih kvadrata koje su sadržane u programskom paketu SCIENTIST. 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 pogreške. Za simulacije procesa pomoću modela je korišten *Episode* algoritam za rješavanje krutih diferencijalnih jednadžbi koji je sastavni dio programskog paketa SCIENTIST³⁵.

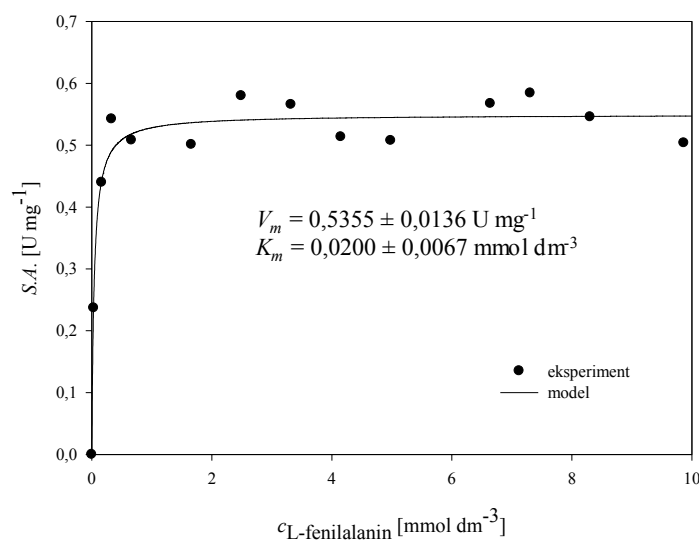
4. REZULTATI I RASPRAVA

Provedene su dvije serije pokusa. U prvoj seriji pokusa je ispitana kinetika enzimske oksidacije L-fenilalanina katalizirane s L-AAO iz *Crotalus adamanteus* i određena inhibicijska konstanta produkta fenilpirogroždane kiseline mjerenjem u kiveti spektrofotometra. Rezultati su prikazani na slikama 4.1. i 4.2.

U drugoj seriji pokusa je provedena oksidacija L-fenilalanina uz enzim L-AAO u šaržnom reaktoru bez dodatka katalaze, zatim u šaržnom reaktoru sa katalazom i u šaržnom reaktoru s ponovljivom dobavom svježeg reaktanta, te kontinuirana oksidacija L-fenilalanina u protočnom kotlastom enzimskom membranskom reaktoru (EMR). Rezultati su prikazani na slikama 4.3., 4.4., 4.5. i 4.6.

4.1. ISPITIVANJE KINETIKE BOKATALITIČKE OKSIDACIJE L-FENILALANINA KATALIZIRANE OKSIDAZOM L-AMINO KISELINA (L-AAO)

4.1.1. Ispitivanje kinetike enzimske oksidacije L-fenilalanina katalizirane sa L-AAO



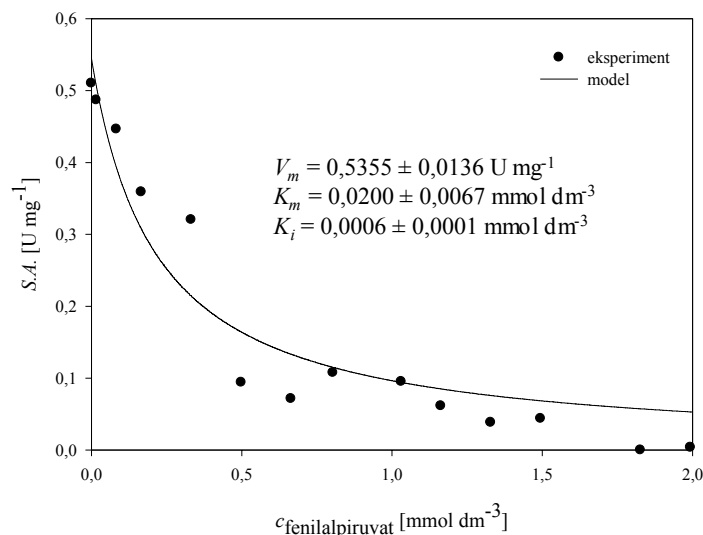
Slika 4.1. Rezultati ispitivanja kinetike enzimske oksidacije L-Phe katalizirane s L-AAO iz *C. adamanteus* u fosfatnom puferu ($c_{L-AAO} = 0,0333 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,6, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$) sa procijenjenim parametrima Michaelis-Menten-ove kinetike (Jed. 2.7.).

Kinetika enzimske oksidacije L-Phe katalizirane s L-AAO je mjerena u fosfatnom puferu ($c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,6). Početna brzina reakcije oksidacije L-fenilalanina

katalizirane sa L-AAO je jednaka specifičnoj aktivnosti enzima L-AAO. Stoga je u daljnjim kinetičkim razmatranjima umjesto uobičajene ovisnosti koncentracija supstrata (produkta)-početna brzina reakcije, korišten prikaz ovisnosti koncentracije supstrata (produkta) o specifičnoj aktivnosti enzima. Na slici 4.1. su prikazani rezultati ovisnosti specifične aktivnosti enzima L-AAO o koncentraciji supstrata, te parametri Michaelis-Menten-ovog kinetičkog izraza (Jed. 2.7.) procijenjeni iz rezultata pokusa nelinearnom regresijom. Niska vrijednost konstante K_m ukazuje na visoku specifičnost ovog enzima na L-fenilalanin.

4.1.2. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO produktom fenilpirogrožđanom kiselinom

Ispitivanje moguće inhibicije produktom, fenilpirogrožđanom kiselinom, provedeno je pri različitim početnim koncentracijama fenilpirogrožđane kiseline. Mjerenja su provedena pokusima u kiveti u fosfatnom puferu ($c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,6). Na slici 4.2. su prikazani rezultati ovisnosti specifične aktivnosti enzima L-AAO o koncentraciji produkta, parametri Michaelis-Menten-ovog kinetičkog izraza i inhibicijska konstanta (Jed. 2.8.) procijenjeni iz rezultata pokusa nelinearnom regresijom.

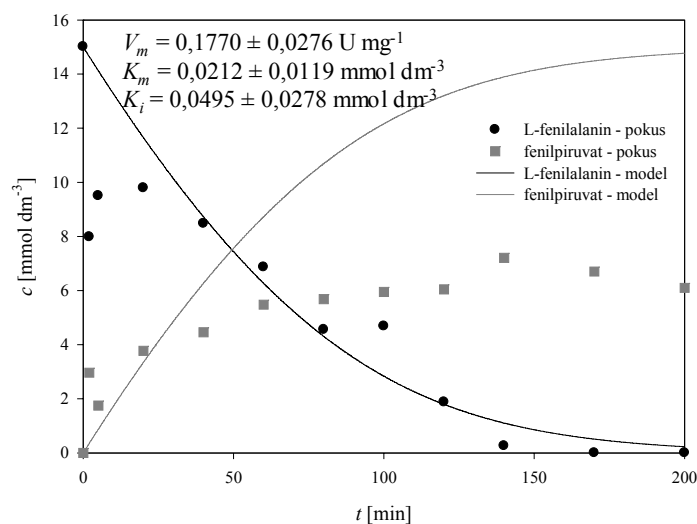


Slika 4.2. Rezultati ispitivanja inhibicije enzima L-AAO produktom fenilpirogrožđanom kiselinom u fosfatnom puferu ($c_{\text{L-AAO}} = 0,0333 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,6, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$) sa procijenjenim parametrima Michaelis-Menten-ove kinetike i inhibicijskom konstantom (Jed. 2.8.).

4.2. BIOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-FENILALANINA

4.2.1. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u šaržnom sustavu bez katalaze uz enzim L-AAO

Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina je provedena u šaržnom reaktoru uz početnu koncentraciju L-Phe od 15 mmol dm^{-3} u fosfatnom puferu ($c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,6) pri $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Kako je stvarna koncentracija L-fenilalanina bila vrlo blizu 15 mmol dm^{-3} , to su sve vrijednosti normirane na 15 mmol dm^{-3} kako bi se različiti pokusi mogli uspoređivati. Koncentracija enzima L-AAO u reaktoru je bila 1 mg cm^{-3} , a katalaza u ovom pokusu nije dodana.



Slika 4.3. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina bez katalaze u šaržnom sustavu ($c_{\text{L-AAO}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,6, $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

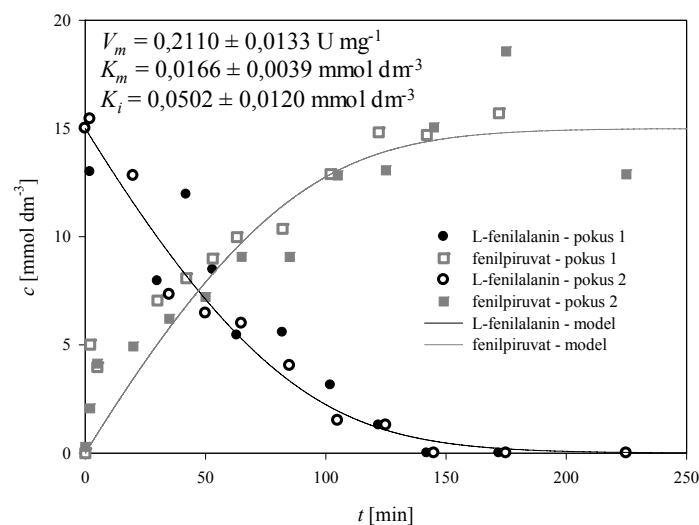
Za opis biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina je predložen model enzimske kinetike uz inhibiciju produktom (fenilpirogroždanoj kiselini). Parametri modela su optimirani, te je dobiveno dobro slaganje eksperimentalnih podataka i podataka izračunatih pomoću modela za promjenu koncentracije L-fenilalanina (Slika 4.3.). Do odstupanja eksperimentalno dobivenih vrijednosti koncentracija fenilpirogroždane kiseline od onih izračunatih modelom dolazi jer je biokatalitička oksidacija L-fenilalanina provedena bez dodatka katalaze. Bez prisutnosti katalaze, koja uklanja vodikov peroksid, dolazi do dekarboksilacije fenilpirogroždane kiseline u fenilactenu kiselinu (Slika 2.1.). Promjena koncentracije fenilactene kiseline u sustavu nije praćena, zbog nemogućnosti njenog kvantitativnog određivanja na korištenom HPLC sustavu.

Parametri modela (V_m , K_m i K_i) procijenjeni iz podataka koncentracija-vrijeme u šaržnom sustavu bez dodatka katalaze (Slika 4.3.) odstupaju od parametara procijenjenih iz eksperimentalnih podataka dobivenih u kivetu (Slike 4.1., 4.2. i tablica 4.1.). Vjerojatni uzrok tome je postojanje nekompetitivne inhibicije nekom od komponenti reakcijske smjese, čiji utjecaj na kinetička mjerenja nije bilo moguće primjetiti iz rezultata mjerenja provedenih u kivetu.

Tablica 4.1. Usporedba procijenjenih parametara modela za različite vrste pokusa.

Vrsta pokusa	V_m [U mg ⁻¹]	K_m [mmol dm ⁻³]	K_i [mmol dm ⁻³]	k_d [min ⁻¹]
kiveta	0,5355 ± 0,0136	0,0200 ± 0,0067	-	-
inhibicija produktom	0,5355 ± 0,0136	0,0200 ± 0,0067	0,0006 ± 0,0001	-
šaržni bez katalaze	0,1770 ± 0,0276	0,0212 ± 0,0119	0,0495 ± 0,0278	-
šaržni sa katalazom	0,2110 ± 0,0133	0,0166 ± 0,0039	0,0502 ± 0,0120	-
ponovljivi šaržni	0,2986 ± 0,0304	0,0252 ± 0,0060	0,0279 ± 0,0066	0,0226 ± 0,0038
kontinuirani, $\tau = 75$ min	0,2110 ± 0,0133	0,0166 ± 0,0039	0,00052 ± 0,00026	-
kontinuirani, $\tau = 270$ min	0,2110 ± 0,0133	0,0166 ± 0,0039	0,00052 ± 0,00026	0,0123 ± 0,0082

4.2.2. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u šaržnom sustavu sa katalazom uz enzim L-AAO



Slika 4.4. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u šaržnom sustavu uz prisustvo katalaze ($c_{L-AAO} = 0,7 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{katalaza} = 0,04 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{puffer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,6, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$).

Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina je provedena u fosfatnom puferu u sustavu sa katalazom radi *in situ* uklanjanja vodikovog peroksida koji uzrokuje dekarboksilaciju produkta fenilpirogroždane kiseline. Katalaza je dodana u visokoj koncentraciji ($C_{\text{katalaza}} = 0,04 \text{ mg cm}^{-3}$), kako bi se osiguralo njeno katalitičko djelovanje za vrijeme trajanja čitavog eksperimenta (Slika 4.4.). Provedena su dva istovrsna pokusa kako bi se ustanovila ponovljivost procesa biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina.

Parametri modela procijenjeni iz podataka koncentracija-vrijeme u šaržnom sustavu uz prisustvo katalaze (Slika 4.4.) odstupaju od parametara procijenjenih iz eksperimentalnih podataka dobivenih pokusima u kiveti (Slike 4.1., 4.2. i tablica 4.1.). Kao i u slučaju provedbe biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina u šaržnom sustavu bez katalaze, vjerojatni razlog ovog odstupanja je postojanje nekompetitivne inhibicije nekom od komponenata reakcijskog sustava. Vidljivo je (Tablica 4.1.) da su parametri Michaelis-Menten-ovog izraza procijenjeni iz šaržnog pokusa sa i bez katalaze, uzimajući u obzir interval pouzdanosti procjene, praktički jednaki. Posebno je interesantno da je procijenjena vrijednost konstante inhibicije K_i praktički jednaka u oba slučaja. Kako je u pokusu bez katalaze (Slika 4.3.) nastalo dva puta manje fenilpirogroždane kiseline ovim je još jednom pokazana potreba dodatka ovog enzima kako bi se spriječila akumulacija vodikovog peroksida te sa njim povezana dekarboksilacija produkta fenilpirogroždane kiseline.

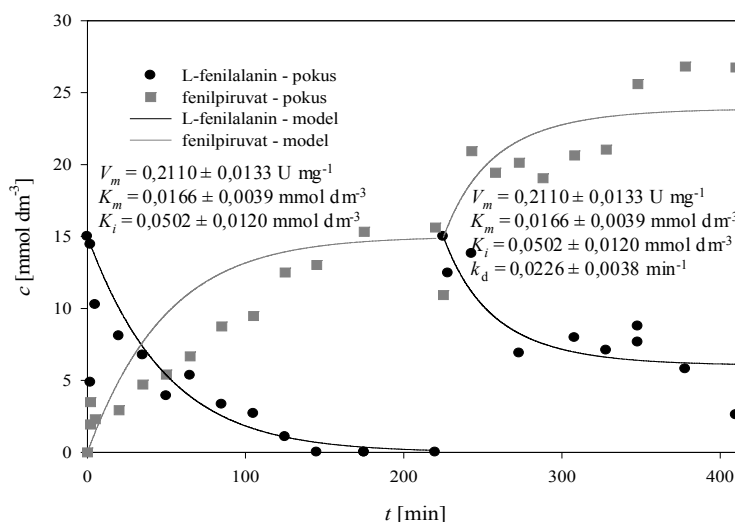
Iz rezultata dva pokusa (Slika 4.4.) vidljiva je njihova visoka ponovljivost, kao i dobro slaganje rezultata pokusa sa rezultatima simulacije procesa pomoću modela.

4.2.3. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u ponovljivom šaržnom sustavu sa katalazom uz enzim L-AAO

Osim prethodno opisanih šaržnih eksperimenata proveden je i ponovljivi šaržni pokus biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina. Dobiveni rezultati praćenja koncentracija L-fenilalanina i fenilpirogroždane kiseline tijekom eksperimenta su prikazani na slici 4.5. Može se vidjeti da je u prvom ciklusu postignuta 100 %-tna konverzija L-fenilalanina nakon 180 minuta. U drugom ciklusu je brzina reakcije bila nešto sporija, te je nakon 200 minuta postignuta 80 %-tna konverzija. Do smanjenja brzine reakcije dolazi zbog smanjenja aktivnosti enzima uzrokovanog njegovom deaktivacijom i zbog nakupljanja produkata u sustavu.

Ekperimentalni rezultati su opisani pomoću kinetičkog modela koji uključuje brzinu deaktivacije enzima (Jed. 2.9.), te inhibiciju produktom fenilpirogroždanom kiselinom. Ako

se usporede rezultati šaržnog pokusa bez katalaze (Slika 4.3.) i ponovljivog šaržnog pokusa može se uočiti konstantna prisutnost inhibicije produktom fenilpirogrožđanom kiselinom. U ponovljivom šaržnom pokusu zbog stalnog nakupljanja produkta dolazi do inhibicije enzima koja je zbog velike osjetljivosti enzima na fenilpirogrožđanu kiselinu bila i očekivana. U šaržnom pokusu provedenom bez prisustva katalaze, osim navedene inhibicije enzima produktom, dolazi do dekarboksilacije fenilpirogrožđane kiseline u feniloctenu kiselinu zbog neuklanjanja vodikovog peroksida a time i do smanjenja konačne koncentracije željenog produkta u reaktoru.

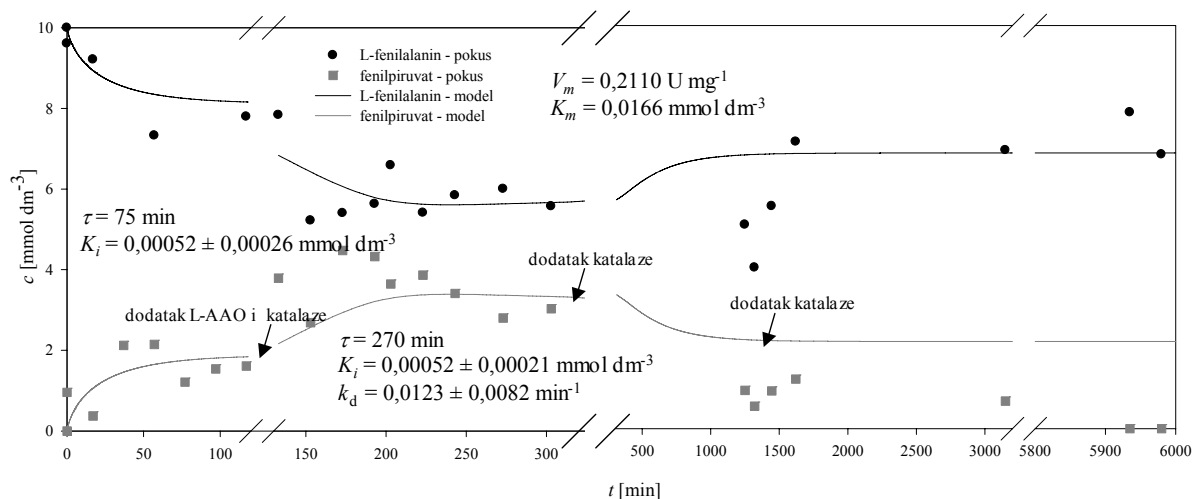


Slika 4.5. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u ponovljivom šaržnom pokusu ($c_{L-AAO} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{katalaza}} = 0,08 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{puffer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,6, $T = 30 \text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.2.4. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u kontinuiranom sustavu sa katalazom uz enzim L-AAO

Kontinuirana reakcija oksidacije L-fenilalanina je provedena u enzimskom membranskom reaktoru koji radi kao protočni kotlasti reaktor. Pri početnoj koncentraciji L-fenilalanina 10 mmol dm^{-3} , koncentracija enzima L-AAO je bila 1 mg cm^{-3} , a koncentracija katalaze $0,2 \text{ mg cm}^{-3}$. Rezultati pokusa prikazani su na slici 4.6. i tablici 4.2. Obzirom da za 117 minuta nije došlo do očekivane konverzije zbog jake inhibicije produktom dodana je nova količina enzima L-AAO tako da mu je ukupna koncentracija bila 2 mg cm^{-3} . U isto vrijeme dodana je i katalaza tako da joj je ukupna koncentracija bila $c_{\text{katalaza}} = 0,4 \text{ mg cm}^{-3}$. Katalaza je dodana kako bi se uklonio nastali vodikov peroksid. Dodatno je smanjen i protok sa $8 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 75 \text{ min}$ na minimalnu vrijednost određenu karakteristikama korištene klipne pumpe i on

je iznosio $2,2 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$, $\tau = 270 \text{ min}$. Dodatak enzima i smanjenje protoka (povećanje vremena zadržavanja) imali su za posljedicu povećanje konverzije sa 20 % na 45 % ($t = 150 - 300 \text{ min}$). Katalaza je ponovno dodana nakon 303 minute (ukupna koncentracija katalaze u sustavu je iznosila $c_{\text{katalaza}} = 0,9 \text{ mg cm}^{-3}$), ali njen dodatak nije imao značajniji utjecaj na povećanje konverzije. Suprotno očekivanjima konverzija je dodatno smanjena i nakon 1320 min provedbe pokusa ($\approx 4 \tau$) iznosila je 35 %. Razlog tome prije svega treba tražiti u deaktivaciji enzima L-AAO i njegovoj inhibiciji komponentama reakcijske smjese (nekompetitivna inhibicija). U prilog tome ide i podatak da dodatak katalaze u vremenu $t = 1320 \text{ min}$ nije imao ni pozitivne ni negativne učinke na konverziju. Na kraju provedbe pokusa konverzija je bila oko 35 %, ali je koncentracija fenilpirogroždane kiseline bila jednaka nuli što upućuje na njenu razgradnju vodikovim peroksidom, odnosno na nedostatak katalaze potrebne za razgrađivanje vodikovog peroksida u sustavu.



Slika 4.6. Biokatalitička oksidacija L-fenilalanina u kontinuiranom pokusu ($c_{\text{L-AAO}} = 1-2 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{katalaza}} = 0,2-1,1 \text{ mg cm}^{-3}$, $c_{\text{puffer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$, pH 7,6, $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$).

Aktivnost enzima L-AAO je praćena tijekom provedbe biotransformacije L-fenilalanina u kontinuiranom enzimskom membranskom reaktoru. Ustanovljeno je da enzim L-AAO ne prolazi kroz membranu enzimskog membranskog reaktora jer je njena aktivnost u izlaznom toku bila jednaka nuli. Pad aktivnosti enzima L-AAO praćen je i u reaktoru i prikazan je u tablici 4.2. Iako je pad aktivnosti enzima L-AAO znan ($t = 3000 \text{ min}$) konverzija L-fenilalanina (Slika 4.6.) je praktički konstantna. Ovime je još jednom potvrđeno da pad koncentracije fenilpirogroždane kiseline nije posljedica gubitka aktivnosti enzima L-AAO već je uzrokovan njenom dekarboksilacijom povezanom s nedostatkom enzima katalaze u sustavu.

Tablica 4.2. Ovisnost specifične aktivnosti enzima L-AAO o vremenu provedbe pokusa.

t [min]	$S.A.$ [$U\ mg^{-1}$]
1290	0,171
1610	0,167
3055	0,063

Dodatno su rezultati pokusa provedenog u kontinuiranom enzimskom membranskom reaktoru uspoređeni s rezultatima simulacije procesa pomoću modela. Parametri modela K_i i k_d procijenjeni su iz rezultata kontinuiranog pokusa. Vidljivo je da je procijenjena vrijednost konstante inhibicije K_i manja od one procijenjene u pokusima provedenim u kivetu i u šaržnim pokusima (Tablica 4.1.). Ovo je u suprotnosti sa očekivanim rezultatima jer je koncentracija produkta u kontinuiranom sustavu ($c_{\max} = 4\ \text{mmol}\ \text{dm}^{-3}$) bila znatno manja nego u šaržnim pokusima ($c_{\max} = 15\ \text{mmol}\ \text{dm}^{-3}$). Osim toga kontinuirani sustavi se i upotrebljavaju za provedbu procesa u kojima je izražena inhibicija produktom.

Pokazalo se da model procesa biokatalitičke oksidacije L-fenilalanina može zadovoljavajuće opisati rezultate pokusa. Model daje mogućnost opisivanja kako stacionarnih stanja tako i dinamičke promjene pri skokomičnoj pobudi izazvanoj bilo dodatkom svježeg enzima bilo promjenom protoka (Slika 4.6.).

5. ZAKLJUČAK

Rezultati ispitivanja kinetike enzimske reakcije oksidacije L-fenilalanina katalizirane enzimom L-AAO iz *Crotalus adamanteus* ukazuju na visoku specifičnost spomenutog enzima na L-fenilalanin kao supstrat, što je vidljivo iz niske K_m vrijednosti ($K_m = 0,0200 \pm 0,0067 \text{ mmol dm}^{-3}$). Osim visoke specifičnosti na supstrat L-fenilalanin enzim je pokazao i visoku specifičnu aktivnost ($V_m = 0,5355 \pm 0,0136 \text{ U mg}^{-1}$).

Obzirom da u reakciji oksidacije L-fenilalanina nastaje vodikov peroksid bilo ga je potrebno uklanjati katalazom kako ne bi došlo do dekarboksilacije dobivenog produkta fenilpirogroždane kiseline u feniloctenu kiselinu. To je vidljivo iz pokusa provedenog u šaržnom reaktoru bez dodatka katalaze gdje je unatoč 100 %-tnoj konverziji L-fenilalanina koncentracija dobivenog produkta dva puta manja od one dobivene u šaržnom pokusu uz dodatak katalaze. Eksperimentalno je određena i inhibicija produktom fenilpirogrožđanom kiselinom ($K_i = 0,0006 \pm 0,0001 \text{ mmol dm}^{-3}$) pokusima provedenim u kivetu.

Provedbom pokusa u ponovljivom šaržnom reaktoru i protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru pokazalo se da duljom uporabom enzim gubi na aktivnosti, te dolazi do deaktivacije enzima (u ponovljivom šaržnom reaktoru $k_d = 0,0226 \pm 0,0038 \text{ min}^{-1}$, u protočno kotlastom enzimskom membranskom reaktoru $k_d = 0,0123 \pm 0,0082 \text{ min}^{-1}$).

Rezultati simulacija pretpostavljenog matematičkog modela procesa biokatalitičke L-fenilalanina dobro opisuju eksperimentalne podatke. Kod pokusa provedenih u šaržnom sustavu vrijednost inhibicijske konstante se nešto razlikuje od one procijenjene iz pokusa provedenih u kivetu što može ukazivati na prisustvo nekompetitivne inhibicije nekom od komponenata reakcijskog sustava prisutnom u pokusima provedenim u reaktoru.

6. LITERATURA

1. **Schmid, A.; Hollmann, F.; Byung Park, J.; Bühler, B.:** The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13** (2002) 359.
2. **Giorno, L.; Drioli, E.:** Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives, *Trends in Biotechnol.*, **18** (2000) 339.
3. **Prescott, L.M.; Harley, J.P.; Klein, D.A.:** Microbiology, *McGraw-Hill*, 2000, str. 161.
4. **Sonia, F.; Loredano, P.; Mirella, P.S.:** Engineering, expression and purification of a His-tagged chimeric D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*, *Enz. Microb. Technol.*, **29** (2001) 407.
5. **Cooper, G.M.:** The Cell: A Molecular Approach, ASM Press, Sinauer Assoc, 2000, str. 56.
6. **Findrik Z.:** Biokatalitička oksidacija L-DOPE, magistarski rad, Zagreb, 2004.
7. **Vasić-Rački, Đ.:** Osnovne značajke heterogenih biokatalizatora, *Kem. Ind.*, **35** (11) (1986) 603.
8. **Cao, L.; Langen, L.; Sheldon, R.:** Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free?, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **14** (2003) 387.
9. **Fernández-Lafuente, R.; Rodrigez, V.; Guisán, J.M.:** The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into α -keto acids (phenylpyruvic acid), *Enzyme Microb. Technol.*, **23** (1998) 28.
10. **Upadhyya, R.; Nagajyothi, H.; Bhat, S.G.:** Stabilization of D-Amino Acid Oxidase and Catalase in Permeabilized *Rhodotorula gracilis* Cells and Its Application for the Preparation of α -ketoacids, *Biotechnol. Bioeng.*, **68** (2000) 430.
11. **Gabler, M.; Hensel, M.; Fischer, L.:** Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases, *Enzyme Microb. Technol.*, **27** (2000) 605.
12. **Geueke, B.; Hummel, W.:** A new bacterial L-aminoacid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization, *Enzyme Microb. Technol.*, **31** (2002) 77.
13. **Yao, T.; Takashima, K.; Nanjyuo, Y.:** Dual Enzyme Electrode with Optical Specificity for L- and D-Amino Acids, *Anal. Sci.*, **18** (2002) 1039.

14. **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 carotarium* 2Pfa isolated from soil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41** (1994) 670.
15. **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.
16. **Pawelek, P.D.; Cheach, 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.
17. **Raibekas, A.A.; Massey, V.:** Glycerol-induced development of catalytically active conformation of *Crotalus adamanteus* L-aminoacid oxidase *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93** (1996) 7546.
18. **Ali, S.A.; Stoeva, S.; Abbasi, A.; Alam, J.M.; Kayed, R.; Faigle, M.; Neumeister, B.; Voelter W.:** Isolation, Structural and Functional Characterization of an Apoptosis-Inducing L-Amino Acid Oxidase from Leaf-Nosed Viper (*Eristocophis macmahoni*) Snake Venom, *Arch. Biochem. Biophys.*, **15** (2000) 216.
19. **Souza, D.H.F.; Eugenio, L.M.; Fletcher, J.E.; Jiang, M.-S.; Garratt, R.C.; Oliva, G.; Selistre-de-Aranjo, H.S.:** Isolation and Structural Characterization of a Cytotoxic L-Amino Acid Oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* Snake Venom: Preliminary Crystallographic Data, *Arch. Biochem. Biophys.*, **15** (1999)285.
20. **Macheroux, P.; Seth, O.; Bollschweiler, C.; Schwarz, M.; Kurfürst, M.; Au, L.-C.; Ghisla, S.:** L-Amino Acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*, *Eur. J. Biochem.*, **268** (2001) 1679.
21. **Murphy, E.F.; Gilmour, S.G.; Crabbe, M.J.:** Effective experimental design: enzyme kinetics in the bioinformatics era, *Drug disc. Today.*, **7** (20) (2002) 187.
22. **Geyer, A.; Fitzpatrick, T.B.; Pawelek, P.D.; Kitzing, K.; Vrieling, A.; Ghisla, S.; Macheroux, P.:** Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Callolesma rhodostoma*, *Eur. J. Biochem.*, **268** (2001) 4044.
23. **Gonçalves, V.M.; Leite, L.C.C.; Raw, I.; Cabrera-Crespo, J.:** Purification of catalase from human placenta, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **29** (1999) 73.
24. **Reid III, T.J.; Murthy, M.R.N.; 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.

25. **Sabelli, H.C.:** Clinical studies on the phenylethylamine hypothesis of affective disorder: urine and blood phenylacetic acid and phenylalanine dietary supplements, *J. Clin. Psychiatry*, **47** (1986) 66.
26. **Fischer, E.; Heller, B.; Nachon, M.; Spatz, H.:** Therapy of depression by phenylalanine, *Arzneimittelforschung*, **25** (1975) 132.
27. **Heller, B.; Fischer, E.; Martin, R.:** Therapeutic action of D-phenylalanine in Parkinson's disease, *Arzneimittelforschung*, **26** (1976) 577.
28. **Schröder, T.; Andreesen, J.R.:** Studies on the inactivation of the flavoprotein D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis*, *Appl. Microb. Biotechnol.*, **45** (1996) 458.
29. **Vasić-Rački, Đ.; Kragl, U.; Liese, A.:** Benefits of Enzyme Kinetics Modelling, *Chem. Biochem. Eng.*, **17** (2003) 7.
30. **Bódalo, A.; Gómez, J.L.; Bastida, J.; León, G.; Máximo, M.F.; Hidalgo, A.M.; Montiel, M.C.:** Kinetic calculations in the enzymatic resolution of DL-amino acids, *Enzyme Microb. Technol.*, **24** (1999) 381.
31. **Carrara, C.R.; Mammarella, E.J.; Rubiolo, A.C.:** Prediction of the fixed-bed reactor behavior using dispersion and plug-flow models with different kinetics for immobilised enzyme, *Chem. Eng. J.*, **92** (2003) 123.
32. **Tichy, S.; Vasić-Rački, Đ.; Schütte, H.:** Modelling of a Multi-Enzyme System, *Chem. Biochem. Eng.*, **1** (1) (1987) 25.
33. **Gomzi, Z.:** Kemijski reaktori, *HINUS*, Zagreb, 1998, str. 36-55.
34. Biochemica information I, Boehringer Mannheim, GmbH, Germany, 1973, pp. 41.
35. SCIENTIST handbook, Micromath[®], Salt Lake City, 1986-1995.

7. POPIS SIMBOLA I SKRAĆENICA

7.1. Simboli

A	površina, -
A	apsorbancija, -
c	koncentracija, mmol dm^{-3} ili mg cm^{-3}
d	promjer kivete spektrofotometra, cm
k	konstanta brzine reakcije, min^{-1}
k_d	konstanta deaktivacije enzima, min^{-1}
K_i	konstanta inhibicije, mmol dm^{-3}
K_m	Michaelis-Menten-ova konstanta, mmol dm^{-3}
r	brzina reakcije, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$
$S.A.$	specifična aktivnost enzima, U mg^{-1}
t	vrijeme, min
T	temperatura, $^{\circ}\text{C}$
V	volumen, cm^{-3}
$V.A.$	volumna aktivnost enzima, U cm^{-3}
V_m	maksimalna reakcijska brzina, U mg^{-1}

7.1.1. Grčki simboli

ε_{340}	ekstincijski koeficijent o-dianizidina pri 340 nm, $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ($\varepsilon_{340} = 8,1 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$)
Δ	promjena, -
λ	valna duljina, nm

7.2. Skraćenice

DH ₂	o-dianizidin
D	oksidirani oblik o-dianizidina
EMR	enzimski membranski reaktor
L-AAO	oksidaza L-amino kiselina
L-Phe	L-fenilalanin
PhePyr	fenilpirogroždana kiselina
POD	peroksidaza
0	početni uvjeti

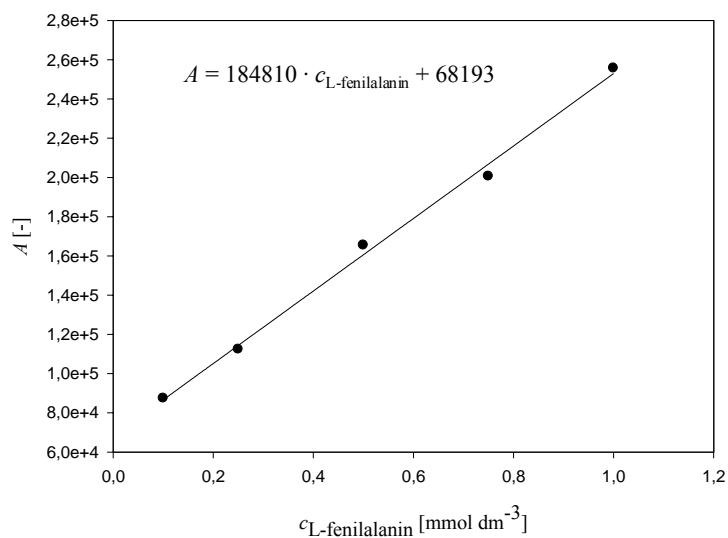
8. PRILOZI

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

PRILOG 2.: Baždarni pravac za određivanje koncentracije fenilpirogroždane kiseline.

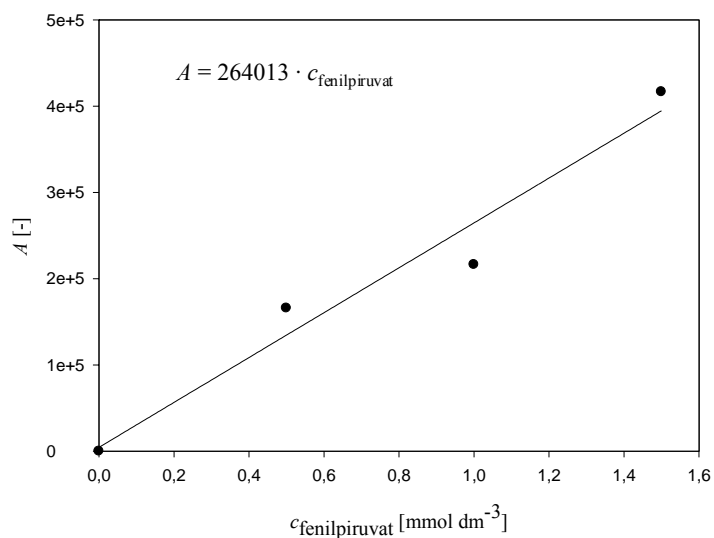
PRILOG 3.: Kromatogram uzorka reakcijske smjese.

PRILOG 1.



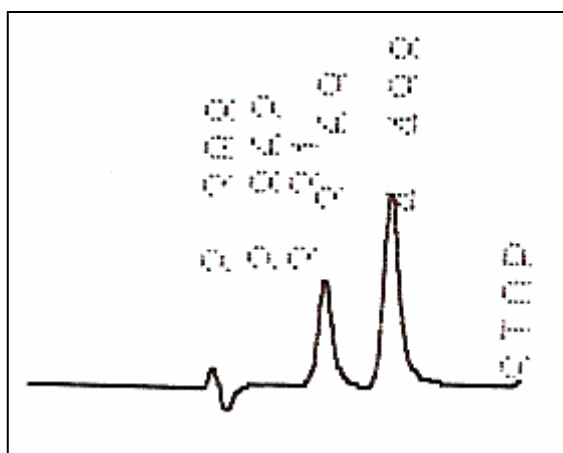
Slika 7.1. Baždarni pravac za određivanje koncentracije L-fenilalanina.

PRILOG 2.



Slika 7.2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije fenilpirogroždane kiseline.

PRILOG 3.



Slika 7.3. Kromatogram uzorka reakcijske smjese: L-fenilalanin ($t = 3,69$ min) i fenilpirogroždana kiselina ($t = 4,50$ min).

ŽIVOTOPIS

Marijana Drmač je rođena 28. veljače 1981. u Fojnici, Bosna i Hercegovina. Završila je opću gimnaziju u Kiseljaku, Bosna i Hercegovina 2000. godine kao učenik generacije. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu je upisala 2000. godine. Tijekom studija je primala Državnu stipendiju koju dodjeljuje Ministarstvo znanosti i tehnologije za studente koji pripadaju među 10 % najboljih studenata. 2005. godine završava Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije.