

Kinetika kaskadne reakcije katalizirane cijelim stanicama mikroorganizma

Zovko, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:225465>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Zovko

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Zovko

KINETIKA KASKADNE REAKCIJE KATALIZIRANE CIJELIM
STANICAMA MIKROORGANIZMA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Doc. dr. sc. Martina Sudar

Zagreb, rujan 2019.



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

*Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na izvrsnom mentorstvu,
velikoj pomoći, savjetima i svom izdvojenom vremenu.*

*Mag. ing. oecoing. Morani Česnik, zahvaljujem na svim savjetima i pomoći tijekom izrade
ovog diplomskog rada, strpljenju i veoma ugodnoj suradnji.*

Veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima koji su me podupirali i uvijek bili uz mene.

SAŽETAK:

Enzimi nude jedan od najboljih načina proizvodnje enantiomerno čistih spojeva zbog svoje izrazite stereoselektivnosti te se iz tog razloga sve više primjenjuju za dobivanje farmaceutika. Kako je dokazano da pogrešan enantiomer može uzrokovati štetne i ozbiljne nuspojave, upravo je kiralnost ključni čimbenik za dobivanje sigurnih i djelotvornih lijekova.

U ovome radu proučavana je kinetika kaskadne reakcije katalizirane genetski modificiranim i liofiliziranim cijelim stanicama mikroorganizma *Escherichia coli* u kojoj se nalaze dva enzima potrebna za provedbu reakcije. Prvi stupanj reakcije kataliziran je enzimom 2-keto-3-deoksi-L-ramonat-aldolazom – YfaU 013. Radi se o reakciji aldolne adicije između natrijevog piruvata i formaldehida te se kao produkt dobiva 4-hidroksi-2-oksobutanoat koji zajedno s L-alaninom sudjeluje u drugom koraku reakcije – reakciji transaminacije (ili reduktivne aminacije) katalizirane enzimom transaminazom – TA 039. Cilj ove kaskadne reakcije je dobivanje aminokiseline L-homoserin koja predstavlja gradivni blok za sintezu drugih važnih i esencijalnih aminokiselina. Korištenjem metode početnih brzina ispitana je kinetika navedene kaskadne reakcije i procijenjene su vrijednosti kinetičkih parametara (K_m , V_m). Razvijen je matematički model kaskadne reakcije, te su provedene simulacije pomoću programskog paketa SCIENTIST kako bi se pronašli uvjeti u kojima je moguće dobiti zadovoljavajuću koncentraciju produkta, kao i volumnu produktivnost u reaktoru.

KLJUČNE RIJEČI: kinetika, kaskadna reakcija, enzim, L-homoserin, matematički model

ABSTRACT:

Enzymes offer one of the best ways of producing enantiomerically pure compounds due to their great stereoselectivity and therefore they are increasingly being used to obtain pharmaceuticals. Since it is proven that the wrong enantiomer can cause harmful and serious side effects, chirality is a key factor in obtaining safe and effective medications.

In this paper, a cascade reaction kinetics has been studied using genetically modified and lyophilized whole cells of *Escherichia coli*, in which two enzymes that catalyse the reaction were overexpressed. The first step of the reaction was catalysed by the enzyme 2-keto-3-deoxy-L-ramonate-aldolase – YfaU 013. It is an aldol addition between sodium pyruvate and formaldehyde and where 4-hydroxy-2-oxobutanoate is formed which together with L-alanine participates in the second step of reaction called transamination (or reductive amination) catalysed by transaminase – TA 039. The goal of this cascade reaction is to obtain an amino acid L-homoserine which represents a building block for the synthesis of other important and essential amino acids. Kinetics of the cascade reaction were investigated using the initial reaction rate method, and the kinetic parameters (K_m , V_m) were estimated from the experimental data. A mathematical model of cascade reaction was developed and simulations were carried out using the program package SCIENTIST to find the conditions at which it is possible to obtain a satisfactory product concentration as well as volume productivity in the reactor.

KEYWORDS: kinetics, cascade reaction, enzyme, L-homoserine, mathematical model

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	2
2.1. Katalizatori	2
2.2. Biokatalizatori	3
2.3. Enzimi.....	5
2.3.1. Kiralnost i primjena enzima u farmaceutskoj industriji	8
2.3.2. Aldolaza i reakcije aldolne adicije	10
2.3.3. Transaminaza i reakcije transaminacije	11
2.4. Kaskadne reakcije.....	12
2.4.1. Sinteza L-homoserina.....	14
2.5. Enzimski kinetika.....	15
2.6. Matematičko modeliranje	17
3. Eksperimentalni dio	19
3.1. Kemikalije	19
3.2. Aparatura	19
3.2.1. Analitička vaga.....	19
3.2.2. Homogenizator	20
3.2.3. Tresilica	20
3.2.4. Termostatirana tresilica	21
3.2.5. Centrifuga.....	21
3.2.6. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC).....	22
3.3. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	23
3.3.1. Priprava uzoraka za analizu.....	23
3.3.2. Analiza uzoraka na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti	23
3.4. Ispitivanje reakcijske kinetike.....	24
3.4.1. Preliminarna mjerenja	25

3.4.2.	Ispitivanje kinetike aldolne adicije.....	26
3.4.3.	Ispitivanje kinetike retro-aldolne reakcije.....	28
3.4.4.	Ispitivanje kinetike reakcije transaminacije	29
3.4.5.	Ispitivanje kinetike reakcije povratne transaminacije	31
4.	Matematički model	34
4.1.	Obrada podataka	36
5.	Rezultati i rasprava	37
5.1.	Određivanje kinetike reakcije	37
5.1.1.	Preliminarna mjerenja	37
5.1.2.	Određivanje kinetike aldolne adicije.....	39
5.1.3.	Određivanje kinetike retro-aldolne reakcije	41
5.1.4.	Određivanje kinetike reakcije transaminacije	42
5.1.5.	Određivanje kinetike reakcije povratne transaminacije	44
5.2.	Primjena matematičkog modela	46
6.	Zaključak.....	48
7.	Popis pokrata i simbola	50
8.	Literatura.....	51
9.	Prilozi	56
10.	Životopis.....	62

1. UVOD

Enzimi su neophodne tvari za život koje kataliziraju sve *in vivo* metaboličke reakcije kako bi se proizvele potrebne biomakromolekule za održavanje živog sustava. Enzimska kataliza je interesantna znanstvenicima još od 1833. godine kada su A. Payen i J. F. Persoza otkrili enzim amilazu. Otada su istraživanja o enzimima i enzimskim funkcijama bila jedna od najatraktivnijih tema u znanstvenim područjima zbog svoje tajnovite i raznolike prirode. Do danas je na enzimskim funkcijama akumulirano mnogo istraživanja, a poznato je više od nekoliko tisuća vrsta enzima. Enzimska kataliza se koristi ne samo za sintezu makromolekula, već i za makromolekularne modifikacije korištenjem selektivnih reakcija za pretvorbu u nove funkcionalizirane makromolekule (Shoda et al., 2016.).

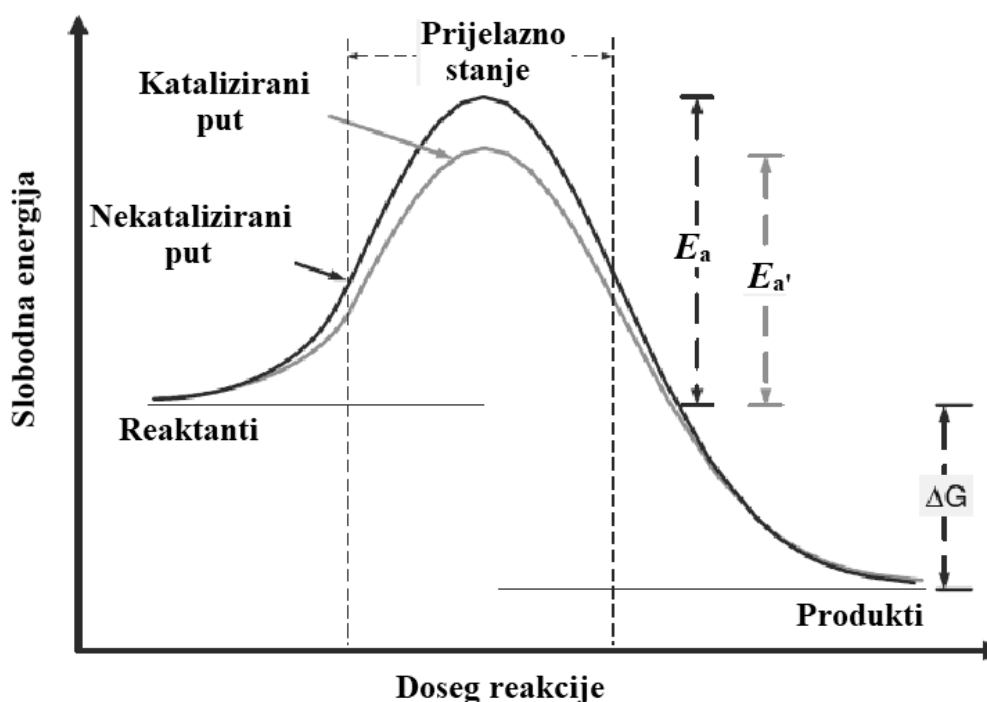
Raširena primjena biokatalize posljedica je mnogobrojnih ekonomskih i ekoloških prednosti enzima. Biokatalizator (enzim) je proizveden iz lako dostupnih obnovljivih izvora, biorazgradiv je i uglavnom bezopasan i netoksičan. Upotrebom biokatalizatora zaobilazi se korištenje plemenitih metala i naknadni troškovi uklanjanja tragova plemenitih metala iz krajnjih produkata. Enzimске reakcije se općenito provode u blagim uvjetima (sobna temperatura i atmosferski tlak) u vodi, često bez potrebe za koracima aktivacije i zaštite funkcionalne skupine te uklanjanja zaštite. To omogućuje ekonomičnije puteve čime se generira manje otpada za razliku od konvencionalnih organskih sinteza. Upravo su zbog toga biokatalitičke metode ekološki atraktivnije, isplativije i održivije (Sheldon i Woodley, 2017.).

54 % molekula farmaceutika su kiralne, a enzimska kinetička rezolucija predstavlja važan i ekonomičan pristup kiralnim molekulama. Postoji vidljiva i jasna potreba za novim metodologijama za proizvodnju kiralnih molekula. Kao rezultat nedavnih dostignuća u DNA sekvenciranju, strukturnoj biologiji, ekspresiji proteina, usmjerenom razvoju enzima i metaboličkom inženjerstvu, biokataliza postaje transformacijska tehnologija za kemijsku sintezu. Glavno svojstvo enzima za primjenu u farmaceutskoj industriji jest njihova visoka stereo- i regioselektivnost (Ran et al., 2008.).

2. OPĆI DIO

2.1. KATALIZATORI

Katalizatori su tvari koje ubrzavaju kemijsku reakciju. Utječu na povećanje brzine postizanja ravnoteže reakcije. Brzina reakcije ovisi o slobodnoj energiji aktivacije, a katalizator uzrokuje smanjenje barijere koja je potrebna da bi se supstrat kemijski transformirao u produkt zahvaljujući interakciji sa supstratom kako je prikazano na slici 1 (Saibi et al., 2012.). Supstrat i katalizator formiraju aktivirani prijelazni kompleks iz kojih će nastati produkt i oslobođeni katalizator. Katalizator ne sudjeluje u kemijskoj reakciji niti se mijenja tijekom reakcije. Njegovo korištenje ograničeno je sposobnošću zadržavanja aktivne strukture kroz vrijeme u određenim uvjetima reakcije (Illanes, 2008.). Do deaktivacije katalizatora dolazi uslijed promjene njegove strukture koja može biti posljedica negativnog utjecaja produkata sporedne reakcije (Knözinger i Kochloefl, 2003.)

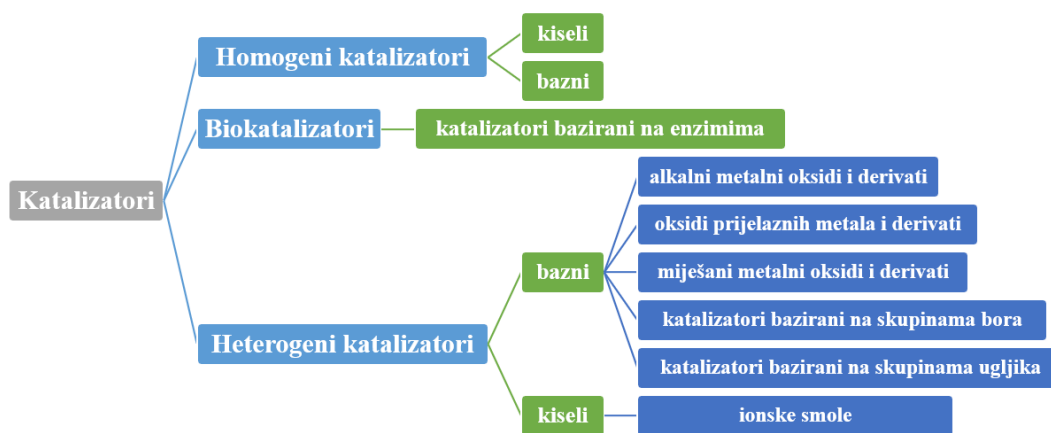


Slika 1. Mehanizam katalize (E_a i $E_{a'}$ su energije aktivacije nekatalizirane i katalizirane reakcije, ΔG predstavlja slobodnu energiju promjene reakcije) (Illanes, 2008.).

Kvalitetu nekog katalizatora određuju slijedeća svojstva:

- Aktivnost koja se definira kao brzina, konverzija ili broj reakcija u kojima je katalizator aktivan. Veća aktivnost znači veća produktivnost.
- Selektivnost (kemo-, stereo- i regio-) izražava se kao količina željenog proizvoda po količini konvertiranog reaktanta. Što je veća selektivnost, to su niži troškovi odvajanja, pročišćavanja i obrade produkata i katalizatora.
- Stabilnost se izražava kao količina produkta po količini katalizatora u nekom vremenskom razdoblju.
- Lakoća regeneracije iskorištenog katalizatora.
- Toksičnost, odnosno lakoća i sigurnost pri rukovanju i odlaganju istrošenih katalizatora.
- Cijena (Cavani i Trifirò, 1997.).

Na slici 2 prikazana je podjela katalizatora na osnovi agregatnih faza u kojima se nalaze katalizatori i supstrati pa tako postoje homogeni i heterogeni katalizatori te biokatalizatori (Chouhan i Sarma, 2011.).



Slika 2. Podjela katalizatora (Singh Chouhan i Sarma, 2011.).

2.2. BIOKATALIZATORI

Metalna kataliza, organokataliza i biokataliza su tri ključne komponente katalitičke sinteze. Biokataliza je opsežno proučavana zbog sve veće ekološke svijesti jer predstavlja blag, čist i visoko učinkovit proces (Ji et al., 2016.). Podrazumijeva upotrebu biokatalizatora (najčešće enzima) za ubrzavanje biokemijskih reakcija organskih komponenata (Nikalje, 2011.). Djeluju po istom principu kao katalizatori (slika 1) – smanjuju visinu energetske

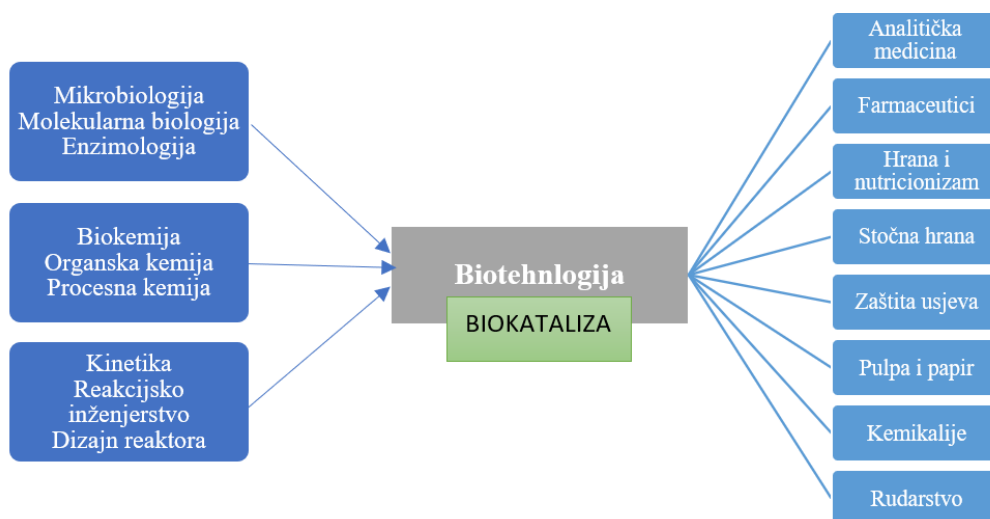
barijere, tj. smanjuju energiju aktivacije (Bommarius, 2015.). Ključna prednost ovih prirodnih katalizatora, osobito za upotrebu u organskoj sintezi, jest selektivnost (Nikalje, 2011.).

Biokataliza je jedna od najvažnijih alata za primjenu u zelenoj kemiji. Biokatalizatori se sve više primjenjuju u mnogim industrijama (slika 3) upravo zbog naglaska na siguran, zdrav, učinkovit i ekonomičan postupak proizvodnje koja štedi energiju i okoliš (Wohlgemuth, 2010.). Zbog navedenih ekoloških prednosti smanjuje se broj koraka u kemijskoj sintezi što dovodi do smanjenja količine otpada, opasnosti i troškova proizvodnje (Ferreira-Leitão, 2017.).

Iako biokatalizatore krasi visoka selektivnost i brojne ekološke prednosti, oni imaju i nekoliko nedostataka koji su povezani s biokatalizom kao tehnikom opće primjene:

- Razvoj biokatalizatora vrlo je spor proces i ne slijedi nikakva pravila.
- Stabilnost biokatalizatora uvelike ovisi o uvjetima reakcije (temperatura, pH vrijednost, otapala, ionska snaga i vrsta soli).
- U usporedbi s kemijskim katalizatorima, vrlo je mali broj dobro karakteriziranih biokatalizatora (enzima) i još uvijek su mnogi komercijalno nedostupni što sprječava razvoj ove tehnologije (Bommarius, 2015.).

Pregled prednosti i nedostataka biokatalizatora i enzima u odnosu na kemijske katalizatore prikazan je u tablici 1.



Slika 3. Središnja uloga biokatalize i biotehnologije između interdisciplinarnih znanosti (biologija, kemija, kemijsko inženjerstvo) i industrije (Bommarius i Riebel, 2004.).

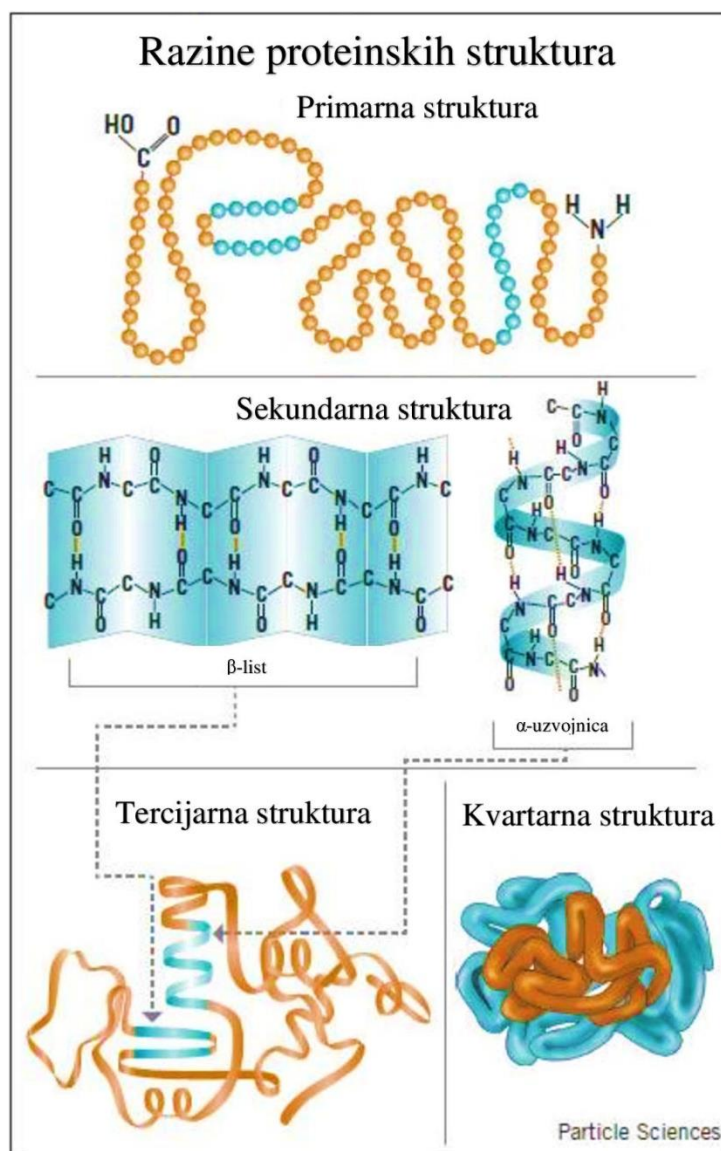
Tablica 1. Prednosti i nedostaci biokatalizatora i enzima (Bommarius i Riebel, 2004.).

Prednosti	Nedostaci
Vrlo visoka stereoselektivnost	Često niska specifična aktivnost
Vrlo visoka regioselektivnost	Nestabilnost pri ekstremnim T i pH
Djelovanje u blagim uvjetima	Dostupnost samo za određene reakcije
Otapalo je najčešće voda	Skup i dug proces razvoja novih enzima

2.3. ENZIMI

Enzimi su proteini – linearni lanci od preko stotine aminokiselina koji čine jedinstvenu i dobro definiranu trodimenzionalnu strukturu. Svaki enzim ima jedinstveni slijed aminokiselina koji je definiran DNA kodom organizma unutar stanica. Ukoliko dođe do promjene slijeda aminokiselina, potpuno se mijenja i funkcija enzima.

Na slici 4 prikazana je struktura proteina koja je organizirana u četiri strukturne razine. Primarnu strukturu čine α -aminokiseline koje procesom polimerizacije formiraju polipeptid. Polipeptid je dobio naziv po peptidnim vezama koje se formiraju između aminokiselina gubitkom vode tijekom polimerizacije. Aminokiseline se povezuju određenim redoslijedom. Ukoliko se taj redoslijed promijeni, mijenja se i funkcija i struktura biokatalizatora (Godbey, 2014.). Sekundarna struktura je proširena primarna struktura stabilizirana vodikovim vezama. Dva glavna tipa strukture proizvedena ovom vrstom vezanja su konformacija α -uzvojnica i β -nabrane strukture. α -uzvojnica se sastoji od peptidnih veza koje se nalaze na unutarnjoj strani lanca i bočnih lanaca koji se protežu prema van. Stabilizira se pravilnim formiranjem vodikovih veza paralelno s osi spirale koje se formiraju između amidnih i karbonilnih skupina svake četvrte peptidne veze. β -nabrani list sastoji se od susjednih polipeptidnih sekvenci koje se također stabiliziraju vodikovom vezom između karbonilnih i amidnih skupina peptida (Pelley, 2011.). Daljnjim preklapanjem uzvojnica i listova formira se tercijska struktura. Uzvojnice se međusobno povezuju kovalentnim vezama, te se spiralno uvijaju. Nastaju proteinska vlakna koja tvore molekulske agregate. Kvartarna struktura nastaje spajanjem peptidnih lanaca u još veće aglomerate i formiraju se disulfidni mostovi i sekundarne valencijske veze koje stabiliziraju strukturu (Godbey, 2014., Engelking, 2015.).



Slika 4. Razine proteinskih struktura (<https://www.particlesciences.com>)

Enzimi su najkvalitetniji katalizatori koji nude mnogo više prednosti u usporedbi s kemijskim katalizatorima (Choi et al., 2015.). Enzimi su netoksični, dobivaju se iz obnovljivih izvora i prirodni (zeleni) katalizatori. Uz visoku reakcijsku selektivnost, enzimska katalitička aktivnost je vrlo visoka čak i *in vitro*. U nekim slučajevima, enzim je dovoljno robustan da se može koristiti u kombinaciji s drugim kemijskim katalizatorima, a njihovim se kombiniranjem razvijaju novi kemo-enzimatski procesi (Shoda et al., 2016.).

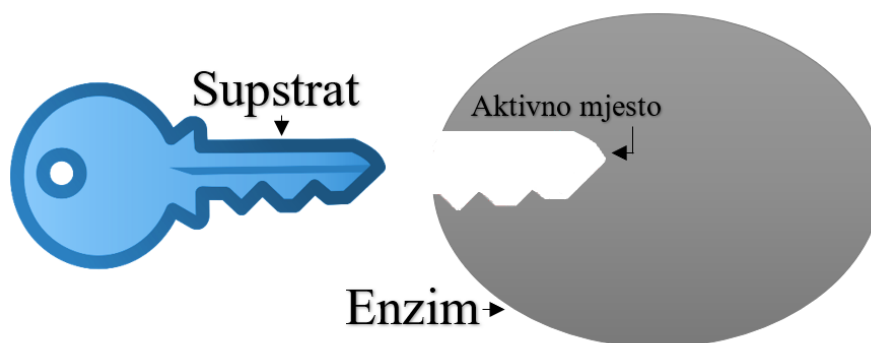
Najbitnije svojstvo enzima i ujedno njihova najveća prednost jest svojstvo selektivnosti koje se može izraziti kao:

- Kemoselektivnost – selektivnost prema funkcionalnim skupinama.

- Regioselektivnost – enzimi imaju složenu trodimenzionalnu strukturu i mogu razlikovati funkcionalne skupine koje su smještene u različitim područjima molekule supstrata.
- Enantioselektivnost ili stereoselektivnost – bilo koji tip kiralnosti prisutan u molekuli supstrata je "prepoznat" nakon formiranja međukompleksa enzim-supstrat jer su enzimi kiralni katalizatori (Nikalje, 2011.).

Kako bi bili katalitički aktivni, većina enzima zahtijeva prisutnost jedne ili više specifičnih kemijskih skupina, koje mogu biti metalni ion (kofaktor) ili organski kompleks (koenzim) koji djeluje kao aktivator biokatalizatora (Fernandes et al., 2017.).

Kako bi objasnio specifičnost enzima, Fischer je 1894. godine predložio model "brave i ključa". Model predlaže geometrijsku komplementarnost enzima i supstrata koji se točno uklapaju jedan u drugi kako je prikazano na slici 5. Supstrati su vezani za enzime kroz višestruke nekovalentne interakcije između skupina na aktivnim mjestima enzima i komplementarnih skupina na supstratu. 1958. godine Koshland (Koshland, 1958.) je pretpostavio drugi model vezanja enzima i supstrata – model "inducirane prilagodbe". Dok kod modela "brave i ključa" aktivna mjesta imaju krutu strukturu, kod modela "inducirane prilagodbe" su fleksibilnija. Vezanje supstrata na aktivno mjesto inducira konformacijsku promjenu u strukturi enzima koja dovodi do točnog prijanjanja na svim aktivnim mjestima između enzima i supstrata (Engelking, 2015., Pan et al., 2010.).



Slika 5. Teorija brave i ključa.

Većina enzima katalizira prijenos elektrona, atoma ili funkcionalnih skupina. Stoga se klasificiraju u razrede (klase) i dodijeljena su im imena prema vrsti prijenosne reakcije, donoru ili akceptoru skupine. U tablici 2 prikazana je klasifikacija enzima i reakcije koje kataliziraju (Nelson i Cox, 2005.).

Tablica 2. Klasifikacija enzima (Nelson i Cox, 2005.).

Razred	Enzimi	Reakcije koje kataliziraju
1.	oksidoreduktaze	Prijenos elektrona
2.	transferaze	Reakcije prijenosa skupina
3.	hidrolaze	Reakcije hidrolize
4.	liaze	Adicija skupina na dvostruke veze ili stvaranje dvostrukih veza uklanjanjem skupina
5.	izomeraze	Prijenos skupina unutar molekula kako bi se dobile izomerne strukture
6.	ligaze	Formiranje C–C, C–S, C–O i C–N veza reakcijom kondenzacije vezanim za cijepanje ATP-a

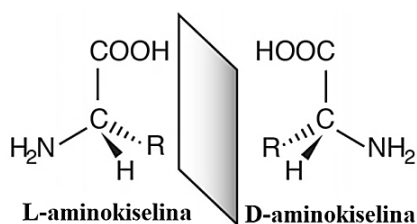
2.3.1. Kiralnost i primjena enzima u farmaceutskoj industriji

Krajem 1980.-ih Roger Sheldon uveo je faktor utjecaja na okoliš – *E*-faktor – (kg otpad/kg proizvoda) kako bi procijenio utjecaj proizvodnih procesa na okoliš. Veći *E*-faktor znači veća količina otpada i više negativnog utjecaja na okoliš. 1992. procjenjivao je *E*-faktore za različite kemijske industrije, što je pokazalo da farmaceutska industrija ima najviši *E*-faktor (za usporedbu, petrokemijska industrija ima faktor $E < 0,1$, a farmaceutska 25-100) (Sun et al., 2017.). Uz to, farmaceutici postaju sve složeniji, a javna i ekološka potražnja za zelenim tehnologijama sve se više povećava. Stoga industrija traži ekonomičnije, sigurnije i zelenije biokatalitičke procese kao alternative tradicionalnoj kemijskoj katalizi (Choi, 2015.). U današnje vrijeme, većina industrijski primijenjenih biokatalitičkih reakcija daje optički čiste kiralne produkte koji se koriste u industriji kao gradivni blokovi za sintezu agrokemikalija i farmaceutika (Gundersen et al., 2016.). Mnoga buduća istraživanja koristit će kombinacije projektiranih i *de novo* dizajniranih enzima kako bi se stvorili novi putevi za dobivanje pristupa novim zanimljivim molekulama (Nestl et al., 2011.).

Najvažnije svojstvo katalizatora za primjenu u nekom procesu nije njegova aktivnost, već njegova selektivnost, nakon čega slijedi stabilnost koja predstavlja aktivnost integriranu tijekom vremena (Bommarius i Riebel, 2004.). Većina biokatalitički proizvedenih tvari posjeduje najmanje jedan kiralni centar u kojem stereocentar potječe iz biogenog početnog materijala ili se alternativno stvara tijekom biokatalitičke konverzije (Leuchs et al., 2013.). Upotreba biokatalizatora veoma je interesantna za organske kemičare upravo zbog kiralnosti i selektivnosti s obzirom na regio- i stereokemiju u molekulama. Upravo zbog toga, enzimi nude jedan od najboljih načina proizvodnje enantiomerno čistih spojeva (Nestl et al., 2011.).

Biokatalizatori koji se koriste za farmaceutske svrhe mogu se naći kao individualni enzimi ili u kombinaciji s nekoliko njih. Cijele stanice se također mogu koristiti kao biokatalizatori. U takvim mikroorganizmima koordinira se nekoliko enzima za postizanje kemijskih transformacija. Biokatalizatori u obliku cijelih stanica predstavljaju sljedeći korak u biokatalizi. Koristeći kombinaciju metaboličkih i proteinskih inženjerskih alata za projektiranje i preusmjeravanje biosintetskih putova, komplicirane reakcije mogu se provoditi u mikroorganizmima za proizvodnju tvari u velikim količinama iz jeftinih obnovljivih sirovina. To je posebno povoljno za proizvodnju prirodnih proizvoda, osobito farmaceutika čija je strukturna složenost otežala industrijsku proizvodnju budući da su kemijske sinteze izazovne, a ekstrakcija iz prirodnih izvora je ograničena dobivanjem malih količina tvari (Zhang et al., 2013.).

Tetraedarski raspored četverovalentnog ugljika na kojeg su vezane različite skupine čini cijelu molekulu asimetričnom u strukturi i takav se atom ugljika naziva asimetričnim ili kiralnim (stereo-) centrom. Takva vrsta molekula razlikuje se u trodimenzionalnim konfiguracijama i postoji u dva oblika koji su međusobno zrcalni kao što je prikazano na slici 6. Te zrcalne molekule zovu se optički izomeri (koji imaju sposobnost rotiranja polarizirane svjetlosti) ili stereoizomeri ili enantiomeri ili kiralne molekule. Fenomen postojanja enantiomera naziva se stereoizomerizam ili kiralnost. Omjer enantiomera u omjeru 50:50 naziva se racemična smjesa koja nema sposobnost rotiranja polarizirane svjetlosti. Broj enantiomera može se izračunati korištenjem formule 2^n , gdje je n broj kiralnih centara. U početku su se optički izomeri razlikovali sa znakovima (+) i (-) ili D (*dekstro*) i L (*levo*), što ukazuje na smjer u kojem enantiomeri rotiraju ravninu polariziranog svjetla. (+) ili D označava rotaciju udesno (u smjeru kazaljke na satu), dok (-) ili L označava rotaciju ulijevo (suprotno od kazaljke na satu). Glavni nedostatak takvih simbola jest da se iz njih ne može izvući broj kiralnih središta. To je moguće primjenom oznaka R ili S koje opisuju apsolutnu konfiguraciju (prostorni raspored supstituenata) oko asimetričnog ugljikovog atoma (Ali et al., 2003.).



Slika 6. D- i L- konfiguracija kiralne aminokiseline (Sasabe i Suzuki, 2018.).

Kiralnost je ključni čimbenik u sigurnosti i djelotvornosti mnogih lijekova te je stoga proizvodnja pojedinačnih enantiomera intermedijera lijeka i lijekova postala važna i najsuvremenija u farmaceutskoj industriji (Patel, 2018.). Velika većina potencijalnih lijekova sadrži jedan ili više kiralnih centara. Budući da pogrešan enantiomer može uzrokovati štetne nuspojave, veoma je važna enantiomerna čistoća terapeutika (Bommarius i Riebel, 2004.). Opažanje da kiralnost može odigrati važnu ulogu u toksičnosti i specifičnosti terapijskih sredstava, prvi put je napravio 1956. Carl Pfeiffer (Pfeiffer, 1956.) i obično se naziva Pfeifferovim pravilom, u kojem se navodi "... što je veća razlika između farmakološke aktivnosti D- i L-izomera veća je specifičnost aktivnog izomera za odgovor tkiva koje se testira."

2.3.2. Aldolaza i reakcije aldolne adicije

Stvaranje veze ugljik-ugljik (C-C) ključna je transformacija u organskoj sintezi koja u isto vrijeme predstavlja značajan stereokemijski izazov jer može dovesti do stvaranja dva nova stereocentra. U takve reakcije spadaju i reakcije aldolne adicije. Kemijske metode za postizanje takvog stereoselektivnog nastajanja C-C veza su općenito kružne i uključuju različite korake aktivacije, zaštite i uklanjanja zaštite. No, pokazalo se da enzimi mogu postići ovu transformaciju u jednom koraku. Aldolaze kataliziraju reverzibilno stereospecifično nastajanje veze između ugljikovih atoma i imaju vrlo važnu ulogu u kruženju ugljika u prirodi. Također su korisni biokatalizatori za sintezu organskih molekula za upotrebu u farmaceutskoj industriji. Međutim, bez obzira na enormne potencijale ovih enzima, postoji tek nekoliko primjera njihove uporabe u industrijskim razmjerima. Glavni razlog za to je da mnogi procesi katalizirani aldolazom zahtijevaju skupe kosupstrate (Sheldon, 2008., Coincon et al., 2012.).

Aldolaze su specifična skupina liza koja katalizira reverzibilnu stereoselektivnu adiciju donorskog spoja (nukleofila) na aldehidni akceptor (elektrofil). U većini slučajeva, stereokemija u novoformiranim stereocentrima se strogo kontrolira enzimom. To čini aldolaze atraktivnim alatima u sintezi kiralnih kompleksa, bioaktivnih spojeva, kao što su ugljikohidrati, aminokiseline i njihovi analozi (Samland i Sprenger, 2006., Clápes et al., 2010.). Aldolaze pretvaraju svoje supstrate u aldolne produkte s visokim iskorištenjem i specifičnošću u blagim uvjetima, ali i velikom kontrolom relativnih i apsolutnih konfiguracija novih stvorenih stereocentara. Ova svojstva čine aldolaze atraktivnim za proizvodnju biološki značajnih spojeva. Međutim, aldolaze koje se pojavljuju u prirodi ne postoje za mnoge

industrijski važne reakcije i stoga se koristi proteinsko inženjerstvo, usmjerena evolucija i *de novo* dizajn enzima za mijenjanje svojstava kao što su stabilnost, specifičnost supstrata i stereoselektivnost kako bi se proizvele aldolaze po mjeri za primjenu kao biokatalizatori (Windle et al., 2014.).

Derivati 4-hidroksi-2-ketokiselina su raznovrsni gradivni blokovi za sintezu aminokiselina, hidroksi-karboksilnih kiselina i kiralnih aldehida. Upravo su se piruvat-aldolaze pokazale kao izvrsni katalizatori za izravnu sintezu ove klase keto kiselinskih spojeva. Aldolaze ovisne o piruvatu su klasa liaza koje djeluju u metabolizmu šećerne kiseline gdje koriste piruvat kao zajedničku aldolnu nukleofilnu komponentu. Praktički su sve aldolaze tipa I (ne zahtijevaju kofaktor, formiraju intermedijer u obliku Schiffove baze sa supstratom na aktivnom mjestu), ali postoje i neki enzimi klase II (ovisni o metalnom kofaktoru) koji su primili manje pažnje sa sintetičke točke gledišta. Aldolaze II klase su stabilnije od aldolaze I klase što je važno za njihovu primjenu. Aldolaze II klase nalaze se samo u prokariotima i eukariotima niže vrste. (Hernández et al., 2017., Samland i Sprenger, 2006.).

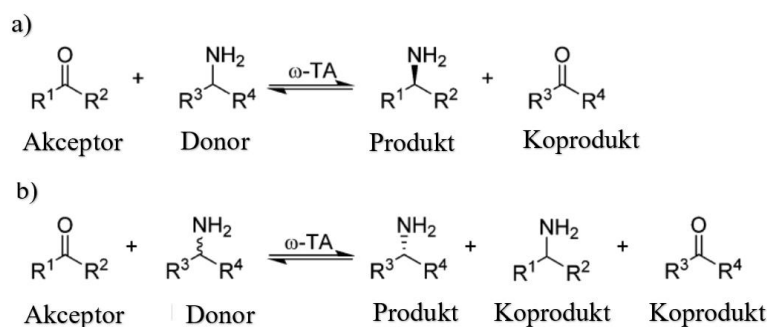
U ovom radu, piruvat-aldolaza klase II iz mikroorganizma *Escherichia coli* K-12 – 2-keto-3-deoksi-L-ramonat-aldolaza (YfaU 013), ispitana je za sintezu 4-hidroksi-2-oksobutanoata koji će se primijeniti za daljnje dobivanje aminokiseline L-homoserina.

2.3.3. Transaminaza i reakcije transaminacije

Transaminaze pripadaju razredu transferaza i kataliziraju izmjenu amino-skupine (NH_2) amino donora i keto-skupine ($\text{C}=\text{O}$) iz akceptora koja vodi do sinteze kiralnih aminokiselina ili amina. Transaminaze su opsežno proučavane za sintezu kiralnih amino spojeva zbog njihove izvrsne stereoselektivnosti i sažetih reakcijskih koraka u blagim uvjetima, nudeći alternativu kemijskoj sintezi kataliziranoj prijelaznim metalima (Sun et al., 2017.). Kiralni amini su važni sastavni dijelovi mnogih bioaktivnih prirodnih proizvoda i lijekova i potrebni su za pripremu širokog raspona biološki aktivnih spojeva koji pokazuju različita farmakološka svojstva. Koriste se kao sredstva za razdvajanje, kiralne pomoćne tvari i gradivni blokovi u sintezi neuroloških, kardiovaskularnih, imunoloških, antihipertenzivnih, antiinfektivnih i antiemetičkih lijekova. U većini slučajeva, farmakološke aktivnosti ovih amina povezane su s konfiguracijom stereocentra (Koszelewski et al., 2019.).

Biokatalitička kemija transaminacije identificirana je kao jedna od ključnih područja za proizvodnju optički čistih kiralnih amina za primjenu u farmaceutskoj industriji. Transaminaze su se pokazale kao održivi biokatalizatori zbog izvanredne stereoselektivnosti i širokog raspona supstrata ketona koji se mogu koristiti. Transaminaze se mogu koristiti na dva komplementarna načina prikazana na slici 7:

- U asimetričnoj sintezi kiralnih amina iz ketona upotrebom prikladnog donora amina (npr. L-alanin). Kako je prikazano na slici 7a, amino donor (amin) i amino akceptor (prokiralni keton) reagiraju uz pristustvo enzima proizvodeći željeni ciljni kiralniaminski proizvod i nusprodukt.
- U kinetičkoj rezoluciji racemskih amina upotrebom prikladnog akceptora amina (npr. piruvat). U ovom slučaju amino donor se dodaje kao racemična smjesa. Prema tome, jedan izomer ostaje neizreagiran, koji i postaje željeni optički čisti produkt (slika 7b) (Gundersen et al., 2016., Truppo et al, 2009.).



Slika 7. Primjeri potencijalnih reakcija s ω -transaminazom koristeći: a) sintetički put ili b) rezolucijski put (Gundersen et al., 2016.).

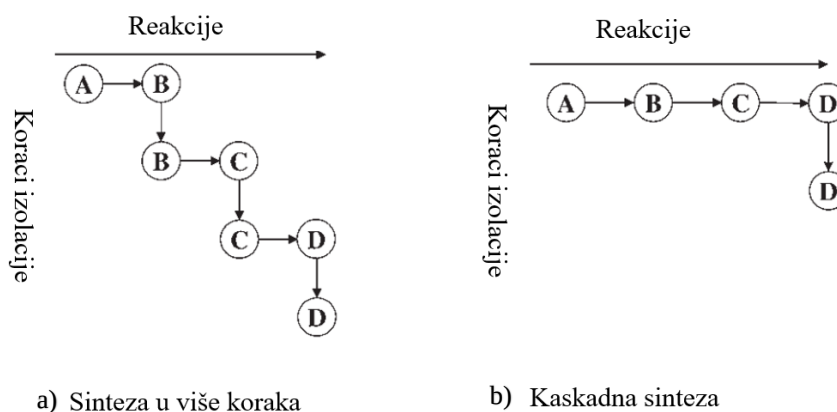
Sama amino-skupina prenosi se između dva polazna supstrata, i stoga će se u smjeru sinteze, molekularna struktura kiralnog produkta odrediti strukturom akceptorske molekule što znači da se molekula donora može slobodno odabrati jer ne utječe niti na strukturu ciljanog proizvoda niti na stereoselektivnost (Gundersen et al., 2016.).

2.4. KASKADNE REAKCIJE

Proizvodnja posebnih kemikalija i farmaceutika uključuje reakcije sinteze koje se odvijaju u više koraka, a danas se još uvijek provode na tradicionalan način – izoliranjem međuprodukta svakog koraka koji u sljedećem koraku ima ulogu supstrata (slika 8a). Takvi postupci oduzimaju mnogo kemikalija, vremena, energije i predstavljaju veliki trošak (Findrik

i Vasić-Rački, 2009.). Kaskadne reakcije pokazale su veliku učinkovitost u odnosu na konvencionalnu postepenu sintezu. Razvojem takvih reakcija skratilo se vrijeme sinteze jer više nema potrebe provoditi detaljne postupke izolacije produkata (slika 8b) i uz to, smanjena je količina otpada jer je potrebno manje otapala i kemikalija čime je povećana ekonomičnost procesa. Stoga se enzimске kaskadne reakcije ubrajaju u zelene tehnologije (Ji et al., 2016.).

Nicolaou i Chen (Nicolaou i Chen, 2009.) definirali su kaskadne reakcije kao sekvence kemijskih transformacija u kojima je polazni supstrat dizajniran tako da se podvrgne reakciji čiji produkt postaje supstrat za sljedeći korak u kojem će nastati novi produkt koji postaje supstrat za sljedeći korak, i tako sve dok se ne dobije produkt koji je stabilan u uvjetima reakcije.



Slika 8. Organska sinteza u više koraka i kaskadna sinteza (Sheldon, 2008.).

Trenutačno postoji relativno malo primjera katalitičkih enantioselektivnih kaskadnih reakcija, a sigurno je da će asimetrična kataliza kaskadnih procesa postati sve izraženija u godinama koje dolaze zbog brojnih prednosti koje nude enzimске kaskadne reakcije (Nicolaou et al., 2006.).

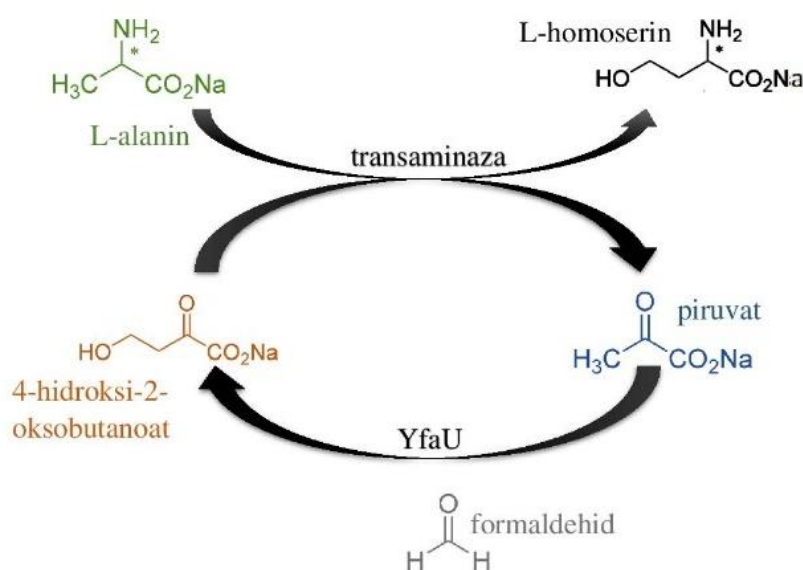
Biokatalitičke kaskadne reakcije katalizirane cijelim stanicama mikroorganizama predstavljaju revolucionarni razvoj u višestupanjskoj sintezi finih kemikalija (Rudroff, 2019.). Multi-enzimski procesi koriste dva ili više enzima za kataliziranje reakcija po definiranom putu kaskade, te paralelne ili mrežne konfiguracije (Santacoloma et al., 2011.). Danas brojni industrijski procesi koriste biokatalizatore ili u formi cijelih stanica ili kao izolirane enzime. Već je spomenuto kako biokatalizatori u obliku cijelih stanica predstavljaju sljedeći korak u biokatalizi – osobito *in vivo* više-enzimski kaskadni procesi (Zhang et al., 2013.). Postoje mnoge prednosti u korištenju više-enzimskih sustava u biosintezi: enantioselektivnost,

regioselektivnost, niži troškovi za daljnju obradu, pomicanje ravnoteže uklanjanjem jednog od supstrata ili produkta iz reakcijske smjese itd. (Findrik i Vasić-Rački, 2009.).

2.4.1. Sinteza L-homoserina

L-homoserin se upotrebljava kao prekursor za sintezu esencijalnih aminokiselina (L-metionina, L-treonina, L-izoleucina) i vrijedan gradivni blok za proizvodnju industrijskih proizvoda. Metionin, zajedno s cisteinom spada u proteinogene aminokiseline koje sadrže sumpor. Metionin je međuprodukt u biosintezi cisteina, karnitina, taurina, lecitina, fosfatidil-kolina i drugih fosfolipida. Esencijalna je aminokiselina, ne samo kod ljudi nego i kod svinja i peradi. Kako se ne sintetizira *de novo* kod ljudi, mora se unijeti u organizam što dovodi do povećane potražnje za ovom aminokiselinom (Sanders i Sheldon, 2015).

Na slici 9 prikazana je kaskadna reakcija proučavana u svrhu izrade ovoga rada. Radi se o sintezi L-homoserina koja je katalizirana cijelim stanicama mikroorganizma *Escherichia coli*. U stanicama se nalaze dva enzima koja su potrebna za kataliziranje ove kaskadne reakcije: aldolaza (YfaU 013) i transaminaza (TA 039). Aldolaza katalizira prvi stupanj reakcije – aldolnu adiciju između piruvata i formaldehida iz kojih nastaje 4-hidroksi-2-oksobutanoat (aldol). Reduktivnu aminaciju, odnosno transaminaciju katalizira enzim transaminaza. U reakciji sudjeluje 4-hidroksi-2-oksobutanoat (produkt aldolne adicije) i L-alanin koji sintezom daju L-homoserin i piruvat. Reakcije se događaju i u suprotnom smjeru pa tako postoji i retro-aldolna reakcija i reakcija povratne transaminacije.



Slika 9. Primjer kaskadne reakcije: sinteza L-homoserina.

2.5. ENZIMSKA KINETIKA

Enzimski kinetika proučava čimbenike koji utječu na brzinu enzimski kataliziranih reakcija. Leonor Michaelis i Maud Menten prvi su pokazali da se te reakcije odvijaju u dva stupnja (jednadžba 1). Supstrat (S) se najprije reverzibilno veže na svoj enzim (E), formirajući tako međukompleks (ES) (k_1 i k_2 su konstante brzine tih procesa). Supstrat vezan za enzim se zatim kemijski transformira u produkt (P) koji se odvajaju od enzima (konstanta brzine k_3). Katalitička snaga enzima na danom supstratu uključuje dvije osnovne varijable: K_m predstavlja afinitet enzima prema supstratu i V_m predstavlja maksimalnu brzinu enzimске katalize (Engelking, 2015.).



Kinetika jednosupstratnih reakcija obično se opisuje najjednostavnijom Michaelis-Menteničinom (MM) jednadžbom:

$$r_s = \frac{d[P]}{dt} = \frac{V_m c_s}{K_m + c_s} = \frac{k_2 c_e c_s}{K_m + c_s} \quad (2)$$

gdje r [$\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$] označava brzinu reakcije, V_m [U mL^{-1}] maksimalnu brzinu reakcije, c_s [mmol dm^{-3}] koncentraciju supstrata, a K_m [mmol dm^{-3}] koncentraciju supstrata pri $V_m/2$.

Parametri Michaelis-Menteničine kinetike matematički se definiraju prema sljedećim jednadžbama:

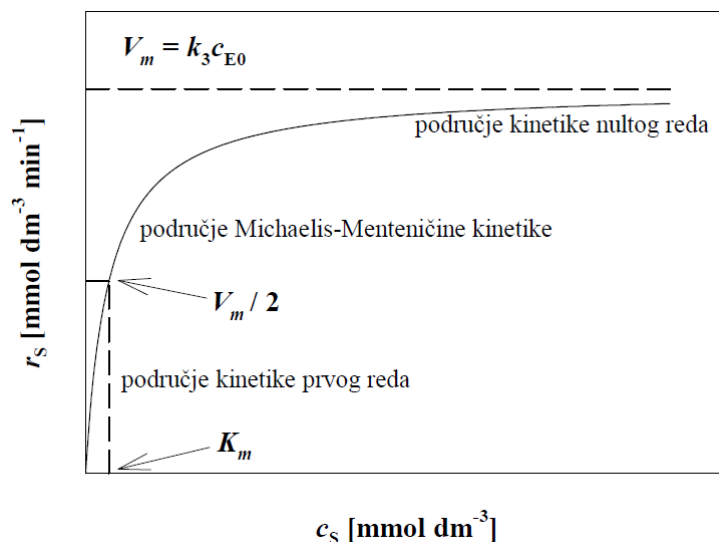
$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad (3)$$

$$K_m = \frac{k_1 + k_3}{k_2} \quad (4)$$

pri čemu c_{E0} [mg mL^{-1}] predstavlja početnu koncentraciju enzima, a k_1 , k_2 i k_3 su konstante koje potječu iz jednadžbe 1.

Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata za enzimski kataliziranu reakciju prikazana je na slici 10. Prema Michaelis-Menteničinoj jednadžbi razlikuju se tri područja ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji supstrata. Kada je koncentracija supstrata niska ($c_s \ll K_m$), ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata je linearna. U tom slučaju,

reakcija se može aproksimirati kinetikom prvog reda. Kada je koncentracija supstrata visoka ($c_s \gg K_m$), brzina reakcije može se opisati kinetikom nultog reda. To znači da brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata. Ukoliko koncentracija supstrata postiže umjerene vrijednosti, mora se upotrijebiti puna Michaelis-Menteničina jednačba (Dunn et al., 1992.).



Slika 10. Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata za enzimski kataliziranu reakciju.

Michaelis-Menteničina kinetika može se primijeniti i za sustave s dva supstrata pa jednačba glasi:

$$r_s = \frac{V_m c_{S1} c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) \cdot (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (5)$$

Glavni problemi u radu s enzimima jesu deaktivacija enzima tijekom velikih bioprocesa i inhibicija enzima koja nastaje zbog prisutnosti inhibitorskog reagensa koji smanjuje ili zaustavlja enzimatsku reakciju. Inhibicija enzima može biti reverzibilna ili ireverzibilna. Ireverzibilna inhibicija je nepovratna i događa se kada se inhibitor kovalentno veže ili uništi dio strukture enzima koji je neophodan za obavljanje njegove katalitičke funkcije. Postoje tri vrste reverzibilne inhibicije: kompetitivna, nekompetitivna i mješovita. Kod kompetitivne inhibicije, inhibitor se natječe sa supstratom za aktivno mjesto enzima. U ovom slučaju, inhibitor je biokemijski sličan supstratu i može se vezati na enzim tvoreći kompleks inhibitor-enzim i na taj način sprječava stvaranje međukompleksa enzim-supstrat zbog čega ne dolazi do reakcije. Kako je ovaj proces reverzibilan, moguće ga je riješiti povećanjem koncentracije supstrata. Kod nekompetitivne inhibicije, inhibitor se veže na enzim, ali na mjestu različitom od mjesta gdje će se vezati supstrat. U mješovitoj inhibiciji, inhibitorsko sredstvo ne

konkurira supstratu za aktivno mjesto, ali može vezati enzim ili ES međukompleks. Nekompetitivna i mješovita inhibicija javljaju se kada su prisutna dva supstrata i utječu i na K_m i V_m . Kompetitivna inhibicija utječe samo na K_m , ne na V_m . Michaelis-Mentenićini izrazi za kompetitivnu, nekompetitivnu i antikompetitivnu inhibiciju dani su jednadžbama 6-8, pri čemu c_i [mmol dm⁻³] predstavlja koncentraciju inhibitora, a K_i [mmol dm⁻³] konstantu inhibicije (Fernandes et al., 2017).

$$r_s = \frac{V_m c_s}{K_m \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s} \quad (6)$$

$$r_s = \frac{V_m c_s}{K_m + \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) \cdot c_s} \quad (7)$$

$$r_s = \frac{V_m c_s}{(K_m + c_s) \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (8)$$

2.6. MATEMATIČKO MODELIRANJE

Matematički modeli, posebice u kombinaciji s modernim računalnim tehnikama, pokazali su se vrlo učinkovitim za pronalazak optimalnih radnih uvjeta i stvaranje optimalnog mikrookruženja za biokatalizator. Stoga je proučavanje teorijskog modela sustava enzimske reakcije od interesa za industrijsku primjenu biokatalizatora. Model obično sadrži informacije o određenim biokatalitičkim reakcijama – kinetičke jednadžbe i jednadžbe masene bilance u reaktoru (Vasić-Rački et al., 2003.).

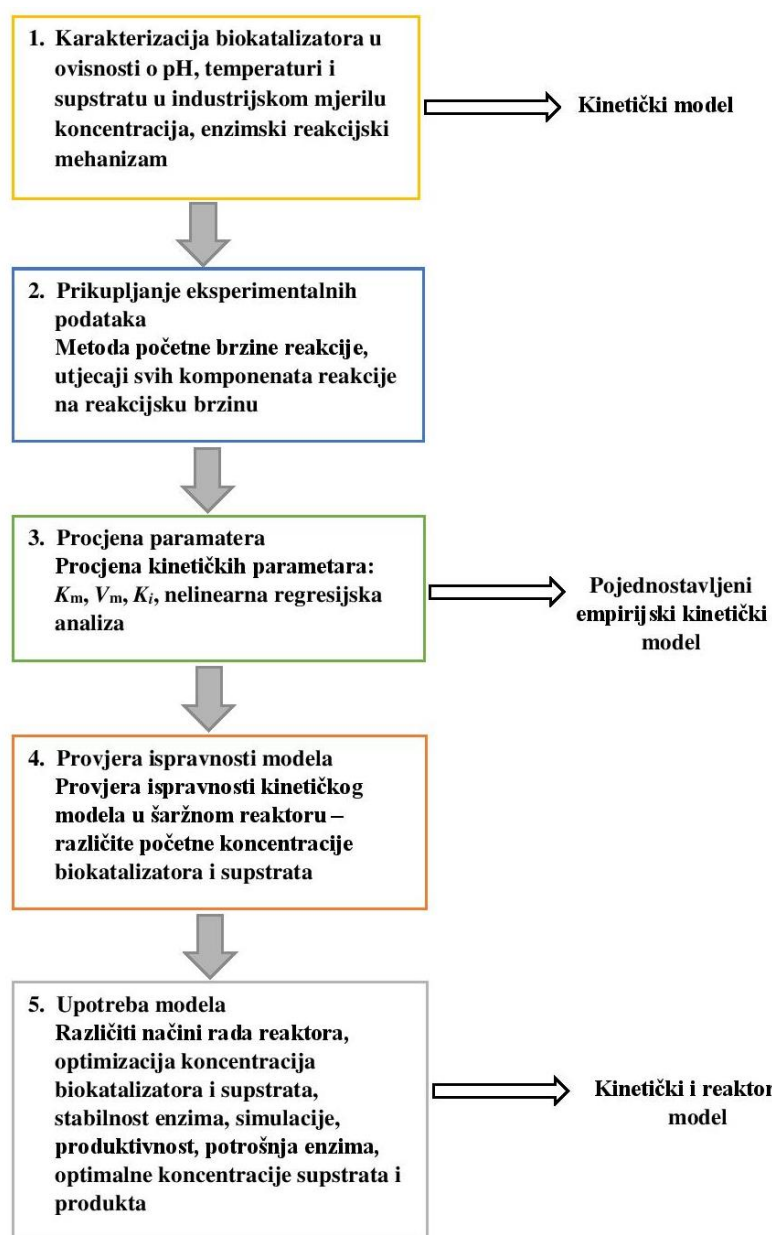
Matematičko modeliranje u području biokatalize klasificira se u sljedeća četiri područja (Sin et al., 2009.):

- Biokatalizator – modeli koji opisuju katalizu na molekularnoj razini što vodi do predviđanja selektivnosti reakcije.
- Reakcija – kinetički modeli koji opisuju mehanizam i brzinu reakcije.
- Reaktor – modeli koji opisuju promatranu kinetiku reakcije uključujući bilancu tvari kao i hidrodinamičke uvjete u reaktoru.
- Proces – modeli koji uključuju interakciju između različitih operacijskih jedinica uključenih u tijek procesa.

Razvoj modela enzimskog reaktora s reakcijom kataliziranom izoliranim topljivim enzimima sastoji se od:

- modeliranja enzimske kinetike i
- modeliranja reaktora, koji povezuje kinetiku enzima s masenom bilancom za enzimske reaktore kako bi se predvidjela učinkovitost reaktora i olakšala identifikacija najučinkovitijeg reaktorskog načina rada (Vasić-Rački et al., 2011.).

Na slici 11 prikazan je pojednostavljeni prikaz razvoja modela za enzimski reaktor (Vasić-Rački et al., 2011.).



Slika 11. Strategija razvijanja modela za enzimski reaktor (Vasić-Rački et al., 2011.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

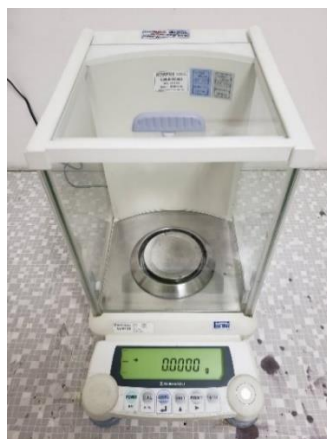
Prilikom eksperimentalnog rada u laboratoriju korištene su sljedeće kemikalije:

- 4-hidroksi-2-oksobutanoat – aldol, $C_4H_6O_4$ (sintetiziran i pročišćen u IQAC-CSIC laboratorijima (Španjolska) i na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu),
- acetonitril, C_2H_3N (Sigma Aldrich, Njemačka),
- dikalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 (Merck, Njemačka),
- formaldehid, CH_2O (T. T. T. d.o.o., Hrvatska)
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 (Lach-Ner, Češka),
- L-alanin, $C_3H_7NO_2$ (Sigma Aldrich, Njemačka),
- L-homoserin, $C_4H_9NO_3$ (Sigma Aldrich, Njemačka),
- metanol, CH_3OH (J. T. Baker, Sjedinjene Američke Države),
- natrijev piruvat, $C_3H_3NaO_3$ (Sigma Aldrich, Njemačka),
- *N*-benziloksikarboniloksi-sukcinimid – Cbz-OSu, $C_{12}H_{11}NO_5$ (Sigma Aldrich, Njemačka),
- *O*-benzilhidroksilamin hidroklorid, $BnONH_2 \cdot HCl$ (Acros Organics, Belgija),
- piridin, C_5H_5N (Acros Organics, Belgija),
- trifluorooctena kiselina – TFA, $C_2HF_3O_2$ (Sigma Aldrich, Njemačka),
- liofilizirane cijele stanice *E. coli* koje sadrže enzime YfaU(013)/PRO TRANS(039) dobivene uz prekomjernu ekspresiju, (Prozomix Ltd, Velika Britanija).

3.2. APARATURA

3.2.1. Analitička vaga

Za odvagu kemikalija korištena je laboratorijska analitička vaga proizvođača *Shimadzu* s preciznošću 0,001 g (slika 12).



Slika 12. Analitička vaga

3.2.2. Homogenizator

Homogenizator *Vortex V-1 plus* proizvođača *Biosan* (slika 13) korišten je za homogeniziranje otopina prilikom uzorkovanja, pripreme i prije svakog korištenja otopina.



Slika 13. Homogenizator.

3.2.3. Tresilica

Za provođenje reakcija te neprekidno i jednoliko miješanje reakcijskih otopina korištena je tresilica *VIBROMIX 203 EVT*, tvrtke *Tehtnica* (slika 14), pri čemu je broj okretaja iznosio $1000 \text{ okr min}^{-1}$.



Slika 14. Tresilica.

3.2.4. Termostatirana tresilica

Uzorke s derivatizacijskom otopinom Cbz-OSu potrebno je inkubirati 60 min pri temperaturi od 60 °C na termostatiranoj tresilici *Digital Shaking Drybath*, proizvođača *Thermo SCIENTIFIC* (slika 15).



Slika 15. Termostatirana tresilica.

3.2.5. Centrifuga

Centrifuga *Hettich*, model *Universal 320 R* (slika 16), korištena je kako bi se istaložio enzim i nečistoće iz otopine prije analize uzoraka na HPLC-u. Centrifugiranje svih otopina provedeno je u trajanju od 5 minuta pri 14000 okr min⁻¹ i 4 °C.



Slika 16. Centrifuga.

3.2.6. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

Koncentracije supstrata i produkata u reakcijama praćene su uz pomoć HPLC uređaja *Shimadzu* opremljenog s UV detektorom istog proizvođača (slika 17).



Slika 17. Uređaj za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC).

3.3. ANALIZA UZORAKA TEKUĆINSKOM KROMATOGRAFIJOM VISOKE DJELOTVORNOSTI

3.3.1. Priprava uzoraka za analizu

Prije provođenja analize na uređaju za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, potrebno je pripremiti uzorke. U tu svrhu provodi se derivatizacija uzorka kako bi se supstrati i produkti preveli u oblik vidljiv na valnoj duljini na kojoj se provodi analiza.

Uzorci u kojima se prati koncentracija natrijevog piruvata, formaldehida i 4-hidroksi-2-oksobutanoata potrebno je pripremiti derivatizacijom s *O*-benzilhidroksilamin hidrokloridom ($\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$). Otopina za derivatizaciju sadrži 200 mg $\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$ (koncentracije 130 mmol dm^{-3}) otopljenog u 6,6 mL piridina, 3 mL metanola i 0,4 mL vode. Priprema uzorka za analizu na HPLC-u provedena je tako da je 5 μL uzorka iz reakcijske otopine otpipetirano u već prethodno pripremljenih 50 μL derivatizacijske otopine. Otopina je zatim inkubirana na sobnoj temperaturi u trajanju od minimalno 5 minuta nakon čega je dodano 500 μL metanola. Uzorak je potom centrifugiran pri $14000 \text{ okr min}^{-1}$ u vremenskom trajanju od 5 minuta kako bi se na dnu odvojio enzim i nečistoće. U staklenu vijalu za HPLC otpipetirano je 400 μL otopine s vrha kivete. Tako pripremljen uzorak je spreman za analizu na HPLC-u.

Uzorci u kojima se prati koncentracija L-alanina i L-homoserina derivatiziraju se otopinom koja je pripremljena otapanjem 0,4 g *N*-benziloksikarboniloksi-sukcinimid – CbzOSu (koncentracije 150 mmol dm^{-3}) u 10,7 mL acetonitrila. Priprema uzorka za analizu na HPLC-u provedena je tako da je 10 μL uzorka iz reakcijske otopine otpipetirano u već prethodno pripremljenih 50 μL derivatizacijske otopine. Otopinu je potrebno termostatirati jedan sat pri 60°C nakon čega je dodano 440 μL metanola. Uzorak je potom centrifugiran pri $14000 \text{ okr min}^{-1}$ u vremenskom trajanju od 5 minuta kako bi se na dnu odvojio enzim i nečistoće. U staklenu vijalu za HPLC otpipetirano je 350 μL otopine s vrha kivete. Tako pripremljen uzorak je spreman za analizu na HPLC-u.

3.3.2. Analiza uzoraka na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti

Nakon što su uzorci pripremljeni prethodno opisanom metodom, provedena je njihova analiza na način da su mjerene koncentracije supstrata i produkata. Analiza je provedena uz pomoć uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, HPLC-a. Pritom je

korištena Phenomenex Kinetex® C18 kolona, veličine čestica 5 μm te dimenzija 4,6 $\times$ 250 mm. Uvjeti pri kojima je analiza provedena su:

- temperatura od 30 $^{\circ}\text{C}$,
- protok eluenta 1,5 mL/min te
- valna duljina 215 nm.

Korišteni su eluent A (organski) i eluent B (vodeni). Eluent A čine acetonitril, ultračista voda i trifluoroctena kiselina (TFA) u omjeru 80:20:0.1, a eluent B ultračista voda i TFA (0,1 %). Primijenjena je gradijentna metoda analize: 90 % – 0 % B 10 minuta, 0 % B 2 minute, 0 – 90 % B 3 minute, 90 % B 1 minuta. Retencijsko vrijeme za L-homoserin je 5,6, 4-hidroksi-2-oksobutanoat 6,2, L-alanin 6,6, piruvat 7,8, formaldehid 8,5 min. Baždarni pravci i kromatogrami za formaldehid, natrijev piruvat, L-alanin, L-homoserin i 4-hidroksi-2-oksobutanoat nalaze se u Prilozima 1, 2, 3, 4 i 5.

3.4. Ispitivanje reakcijske kinetike

Korištenjem metode početnih brzina ispitana je kinetika kaskadne reakcije katalizirana cijelim stanicama mikroorganizma. Kaskadna reakcija se sastoji od dva povezana koraka:

- i. Reakcija aldolne adicije između natrijevog piruvata i formaldehida iz kojih nastaje 4-hidroksi-2-oksobutanoat. Reakcija je reverzibilna te se povratna reakcija naziva retro-aldolna reakcija.
- ii. Reakcija transaminacije između 4-hidroksi-2-oksobutanoata i L-alanina iz kojih nastaje L-homoserin. Odvija se i reakcija povratne transaminacije.

Ispitan je utjecaj koncentracija supstrata na početnu reakcijsku brzinu i to na način da je koncentracija jedne komponente varirana dok su koncentracije svih ostalih komponenata reakcije održavane konstantnima. Sva su mjerenja provedena na Eppendorf tresilici pri čemu je broj okretaja iznosio 1000 okr min^{-1} . Za otapanje svih komponenata korišten je 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer čiji je pH jednak 7,0. Reakcije su praćene periodički tijekom 18 minuta pri čemu se pratila promjena koncentracije u vremenu.

Volumna i specifična aktivnost enzima izračunate su prema danim jednadžbama (jednadžbe 9 i 10).

$$V.A. = \frac{\frac{dc}{dt} V_{uk}}{V_{enz}} \quad [U \text{ mL}^{-1}] \quad (9)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_{enz}} \quad [U \text{ mg}^{-1}] \quad (10)$$

U navedenim jednadžbama $V.A.$ označava volumnu aktivnost enzima ($U \text{ mL}^{-1}$), $S.A.$ specifičnu aktivnost enzima ($U \text{ mg}^{-1}$), dc/dt je promjena koncentracije u vremenu ($\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$), V_{uk} je volumen reaktora (μL), V_{enz} predstavlja volumen enzima dodanog u reaktor (μL), a γ_{enz} je masena koncentracija enzima (mg mL^{-1}).

3.4.1. Preliminarna mjerenja

Najprije je potrebno odrediti masenu koncentraciju stanica (enzima), γ_{enz} , koja je dovoljna za optimalnu izvedbu aldolne adicije i reakcije transaminacije. Koncentracije supstrata su konstantne, dok varira koncentracija stanica (YfaU(013)/PRO TRANS(039)) od 0 do 10 mg mL^{-1} .

3.4.1.1. Preliminarna mjerenja za aldolnu adiciju

U tablici 3 prikazan je cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom određivanja optimalne koncentracije stanica za reakciju aldolne adicije.

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese prilikom određivanja optimalne koncentracije stanica (enzima) za reakciju aldolne adicije.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm^{-3}]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm^{-3}]
pufer	700,69 - x	50,00	50,00
formaldehid	99,31	1006,99	100,00
piruvat	200,00	500,00	100,00
stanice	x	25 mg mL^{-1}	X

3.4.1.2. Preliminarna mjerenja za reakciju transaminacije

Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja koje za cilj ima odrediti optimalnu koncentraciju stanica (enzima) za reakciju transaminacije prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese prilikom određivanja optimalne koncentracije stanica (enzima) za reakciju transaminacije.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm^{-3}]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm^{-3}]
pufer	800,00 - x	50,00	50,00
L-alanin	100,00	1000,00	100,00
4-hidroksi-2-oksobutanoat	100,00	1000,00	100,00
stanice	X	25 mg mL ⁻¹	X

3.4.2. Ispitivanje kinetike aldolne adicije

3.4.2.1. Ispitivanje utjecaja formaldehida na početnu brzinu aldolne adicije

Ispitivanje utjecaja koncentracije formaldehida na početnu reakcijsku brzinu provedeno je tako da je koncentracija formaldehida varirana u rasponu od 0 do 800 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 5.

Tablica 5. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem formaldehida.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm^{-3}]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm^{-3}]
pufer	860,00 - x	50,00	50,00
piruvat	100,00	1000,00	100,00
formaldehid	x	999,91	X
stanice	40,00	5,00 mg mL ⁻¹	0,20 mg mL ⁻¹

3.4.2.2. Ispitivanje utjecaja piruvata na početnu brzinu aldolne adicije

Ispitivanje utjecaja koncentracije natrijevog piruvata na početnu reakcijsku brzinu provedeno je tako da je koncentracija piruvata varirana u rasponu od 0 do 800 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 6.

Tablica 6. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem natrijevog piruvata.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm^{-3}]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm^{-3}]
pufer	860,03 - x	50,00	50,00
piruvat	x	1000,00	X
formaldehid	99,97	1000,25	100,00
stanice	40,00	5,00 mg mL^{-1}	0,20 mg mL^{-1}

3.4.2.3. Ispitivanje utjecaja L-homoserina na početnu brzinu aldolne adicije

Ispitivanje utjecaja koncentracije L-homoserina na početnu reakcijsku brzinu provedeno je tako da je koncentracija L-homoserina varirana u rasponu od 0 do 400 mmol dm^{-3} , dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne, a ukupni sastav reakcijske smjese prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem L-homoserina.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm^{-3}]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm^{-3}]
pufer	659,99 - x	50,00	50,00
piruvat	200,00	1000,00	200,00
formaldehid	100,01	999,91	100,00
L-homoserin	x	1000,00	X
stanice	40,00	5,00 mg mL^{-1}	0,20 mg mL^{-1}

3.4.2.4. Ispitivanje utjecaja L-alanina na početnu brzinu aldolne adicije

Ispitivanje utjecaja koncentracije L-alanina na početnu reakcijsku brzinu provedeno je tako da je koncentracija L-alanina varirana u rasponu od 0 do 600 mmol dm^{-3} , dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne (tablica 8).

Tablica 8. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem L-alanina.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm^{-3}]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm^{-3}]
pufer	659,99 - x	50,00	50,00
piruvat	200,00	1000,00	200,00
formaldehid	100,01	999,91	100,00
L-alanin	x	1000,00	X
stanice	40,00	5,00 mg mL^{-1}	0,20 mg mL^{-1}

3.4.3. Ispitivanje kinetike retro-aldolne reakcije

3.4.3.1. Ispitivanje utjecaja 4-hidroksi-2-oksobutanoata na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

Ispitivanje utjecaja koncentracije 4-hidroksi-2-oksobutanoata (aldola) na početnu reakcijsku brzinu retroaldolne reakcije provedeno je tako da je koncentracija 4-hidroksi-2-oksobutanoata varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 9.

Tablica 9. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem 4-hidroksi-2-oksobutanoata.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	800,00 - x	50,00	50,00
4-hidroksi-2-oksobutanoat	x	1000,00	X
stanice	200,00	50,00 mg mL ⁻¹	10,00 mg mL ⁻¹

3.4.3.2. Ispitivanje utjecaja piruvata na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

Ispitivanje utjecaja koncentracije piruvata na početnu reakcijsku brzinu retro-aldolne reakcije provedeno je tako da je koncentracija piruvata varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 10.

Tablica 10. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem piruvata.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	700,00 - x	50,00	50,00
piruvat	x	1000,00	X
4-hidroksi-2-oksobutanoat	100,00	1000,00	100,00
stanice	200,00	50 mg mL ⁻¹	10 mg mL ⁻¹

3.4.4. Ispitivanje kinetike reakcije transaminacije

3.4.4.1. Ispitivanje utjecaja 4-hidroksi-2-oksobutanoata na početnu brzinu reakcije transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije 4-hidroksi-2-oksobutanoata na početnu reakcijsku brzinu reakcije transaminacije provedeno je tako da je koncentracija 4-hidroksi-2-oksobutanoata varirana u rasponu od 0 do 700 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 11.

Tablica 11. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem 4-hidroksi-2-oksobutanoata.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	800,00 - x	50,00	50,00
L-alanin	100,00	1000,00	100,00
4-hidroksi-2-oksobutanoat	x	1000,00	X
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

3.4.4.2. Ispitivanje utjecaja L-alanina na početnu brzinu reakcije transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije L-alanina na početnu reakcijsku brzinu reakcije transaminacije provedeno je tako da je koncentracija L-alanina varirana u rasponu od 5 do 700 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 12.

Tablica 12. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem L-alanina.

Otopina	V [μL]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	795,00 - x	50,00	50,00
L-alanin	x	1000,00	X
4-hidroksi-2-oksobutanoat	100,00	1000,00	100,00
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

3.4.4.3. Ispitivanje utjecaja L-homoserina na početnu brzinu reakcije transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije L-homoserina na početnu reakcijsku brzinu reakcije transaminacije provedeno je tako da je koncentracija L-homoserina varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 13.

Tablica 13. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem L-homoserina.

Otopina	V [μ L]	C _u temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	C _u reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	500,00 - x	50,00	50,00
L-alanin	300,00	1000,00	300,00
4-hidroksi-2-oksobutanoat	100,00	1000,00	100,00
L-homoserin	x	1000,00	X
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

3.4.4.4. Ispitivanje utjecaja piruvata na početnu brzinu reakcije transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije piruvata na početnu reakcijsku brzinu reakcije transaminacije provedeno je tako da je koncentracija piruvata varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 14.

Tablica 14. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem piruvata.

Otopina	V [μ L]	C _u temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	C _u reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	500,00 - x	50,00	50,00
L-alanin	300,00	1000,00	300,00
4-hidroksi-2-oksobutanoat	100,00	1000,00	100,00
piruvat	x	1000,00	X
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

3.4.4.5. Ispitivanje utjecaja formaldehida na početnu brzinu reakcije transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije formaldehida na početnu reakcijsku brzinu reakcije transaminacije provedeno je tako da je koncentracija formaldehida varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 14.

Tablica 14. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem formaldehida.

Otopina	V [μL]	C _u temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	C _u reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	500,00 - x	50,00	50,00
L-alanin	300,00	1000,00	300,00
4-hidroksi-2-oksobutanoat	100,00	1000,00	100,00
formaldehid	x	1000,00	X
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

3.4.5. Ispitivanje kinetike reakcije povratne transaminacije

3.4.5.1. Ispitivanje utjecaja L-homoserina na početnu brzinu reakcije povratne transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije L-homoserina na početnu reakcijsku brzinu reakcije povratne transaminacije provedeno je tako da je koncentracija L-homoserina varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 15.

Tablica 15. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem L-homoserina.

Otopina	V [μL]	C _u temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	C _u reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	700,00 - x	50,00	50,00
piruvat	200,00	1000,00	200,00
L-homoserin	x	1000,00	X
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

3.4.5.2. Ispitivanje utjecaja piruvata na početnu brzinu reakcije povratne transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije piruvata na početnu reakcijsku brzinu reakcije povratne transaminacije provedeno je tako da je koncentracija piruvata varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 16.

Tablica 16. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem natrijevog piruvata.

Otopina	V [μL]	C _u temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	C _u reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	700,00 - x	50,00	50,00
piruvat	x	1000,00	X
L-homoserin	200,00	1000,00	200,00
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

3.4.5.3. Ispitivanje utjecaja formaldehida na početnu brzinu reakcije povratne transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije formaldehida na početnu reakcijsku brzinu reakcije povratne transaminacije provedeno je tako da je koncentracija formaldehida varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 17.

Tablica 17. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem formaldehida.

Otopina	V [μL]	C _u temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	C _u reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	500,00 - x	50,00	50,00
piruvat	200,00	1000,00	200,00
L-homoserin	200,00	1000,00	200,00
formaldehid	x	265,56	X
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

3.4.5.4. Ispitivanje utjecaja L-alanina na početnu brzinu reakcije povratne transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije L-alanina na početnu reakcijsku brzinu reakcije povratne transaminacije provedeno je tako da je koncentracija L-alanina varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i enzima bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 18.

Tablica 18. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem L-alanina.

Otopina	V [μ L]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	500,00 - x	50,00	50,00
piruvat	200,00	1000,00	200,00
L-homoserin	200,00	1000,00	200,00
L-alanin	x	1000,00	X
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

3.4.5.5. Ispitivanje utjecaja 4-hidroksi-2-oksobutanoata na početnu brzinu reakcije povratne transaminacije

Ispitivanje utjecaja koncentracije 4-hidroksi-2-oksobutanoata – aldola na početnu reakcijsku brzinu reakcije povratne transaminacije provedeno je tako da je koncentracija aldola varirana u rasponu od 0 do 500 mmol dm⁻³, dok su koncentracije preostalih komponenti i stanica bile konstantne. Cjelokupni sastav reakcijske smjese prilikom niza mjerenja prikazan je u tablici 19.

Tablica 19. Sastav reakcijske smjese pri određivanju početne reakcijske brzine variranjem 4-hidroksi-2-oksobutanoata.

Otopina	V [μ L]	Cu temeljnoj otopini [mmol dm ⁻³]	Cu reakcijskoj smjesi [mmol dm ⁻³]
pufer	500,00 - x	50,00	50,00
piruvat	200,00	1000,00	200,00
L-homoserin	200,00	1000,00	200,00
4-hidroksi-2-oksobutanoat	x	1000,00	X
stanice	100,00	50,00 mg mL ⁻¹	5,00 mg mL ⁻¹

4. MATEMATIČKI MODEL

Kinetički parametri procijenjeni su na temelju eksperimentalnih podataka ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji prikupljenih metodom početnih brzina. Za procjenu parametara korištene su metode nelinearne regresije (simpleks i metoda najmanjih kvadrata) koje se primjenjuju u softveru SCIENTIST. Isti je softver korišten za simulacije modela. Razvijen je kinetički model za kaskadni sustav (slika 9). Brzina reakcije aldolne adicije katalizirane YfaU 013 između natrijevog piruvata (pir) i formaldehida (FA) (r_1) opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednadžbom s uključenom inhibicijom supstrata s formaldehidom i natrijevim piruvatom, kao i kompetitivnom inhibicijom s L-alaninom (alan) i L-homoserinom (hom) (jednadžba 11). Brzina retro-aldolne reakcije (r_2) opisana je Michaelis-Menteničinom kinetikom s uključenom kompetitivnom inhibicijom s natrijevim piruvatom (jednadžba 12). Brzina reakcije druge aldolne adicije katalizirane s YfaU 013 (r_3) između 4-hidroksi-2-oksobutanoata (aldol) i formaldehida opisana je pojednostavljenom jednadžbom (jednadžba 13) dvosupstratne Michaelis-Menteničine kinetike s inhibicijom supstrata s formaldehidom, dok brzina reakcije linearno ovisi o koncentraciji 4-hidroksi-2-oksobutanoata. Umjesto maksimalne brzine reakcije za ovu reakciju, u jednadžbi postoji k_3 , koji odgovara kvocijentu V_{m3} i $K_{m3,aldol}$. Nije bilo moguće utvrditi vrijednost V_{m3} zbog linearnosti eksperimentalnih podataka. Nespecifična ne-enzimatska transformacija 4-hidroksi-2-oksobutanoata procijenjena je iz eksperimenata i uključena u model. Njegova brzina reakcije (r_4) opisana je kinetikom prvog reda (jednadžba 14).

Brzina reakcije katalizirane transaminazom između L-alanina i 4-hidroksi-2-oksobutanoata (r_5) opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom jednadžbom (jednadžba 15) s uključenim kompetitivnim inhibicijama natrijevim piruvatom, formaldehidom i L-homoserinom. Utjecaj koenzima PLP je uključen u model uvođenjem faktora f . Stanice prirodno sadrže ovaj koenzim i iako se ne troši u reakciji njegova koncentracija utječe na aktivnost enzima. Brzina reakcije reverzne transaminacije između natrijevog piruvata i L-homoserina (r_6) opisana je Michaelis-Menteničinom dvosupstratnom jednadžbom (jednadžba 16) s uključenim kompetitivnim inhibicijama L-alaninom, formaldehidom i 4-hidroksi-2-oksobutanoatom.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot \gamma_{YfaU} \cdot c_{pir} \cdot c_{FA}}{\left(K_{m1,pir} \cdot \left(1 + \frac{c_{hom}}{K_{i1,hom}} + \frac{c_{alan}}{K_{i1,alan}} \right) + c_{pir} + \frac{c_{pir}^2}{K_{i1,pir}} \right) \cdot \left(K_{m1,FA} + c_{FA} + \frac{c_{FA}^2}{K_{i1,FA}} \right)} \quad (11)$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot \gamma_{YfaU} \cdot c_{aldol}}{K_{m2,aldol} \cdot \left(1 + \frac{c_{pir}}{K_{i2,pir}}\right) + c_{aldol}} \quad (12)$$

$$r_3 = \frac{k_3 \cdot \gamma_{YfaU} \cdot c_{FA} \cdot c_{aldol}}{K_{m3,FA} + c_{FA} + \frac{c_{FA}^2}{K_{i3,FA}}} \quad (13)$$

$$r_4 = k_4 \cdot c_{aldol} \quad (14)$$

$$r_5 = \frac{V_{m5} \cdot \gamma_{TA} \cdot c_{alan} \cdot c_{aldol} \cdot f}{\left(K_{m5,alan} \cdot \left(1 + \frac{c_{pir}}{K_{i5,pir}} + \frac{c_{FA}}{K_{i5,FA}}\right) + c_{alan}\right) \cdot \left(K_{m5,aldol} \cdot \left(1 + \frac{c_{hom}}{K_{i5,hom}}\right) + c_{aldol} + \frac{c_{aldol}^2}{K_{i5,aldol}}\right)} \quad (15)$$

$$r_6 = \frac{V_{m6} \cdot \gamma_{TA} \cdot c_{hom} \cdot c_{pir} \cdot f}{\left(K_{m6,hom} \cdot \left(1 + \frac{c_{aldol}}{K_{i6,aldol}}\right) + c_{hom}\right) \cdot \left(K_{m6,pir} \cdot \left(1 + \frac{c_{FA}}{K_{i6,FA}} + \frac{c_{alan}}{K_{i6,alan}}\right) + c_{pir}\right)} \quad (16)$$

$$f = \frac{c_{PLP}}{K_{m,PLP} + c_{PLP}}$$

Bilance tvari za natrijev piruvat, formaldehid, 4-hidroksi-2-oksobutanoat, L-homoserin, YfaU 013 i TA 039 za kaskadnu reakciju u kotlastom reaktoru uz dotok supstrata prikazane su jednadžbama 17-23. Jednadžba 24 predstavlja promjenu volumena reaktora tijekom eksperimenta koji je definiran brzinom protoka otopine formaldehida.

$$\frac{dc_{pir}}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{pir} \cdot \frac{dV}{dt}\right) + r_5 - r_6 - r_1 + r_2 \quad (17)$$

$$\frac{dc_{FA}}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{FA} \cdot \frac{dV}{dt} + c_{FA,0} \cdot q\right) - r_1 - r_3 + r_2 \quad (18)$$

$$\frac{dc_{alan}}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{alan} \cdot \frac{dV}{dt}\right) - r_5 + r_6 \quad (19)$$

$$\frac{dc_{aldol}}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{aldol} \cdot \frac{dV}{dt}\right) - r_5 + r_6 + r_1 - r_2 - r_3 - r_4 \quad (20)$$

$$\frac{dc_{hom}}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{hom} \cdot \frac{dV}{dt}\right) + r_5 - r_6 \quad (21)$$

$$\frac{dc_{YfaU}}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{YfaU} \cdot \frac{dV}{dt}\right) \quad (22)$$

$$\frac{dc_{TA}}{dt} = \frac{1}{V} \cdot \left(-c_{TA} \cdot \frac{dV}{dt} \right) \quad (23)$$

$$\frac{dV}{dt} = q \quad (24)$$

4.1. OBRADA PODATAKA

U svrhu obrade eksperimentalno dobivenih podataka korišten je programski paket SCIENTIST. Navedeni programski paket korišten je za procjenu kinetičkih parametara (V_m i K_m) te za simulaciju reakcije. Pritom su korištene metoda najmanjih kvadrata i simpleks metoda za procjenu parametara.

Kinetički parametri procijenjeni su metodom nelinearne regresije iz eksperimentalnih rezultata mjerenja utjecaja koncentracije svih komponenata reakcije na reakcijsku kinetiku metodom početnih brzina. Optimiranje parametara provodilo se dok se nije postigla minimalna suma kvadrata razlike između eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih pomoću modela koji je zadan u programu SCIENTIST.

Procijenjeni kinetički parametri i matematički model naveden u prethodnom poglavlju (jednadžbe 11-23) korišteni su za simulaciju provedenih eksperimenata u kotlastom reaktoru uz dotok supstrata.

5. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu provedena kaskadna reakcija (slika 9). Reakcija se sastoji od dva dijela koji su međusobno povezani i katalizirana je enzimima čija je prekomjerna ekspresija napravljena u genetski modificiranom mikroorganizmu *E. coli*. U prvom stupnju reagiraju natrijev piruvat i formaldehid iz kojih se dobiva 4-hidroksi-2-oksobutanoat. Ova reakcija naziva se aldolna adicija i katalizirana je enzimom 2-keto-3-deoksi-L-ramonat-aldolazom – YfaU 013. Povratna reakcija naziva se retro-aldolna reakcija. Drugi proces ove kaskadne reakcije jest transaminacija. 4-hidroksi-2-oksobutanoat reagira s L-alaninom i nastaju L-homoserin i natrijev piruvat. Reakcija je katalizirana enzimom transaminaza (TA 039). Odvija se i reakcija u suprotnom smjeru – povratna transaminacija.

5.1. ODREĐIVANJE KINETIKE REAKCIJE

U svrhu određivanja reakcijske kinetike, ispitan je utjecaj koncentracija supstrata i produkata na reakciju aldolne adicije, retro-aldolne reakcije, transaminacije i povratne transaminacije. Kinetika navedenih reakcija ispitana je metodom početnih brzina. Navedeni je model korišten za pronalazak strategije za optimiranje reakcijskih uvjeta, obzirom da se radi o kompleksnom reakcijskom sustavu.

Rezultati dobiveni kinetičkim ispitivanjima prikazani su na slikama 18-23.

5.1.1. Preliminarna mjerenja

Masena koncentraciju stanica (enzima), γ , koja je najbolja za određivanje kinetike reakcije metodom početnih reakcijskih brzina, pronađena je provođenjem eksperimenata prikazanih u sljedećim potpoglavljima. Koncentracije supstrata su pri tome bile konstantne, dok je varirana koncentracija stanica (YfaU(013)/PRO TRANS(039)) od 0 do 10 mg mL⁻¹.

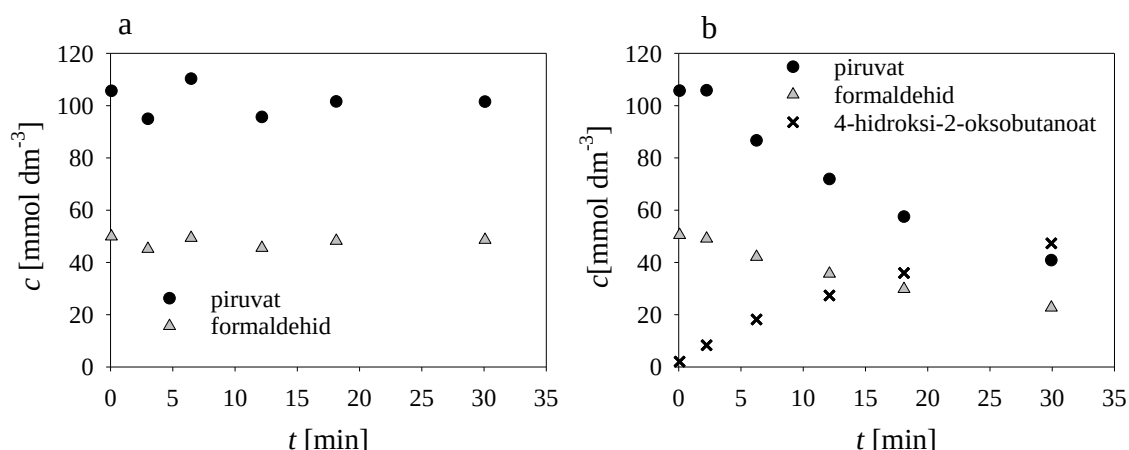
5.1.1.1. Preliminarna mjerenja za aldolnu adiciju

Na slici 18a-b prikazana su rezultati mjerenja kinetike aldolne adicije metodom početnih brzina. Prati se koncentracija piruvata, formaldehida i 4-hidroksi-2-oksobutanoata.

Slika 18a prikazuje rezultate mjerenja u kojima je koncentracija stanica odnosno enzima jednaka 0 mg mL⁻¹ iz čega se može zaključiti da se reakcija ne odvija (ili se odvija izuzetno

sporo) bez prisustva stanica i ne nastaje produkt. Ovaj je eksperiment proveden kako bi se eliminirala mogućnost utjecaja spontane reakcije na rezultate mjerenja.

Na slici 18b prikazani su rezultati mjerenja u kojima je koncentracija stanica 1 mg mL^{-1} . Iz grafa se može zaključiti da nastaje produkt 4-hidroksi-2-oksobutanoat, ali da je već i ova količina stanica previsoka za provođenje kinetičkih mjerenja (konverzija piruvata i 4-hidroksi-2-oksobutanoata iznosi oko 17 %). Na temelju prikupljenih rezultata odlučeno je da će se kinetika aldolne adicije mjeriti sa $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ stanica tijekom 18 minuta.

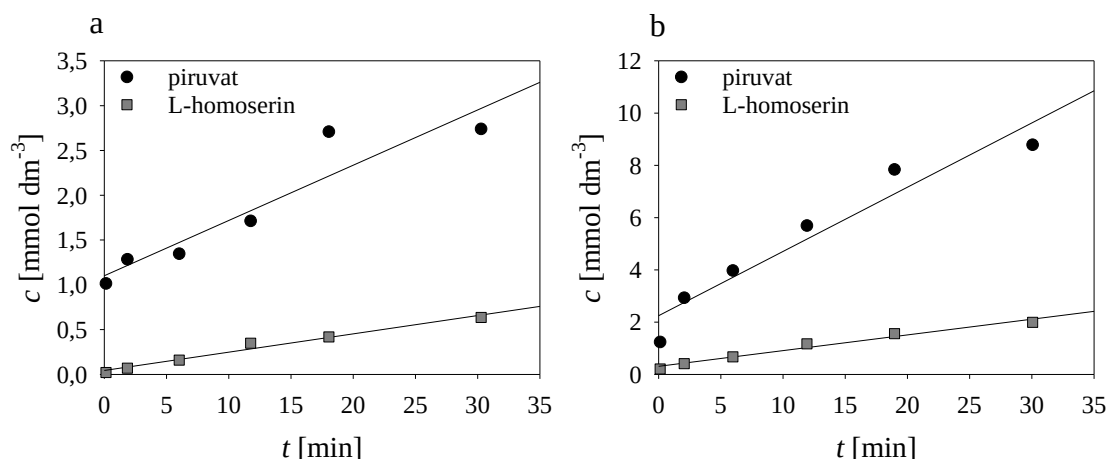


Slika 18. Preliminarna mjerenja za određivanje optimalne koncentracije stanica za provedbu kinetičkih mjerenja. Koncentraciji stanica iznosi a) 0 mg mL^{-1} , b) 1 mg mL^{-1} ($C_{\text{piruvat}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$, $C_{\text{formaldehid}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$, $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 7,0).

5.1.1.2. Preliminarna mjerenja za reakciju transaminacije

Za određivanje optimalne koncentracije stanica za mjerenje kinetike reakcije transaminacije praćena je koncentracija produkata natrijevog piruvata i L- homoserina.

Na slici 19a prikazani su rezultati mjerenja kinetike reakcije između L-alanina i 4-hidroksi-2-oksobutanoata uz količinu stanica u iznosu od 1 mg mL^{-1} . Zaključeno je da će se mjerenja za kinetiku reakcije transaminacije koristiti 5 mg mL^{-1} stanica (slika 19b) zbog niskih koncentracija produkta koje su dobivene u eksperimentom prikazanom na slici 19a što bi uzorkovalo eksperimentalnu pogrešku.



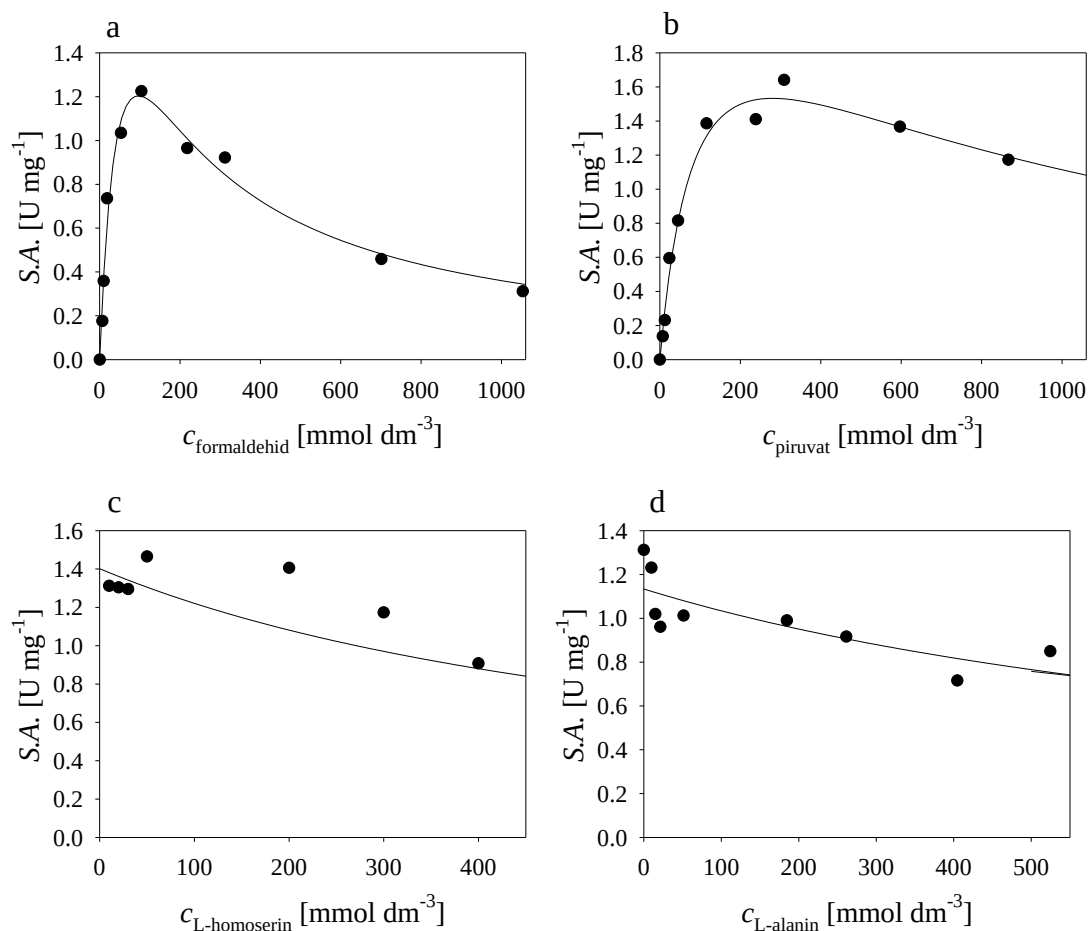
Slika 19. Preliminarna mjerenja za određivanje optimalne koncentracije stanica za provedbu kinetičkih mjerenja u reakciji kataliziranoj transaminazom. Koncentraciji stanica iznosi a) 1 mg ml⁻¹, b) 5 mg ml⁻¹ ($C_{4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$, $C_{\text{L-alanin}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$, 25 °C, 1000 okr min⁻¹, 50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 7,0).

5.1.2. Određivanje kinetike aldolne adicije

Na slici 20 prikazani su rezultati mjerenja kinetike aldolne adicije. Slika 20a-b prikazuje ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama formaldehida, odnosno piruvata koja je opisana Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju supstratom. Slike 20c-d pokazuju utjecaj komponenti kaskadnog reakcijskog sustava L-alanina i L-homoserina na specifičnu aktivnost enzima. Korišten je Michaelis-Menteničin kinetički model koji uključuje kompetitivnu inhibiciju produktom.

Iz dobivenih eksperimentalnih podataka, procijenjeni su kinetički parametri reakcije te su njihove vrijednosti navedene u tablici 20. Vrijednost maksimalne brzine reakcije, V_{m1} , je visoka što znači da se reakcija odvija brzo. Vrijednost V_{m1} za ovu reakciju najveća je u odnosu na druge reakcije što znači da se reakcija aldolne adicije odvija najbrže. Vrijednosti Michaelisovih konstanti, K_m , pokazuju nešto bolji afinitet enzima prema formaldehidu ($K_{m1,\text{fomaldehyd}}$) nego natrijevom piruvatu ($K_{m1,\text{piruvat}}$). Iz grafova a i b vidljivo je da formaldehid i natrijev piruvat pri višim koncentracijama imaju inhibicijski učinak na enzim YfaU 013. Konstanta inhibicije formaldehida ($K_{i1,\text{fomaldehyd}}$) nešto je manja od konstante inhibicije piruvata ($K_{i1,\text{piruvat}}$) što ukazuje na veći inhibicijski učinak formaldehida. Iz grafova c i d vidljiv je utjecaj L-homoserina i L-alanina koji se ponašaju kao kompetitivni inhibitori što znači da sprječavaju stvaranje kompleksa ES. L-homoserin ima manju konstantu inhibicije

($K_{i1,L\text{-homoserin}}$), što znači da ima veći inhibicijski učinak u odnosu na L-alanin ($K_{i1,L\text{-alanin}}$), iako su obje konstante inhibicije vrlo visoke.

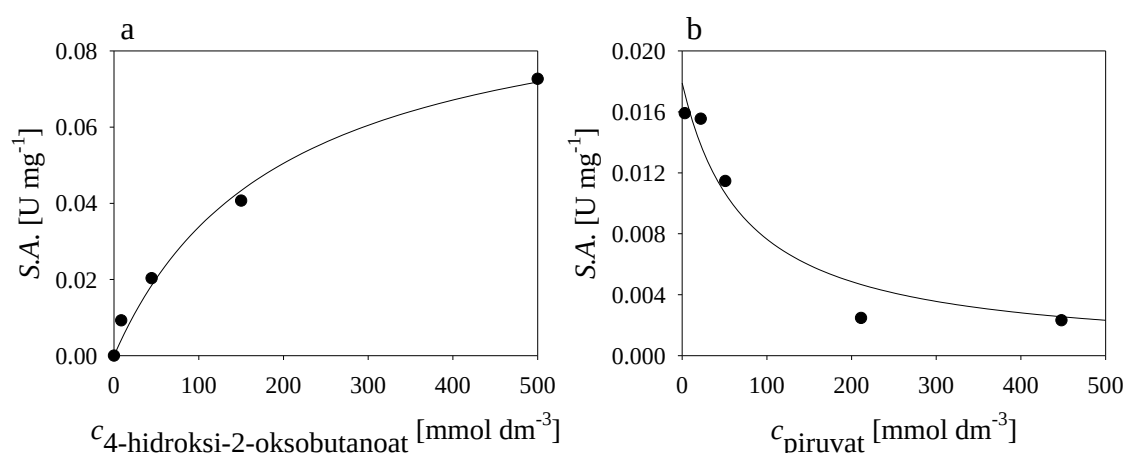


Slika 20. Utjecaj koncentracije a) formaldehida ($c_{\text{piruvat}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$), b) natrijevog piruvata ($c_{\text{formaldehid}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$), c) L-homoserina ($c_{\text{piruvat}} = 200,00 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{formaldehid}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$), d) L-alanina ($c_{\text{piruvat}} = 200,00 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{formaldehid}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$) na specifičnu aktivnost enzima YfaU 013 za izvedbu reakcije aldolne adicije (25°C , $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 7,0, $\gamma_{\text{YfaU}} = 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$).

Tablica 20. Kinetički parametri procijenjeni iz eksperimentalnih podataka prikazanih na slici 20.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_{m1}	U mg^{-1}	6.379 ± 1.514
$K_{m1,\text{fomaldehyd}}$	mmol dm^{-3}	70.963 ± 23.183
$K_{m1,\text{piruvat}}$	mmol dm^{-3}	95.751 ± 22.823
$K_{i1,\text{fomaldehyd}}$	mmol dm^{-3}	131.186 ± 41.999
$K_{i1,\text{piruvat}}$	mmol dm^{-3}	818.800 ± 251.327
$K_{i1,\text{L-homoserin}}$	mmol dm^{-3}	83.444 ± 3.825
$K_{i1,\text{L-alanin}}$	mmol dm^{-3}	289.440 ± 77.841

5.1.3. Određivanje kinetike retro-aldolne reakcije



Slika 21. Utjecaj koncentracije a) 4-hidroksi-2-oksobutanoata i b) natrijevog piruvata ($C_{4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$) na specifičnu aktivnost enzima YfaU 013 za izvedbu reakcije retro-aldolne reakcije (25°C , $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 7,0, $\gamma_{\text{YfaU}} = 10,0 \text{ mg mL}^{-1}$).

Iz dobivenih eksperimentalnih podataka za mjerenje kinetike retro-aldolne reakcije (slika 21), procijenjeni su kinetički parametri reakcije te su njihove vrijednosti navedene u tablici 21. Vrijednost maksimalne brzine reakcije, V_{m2} , je mala što znači da se reakcija odvija sporo. K_m za 4-hidroksi-2-oksobutanoat ($K_{m2, 4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}}$) je vrlo visok što znači da enzim YfaU 013 ima nizak afinitet prema ovom supstratu. Iz slike 21b može se zaključiti da natrijev piruvat djeluje kao kompetitivni inhibitor ($K_{i2,\text{piruvat}}$). Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti da ova reakcija ne bi trebala imati značajan utjecaj na ishod kaskadne reakcije.

Tablica 21. Kinetički parametri procijenjeni iz eksperimentalnih podataka prikazanih na slici 21.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_{m2}	U mg^{-1}	0.100 ± 0.010
$K_{m2, 4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}}$	mmol dm^{-3}	196.062 ± 50.654
$K_{i2, \text{piruvat}}$	mmol dm^{-3}	49.386 ± 19.532

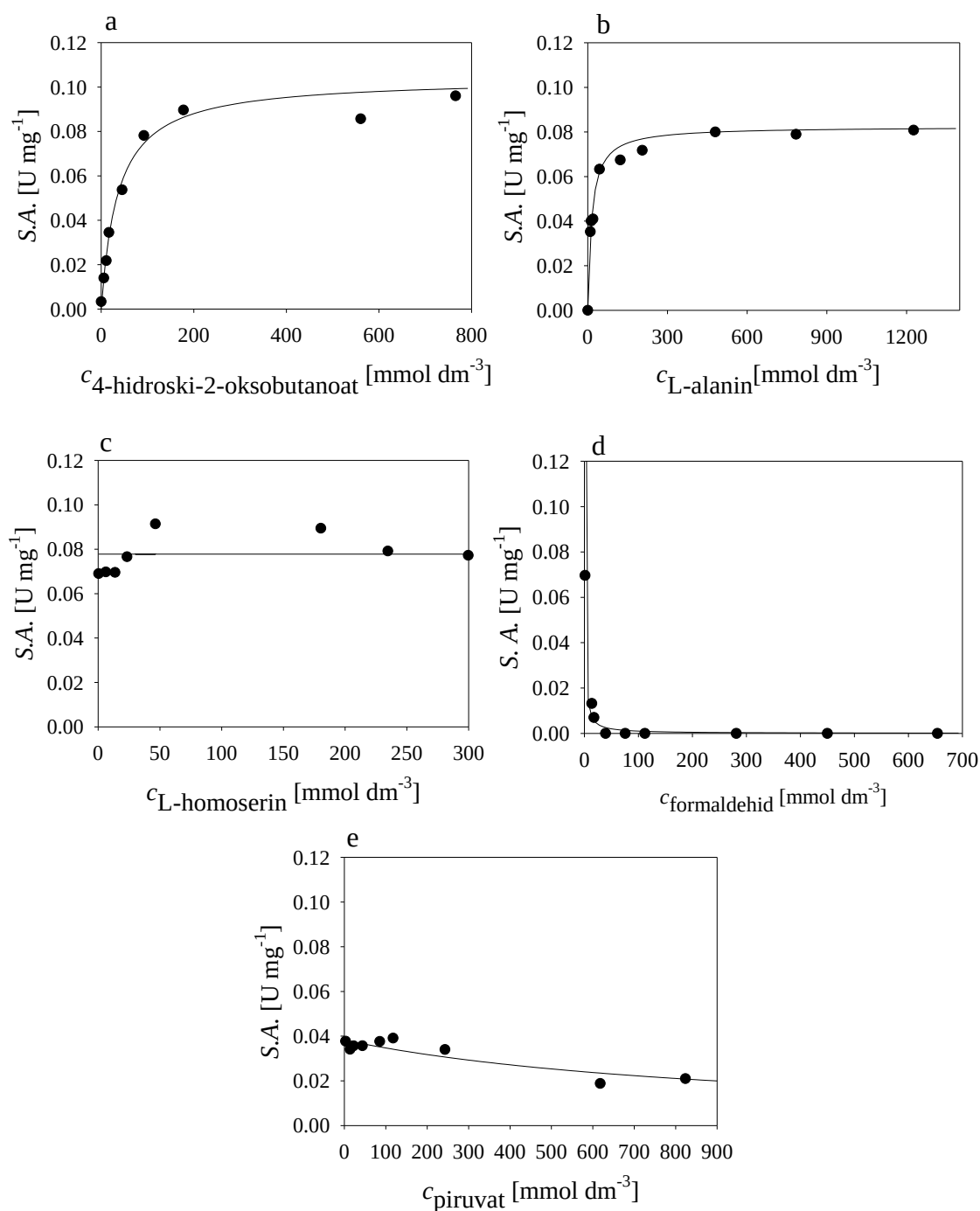
U tablici 22 prikazani su kinetički parametri za reakciju druge aldolne adicije katalizirane s YfaU 013 između 4-hidroksi-2-oksobutanoata i formaldehida ($K_{m3, \text{formaldehid}}$). Umjesto maksimalne brzine reakcije za ovu reakciju, u jednadžbi postoji k_3 , koji odgovara kvocijentu V_{m3} i $K_{m3, 4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}}$. Formaldehid ima inhibicijski učinak na enzim YfaU 013 ($K_{i3, \text{formaldehid}}$). Konstanta koja opisuje raspad 4-hidroksi-2-oksobutanoata, k_4 , preuzeta je iz enzimatskog sustava jednadžba za aldolnu adiciju formaldehida na 4-hidroksi-2-oksobutanoat.

Tablica 22. Kinetički parametri i konstante za aldolnu adiciju formaldehida na 4-hidroksi-2-oksobutanoat i raspad 4-hidroksi-2-oksobutanoata.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
k_3	$\text{U mg}^{-1} (\text{mmol dm}^{-3})^{-1}$	0.000515 ± 0.000133
$K_{m3, \text{formaldehid}}$	mmol dm^{-3}	16.116 ± 4.003
$K_{i3, \text{formaldehid}}$	mmol dm^{-3}	46.666 ± 11.111
k_4	$\text{mL min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	$1.893 \cdot 10^{-4} \pm 1.25 \cdot 10^{-5}$

5.1.4. Određivanje kinetike reakcije transaminacije

Na slici 22 prikazani su rezultati mjerenja kinetike reakcije transaminacije. Grafovi prikazuju ovisnost specifične aktivnosti enzima (S.A.) u odnosu na koncentracije supstrata i produkata. Iz dobivenih eksperimentalnih podataka za mjerenje kinetike reakcije transaminacije (slika 22), procijenjeni su kinetički parametri reakcije te su njihove vrijednosti navedene u tablici 23. Vrijednost maksimalne brzine reakcije, V_{m5} , je mala što znači da se reakcija odvija sporo. K_m za supstrate 4-hidroksi-2-oksobutanoat ($K_{m5, 4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}}$) i L-alanin ($K_{m5, \text{L-alanin}}$) pokazuje da enzim TA 039 ima nešto bolji afinitet L-alanina u odnosu na 4-hidroksi-2-oksobutanoat. Produkt L-homoserin nema utjecaja na reakciju transaminacije što se može zaključiti iz slike 22c. Natrijev piruvat i formaldehid se ponašaju kao kompetitivni inhibitori (slika 22d-e). Konstanta inhibicije (K_i) za formaldehid ($K_{i5, \text{formaldehid}}$) je vrlo niska što znači da enzim TA 039 ima jako velik afinitet prema tom inhibitoru. K_i za natrijev piruvat ($K_{i5, \text{piruvat}}$) je veći iz čega se zaključuje da je afinitet enzima za ovaj produkt manji.



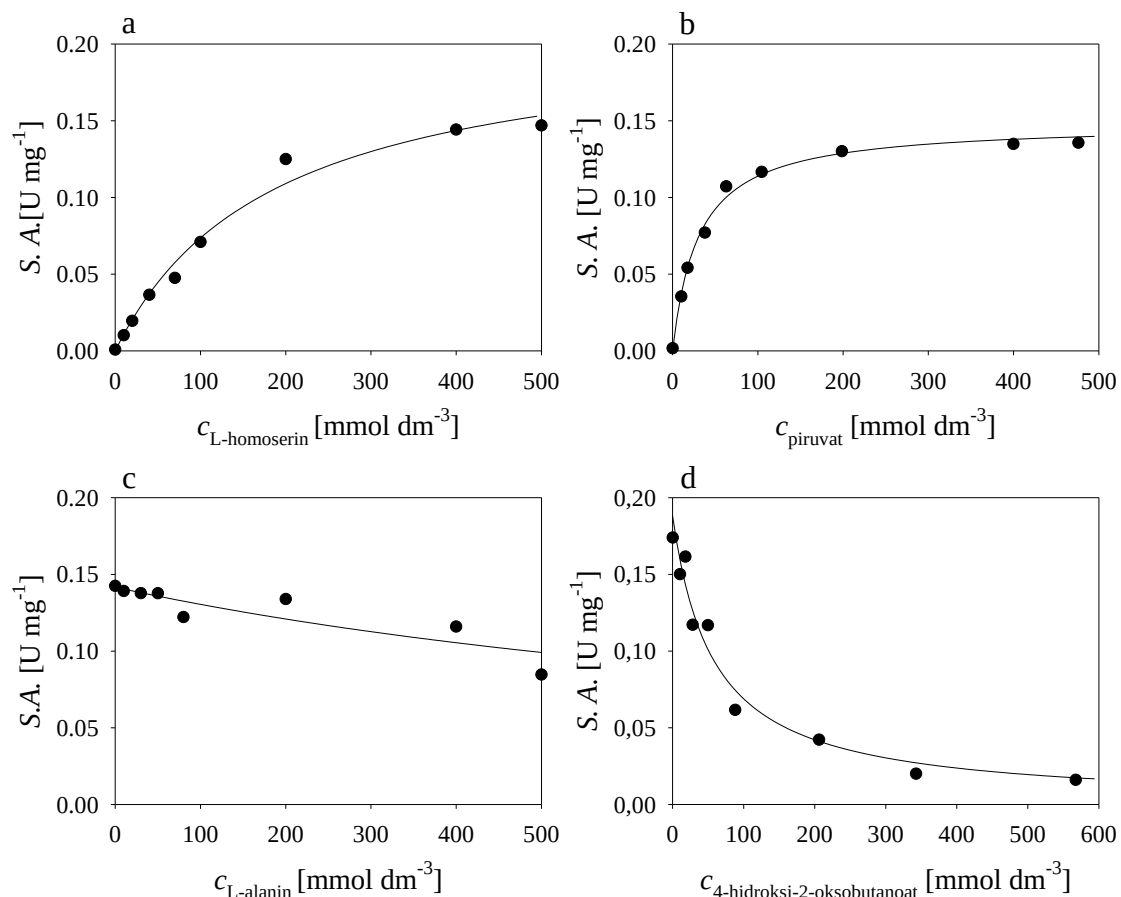
Slika 22. Utjecaj koncentracije a) 4-hidroksi-2-oksobutanoata ($c_{\text{L-alanin}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$), b) L-alanina ($c_{4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$), c) L-homoserina, d) natrijevog piruvata, e) formaldehida (za c), d) i e) koncentracija supstrata iznosi $c_{\text{L-alanin}} = 300,00 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}} = 100,00 \text{ mmol dm}^{-3}$) na specifičnu aktivnost enzima TA 039 za izvedbu reakcije transaminacije (25 °C, 1000 okr min⁻¹, 50 mmol dm⁻³ fosfatni pufer pH 7,0, $\gamma_{\text{TA}} = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$).

Tablica 23. Kinetički parametri procijenjeni iz eksperimentalnih podataka prikazanih na slici 22.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_{m5}	U mg^{-1}	0.104 ± 0.003
$K_{m5, 4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}}$	mmol dm^{-3}	36.119 ± 3.901
$K_{m5, \text{L-alanin}}$	mmol dm^{-3}	14.656 ± 2.130
$K_{i5, \text{formaldehid}}$	mmol dm^{-3}	0.018 ± 0.001
$K_{i5, \text{piruvat}}$	mmol dm^{-3}	45.775 ± 9.503

5.1.5. Određivanje kinetike reakcije povratne transaminacije

Na slici 23 prikazani su rezultati mjerenja kinetike reakcije povratne transaminacije. Grafovi prikazuju ovisnost specifične aktivnosti enzima (S.A.) u odnosu na koncentracije supstrata i produkata. Iz dobivenih eksperimentalnih podataka za mjerenje kinetike reakcije transaminacije (slika 23), procijenjeni su kinetički parametri reakcije te su njihove vrijednosti navedene u tablici 24. Maksimalna brzina reakcije, V_{m6} , nešto je veća od reakcije transaminacije, ali je i dalje spora. Michaelisova konstanta za L-homoserin ($K_{m6, \text{L-homoserin}}$) je vrlo visoka iz čega se može zaključiti da enzim TA 039 nema veliki afinitet prema L-homoserinu, dok ima nešto bolji afinitet prema piruvatu ($K_{m6, \text{piruvat}}$). L-alanin i 4-hidroksi-2-oksobutanoat su kompetitivni inhibitori (slika 23c-d). Konstanta inhibicije (K_i) za L-alanin ($K_{i6, \text{L-alanin}}$) je visoka što znači da inhibicija nije velika. Suprotno tomu, 4-hidroksi-2-oksobutanoat ima vrlo malu konstantnu inhibicije ($K_{i6, 4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}}$) što znači da znatno inhibira reakciju. Važno je napomenuti da je ispitan utjecaj i koncentracije formaldehida na reakciju povratne transaminacije, no trend kinetike i velika aktivnost upućuju da ju je pri većim koncentracijama formaldehida nadjačala reakcija aldolne adicije s YfaU 013.



Slika 23. Utjecaj koncentracije a) L-homoserina ($c_{\text{piruvat}} = 200,00 \text{ mmol dm}^{-3}$), b) natrijevog piruvata ($c_{\text{L-homoserin}} = 200,00 \text{ mmol dm}^{-3}$), c) L-alanina ($c_{\text{piruvat}} = 200,00 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{L-homoserin}} = 200,00 \text{ mmol dm}^{-3}$), d) 4-hidroksi-2-oksobutanoata ($c_{\text{piruvat}} = 200,00 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{L-homoserin}} = 200,00 \text{ mmol dm}^{-3}$) na specifičnu aktivnost enzima TA 039 za izvedbu reakcije povratne transaminacije ($25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, 50 mmol dm^{-3} fosfatni pufer pH 7,0, $\gamma_{\text{TA}} = 5,0 \text{ mg mL}^{-1}$).

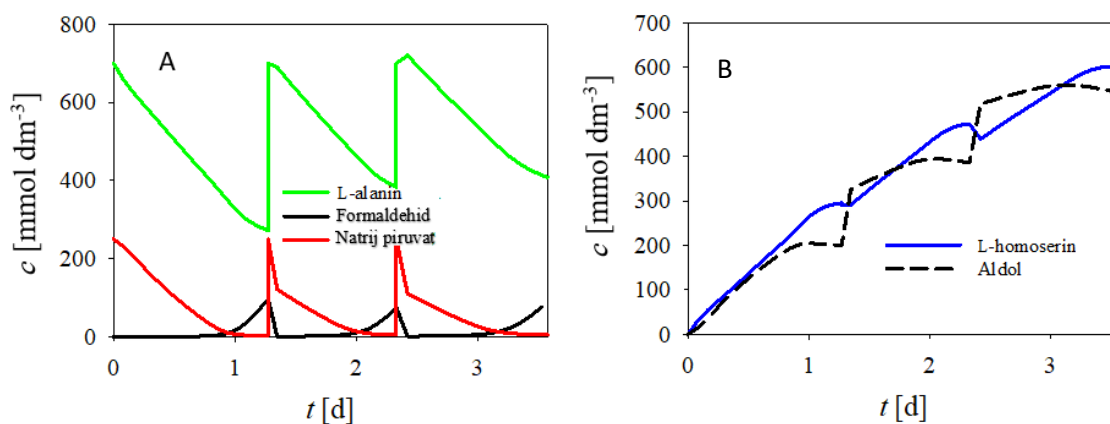
Tablica 24. Kinetički parametri procijenjeni iz eksperimentalnih podataka prikazanih na slici 23.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_{m6}	U mg^{-1}	0.211 ± 0.017
$K_{m6, \text{L-homoserin}}$	mmol dm^{-3}	185.968 ± 34.574
$K_{m6, \text{piruvat}}$	mmol dm^{-3}	30.279 ± 2.850
$K_{i6, \text{L-alanin}}$	mmol dm^{-3}	561.628 ± 115.427
$K_{i6, 4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}}$	mmol dm^{-3}	7.595 ± 0.935

5.2. PRIMJENA MATEMATIČKOG MODELA

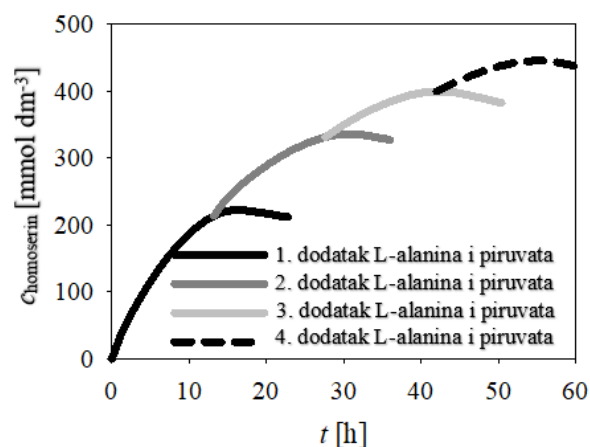
Na temelju opisanih rezultata razvijen je matematički model (jednadžbe 17-22) za provedbu reakcije u kotlastom reaktoru s dotokom formaldehida. Naime, prijašnja iskustva u radu s ovim sustavom su pokazala da formaldehid ima negativan utjecaj na stabilnost enzima, pa ga je potrebno dodavati u malim koncentracijama u reaktor. Razvijeni matematički model je korišten za pronalaženje uvjeta i strategije kako poboljšati izlazne procesne veličine, poput koncentracije produkta i volumne produktivnosti.

Slika 24 pokazuje kako se proizvodnja L-homoserina može poboljšati dodavanjem svježih količina L-alanina i natrijevog piruvata u određenim vremenima reakcije. Slika 24a prikazuje koncentraciju supstrata (L-alanina, natrijevog piruvata i formaldehida), a slika 24b prikazuje koncentracije 4-hidroksi-2-oksobutanoata i L-homoserina. Ova simulacija predstavlja izvođenje uspješne optimizirane kaskadne reakcije koja daje najveću koncentraciju produkta L-homoserina. U usporedbi s drugim simulacijama, ovaj postupak ponovnog dodavanja L-alanina i natrijevog piruvata uz kontinuirani protok formaldehida daje najveću koncentraciju produkta L-homoserina na kraju reakcije.



Slika 24. Simulacija kaskade s ponovnim dodavanjem L-alanina i natrijevog piruvata s kontinuiranim protokom formaldehida ($V_0 = 7.8 \text{ mL}$, $c_{\text{formaldehid}} = 3110 \text{ mmol dm}^{-3}$, $q_{\text{formaldehid}} = 1 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, $c_{\text{piruvat}} = 250 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{L-alanin}} = 700 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\gamma_{\text{TA 039}} = 100 \text{ mg mL}^{-1}$, $\gamma_{\text{YfaU 013}} = 400 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{PLP}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$). L-alanin i natrijev piruvat su ponovno dodani nakon 1.27 dana i 2.32 dana do njihovih početnih koncentracija od 700 mmol dm^{-3} do 250 mmol dm^{-3} .

Na slici 25 prikazana je simulacija kaskade s 4 dodatka L-alanina i natrijevog piruvata s kontinuiranim dotokom formaldehida.



Slika 25. Simulacija kaskade s 4 dodatka L-alanina i natrijevog piruvata s kontinuiranim dotokom formaldehida ($V_0 = 7.8 \text{ mL}$, $c_{\text{formaldehid}} = 3110 \text{ mmol dm}^{-3}$, $q_{\text{formaldehid}} = 1.5 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$, $c_{\text{piruvat}} = 300 \text{ mmol dm}^{-3}$, $c_{\text{L-alanin}} = 600 \text{ mmol dm}^{-3}$, $\gamma_{\text{TA } 039} = 50 \text{ mg mL}^{-1}$, $\gamma_{\text{YfaU } 013} = 25 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{PLP}} = 1 \text{ mmol dm}^{-3}$).

6. ZAKLJUČAK

U svrhu izrade ovoga rada proučavana je kaskadna reakcija koja se sastoji od dva povezana stupnja: aldolne adicije i reduktivne aminacije – transaminacije. Natrijev piruvat i formaldehid međusobno reagiraju te nastaje 4-hidroksi-2-oksobutanoat reakcijom aldolne adicije. Dobiveni spoj zatim reagira s L-alaninom te nastaje L-homoserin i natrijev piruvat reakcijom transaminacije. Ova reakcija katalizirana je genetski modificiranim liofiliziranim cijelim stanicama mikroorganizma *E. coli* u kojima je u tu svrhu napravljena prekomjerna ekspresija dva enzima potrebnih za provedbu ovih reakcija; 2-keto-3-deoksi-L-ramonat-aldolaze (YfaU 013) i transaminaze (TA 039).

Navedena reakcija predstavlja zanimljiv način za sintezu L-homoserina koji nudi brojne prednosti koje proizlaze iz primjene kaskadnih reakcija u odnosu na konvencionalnu postepenu sintezu, biokatalizatora u odnosu na kemijske katalizatore i enzima u obliku cijelih stanica mikroorganizma za razliku od izoliranih. L-homoserin je veoma važan metabolički međuprodukt za sintezu L-metionina, L-treonina i L-izoleucina te je stoga ova reakcija vrlo važna i zanimljiva.

Istraživanjem kinetike procijenjeni su kinetički parametri za reakciju aldolne adicije, retro-aldolne reakcije, transaminacije i povratne transaminacije. Iz dobivenih V_m vrijednosti zaključeno je da se reakcija aldolne adicije odvija najbrže ($V_{m1} = 6.379 \pm 1.514 \text{ U mg}^{-1}$).

Kinetički parametri aldolne adicije pokazuju veliki afinitet enzima YfaU 013 prema supstratima natrijevom piruvatu i formaldehidu ($K_{m1,\text{piruvat}} = 95.751 \pm 22.823 \text{ mmol dm}^{-3}$, $K_{m1,\text{fomaldehid}} = 70.963 \pm 23.183 \text{ mmol dm}^{-3}$). Pri većim koncentracijama supstrati pokazuju inhibicijski učinak na enzim. L-alanin i L-homoserin ponašaju se kao kompetitivni inhibitori ($K_{i1,L\text{-alanin}} = 289.440 \pm 77.841 \text{ mmol dm}^{-3}$, $K_{i1,L\text{-homoserin}} = 83.444 \pm 3.825 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Prema dobivenim rezultatima kinetike retro-aldolne reakcije može se zaključiti da ta reakcija ne bi trebala imati značajan utjecaj na ishod kaskadne reakcije. Rezultati mjerenja su pokazali da enzim YfaU 013 ima nizak afinitet prema 4-hidroksi-2-oksobutanoatu ($K_{m2,4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}} = 196.062 \pm 50.654 \text{ mmol dm}^{-3}$), dok natrijev piruvat djeluje kao kompetitivni inhibitor ($K_{i2,\text{piruvat}} = 49.386 \pm 19.532 \text{ mmol dm}^{-3}$).

Kinetički parametri za reakciju transaminacije pokazuju nešto veći afinitet enzima TA 039 prema L-alaninu ($K_{m5,L\text{-alanin}} = 14.656 \pm 2.130 \text{ mmol dm}^{-3}$) u odnosu na

4-hidroksi-2-oksobutanoat ($K_{m5, 4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}} = 36.119 \pm 3.901 \text{ mmol dm}^{-3}$). Natrijev piruvat i formaldehid pokazuju kompetitivno-inhibicijski učinak. Formaldehid znatno inhibira reakciju – konstanta inhibicije mu je vrlo niska ($K_{i5, \text{formaldehid}} = 0.018 \pm 0.001 \text{ mmol dm}^{-3}$). Produkt L-homoserin nema utjecaja na reakciju transaminacije.

Rezultati mjerenja kinetike povratne transaminacije pokazuju veći afinitet natrijevog piruvata ($K_{m6, \text{piruvat}} = 30.279 \pm 2.850 \text{ mmol dm}^{-3}$) u odnosu na L-homoserin ($K_{m6, \text{L-homoserin}} = 185.968 \pm 34.574 \text{ mmol dm}^{-3}$). L-alanin i 4-hidroksi-2-oksobutanoat su kompetitivni inhibitori. Konstanta inhibicije za L-alanin ne pokazuje veliku inhibiciju ($K_{i6, \text{L-alanin}} = 561.628 \pm 115.427 \text{ mmol dm}^{-3}$) za razliku od 4-hidroksi-2-oksobutanoata kojemu je konstanta inhibicije vrlo niska ($K_{i6, 4\text{-hidroksi-2-oksobutanoat}} = 7.595 \pm 0.935 \text{ mmol dm}^{-3}$). Zanimljivo je da se pri većim koncentracijama formaldehida odvija reakcija aldolne adicije s YfaU 013, a ne reakcija povratne transaminacije, kako i prikazuje trend kinetike i velika aktivnost.

Kako je pokazano da formaldehid ima negativan utjecaj na stabilnost enzima, potrebno ga je dodavati u malim koncentracijama u reaktor. Također, proizvodnja L-homoserina se može poboljšati dodavanjem svježih količina L-alanina i natrijevog piruvata u određenim vremenima reakcije. U usporedbi s drugim izvedenim simulacijama, upravo se simulacija s ponovnim dodavanjem svježih količina L-alanina i natrijevog piruvata uz kontinuirani protok formaldehida pokazala kao najproduktivnija, odnosno daje najveću koncentraciju produkta L-homoserina na kraju reakcije.

7. POPIS POKRATA I SIMBOLA

BnONH ₂ ·HCl	O-benzilhidroksilamin hidroklorid	
<i>C</i>	molarna koncentracija	[mmol dm ⁻³]
Cbz-OSu	N-benziloksikarboniloksi-sukcinimid	
<i>dc/dt</i>	promjena koncentracije u vremenu	
<i>E</i>	faktor utjecaja na okoliš	[kg otpada/kg proizvoda]
<i>E</i>	enzim	
<i>ES</i>	enzim-supstrat međukompleks	
<i>f</i>	faktor utjecaja koenzima PLP na brzinu reakcije	
FA	formaldehid	
γ	masena koncentracija	[mg cm ⁻³]
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	
<i>K_i</i>	konstanta inhibicije	[mmol dm ⁻³]
<i>K_m</i>	Michaelisova konstanta	[mmol dm ⁻³]
okr min ⁻¹	okretaji u minuti	
<i>P</i>	površina ispod krivulje	[-]
<i>P</i>	produkt	
PLP	piridoksal fosfat	
<i>S</i>	supstrat	
<i>S.A.</i>	specifična aktivnost enzima	[U mg ⁻¹]
<i>T</i>	temperatura	[°C]
<i>t</i>	vrijeme	[s], [min], [h] ili [d]
TA	transaminaza	
TFA	trifluoroctena kiselina	
<i>V</i>	volumen	[μL] ili [mL]
<i>r</i>	brzina reakcije	[mmol dm ⁻³ min ⁻¹]
<i>V.A.</i>	volumna aktivnost enzima	[U mL ⁻¹]
<i>V_{enz}</i>	volumen dodanog enzima	[μL]
<i>V_m</i>	maksimalna brzina reakcije	[U mg ⁻¹]
YfaU 013	2-keto-3-deoksi-L-ramonat-aldolaza	

8. LITERATURA

Ali I., Gupta V. K., Aboul-Enein H. Y., Chirality: A challenge for the environmental scientists, *Curr. Sci.*, **84** (2) (2003) 152–156.

Bommarius A. S., Riebel B. R., *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*, WileyVCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2004., str. 7-8, 11, 379.

Bommarius A. S., *Biocatalysis: A Status Report*, *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, **6** (2015) 319–345.

Cavani F., Trifiò F., Classification of industrial catalysts and catalysis for the petrochemical industry, *Catal. Today*, **34** (1997) 269-279.

Choi J., Han S., Kim H., Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnol. Adv.*, **33** (7) (2015) 1443-1454.

Clapés P., Fessner W., Sprenger G. A., Samland A. K., Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **14** (2010) 154–167.

Coincon M., Wang W., Sygusch J., Seah S. Y. K., Crystal structure of reaction intermediates in pyruvate Class II aldolase: Substrate Cleavage, Enolate Stabilization and Substrate Specificity, *J. Biol. Chem.*, **287** (43) (2012) 36208–36221.

Dunn I. J., Heinzle E., Ingham J., Přenosil J. E., *Biological reaction engineering – Principles, applications and modelling with PC simulation*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1992., str. 67–109.

Engelking Larry R., *Textbook of Veterinary Physiological Chemistry (Third Edition)*, Academic Press , 2015., str. 22–31.

Fernandes B., Mota A., Vicente A., *Fundamentals of Bio-reaction Engineering, Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier, 2017., str. 154, 157-158.

Ferreira-Leitão V. S., Cammarota M. C., Gonçalves Aguiéiras E. C., Ribeiro Vasconcelos de Sá L., Fernandez-Lafuente R., Guimarães Freire D. M., The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits, *Catalysts*, **7** (2017) 9, <https://doi.org/10.3390/catal7010009>.

Findrik Z., Vasić-Rački Đ., Overview on Reactions with Multi-enzyme Systems, Chem. Biochem. Eng. Q., **23** (4) (2009) 545–553.

Godbey, W. T., Proteins, An Introduction to Biotechnology, The Science, Technology and Medical Applications, Academic Press, 2014., str. 15-16.

Gundersen M. T., Tufvesson P., Rackham E. J., Lloyd R. C., Woodley J. M., A Rapid Selection Procedure for Simple Commercial Implementation of ω -Transaminase Reactions, Org. Proc. Res. Dev., **20** (2016) 602–608.

Hernández K., Gómez A., Joglar J., Bujons J., Parella T., Clapés P., 2-Keto-3-Deoxy-L-Rhamnonate Aldolase (YfaU) as Catalyst in Aldol Additions of Pyruvate to Amino Aldehyde Derivatives, Adv. Synth. Catal., **359** (2017) 2090 – 2100.

<https://www.particlesciences.com> (pristup 18.5.2019.)

Illanes A., Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, Springer, 2008., str. 1–6.

Ji Q., Wang B., Tan J., Zhu L., Li L., Immobilized multienzymatic systems for catalysis of cascade reactions, Proc. Biochem., **51**(9) (2016) 1193-1203.

Knözinger H., Kochloefl K., Heterogeneous Catalysis and Solid Catalysts, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2003., str. 1.

Koshland, D. E., Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis, Proc. Nat. Acad. Sci., **44** (2) (1958) 98–104

Koszelewski D., Clay D., Rozzell D., Kroutil W., Deracemisation of α -Chiral Primary Amines by a One-Pot, Two-Step Cascade Reaction Catalysed by ω -Transaminases, Eur. J. Org. Chem., (2009) 2289–2292.

Leuchs S., Lima-Ramos J., Greiner L., Al-Haque N., Tufvesson P., Woodley J. M., Reaction Engineering of Biocatalytic Enantioselective Reduction: A Case Study for Aliphatic Ketones, Org. Proc. Res. Dev., **17** (8) (2013) 1027 – 1035.

Nelson D. L., Cox M. M., Lehninger principles of biochemistry (Fourth edition), W.H. Freeman and Company, New York, 2005., str. 192.

Nestl, B. M., Nebel, B. A., Hauer, B., Recent progress in industrial biocatalysis, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **15** (2) (2011) 187–193.

Nicolaou K. C., Chen J. S., The art of total synthesis through cascade reactions, *Chem. Soc. Rev.*, **38** (2009) 2993–3009.

Nicolaou K. C., Edmonds D. J., Bulger P. G., Cascade Reactions in Total Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **45** (2006) 7134–7186.

Nikalje A. P., Tathe A. C., Ghodke M. S., Biocatalysis: A Brief Review, *Asian J. Res. Chem.*, **4** (9) (2011) 1355–1360.

Pan R., Zhang X., Zhang Z., Zhou Y., Tian W., He R., Substrate-induced Changes in Protease Active Site Conformation Impact on Subsequent Reactions with Substrates, *J. Biol. Chem.*, **285** (30) (2010) 22950–22956.

Patel R. N., Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals, *Bioorg. Med. Chem.*, **26** (2018) 1252–1274.

Pelley J., Protein Structure and Function, Elsevier's Integrated Review Biochemistry, Elsevier, 2011., str. 19-20.

Pfeiffer C. C., Optical Isomerism and Pharmacological Action, a Generalization, *Science*, **124** (3210) (1956) 29–31.

Ran N., Zhao L., Chen Z., Tao J., Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale, *Green Chem.*, **10** (2008) 361–372.

Rudroff F., Whole-cell based synthetic enzyme cascades—light and shadow of a promising technology, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **49** (2019) 84–90.

Saibi W., Abdeljalil S., Masmoudi K., Gargouri A., Biocatalysts: Beautiful creatures, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **426** (2012) 289–293.

Samland, A.K., Sprenger, G.A., Microbial aldolases as C–C bonding enzymes—unknown treasures and new developments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **71** (2006) 253–264.

Sanders J. P. M., Sheldon R. A., Comparison of the sustainability metrics of the petrochemical and biomass-based routes to methionine, *Catal. Today*, **239** (2015) 44–49.

Santacoloma P. A., Sin G., Gernaey K. V., Woodley J. M., Multienzyme-Catalyzed Processes: Next-Generation Biocatalysis, *Org. Proc. Res. Dev.*, **15** (2011) 203–212.

Sasabe J., Suzuki M., Distinctive Roles of D-Amino Acids in the Homochiral World: Chirality of Amino Acids Modulates Mammalian Physiology and Pathology, *Keio J. Med.*, **68** (1) (2018) 1–16.

Sheldon R. A., Enzyme-Catalyzed Cascade Reactions, in Garcia-Junceda, E., *Multi-step Enzyme Catalysis: Biotransformations and Chemoenzymatic Synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008., str. 110 i 127.

Sheldon R. A., Woodley J. M., Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chem. Rev.*, **118** (2018) 801–838.

Shoda S., Uyama H., Kadokawa J., Kimura S., Kobayashi S., Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis, *Chem. Rev.*, **116** (2016) 2307–2413.

Sin G., Woodley J. M., Gernaey K. V., Application of Modeling and Simulation Tools for the Evaluation of Biocatalytic Processes: A Future Perspective, *Biotechnol. Prog.*, **25** (6) (2009) 1529–1538.

Singh Chouhan A.P., Sarma A.K., Modern heterogeneous catalysts for biodiesel production: A comprehensive review, *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **15** (2011) 4378–4399.

Sun H., Zhang H., Ang E. L., Zhao H., Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates, *Bioorg. Med. Chem.*, **26** (2018) 1275–1284.

Truppo M. D., Turner N. J., Rozzell J. D., Efficient kinetic resolution of racemic amines using a transaminase in combination with an amino acid oxidase, *Chem. Commun.*, (2009) 2127–2129.

Vasić-Rački Đ., Findrik Z., Vrsalović Presečki A., Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91** (2011) 845–856.

Vasić-Rački Đ., Kragl U., Liese A., Benefits of Enzyme Kinetics Modelling, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **17** (1) (2003) 7–18.

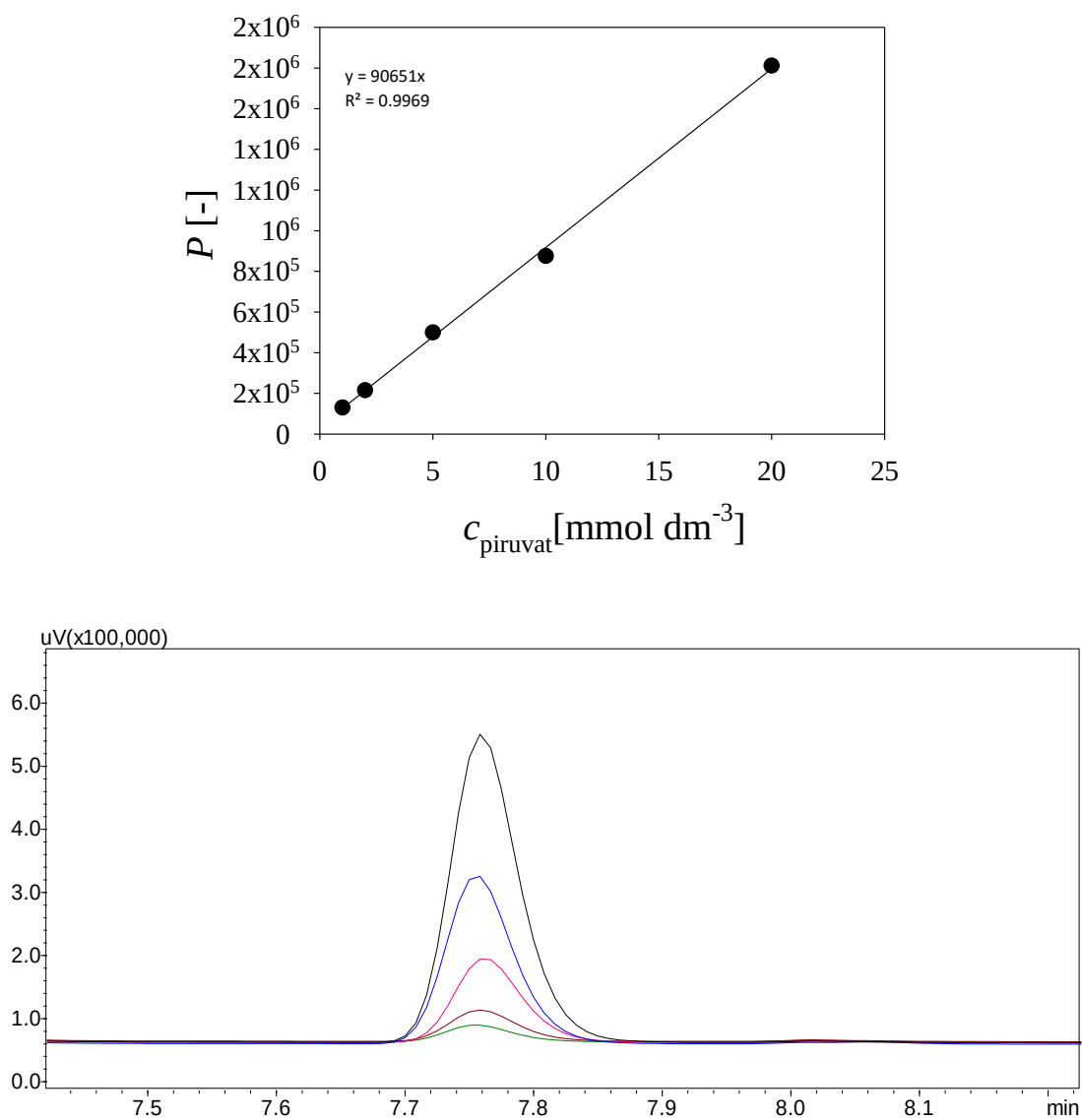
Windle C. L., Müller M., Nelson A., Berry A., Engineering aldolases as biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **19** (2014) 25–33.

Wohlgemuth R., Biocatalysis —key to sustainable industrial chemistry, *Curr. Opin. Biotech.*, **21** (2010) 713–724.

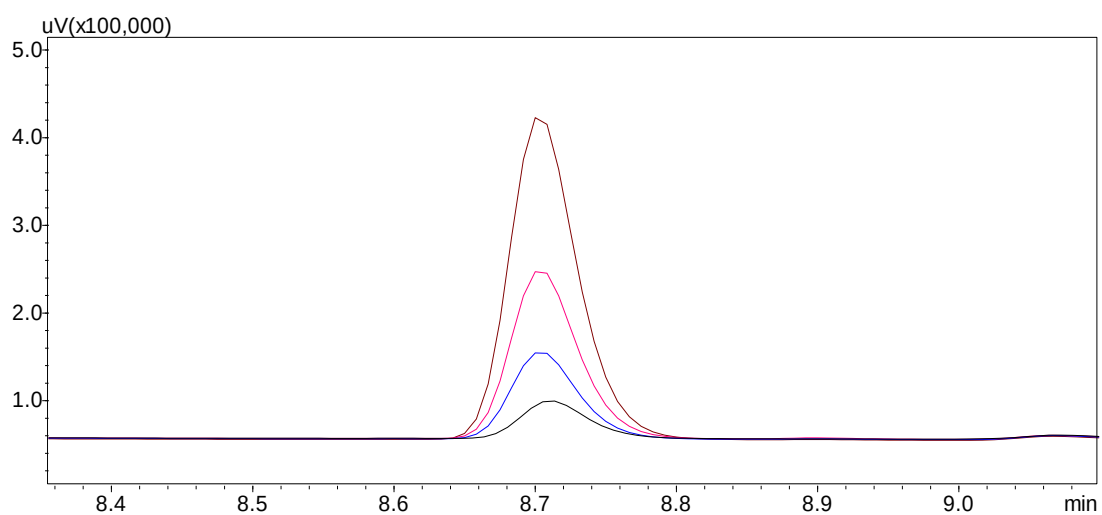
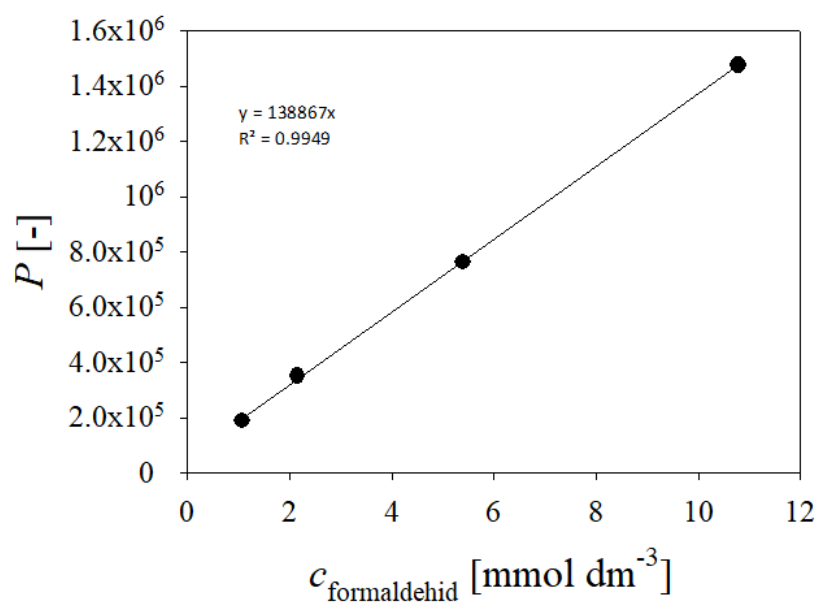
Zhang M. M., Su X., Ang E. L., Zhao H., Recent advances in biocatalyst development in the pharmaceutical industry, *Pharm. Bioprocess.*, **1** (2) (2013) 179–196.

9. PRILOZI

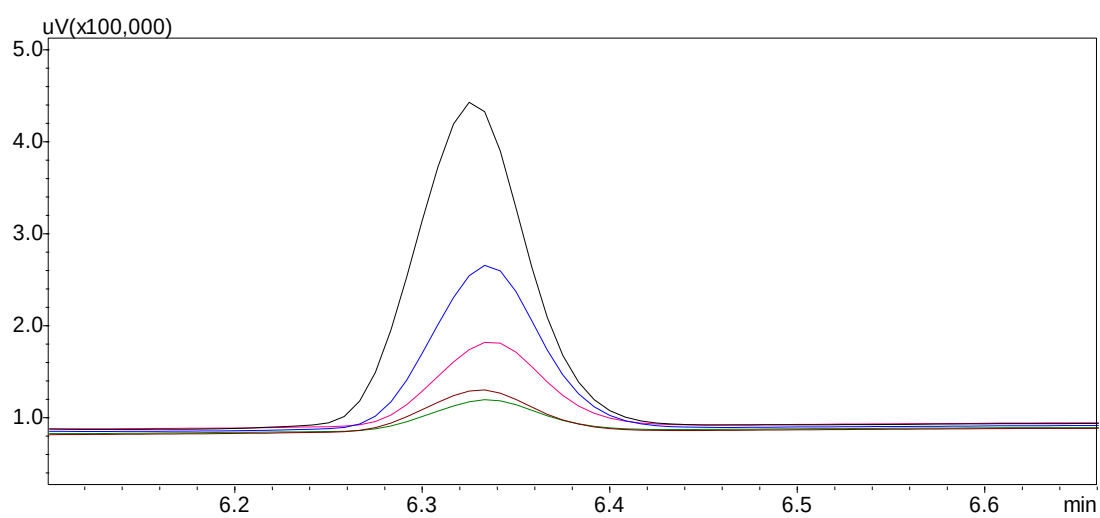
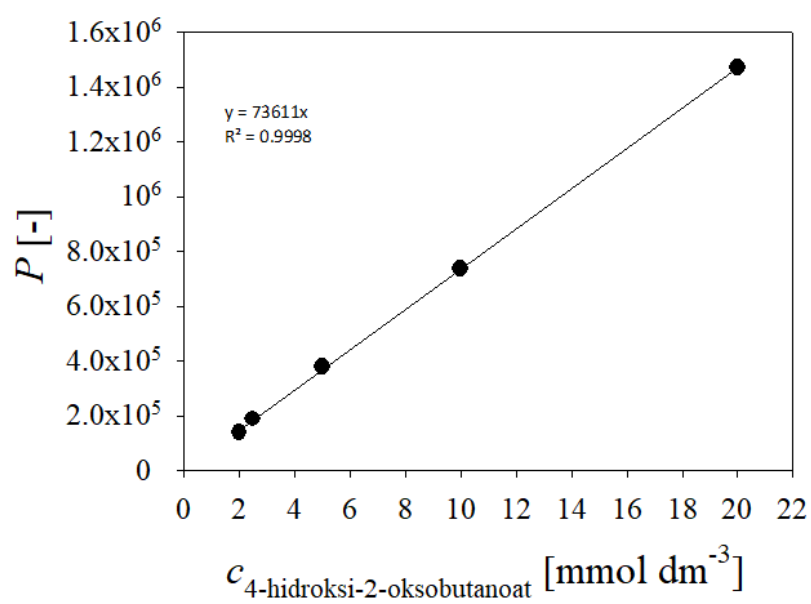
Prilog 1. Kromatogram i baždarni pravac za određivanje koncentracije natrijevog piruvata



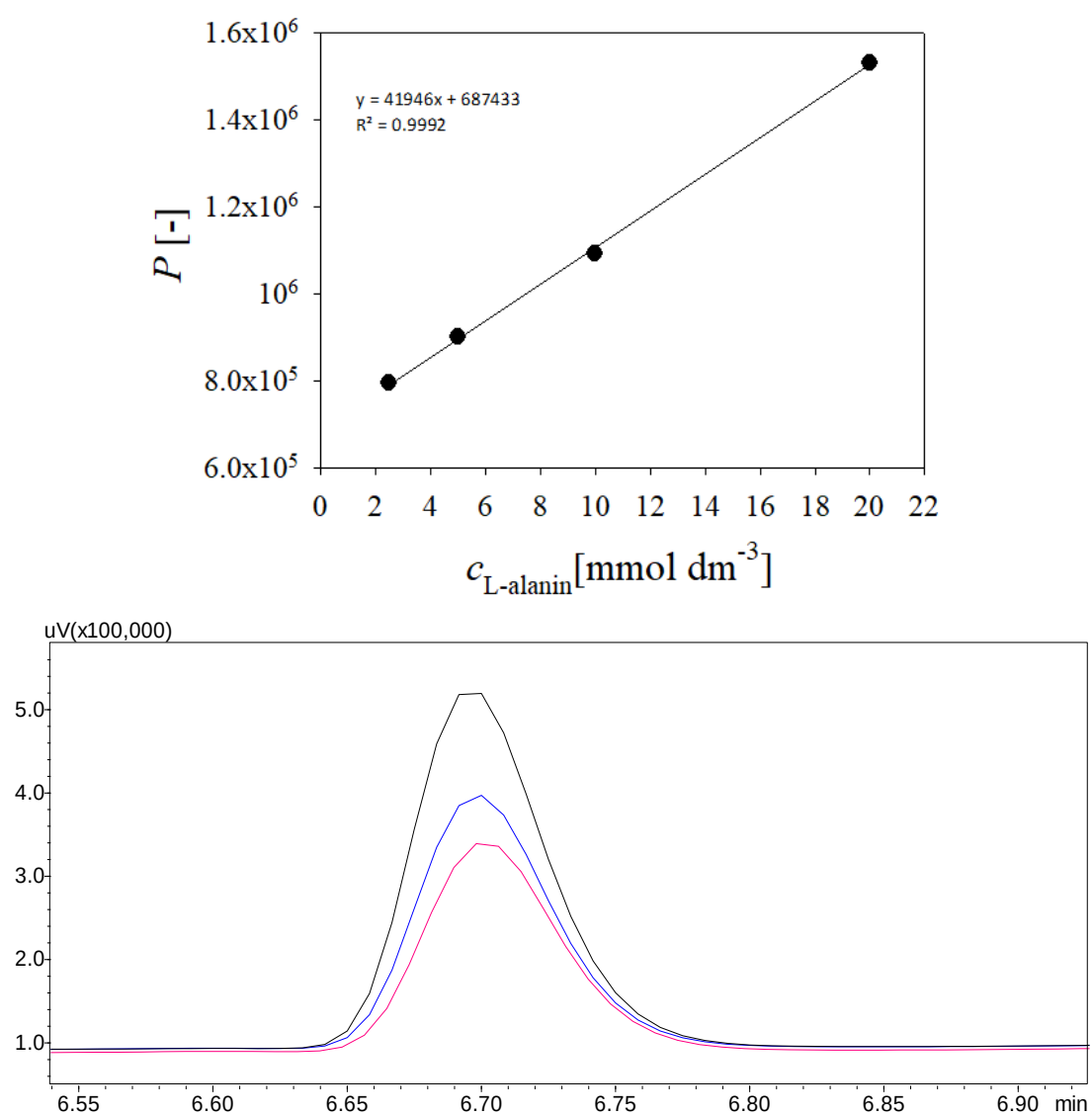
Prilog 2. Kromatogram i baždarni pravac za određivanje koncentracije formaldehida



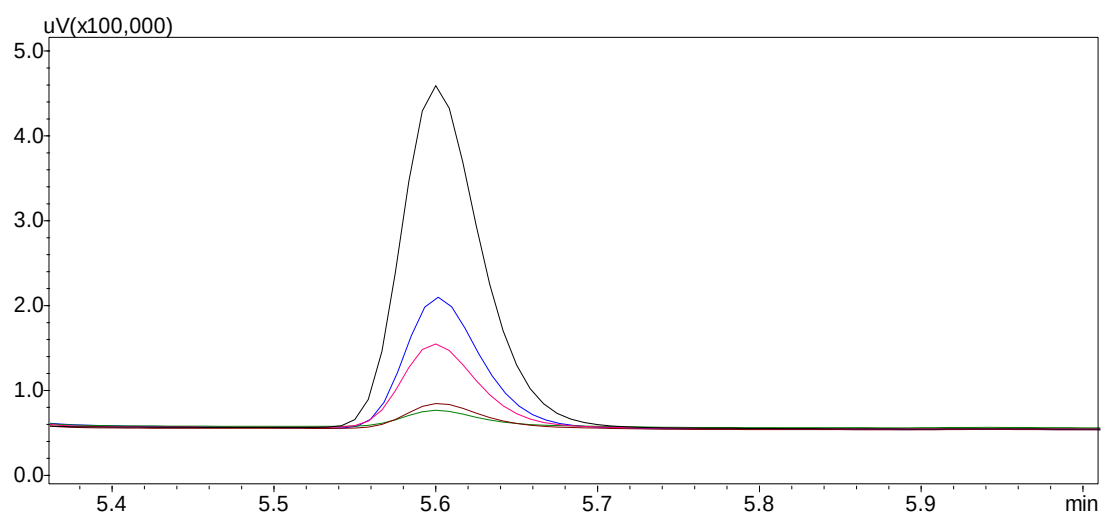
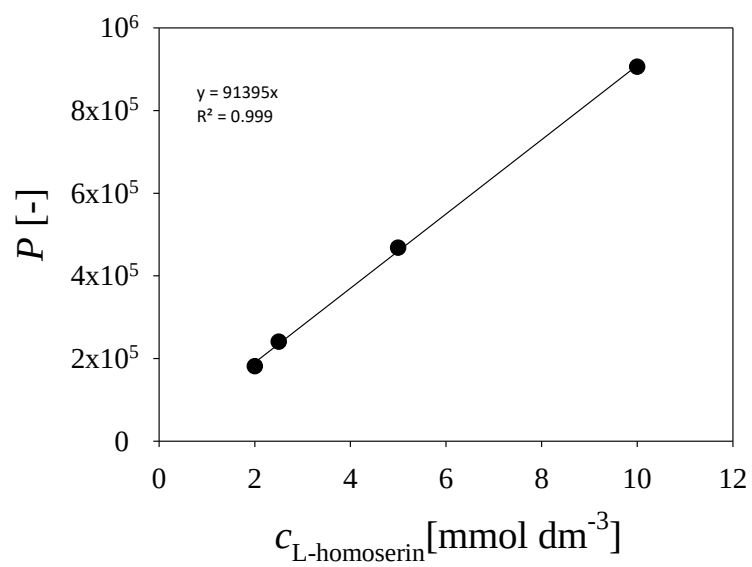
Prilog 3. Kromatogram i baždarni pravac za određivanje koncentracije 4-hidroksi-2-oksobutanoata



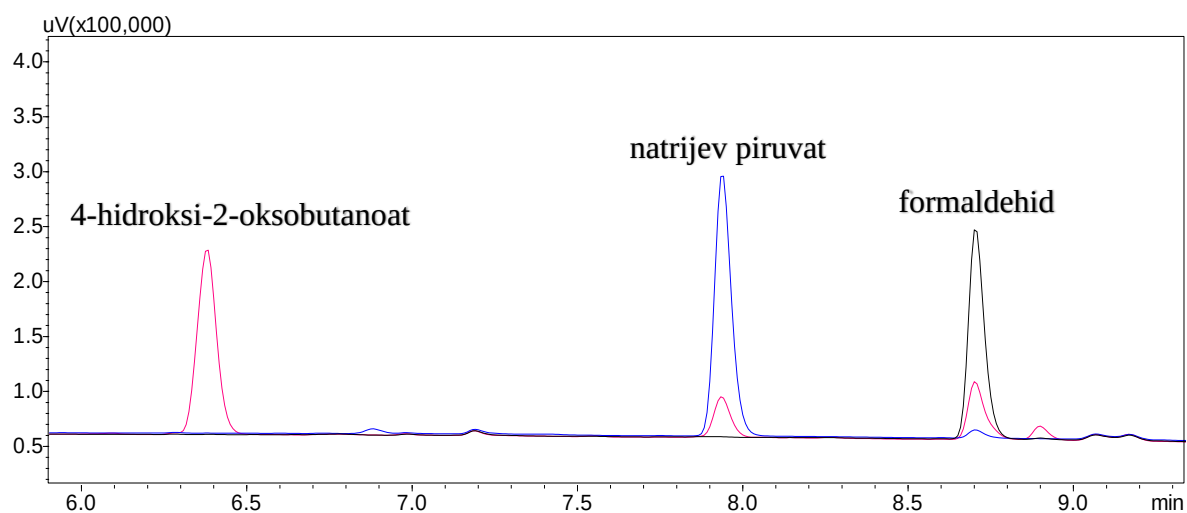
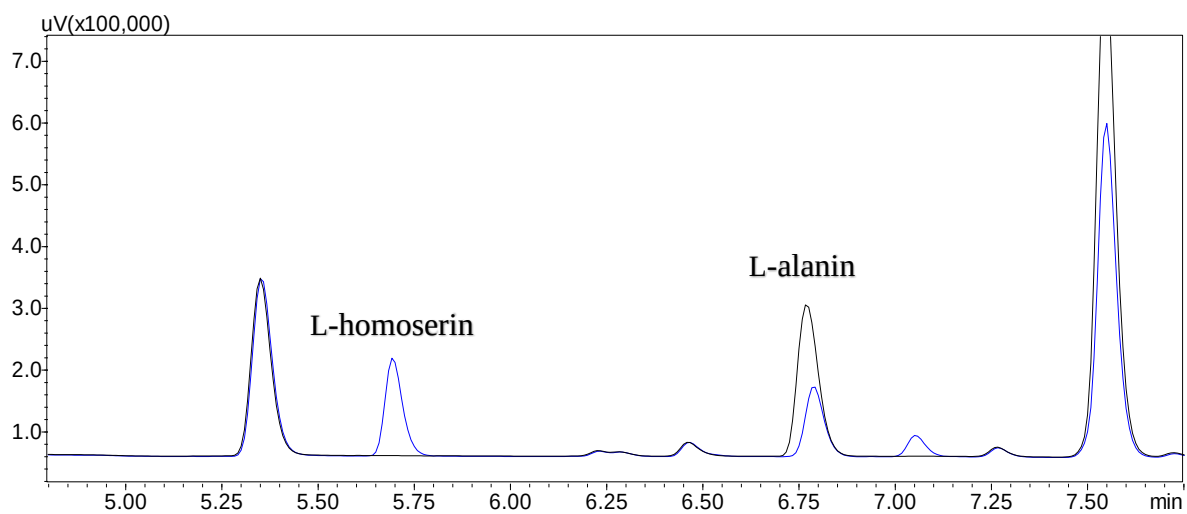
Prilog 4. Kromatogram i baždarni pravac za određivanje koncentracije L-alanina



Prilog 5. Kromatogram i baždarni pravac za određivanje koncentracije L-homoserina



Prilog 6. Kromatogrami L-alanina, L-homoserina, natrijevog piruvata, formaldehida i 4-hidroksi-2-oksobutanoata analiziranih HPLC metodom opisanom u poglavlju 3.3.1.



10. ŽIVOTOPIS

Lucija Zovko [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje završila je u OŠ Vladimir Nazor, a srednjoškolsko u Gimnaziji Matija Antun Reljković u Vinkovcima. 2014. godine upisala je preddiplomski studij Primijenjena kemija na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, koji je završila 2017. godine obranom završnog rada na temu *Optički (bio)kemijski senzori na tekstilu i papiru* čime je stekla titulu prvostupnice primijenjene kemije. Iste te godine upisala je diplomski studij Primijenjena kemija, modul Kemija okoliša. Stručnu praksu je odradila na Veterinarskom zavodu u Vinkovcima. Akademske godine 2015./2016. radila je kao demonstratorica u Zavodu za opću i anorgansku kemiju.