

# Kinetička karakterizacija oksidaza aminokiselina iz različitih izvora i njihova primjena u oksidaciji L-metionina

---

Žeravica, Sanja

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:331629>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-07**

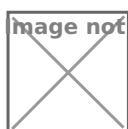


image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology Osijek](#)



image not found or type unknown

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK**

**Sanja Žeravica**

**KINETIČKA KARAKTERIZACIJA OKSIDAZA  
AMINOKISELINA IZ RAZLIČITIH IZVORA I NJIHOVA  
PRIMJENA U OKSIDACIJI L-METIONINA**

**DIPLOMSKI RAD**

**Osijek, veljača, 2015.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek  
Zavod za procesno inženjerstvo  
Katedra za termodinamiku i reakcijsko inženjerstvo  
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

**Znanstveno područje:** Biotehničke znanosti  
**Znanstveno polje:** Prehrambena tehnologija  
**Nastavni predmet:** Kemijski i biokemijski reaktori  
**Tema rada** je prihvaćena na IV. sjednici Odbora za završne i diplomske ispite održanoj 23. 1. 2015.  
**Institucija u kojoj je rad izrađen:** Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu  
**Mentor:** dr. sc. Marina Tišma, docent  
**Pomoć pri izradi:**

### KINETIČKA KARAKTERIZACIJA OKSIDAZA AMINOKISELINA IZ RAZLIČITIH IZVORA I NJIHOVA PRIMJENA U OKSIDACIJI L-METIONINA

Sanja Žeravica, 1983/99

**Sažetak:** Oksidaze L-aminokiselina (L-AAO) su poznate po svojoj specifičnosti prema nizu različitih supstrata. U ovom radu su kinetički karakterizirani enzimi oksidaze L-aminokiselina iz triju različitih izvora. Korišteni su enzimi iz zmijskog otrova kobre roda *Crotalus adamanteus*, zmijskog otrova kobre *Crotalus atrox* i novi enzim iz bakterije *Rhodococcus opacus*. Kao supstrat je korišten L-metionin koji se u prisustvu enzima L-AAO oksidativno deaminira u odgovarajuću  $\alpha$ -keto 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-metionina, odnosno produkta, dobivenih metodom početnih brzina, nelinearnom regresijom su procijenjeni parametri Michaelis-Menteničinog izraza sva tri enzima,  $V_m$  i  $K_m$ , kao i konstanta inhibicije produktom  $K_p$ .

Biotransformacija L-metionina katalizirana oksidazama L-aminokiselina je provedena u kotlastom reaktoru bez dodatka katalaze te u ponovljenom kotlastom reaktoru s dodatkom katalaze. Postavljen je i validiran matematički model procesa biotransformacije L-metionina kataliziranog oksidazama L-aminokiselina.

**Ključne riječi:** oksidaza L-aminokiselina, L-metionin, matematički model procesa

**Rad sadrži:** 33 stranica  
15 slika  
6 tablica  
0 priloga  
19 literaturnih referenci

**Jezik izvornika:** Hrvatski

#### Sastav Povjerenstva za obranu:

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. dr. sc. Ivica Strelec, izv. prof.   | predsjednik   |
| 2. dr. sc. Marina Tišma, doc.          | član-mentor   |
| 3. dr. sc. Natalija Velić, doc.        | član          |
| 4. dr. sc. Mirela Planinić, izv. prof. | zamjena člana |

**Datum obrane:** 27. veljače 2015.

**Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.**

## BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek  
Faculty of Food Technology Osijek  
Department of Process Engineering  
Subdepartment of Thermodynamics and Reaction Engineering  
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

**Scientific area:** Biotechnical sciences  
**Scientific field:** Food technology  
**Course title:** Chemical and biochemical reactors  
**Thesis subject** was approved by the The Board for Final and Graduate Exams held on January 23, 2015.

**Institution where the work was compiled:** Department of Chemical Reaction Engineering and Catalysis, Faculty of Chemical Engineering and Technologies, University of Zagreb

**Mentor:** Marina Tišma, PhD, assistant prof.

**Technical assistance:**

### KINETIC CHARACTERIZATION OF AMINO ACID OXIDASE FROM DIFFERENT SOURCES AND THEIR APPLICATION IN THE OXIDATION OF L-METHIONINE

Sanja Žeravica, 1983/99

**Summary:** L-amino acid oxidases (L-AAO) are well known for their broad substrate specificity. In this work, three L-AAOs from different sources were kinetically characterized: two enzymes from the snake venom of *Crotalus adamanteus* and *Crotalus atrox*, and a new enzyme from bacteria *Rhodococcus opacus*. L-methionine was used as substrate. In the presence of L-AAO, L-methionine oxidizes to corresponding  $\alpha$ -keto acid with production of hydrogen peroxide and ammonia as by-products. The presence of hydrogen peroxide in the reaction solution was unwanted and for its decomposition catalase from beef liver was used.

Parameters of Michaelis-Mentens's equation,  $V_m$ ,  $K_m$  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-methionine and product (method of initial rates).

Biotransformation of L-methionine catalysed by L-AAOs was carried out in batch reactor without the presence of catalase and in repetitive batch reactor with the addition of catalase. A mathematical model of L-methionine biotransformation process was developed and validated.

**Key words:** L-amino acid oxidase, L-methionin, mathematical model of the process

**Thesis contains:** 33 pages  
15 figures  
6 tables  
0 supplements  
19 references

**Original in:** Croatian

#### Defense committee:

- |   |              |
|---|--------------|
| 1. Ivica Strelec, PhD, associate prof.  | chair person |
| 2. Marina Tišma, PhD, assistant prof.   | Supervisor   |
| 3. Natalija Velić, PhD, assistant prof. | Member       |
| 4. Mirela Planinić, PhD, associate prof | stand-in     |

**Defense date:** February 27, 2015.

**Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in** Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Marini Tišma, doc. koja mi je svojim stručnim znanjem i zalaganjem pomogla pri realizaciji ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Đurđi Vasić-Rački, red. prof. i dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević, izv. prof. na nesebičnom trudu i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela.

Najtoplije se zahvaljujem svojim roditeljima, bratu Goranu a posebno svom suprugu Saši za svu pruženu pomoć i podršku tijekom studiranja.

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. ENZIMI</b> .....	<b>4</b>
2.1.1. Oksidaze aminokiselina .....	<b>5</b>
2.1.2. Oksidaze L-aminokiselina .....	<b>6</b>
2.1.3. Katalaza.....	<b>6</b>
<b>2.2. L-METIONIN</b> .....	<b>7</b>
<b>2.3. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA</b> .....	<b>7</b>
<b>2.4. KINETIČKI MODELI ENZIMSKI KATALIZIRANIH REAKCIJA</b> .....	<b>8</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	<b>11</b>
<b>3.1. ZADATAK</b> .....	<b>12</b>
<b>3.2. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>12</b>
3.2.1. Aparatura.....	<b>12</b>
3.2.1.1. Spektrofotometar .....	<b>12</b>
3.2.1.2. Kotlasti reaktor.....	<b>12</b>
3.2.1.3. Visokotlačni tekućinski kromatograf.....	<b>12</b>
3.2.2. Analitičke metoda.....	<b>12</b>
3.2.2.1. Određivanje aktivnosti enzima oksidaze L-aminokiselina (L-AAO) iz <i>C. adamanteus</i> i <i>C. atrox</i> .....	<b>12</b>
3.2.2.2. Određivanje aktivnosti enzima oksidaze L-aminokiselina (L-AAO) iz <i>R. opacus</i> ..	<b>13</b>
3.2.2.3. Određivanje koncentracije supstrata i produkta .....	<b>15</b>
<b>3.3. BOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-METIONINA</b> .....	<b>15</b>
3.3.1. Provedba šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-metionina bez dodatka katalaze..	<b>15</b>
3.3.2. Provedba ponovljivog šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-metionina s dodatkom katalaze.....	<b>15</b>
<b>3.4. MATEMATIČKI MODEL PROCESA OKSIDACIJE L-METIONINA UZ ENZIM L-AAO</b> .....	<b>15</b>
<b>3.5. OBRADA PODATAKA</b> .....	<b>16</b>
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>17</b>
<b>4.1. ISPITIVANJE KINETIKE BOKATALITIČKE OKSIDACIJE L-METIONINA KATALIZIRANE OKSIDAZOM L-AMINOKISELINA (L-AAO)</b> .....	<b>18</b>
4.1.1. Ispitivanje kinetike enzimske oksidacije L-metionina katalizirane s L-AAO iz <i>C. adamanteus</i> .....	<b>18</b>
4.1.2. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz <i>C. adamanteus</i> D-metioninom.....	<b>18</b>
4.1.3. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz <i>C. adamanteus</i> 2-okso-4-metiltiobutiričnom kiselinom.....	<b>19</b>
4.1.4. Ispitivanje kinetike enzimske oksidacije L-metionina katalizirane s L-AAO iz <i>C. atrox</i> ....	<b>20</b>
4.1.5. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz <i>C. atrox</i> D-metioninom.....	<b>21</b>
4.1.6. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz <i>C. atrox</i> produktom 2-okso-4-metiltiobutiričnom kiselinom.....	<b>21</b>
4.1.7. Ispitivanje kinetike enzimske oksidacije L-metionina katalizirane s L-AAO iz <i>R. opacus</i>	<b>22</b>
4.1.8. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz <i>R. opacus</i> D-metioninom .....	<b>23</b>

4.1.9. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz <i>R. opacus</i> produktom 2-okso-4-metiltiobutiričnom kiselinom .....	23
<b>4.2. BOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-METIONINA .....</b>	<b>25</b>
4.2.1. Biokatalitička oksidacija L-metionina katalizirana enzimom L-AAO iz <i>C. adamanteus</i> u šaržnom pokusu.....	25
4.2.2. Biokatalitička oksidacija L-metionina u ponovljivom šaržnom pokusu katalizirana enzimom L-AAO iz <i>C. adamanteus</i> .....	26
4.2.3. Biokatalitička oksidacija L-metionina katalizirana enzimom L-AAO iz <i>C. atrox</i> u šaržnom pokusu.....	27
4.2.4. Biokatalitička oksidacija L-metionina u ponovljivom šaržnom pokusu katalizirana enzimom L-AAO iz <i>C. atrox</i> .....	27
<b>5. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>29</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>31</b>



## Popis oznaka, kratica i simbola

$A$	apsorbancija
$c$	koncentracija, $\text{mmol dm}^{-3}$ ili $\text{mg cm}^{-3}$
$d$	promjer kivete spektrofotometra, $\text{cm}$
$k$	konstanta brzine kemijske reakcije, $\text{min}^{-1}$
$k_d$	konstanta deaktivacije enzima, $\text{min}^{-1}$
$K_i$	konstanta inhibicije, $\text{mmol dm}^{-3}$
$K_m$	Michaelis-Menteničina konstanta, $\text{mmol dm}^{-3}$
$r$	brzina reakcije, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$
S.A.	specifična aktivnost enzima, $\text{U mg}^{-1}$
$t$	vrijeme, $\text{min}$
$T$	temperatura, $^{\circ}\text{C}$
$V$	volumen, $\text{cm}^{-3}$
V.A.	volumna aktivnost enzima, $\text{U cm}^{-3}$
$V_m$	maksimalna reakcijska brzina, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$ ili $\text{U mg}^{-1}$
$\epsilon_{436}$	ekstincijski koeficijent o-dianizidina pri 436 nm, $\text{cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ ( $\epsilon_{436}=8,1 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ )
$\Delta$	promjena
$\lambda$	valna duljina, $\text{nm}$
L-Met	L-metionin
DH <sub>2</sub>	o-dianizidin
D	oksidirani oblik o-dianizidina
L-AAO	oksidaza L-aminokiselina
POD	peroksidaza
D-LDH	D-laktat dehidrogenaza
NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid
0	početni uvjeti

## **1. UVOD**

U današnje vrijeme postoji sve veća svijest o potrebi za primjenom ekološki prihvatljivih procesa u industrijskoj proizvodnji. Primjerice, upotreba enzima u kozmetičkoj, tekstilnoj, kemijskoj i drugim industrijama predstavlja jednu od ekološki prihvatljivih tehnologija.

Enzimi imaju nekoliko prednosti u odnosu na klasične katalizatore. Enzimski katalizirane reakcije se provode pri blagim uvjetima, odvijaju se pri većim reakcijskim brzinama, enzimi su stereospecifični, nema upotrebe toksičnih sirovina, nema štetnih emisija u okoliš, nastaje manje otpada i moguće je proizvesti visokovrijedne proizvode (Giorno i Drioli, 2000.). Osim brojnih prednosti enzimi katalizirane reakcije imaju i neke nedostatke, a jedan od njih je nestabilnost enzima, odnosno podložnost deaktivaciji i inhibiciji, te svakako njihova visoka cijena.

Matematički modeli i primjena kompjuterskih tehnika omogućuju optimiranje biokatalitičkog procesa, predviđanje uvjeta dobivanja maksimalne konverzije i maksimalnog volumnog iskorištenja, predviđanje vremena trajanja reakcije, te određivanje najprikladnijeg tipa reaktora za potrebu provedbe nekog bioprocasa (Gomzi, 1998.).

Oksidacijom L-metionina nastaje 2-okso-4-metiltiobutirična kiselina i vodikov peroksid koji spontano dekarboksilira 2-okso-4-metiltiobutiričnu kiselinu u 3-metiltiopropanoičnu kiselinu i vodu. Cilj ovog rada bila je a) kinetička karakterizacija enzima oksidaze L-aminokiselina porijeklom iz triju izvora *Crotalus adamanteus*, *Crotalus atrox* i *Rhodococcus opacus*, b) provedba enzimi katalizirane oksidacije L-metionina, c) razvoj matematičkog modela procesa u kotlastom reaktoru.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. ENZIMI

Kemijske reakcije u biološkim sustavima se uglavnom događaju uz prisustvo enzima. Enzimi su proteinske molekule koje kataliziraju kemijske reakcije u živom organizmu te ih zbog toga nazivamo biokatalizatorima (Duraković, 1996). Prirodni su polimeri koji nastaju kondezacijom aminokiselina te zbog toga imaju veliku molekularnu masu. Predstavljaju visoko specifične katalizatore i svaki enzim katalizira jednu reakciju ili skupinu srodnih reakcija. Specifičnost za supstrat je najčešće visoka, a katkad i potpuna (Stryer, 1991.). Ubrzavaju kemijske reakcije u blagim uvjetima i tako djeluju katalitički, a da se sami u reakciji trajno kemijski ne promijene. Enzimi sudjeluju i u sintezi i u razgradnji određenih tvari. Djelovanje enzima započinje stvaranjem enzim-supstrat kompleksa koji ima manju energiju aktivacije nego aktivirani intermedijer supstrata bez enzima. Kompleksiranje mora biti brzo i reverzibilno, tako da se odmah nakon reakcije produkt odvaja od enzima i oslobađa ga za daljnje katalitičko djelovanje.

Enzimi se mogu podijeliti u šest osnovnih skupina:

- oksidoreduktaze koje kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije,
- transferaze koje kataliziraju reakcije koje uključuju premještanje grupa atoma između molekula,
- hidrolaze koje kataliziraju reakcije hidrolize molekula,
- liaze koje kataliziraju reakcije uklanjanja grupa s ciljem formiranja dvostrukih veza ili reakcije adicije grupa na dvostruku vezu,
- izomeraze koje kataliziraju reakcije izomerizacije,
- ligaze koje kataliziraju formiranje veze između dvaju molekula upotrebom energije adenozin trifosfata (ATP-a)

Od velikog su značaja za odvijanje biokemijskih procesa koji bi se bez njih znatno sporije odvijali ili se uopće ne bi odvijali (Leidler i Bunting, 1973.).

Prednosti enzima u odnosu na obične katalizatore:

- ubrzavaju reakcije  $10^9$  puta i više,
- djeluju u vrlo malim koncentracijama,
- reakcije katalizirane enzimima ne zahtijevaju primjenu visokih temperatura i tlakova, te ekstremnih pH vrijednosti i štetnih materijala za okolinu,
- selektivni su i specifični,
- biorazgradivi su,
- kataliziraju kompleksne reakcije u jednom stupnju.

Da bi bili primjenjivi u industriji moraju imati visoku aktivnost i stabilnost te mora postojati mogućnost njihove višekratne uporabe jer u suprotnom nisu isplativi. Iako imaju

brojne prednosti u odnosu na klasične katalizatore, zastupljenost enzima u industriji je još uvijek mala.

Osnovni nedostaci enzima kao katalizatora:

- visoka cijena izolacije enzima,
- enzimske reakcije su često inhibirane supstratom ili produktom pa se ne može ostvariti, ekonomski opravdana proizvodnja,
- nestabilni su u otopinama organskih otapala i pri povišenim temperaturama,
- u određenim slučajevima mogu biti toksični (npr. enzimi zmijskog otrova),
- može doći do deaktivacije uslijed promjene reakcijskih uvjeta.

Enzime možemo podjeliti na:

- unutarstanične enzime koji su vezani za membranu ili se mogu nalaziti u citoplazmi. Ovi enzimi su nestabilni, a da bi ih ekstrahirali iz stanice potrebno je razbiti staničnu stjenku primjenom mehaničkih, kemijskih ili mikrobioloških metoda.
- izvanstanične enzime koji su metaboliti stanica te ih one izbacuju nakon sinteze pa nisu potrebni procesi razbijanja stanica. Stabilniji su od unutarstaničnih, manji ih je broj i jeftiniji su.

### 2.1.1. Oksidaze aminokiselina

Oksidaze aminokiselina su flavoproteini koji se nalaze u peroksisomima raznih eukariotskih stanica (Gabler i sur., 2000.). Od velikog su biotehnološkog značaja. Oksidaze aminokiselina pripadaju u vrlo zanimljivu skupinu oksidaza zbog svoje mogućnosti oksidacije tj. oksidativne deaminacije širokog spektra aminokiselina pri čemu nastaju odgovarajuće  $\alpha$ -keto kiseline, amonijak i vodikov peroksid (Findrik, 2005.).

Najčešće se koriste za biokatalitičke sinteze i razdvajanje racemičnih smjesa. Sastavni su dio biosenzora za određivanje aminokiselina.

Jedan od nedostataka ovih enzima je što je prilikom oksidacije visokih koncentracija supstrata potrebna kontinuirana opskrba kisikom, pri čemu interakcija između enzima i plina na međufaznoj površini mjehurić/kapljevina može uzrokovati brzu i reverzibilnu inaktivaciju enzima. Zatim, vodikov peroksid koji nastaje kao sporedni produkt reakcije može prouzročiti brzu inaktivaciju enzima zbog oksidacije osjetljivih bočnih ogranaka proteina (metionin, cistein, itd.) ili nespecifičnu oksidaciju reakcijskih produkata koja dovodi do smanjenja konačne produktivnosti i prisutnosti sporednih produkata u konačnoj reakcijskoj smjesi (Fernandez-Lafuente i sur., 1998.).

Oksidaza aminokiselina porijeklom iz zmijskog otrova je dostupan ali preskup enzim za širu uporabu. Osim u zmijskom otrovu, L-AAO se mogu pronaći i u mikroorganizmima

poput bakterija, cijanobakterija i plijesni. Bakterijama se može lakše genetski manipulirati te su one povoljnije za dobivanje enzima (Pantaleone i sur., 2001.).

### 2.1.2. Oksidaze L-aminokiselina

Oksidaza L-aminokiselina (L-AAO) je dimerni flavoprotein koji sadrži nekovalentno vezan flavin adenin dinukleotid kao kofaktor (Pavelek, 2000.).

L-AAO su enzimi prisutni u značajno visokoj koncentraciji u zmijskom otrovu pa se pretpostavlja da su oni uzrok njegove toksičnosti (Geyer i sur., 2001.). Moguće ih je jednostavno izolirati te su ovi enzimi najbolje proučeni u svojoj skupini. Pokazuju afinitet prema hidrofobnim aminokiselinama. Ovi enzimi su apsolutno specifični za L-izomere.

O L-AAO iz *R. opacus*, koji je korišten u ovom radu, u literaturi nema puno podataka. Zbog niske *K<sub>m</sub>* vrijednosti za pojedine supstrate posebno je interesantan za razdvajanje racemata. Provedena testiranja na prirodne aminokiseline pokazala su da je strogo specifičan na L-aminokiseline. Može oksidirati veliki broj aromatskih, alifatskih, bazičnih i kiselih L-aminokiselina, te L-aminokiseline koje sadrže kisik i sumpor (Geueke i Hummel, 2002.).

L-AAO dobivene iz različitih izvora se međusobno razlikuju po specifičnosti, stabilnosti, te biološkim i toksikološkim učincima. Većina bioloških učinaka ovog enzima je posljedica sekundarnog djelovanja vodikovog peroksida. Međutim, još uvijek nisu dobro razjašnjeni niti toksikološki učinci niti strukturalna svojstva ove važne skupine enzima (Ali i sur., 2000.).

### 2.1.3. Katalaza

Katalaza ( $H_2O_2$  oksidoreduktaza E.C.1.11.1.6.) je široko rasprostranjen enzim koji spada u skupinu oksidoreduktaza i čija je funkcija kataliza kemijske reakcije razgradnje vodikovog peroksida na molekularni kisik i vodu. Vodikov peroksid nastaje kao nusprodukt prilikom oksidacije masnih kiselina ili kao produkt bijelih krvnih stanica te može uzrokovati inhibiciju enzima i denaturaciju proteina. Katalaza je tetramerni protein kod kojeg se svaka podjedinica sastoji od 500 aminokiselina.

Katalaza je pronađena u gotovo svim aerobnim organizmima a funkcija joj je zaštita stanica od štetnog utjecaja vodikovog peroksida (Masters i sur., 1986.).

Za uklanjanje vodikovog peroksida u reakciji oksidacije L-metionina, koja je opisana u ovom radu, korištena je katalaza iz goveđe jetre koja razgrađuje vodikov peroksid na vodu i kisik. Katalaza iz goveđe jetre se nalazi u peroksisomima unutar stanice i bila jedan od prvih kristaliziranih unutarstaničnih enzima. Budući da katalaza djeluje u reakcijskoj otopini, a ne na samom aktivnom katalitičkom centru oksidaze L-aminokiselina gdje vodikov peroksid

nastaje,  $\alpha$ -keto kiseline se u samom katalitičkom mjestu oksidaze L-aminokiselina razgrađuju (dekarboksiliraju).

## **2.2. L-METIONIN**

L- metionin (L-Met) je esencijalna aminokiselina i jedina aminokiselina, uz cistein, koja sadrži sumpor. Može se pronaći u hrani, osobito u mesu, jajima, ribi, peradima i siru. L- metionin se također nalazi u voću i povrću, te fermentiranim namirnicama. U metabolizmu čovjeka služi u biokemijskim reakcijama kao donor metilne skupine. Ima ulogu prekursora u sintezi proteina. L-metionin može zaštititi od toksičnih učinaka hepatotoksina, kao što je acetaminofen, te može imati antioksidativno djelovanje.

Oksidativnom deaminacijom L-metionina pomoću oksidaze L-aminokiselina nastaje 2-okso-4-metiltiobutirična kiselina, amonijak i vodikov peroksid. Nastali vodikov peroksid, osim što negativno utječe na enzim, izaziva i dekarboksilaciju  $\alpha$ -keto kiseline pa ga je potrebno uklanjati dodatkom katalaze (Schrader i Andrseen, 1996.). Zbog nepotpunog uklanjanja vodikovog peroksida u reakciji dolazi do dekarboksilacije 2-okso-4-metiltiobutirične kiseline u 3-metiltiopropanoičnu kiselinu.

## **2.3. MODELIRANJE ENZIMSKIH REAKCIJA**

Matematički model procesa uključuje kinetički model i reaktorski model. Za razvoj modela enzimske katalizirane reakcije potrebno je odrediti kinetiku enzimske katalizirane reakcije koja se uobičajeno određuje prateći promjenu početne brzine reakcije pri različitim koncentracijama supstrata. Enzimski kinetički parametri se procjenjuju iz izraza za brzinu reakcije koji se temelje na matematičkoj obradi podataka dobivenih provođenjem enzimske katalizirane reakcije.

Na tijek reakcije utječu kemijska i fizikalna svojstva supstrata i produkta, karakteristike i koncentracija biokatalizatora, reakcijska ravnoteža, koncentracija supstrata i produkta.

Matematički modeli, osobito kada su povezani s modernim kompjutorskim tehnikama, su se pokazali veoma učinkovitim u traženju optimalnih radnih uvjeta i stvaranja optimalnog radnog mikrookoliša za biokatalizator s ciljem optimiranja produktivnosti (Vasić-Rački i sur., 2003.). 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 uvjetima (Murphy i sur., 2002.).

Za provedbu reakcija koje nisu inhibirane niti supstratom niti produktom, jer konstrukcijski ne postoji mogućnost postepenog dovođenja supstrata niti odvođenja produkta, može se upotrebljavati kotlasti reaktor.



## 2.4. KINETIČKI MODELI ENZIMSKI KATALIZIRANIH REAKCIJA

Kinetički model reakcije je matematički izraz koji opisuje ovisnost brzine reakcije o reakcijskim veličinama i parametrima (Gomzi, 1998.).

Kinetičkim mjerenjima se određuju maksimalna brzina enzimske reakcije ( $V_m$ ) i mjera afiniteta enzima za supstrat ( $K_m$ ) ili inhibitor ( $K_i$ ).

Najjednostavniji kinetički model koji opisuje ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata može se opisati Michaelis-Mentenčinim kinetičkim izrazom:

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m^S + c_s} \quad (1)$$

pri čemu  $r_s$  označava brzinu potrošnje supstrata ( $\text{mmol dm}^{-3}\text{min}^{-1}$ ),  $c_s$  koncentraciju supstrata ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ),  $V_m$  maksimalnu brzinu reakcije ( $\text{mmol dm}^{-3}\text{min}^{-1}$ ) koja se može postići kod određene koncentracije enzima, a  $K_m^S$  Michaelis-Menteničinu konstantu ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ).

Kada je vrijednost  $K_m^S$  niska, enzim posjeduje visoki afinitet prema supstratu, dok kod visoke vrijednosti  $K_m^S$ , enzim ima niski afinitet prema supstratu.

Parametar  $V_m$  pokazuje ovisnost o koncentraciji enzima i dan je sljedećim izrazom:

$$V_m = k_{kat} \cdot E_0 \quad (2)$$

Katalitička konstanta enzima  $k_{kat}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) predstavlja broj molekula supstrata koje jedna molekula enzima pretvori u molekule produkta u jedinici vremena kada je enzim potpuno zasićen supstratom, a  $E_0$  početna koncentracija enzima ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ).

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.

Michaelis-Menteničin kinetički izraz za reakciju u kojoj sudjeluju dva supstrata glasi:

$$r_{SI} = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) \cdot (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (3)$$

Vrlo često u enzimski kataliziranim reakcijama dolazi do inhibicije i deaktivacije enzima. Do inhibicije dolazi kada se pojedini kemijski spoj, inhibitor, veže na aktivno mjesto enzima ili kada se inhibitor veže na neki drugi dio enzima, a supstrat na aktivno mjesto pri čemu dolazi do smanjenja brzine reakcije.

Općenito postoje tri tipa inhibicije: kompetitivna inhibicija (4), nekompetitivna inhibicija (5), antikompetitivna inhibicija (6) tj. kombinacija kompetitivne i nekompetitivne inhibicije.

Koncentracija inhibitora je dana sa  $c_I$ , pri čemu to može biti i supstrat i produkt.

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_i}\right) + c_S} \quad (4)$$

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m^S + c_S \cdot \left(1 + \frac{c_I}{K_i}\right)} \quad (5)$$

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{\left(1 + \frac{c_I}{K_i}\right)(K_m^S + c_S)} \quad (6)$$

Kod kompetitivne inhibicije, inhibitor se natječe sa supstratom za aktivno mjesto na enzimu. Inhibitor konkurrira sa supstratom za vezanje na aktivno mjesto. Pri vrlo visokim koncentracijama supstrata, inhibicija je nadvladana jer za reakcijsku brzinu vrijedi kinetika nultog reda te se početna brzina reakcije ( $r_S$ ) približava maksimalnoj brzini ( $V_m$ ), koja ostaje nepromijenjena, a koja ne ovisi o koncentraciji supstrata. Kod nekompetitivne inhibicije dolazi do reverzibilnog vezanja inhibitora na mjesto različito od aktivnog te se tako ometa vezanje supstrata na aktivno mjesto i inhibira brzinu enzimske reakcije. Antikompetitivna inhibicija je kombinacija prethodne dvije inhibicije.



### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. ZADATAK

Zadatak ovog rada bio je a) napraviti kinetičku karakterizaciju enzima oksidaze L-aminokiselina porijeklom iz *Crotalus adamanteus*, *Crotalus atrox* i *Rhodococcus opacus*, b) provesti proces oksidacije L-metionina kataliziran s navedenim enzimima u šaržnom i ponovljivom šaržnom pokusu, c) razviti matematički model procesa.

### 3.2. MATERIJAL I METODE

#### 3.2.1. Aparatura

##### 3.2.1.1. Spektrofotometar

Mjerenje aktivnosti enzima L-AAO provedeno je na dvozračnom spektrofotometru (UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan).

##### 3.2.1.2. Kotlasti reaktor

Kotlasti reaktor je korišten za provedbu šaržnog pokusa oksidacije L-metionina s L-AAO i ponovljivog šaržnog pokusa s dodatkom katalaze. Sastojao se od reakcijske posude volumena 50 cm<sup>3</sup>, opremljene magnetskom mješalicom smještene u termostat za održavanje konstantne temperature 30°C.

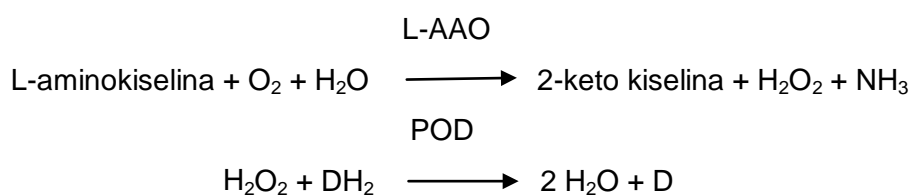
##### 3.2.1.3. Visokotlačni tekućinski kromatograf (HPLC)

Koncentracija supstrata i produkta mjerena je pomoću visokotlačnog tekućinskog kromatografa (HPLC) s UV detektorom pri valnoj duljini od 210 nm na koloni za aminokiseline LiChrospher 100, RP-18 (5mm) i temperature od 30°C.

#### 3.2.2. Analitičke metode

##### 3.2.2.1. Određivanje aktivnosti enzima oksidaze L-aminokiselina (L-AAO) iz *C. adamanteus* i *C. atrox*

Određivanje aktivnosti enzima L-AAO iz *C. adamanteus* i *C. atrox* se temelji na reakcijama prikazanim na **Slici 1**.



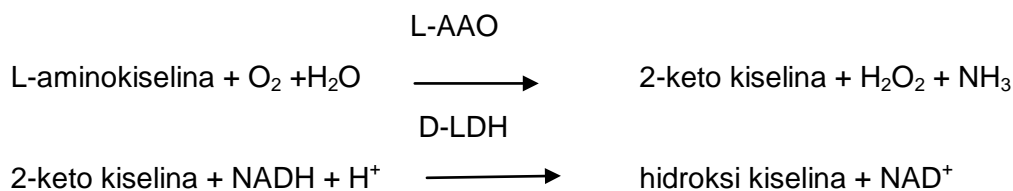
**Slika 1** Jednadžbe na kojima se temelji određivanje aktivnosti enzima L-AAO iz *C. adamanteus* i *C. atrox*.

U reakciji oksidativne deaminacije L-aminokiselina koju katalizira enzim oksidaza L-aminokiselina nastaje vodikov peroksid. Njegova je koncentracija u sustavu proporcionalna koncentraciji L-aminokiselina što se može vidjeti iz jednadžbe reakcije (**Slika 1**), pa se stoga mjerenjem brzine njegova nestajanja mjeri brzina prve reakcije, odnosno aktivnost enzima L-AAO. Kako bi se mjerila brzina njegova nestajanja u sustavu se nalazila otopina o-dianizidina, označena sa  $DH_2$ , koji je u ovom slučaju redukcijsko sredstvo, te se oksidira stvarajući pri tome smeđe obojenje koje se može pratiti na 436 nm, a reakciju katalizira enzim peroksidaza. Važno je naglasiti da je koncentracija peroksidaze morala biti u zasićenju, odnosno dovoljno visoka kako bi prva reakcija bila ona sporija. Test je opisan u Boehringerovom priručniku (Biochemica information I, 1973.). Otopine korištene u testu su: fosfatni pufer, pH 7,6 ( $c_{\text{pufera}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ), otopina o-dianizidina ( $c = 23,2 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), suspenzija peroksidaze u amonijevom sulfatu koncentracije  $3,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , otopina supstrata L-metionina u fosfatnom puferu ( $c = 5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), otopina enzima L-AAO ( $\gamma = 10 \text{ mg cm}^{-3}$ ). Kinetička mjerenja su provedena pri  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  u kvarcnoj kiveti volumena  $3 \text{ cm}^3$ . Sastav testa je prikazan u **Tablici 1**.

**Tablica 1** Sastav reakcijske smjese za određivanje aktivnosti L-AAO iz *C. adamanteus* i *C. atrox*

REAGENSI	V [cm <sup>3</sup> ]
otopina L-metionina u puferu	2,97
o-dianizidin	0,02
peroksidaza	0,01
L-AAO	0,01

### 3.2.2.2. Određivanje aktivnosti enzima oksidaze L-aminokiselina (L-AAO) iz *R. opacus*



**Slika 2** Jednadžbe na kojima se temelji određivanje aktivnosti enzima L-AAO iz *R. opacus*

Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti volumena 1 cm<sup>3</sup> pri 340 nm. Sastav testa je prikazan u **Tablici 2**.

**Tablica 2** Sastav reakcijske smjese za određivanje aktivnosti L-AAO iz *R. opacus*

REAGENSI	V [cm <sup>3</sup> ]
otopina L-metionina u puferu	2,951
NADH	0,01
katalaza	0,02
L-AAO	0,01
LDH	0,009

Iz dinamičke promjene apsorbancije s vremenom izračunate su volumna i specifična aktivnost prema jednadžbama **7** i **8**.

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon_{436} \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (7)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{C_{L-AAO}} \quad (8)$$

gdje je:

- $V_r$  - ukupni volumen uzorka u kiveti, cm<sup>3</sup>;
- $V_E$  - volumen dodanog enzima, cm<sup>3</sup>;
- $\varepsilon_{436}$  - ekstincijski koeficijent pri valnoj duljini  $\lambda=436$  nm, cm<sup>2</sup> μmol<sup>-1</sup>, ( $\varepsilon_{436} = 8,1$  cm<sup>2</sup> μmol<sup>-1</sup>);
- $d$  - promjer kivete, cm, ( $d = 1$  cm);
- $\frac{\Delta A}{\Delta t}$  - promjena apsorbancije u vremenu (nagib pravca), min<sup>-1</sup>.
- $V.A.$  - volumna aktivnost, U cm<sup>-3</sup>;
- $S.A.$  - specifična aktivnost, U mg<sup>-1</sup>;
- $C_{L-AAO}$  - koncentracija enzima u kvarcnoj kiveti, mg cm<sup>-3</sup>.

## 3.2.2.3. Određivanje koncentracije supstrata i produkata

Koncentracije supstrata (L-metionina) i produkta (2-okso-4-metiltiobutirične kiseline) su mjerene pomoću visokotlačnog tekućinskog kromatografa (HPLC) s UV detektorom pri valnoj duljini od 210 nm na koloni za aminokiseline LiChrospher 100, RP-18 (5mm). Mobilna faza se sastojala od redestilirane vode, metanola i fosforne kiseline u volumnom omjeru 975,5 : 19,5 : 1,0. Standardne otopine L-metionina i 2-okso-4-metiltiobutirične kiseline su pripremljene otapanjem određenih masa standarda u klorovodičnoj kiselini,  $c_{HCl} = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ . Na taj se način dobila kalibracijska krivulja obje komponente. Kako bi osigurali veću stabilnost i dobru topivost supstrata i produkta, svi uzorci uzeti pri provedbi šaržnog pokusa bez i sa katalazom, su otopljeni u klorovodičnoj kiselini,  $c_{HCl} = 0,1 \text{ mol dm}^{-3}$ .

### 3.3. BOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-METIONINA

#### 3.3.1. Provedba šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-metionina bez dodatka katalaze

U kotlasti reaktor volumena  $50 \text{ cm}^3$  dodano je  $25 \text{ cm}^3$  otopine L-metionina u fosfatnom puferu. Reakcijska smjesa termostatirana je pri  $30^\circ\text{C}$ . Prije dodavanja enzima uzet je uzorak i analiziran na HPLC-u. Nakon analize početnog uzorka dodan je enzim oksidaza L-AAO. Uzimani su uzorci u definiranim intervalima i analizirani na HPLC-u.

#### 3.3.2. Provedba ponovljivog šaržnog pokusa biokatalitičke oksidacije L-metionina s dodatkom katalaze

U reaktor volumena  $25 \text{ cm}^3$  dodana je otopina L-metionina u fosfatnom puferu. Termostatirana je pri  $30^\circ\text{C}$ . Uzet je i analiziran početni uzorak nakon čega je u otopinu dodana katalaza, a zatim i oksidaza. Kada je koncentracija L-metionina pala na nulu dodana je svježa otopina L-metionina u fosfatnom puferu u reaktor tako da bi se nadoknadilo smanjenje volumena koje je nastalo zbog uzimanja uzoraka tijekom predhodnog ciklusa. Uzorci su analizirani na HPLC-u.

### 3.4 MATEMATIČKI MODEL PROCESA OKSIDACIJE L-METIONINA UZ ENZIM L-AAO

Kinetika reakcije biokatalitičke oksidacije L-metionina katalizirane enzimom L-AAO je opisana Michaelis-Menteničinom jednadžbom 1:

$$r = \frac{V_m \cdot c_{L\text{-met}}}{K_m^{L\text{-met}} + c_{L\text{-met}}} \quad (1)$$



Ovaj kinetički izraz je proširen u slučaju da postoji inhibicija supstratom, pa se ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata može prikazati modificiranim Michaelis-Mentenovim izrazom **9**:

$$r = \frac{V_m \cdot c_{L\text{-met}}}{K_m^{L\text{-met}} + c_{L\text{-met}} + c_{L\text{-met}}^2 / K_i^{L\text{-met}}} \quad (9)$$

Produkt često djeluje kao inhibitor, pri čemu vrijedi slijedeći izraz **10**:

$$r = \frac{V_m \cdot c_{L\text{-met}}}{K_m^{L\text{-met}} \cdot \left(1 + \frac{c_p}{K_i^p}\right) + c_{L\text{-met}}} \quad (10)$$

Matematički model za sustav enzimske oksidacije L-metionina u kotlastom reaktoru sastoji se od kinetičke jednadžbe **10** i bilance tvari za L-metionin i 2-okso-4-metiltiobutiričnu kiselinu **11** i **12**.

$$\frac{dc_{L\text{-met}}}{dt} = -r \quad (11)$$

$$\frac{dc_p}{dt} = r \quad (12)$$

### 3.5. OBRADA PODATAKA

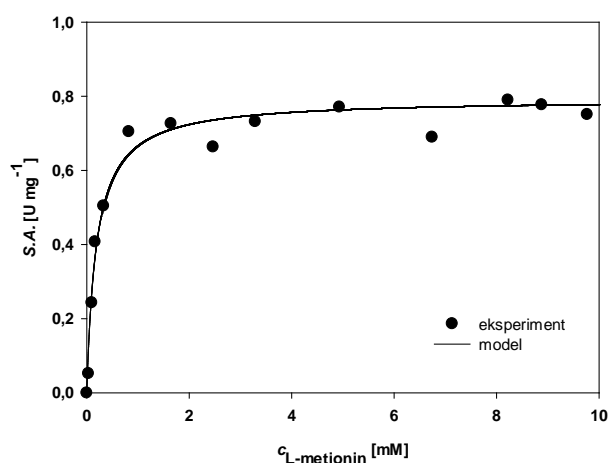
Parametri modela su procijenjeni na temelju eksperimentalnih vrijednosti dobivenih u obliku ovisnosti aktivnosti enzima o koncentraciji supstrata. Koristeći simplex metodu, tj. metodu najmanjih kvadrata sadržanu u programskom paketu SCIENTIST (Scientist handbook) procijenjeni su parametri modela nelinearnom regresijom. Rezultati dobiveni pomoću matematičkog modela su uspoređeni s eksperimentalnim podacima, ponovo 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.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

#### 4.1. ISPITIVANJE KINETIKE OKSIDACIJE L-METIONINA KATALIZIRANE OKSIDAZOM L-AMINOKISELINA (L-AAO)

Ispitana je kinetika enzimske oksidacije L-metionina katalizirane s L-AAO iz tri različita izvora *C. adamanteus*, *C. atrox* i *R. opacus*, te inhibicija reakcije s D-metioninom i produktom reakcije. Rezultati su prikazani za svaki enzim posebno. Kinetički parametri su procijenjeni nelinearnom regresijom i prikazani za svaki enzim posebno, te u zajedničkoj tablici radi jednostavnije usporedbe.

##### 4.1.1. Ispitivanje kinetike enzimske oksidacije L-metionina katalizirane s L-AAO iz *C. adamanteus*

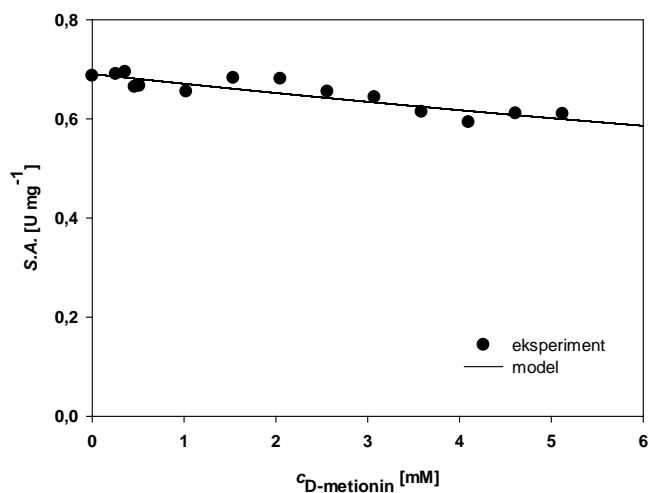


**Slika 3** Ovisnost specifične aktivnosti L-AAO iz *C. adamanteus* o koncentraciji L-metionina ( $c_{L\text{-metionin}} = 9,9 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 30^{\circ}\text{C}$ )

Iz eksperimentalnih podataka (na **Slici 3** prikazani točkicama) nelinearnom regresijom su procijenjene vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante ( $K_m$ ) te maksimalna reakcijska brzina ( $V_m$ ). Rezultati dobiveni po modelu na **Slici 3** su prikazani ravnom linijom.

##### 4.1.2. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz *C. adamanteus* D-metioninom

Rezultati ispitivanja inhibicije enzima L-AAO iz *C. adamanteus* D-metioninom prikazani su na **Slici 4**.

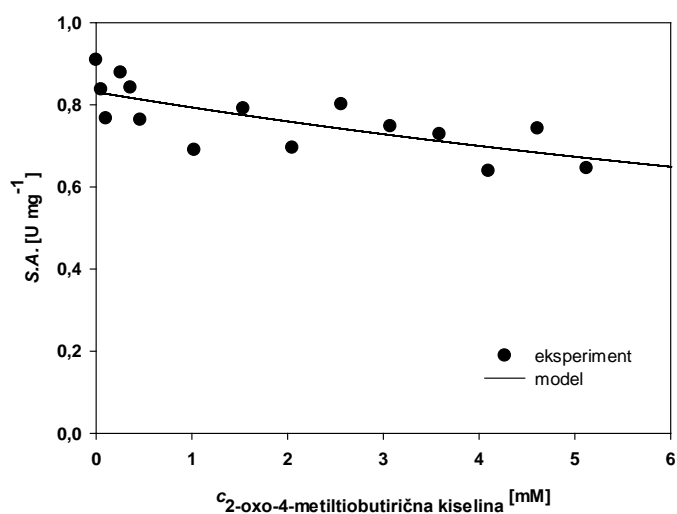


**Slika 4** Ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentraciji D-metionina ( $c_{D\text{-metionin}} = 5,12 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 30^\circ\text{C}$ )

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je došlo do inhibicije D-metioninom.

#### 4.1.3. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz *C. adamanteus* 2-okso-4-metiltiobutiričnom kiselinom

Rezultati ispitivanja inhibicije enzima s produktom 2-okso-4-metiltiobutiričnom kiselinom prikazani su na **Slici 5**.



**Slika 5** Rezultati ispitivanja inhibicije enzima L-AAO iz *C. adamanteus* produktom 2-okso-4-metiltiobutiričnom kiselinom u fosfatnom puferu ( $c_{2\text{-okso-4-metiltiobutirična kiselina}} = 4,4 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 30^\circ\text{C}$ ).

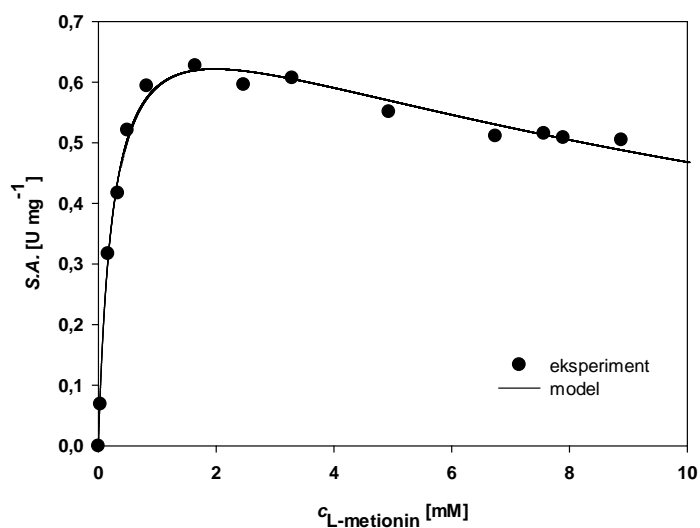
U **Tablici 3** prikazane su procijenjene vrijednosti kinetičkih konstanti maksimalne reakcijske brzine ( $V_m$ ), Michaelisove konstante ( $K_m^{L\text{-met}}$ ), te konstanti inhibicije produktom ( $K_i^p$ ) i D-metioninom ( $K_i^{D\text{-met}}$ ).

**Tablica 3** Procijenjene vrijednosti kinetičkih konstanti za enzim L-AAO iz *C. adamanteus*

IZVOR ENZIMA	$V_m$ [Umg <sup>-1</sup> ]	$K_m^{L\text{-met}}$ [mM]	$K_i^p$ [mM]	$K_i^{D\text{-met}}$ [mM]
<i>C. adamanteus</i>	0,79 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,83 ± 0,16	1,41 ± 0,14

#### 4.1.4. Ispitivanje kinetike enzimske oksidacije L-metionina katalizirane s L-AAO iz *C. atrox*

Na **Slici 6** su prikazani rezultati ovisnosti specifične aktivnosti enzima L-AAO o koncentraciji supstrata.

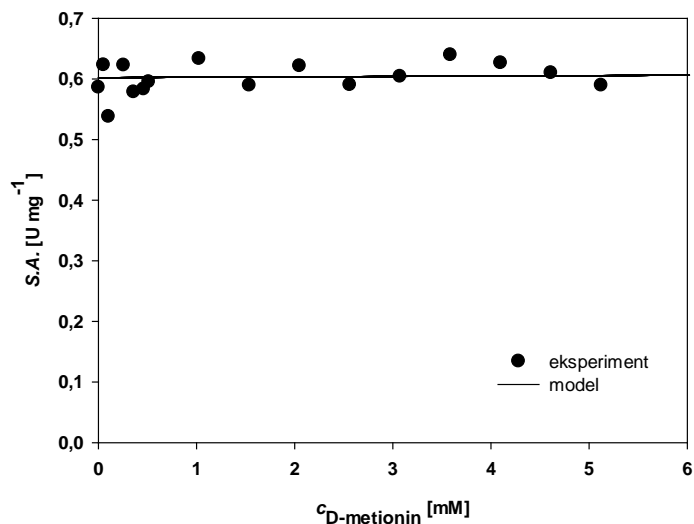


**Slika 6** Rezultati ispitivanja kinetike enzimske oksidacije L-metionina katalizirane s L-AAO iz *C. atrox* u fosfatnom puferu ( $c_{L\text{-metionin}} = 9,9$  mM,  $c_{\text{pufer}} = 0,2$  mol dm<sup>-3</sup>, pH 7,6, T = 30°C).

Iz eksperimentalnih podataka (na **Slici 6** prikazani točkicama) nelinearnom regresijom su procijenjene vrijednosti Michaelisove konstante ( $K_m$ ), konstante inhibicijom

supstratom ( $K_m^{L\text{-met}}$ ) te maksimalna reakcijska brzina ( $V_m$ ). Rezultati dobiveni po modelu na Slici 6 su prikazani ravnom linijom.

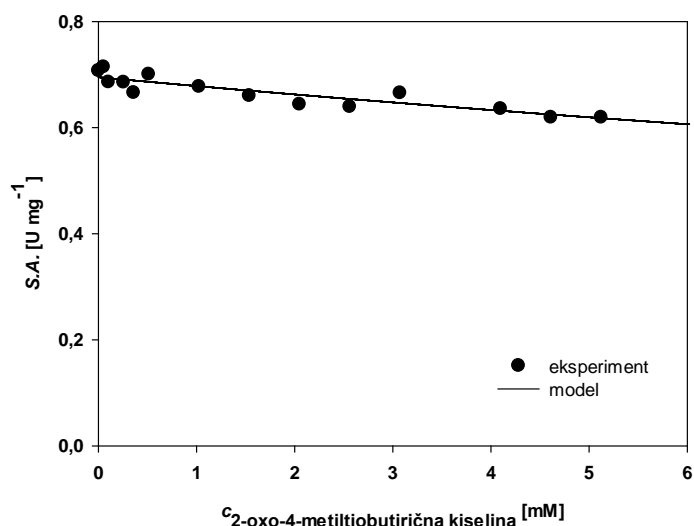
#### 4.1.5. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz *C. atrox* D-metioninom



**Slika 7** Rezultati ispitivanja inhibicije enzima L-AAO iz *C. atrox* D-metioninom u fosfatnom puferu ( $c_{D\text{-metionin}} = 5,12$  mM,  $c_{\text{pufer}} = 0,2$  mol dm<sup>-3</sup>, pH 7,6, T = 30°C).

Iz dobivenih rezultata ovisnosti specifične aktivnosti enzima o koncentraciji D-metionina, vidljivo je da enzim nije inhibiran D-metioninom.

#### 4.1.6. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz *C. atrox* produktom 2-okso-4-metiltiobutiričnom kiselinom



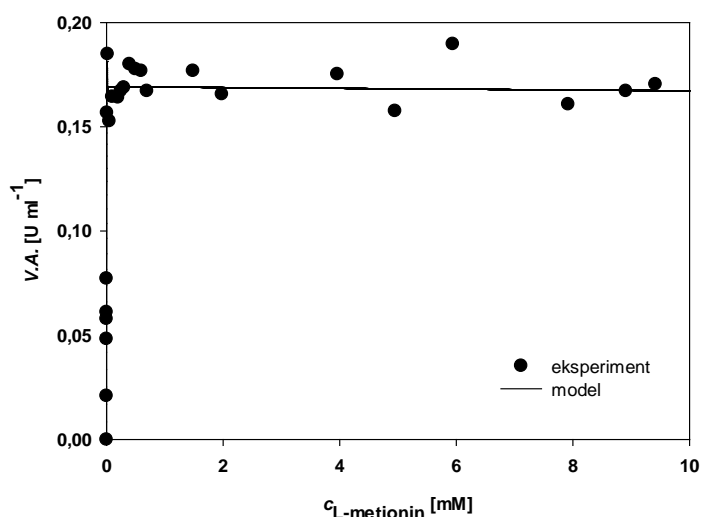
**Slika 8** Rezultati ispitivanja inhibicije enzima L-AAO iz *C. atrox* produktom 2-okso-4-metilbutiričnom kiselinom u fosfatnom puferu ( $c_{2\text{-okso-4-metilbutirična kiselina}} = 4,4 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 30^\circ\text{C}$ ).

Iz dobivenih rezultata ovisnosti specifične aktivnosti enzima o koncentraciji produkta, vidljivo je da enzim inhibiran produktom.

**Tablica 4** Procijenjene vrijednosti kinetičkih konstanti za enzim L-AAO iz *C. atrox*.

IZVOR ENZIMA	$V_m$ [Umg <sup>-1</sup> ]	$K_m^{\text{L-met}}$ [mM]	$K_i^{\text{L-met}}$ [mM]	$K_i^p$ [mM]
<i>C. atrox</i>	$0,78 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$	$15,27 \pm 1,86$	$2,04 \pm 0,21$

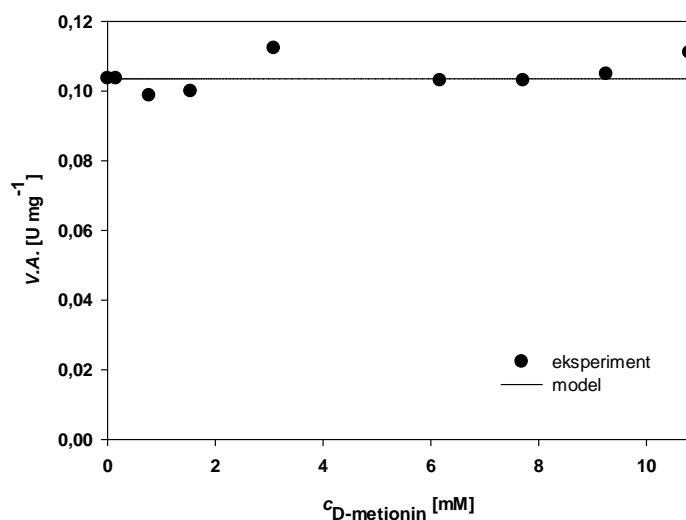
#### 4.1.7. Ispitivanje kinetike enzimske oksidacije L-metionina katalizirane s L-AAO iz *Rhodococcus opacus*



**Slika 9** Ovisnost volumne aktivnosti L-AAO iz *R. opacus* o koncentraciji L-metionina ( $c_{\text{L-metionin}} = 9,9 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T = 30^\circ\text{C}$ ).

Iz eksperimentalnih podataka (na **Slici 9** prikazani točkicama) nelinearnom regresijom su procijenjene vrijednosti Michaelis-Menteničine konstante ( $K_m$ ) te maksimalna reakcijska brzina ( $V_m$ ). Rezultati dobiveni po modelu na **Slici 9** su prikazani ravnom linijom.

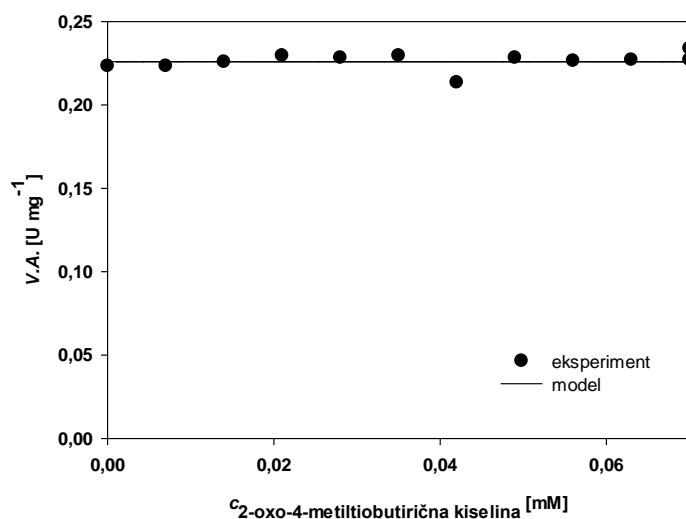
#### 4.1.8. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz *Rhodococcus opacus* D-metioninom



**Slika 10** Rezultati ispitivanja inhibicije enzima L-AAO iz *R. opacus* D-metioninom u fosfatnom puferu ( $c_{D\text{-metionin}} = 15,42$  mM,  $c_{\text{pufer}} = 0,2$  mol dm<sup>-3</sup>, pH 7,6, T = 30°C).

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da nije došlo do inhibicije D-metioninom.

#### 4.1.9. Ispitivanje inhibicije enzima L-AAO iz *Rhodococcus opacus* produktom 2-okso-4-metiltiobutiričnom kiselinom





**Slika 11** Rezultati ispitivanja inhibicije enzima L-AAO iz *R. opacus* produktom 2-okso-4-metiltiobutiričnom kiselinom u fosfatnom puferu ( $c_{2\text{-okso-4-metiltiobutirična kiselina}} = 0,07 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ ,  $\text{pH } 7,6$ ,  $T = 30^\circ\text{C}$ )

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da nije došlo do inhibicije produktom.

**Tablica 5** Procijenjene vrijednosti kinetičkih konstanti za enzim L-AAO iz *R. opacus*.

IZVOR ENZIMA	$V_m$ [ $\text{Umg}^{-1}$ ]	$K_m^{\text{L-met}}$ [mM]
<i>R. opacus</i>	$0,16 \pm 0,003$	$3,59 \cdot 10^{-5} \pm 7,34 \cdot 10^{-6}$

Usporedbe kinetičkih parametara sva tri ispitana enzima L-AAO iz *C. adamanteus*, *C. atrox* i *R. opacus* prikazani su u **Tablici 6**.

**Tablica 6** Usporedbe kinetičkih parametara enzima L-AAO iz različitih izvora

IZVOR ENZIMA	$V_m$ [ $\text{Umg}^{-1}$ ]	$K_m^{\text{L-met}}$ [mM]	$K_i^{\text{L-met}}$ [mM]	$K_i^{\text{p}}$ [mM]	$K_i^{\text{D-met}}$ [mM]
<i>C. adamanteus</i>	$0,79 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,02$	-	$0,83 \pm 0,16$	$1,41 \pm 0,14$
<i>C. atrox</i>	$0,78 \pm 0,03$	$0,25 \pm 0,03$	$15,27 \pm 1,86$	$2,04 \pm 0,21$	-
<i>R. opacus</i>	$0,16 \pm 0,003$	$3,59 \cdot 10^{-5} \pm 7,34 \cdot 10^{-6}$	-	-	-

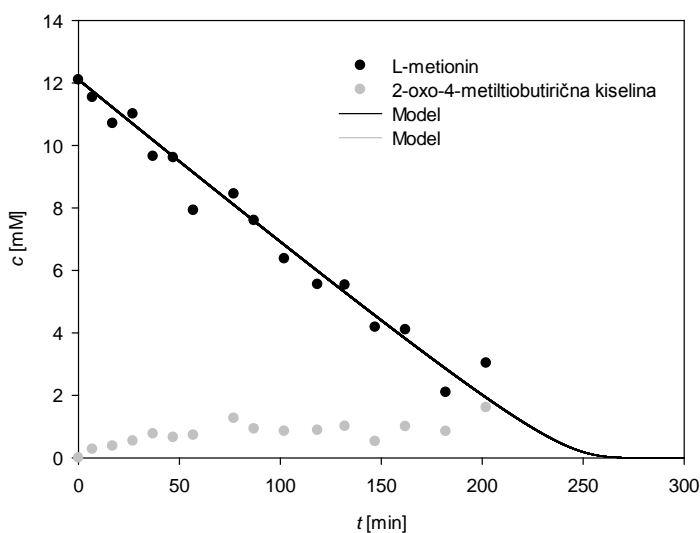
Iz **Tablice 6** je vidljivo da je enzim L-AAO iz *C. adamanteus* je inhibiran i produktom i supstratom. Enzim L-AAO iz *C. atrox* je inhibiran supstratom, ali pokazuje malu inhibiciju produktom dok je L-AAO iz *R. opacus* izrazito specifičan prema L-metioninu (niska  $K_m$  vrijednost) u odnosu na druga dva enzima, te prema rezultatima nije inhibiran niti supstratom niti produktom. Vrijednost maksimalne brzine enzimske reakcije ( $V_m$ ) je za prva dva ispitana enzima približno ista i iznosi  $0,79 \text{ Umg}^{-1}$  (za *C. adamanteus*) i  $0,78 \text{ Umg}^{-1}$  (za *C. atrox*). L-AAO iz *R. opacus* ima najnižu maksimalnu reakcijsku brzinu ( $0,16 \text{ Umg}^{-1}$ ) od sva tri ispitana enzima.

## 4.2. BOKATALITIČKA OKSIDACIJA L-METIONINA

Biokatalitička oksidacija L-metionina sa enzimima iz *C. adamanteus* i *C. atrox* provedena je u šaržnom i ponovljivom šaržnom pokusu. Pokusi s L-AAO iz *R. opacus* nisu provedeni jer enzim nije bio dovoljno aktivan.

### 4.2.1. Biokatalitička oksidacija L-metionina katalizirana enzimom L-AAO iz *C. adamanteus* u šaržnom pokusu

Biokatalitička oksidacija L-metionina je provedena u kotlastom reaktoru uz početnu koncentraciju L-metionina od  $12 \text{ mol dm}^{-3}$  u fosfatnom puferu ( $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6) pri 30 C. Koncentracija enzima L-AAO u reaktoru bila je  $0,063 \text{ mg cm}^{-3}$ . Katalaza u ovom pokusu nije dodana.

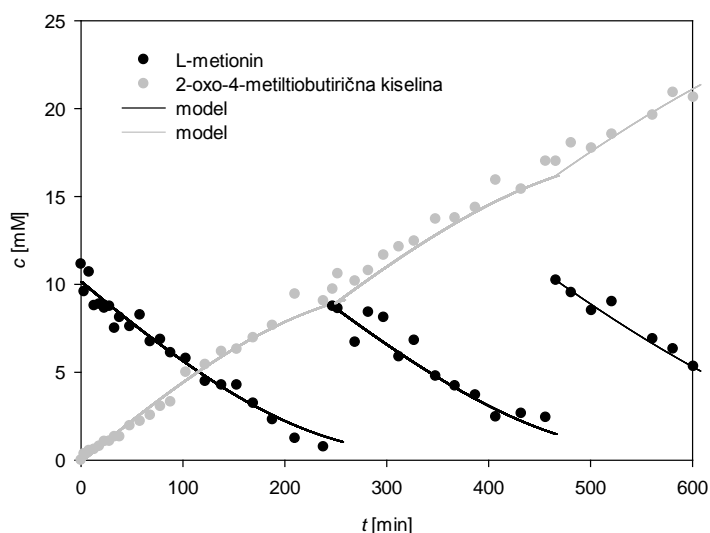


**Slika 12** Biokatalitička oksidacija L-metionina bez katalaze u šaržnom sustavu ( $c_{L-AAO} = 0,063 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{\text{pufer}} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T=30^{\circ}\text{C}$ ).

Koncentracija L-metionina je nakon 200 minuta trajanja pokusa iznosila 3,03 mM. Prema rezultatima dobivenih po modelu, za 100 %-tnu konverziju supstrata potrebno je proći 269 minuta. Nastalo je 1,6 mM produkta.

### 4.2.2. Biokatalitička oksidacija L-metionina u ponovljivom šaržnom pokusu katalizirana enzimom L-AAO iz *C. adamanteus*

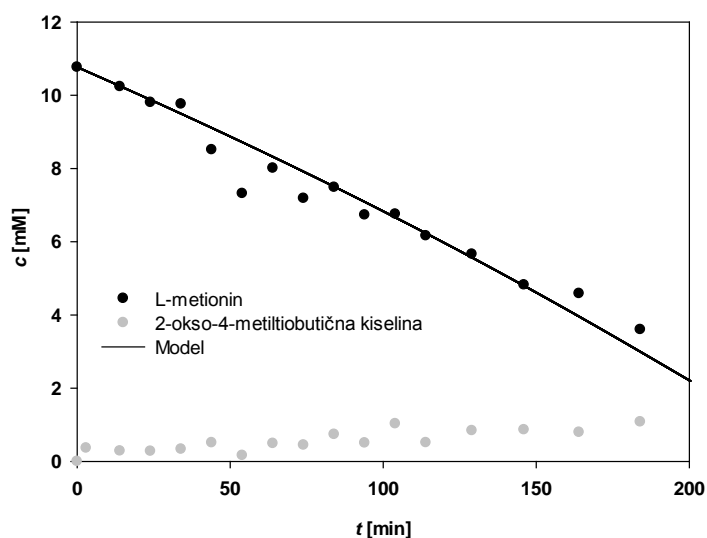
Ponovljivi pokus biokatalitičke oksidacije L-metionina proveden je u kotlastom reaktoru uz dodatak katalaze i L-AAO, a rezultati su prikazani na **Slici 13**.



**Slika 13** Biokatalitička oksidacija L-metionina s katalazom u kotlastom reaktoru ( $c_{L-AAO} = 0,063 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{katalaze} = 0,12 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T=30^{\circ}\text{C}$ ).

Iz grafa je vidljivo da kada je koncentracija L-metionina pala na nulu dodavana je svježa otopina L-metionina u fosfatnom puferu u reaktor tako da bi se nadoknadilo smanjenje volumena koje je nastalo zbog uzimanja uzoraka tijekom predhodnog ciklusa, s ciljem postizanja iste početne koncentracije supstrata. Ovaj ciklus je ponovljen dva puta. U ponovljivom šaržnom pokusu nije došlo do deaktivacije enzima tijekom vremena (L-AAO iz *C. adamanteus*). Postignute su visoke koncentracije produkta,  $c_{2\text{-okso-4-m,etiltiobutirična kiselina}} = 21,8 \text{ mM}$ .

### 4.2.3. Biokatalitička oksidacija L-metionina katalizirana enzimom L-AAO iz *C. atrox* u šaržnom pokusu

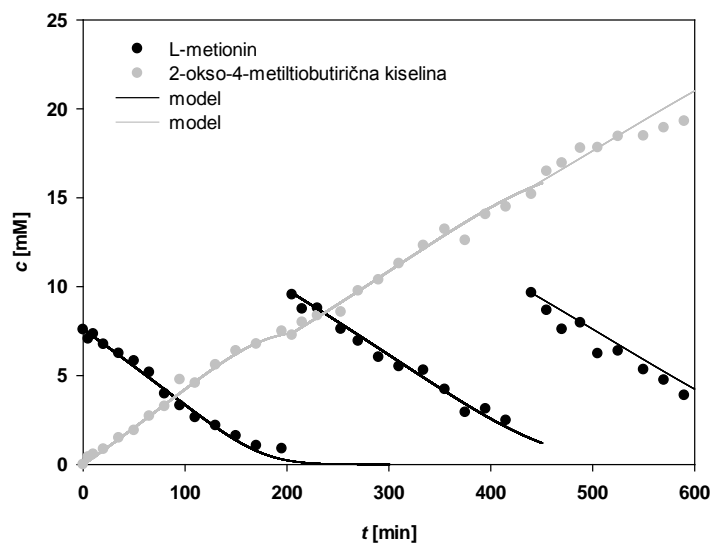


**Slika 14** Biokatalitička oksidacija L-metionina u kotlastom reaktoru ( $C_{L-AAO} = 0,08 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $C_{puffer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T=30^{\circ}\text{C}$ ).

Koncentracija L-metionina je nakon 200 minuta trajanja pokusa iznosila 2,85 mM. Prema rezultatima dobivenim po modelu, za 100 %-tnu konverziju supstrata potrebno je proći više od 300 minuta. Nakon 180 minuta trajanja procesa nastalo je 1,07 mM produkta.

### 4.2.4. Biokatalitička oksidacija L-metionina u ponovljivom šaržnom pokusu katalizirana enzimom L-AAO iz *C. atrox*

Ponovljivi šaržni pokus biokatalitičke oksidacije L-metionina proveden je u kotlastom reaktoru uz dodatak katalaze i L-AAO, a rezultati su prikazani na **Slici 15**.



**Slika 15** Biokatalitička oksidacija L-metionina bez katalaze u kotlastom reaktoru ( $c_{L-AAO} = 0,08 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{katalaze} = 0,12 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $c_{pufer} = 0,2 \text{ mol dm}^{-3}$ , pH 7,6,  $T=30^\circ\text{C}$ ).

Kao i u prethodnom pokusu, i u ovom pokusu dodatak supstrata napravljen je u dodatna dva ciklusa. U ponovljivom šaržnom pokusu nije došlo do deaktivacije enzima tijekom vremena.

## **5. ZAKLJUČCI**

Na osnovi rezultata istraživanja provedenih u ovom radu, mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- Ispitivanjem početne reakcijske brzine oksidacije L-metionina s enzimima L-AAO porijeklom iz tri različita izvora, pokazano je da svaki enzim ima različiti afinitet prema supstratu L-metioninu. Najveći afinitet prema L-metioninu pokazuje L-AAO iz *R. opacus* ( $K_m = 3,59 \cdot 10^{-5} \pm 7,34 \cdot 10^{-6}$ ), a najmanji L-AAO iz *C. atrox* ( $K_m = 0,25 \pm 0,03$ ). Ispitivanjem inhibicije enzima s produktom i D-metioninom, pokazano je da je L-AAO iz *C. adamanteus* inhibirana i produktom i D-metioninom, L-AAO iz *C. atrox* je inhibirana D-metioninom, ali i pokazuje malu inhibiciju produktom. L-AAO porijeklom iz *R. opacus* nije inhibirana supstratom niti produktom.
- U šaržnom pokusu oksidacije L-metionina s L-AAO iz *C. adamanteus* postignuta je 1,6 mM koncentracija produkta nakon 200 minuta.
- U ponovljivom šaržnom pokusu oksidacije L-metionina s L-AAO iz *C. adamanteus* postignuta je 21,8 mM koncentracija produkta nakon 613 minuta.
- U šaržnom pokusu oksidacije L-metionina s L-AAO iz *C. atrox* postignuta je 1,07 mM koncentracija produkta nakon 180 minuta.
- U ponovljivom šaržnom pokusu oksidacije L-metionina s L-AAO iz *C. atrox* postignuta je 17,81 mM koncentracija produkta nakon 680 minuta.
- Aktivnost L-AAO iz *R. opacus* nije bila dovoljna za provedbu oksidacije L-metionina u šaržnim i ponovljivo šaržnim pokusima.

## **6. LITERATURA**



Ali S A, Stoeva S, Abbasi A, Alam J M, Kayed R, Faigle M, Neumeister B, Voelter W: *Isolation, Structural Characterization of an Apoptosis-Inducing L-amino acid oxidase from Leaf-Nosed Viper (Eristocophis mocmahoni) Snake Venom*, Arch. Biochem. Biophys., 15 (2000) 216.

Biochemica information I, Boehringer Mannheim, GmbH, Germany, 1973, pp.41.

Duraković S: *Opća mikrobiologija*, Prehrambeno-tehnološki inženjering, Zagreb, (1996), 231-232.

Fernandez-Lafuente R, Rodriguez V, Guisan J M: *The coimmobilization of D-amino acid oxidase and catalase enables the quantitative transformation of D-amino acids (D-phenylalanine) into  $\alpha$ -ketoacids (phenylpyruvic acid)*, Enzyme Microb. Technol., 23 (1998) 28.

Findrik Z: *Biokatalitička oksidacija L-DOPE*, magistrski rad, Zagreb, 2004. str. 8.

Gabler M, Hensel M, Fischer L: *Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases*, Enzyme Microb Technol 27 (2000) 605.

Geueke B, Hummel W: *A new bacterial L-aminoacid oxidase with a broad substrate specificity: purification and characterization*, Enzyme microb. Technol. 31 (2002) 77

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-acid oxidase from the Malayan pit viper Calloselasma rhodostoma*, Eur J Biochem 268 (2001) 4044.

Giorno L, Drioli E: *Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives*, Trends in Biotechnol., 18 (2000) 339.

Gomzi Z: *Kemijski reaktori*, HINUS, Zagreb, 1998, str. 36-55.

Leidler K. J, Bunting P. S: *The chemical kinetics of enzyme action*, Clarendon Press Oxford, 2<sup>nd</sup> Edition, 1973.

Masters C, Pegg M, Crane D: *On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver*, Mol Cell Biochem 70 (1986) 113.

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.

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.

Pawelek P D, Cheach J, Coulombe R, Macheroux P, Ghisla S, Vrielink A: *The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site*, EMBO J., 19 (2000) 4204.

Schrader T, Andreesen J R: *Studies on the inactivation of the flavoprotein D-amino acid oxidase from Trigonopsis Variabilis*, Appl Microbiol Biotechnol 45 (1996) 458.

Scientist handbook, Micromath, Salt Lake City, 1986-1995.

Stryer L: *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb, 1991, str. 89

Vasić-Rački Đ., Kragl u., Liese A.: Benefits of Enzyme Kinetics Modelling, Chem. Biochem. Eng., 17 (2003) 7.