

Oksidacija diola u prisustvu oksidoreduktaza

Jelačić, Jelena

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:833725>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-02**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDIPLOMSKI STUDIJ

Jelena Jelačić

**OKSIDACIJA DIOLA U PRISUSTVU
OKSIDOREDUKTAZA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.
prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2018.



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

SAŽETAK

U ovom radu istražena je enzimatska oksidacija alkohola katalizirana enzimom galaktoza oksidazom. Zanimala nas je specifična aktivnost galaktoza oksidaze prema alkoholnom supstratu, diolu. Provedeno je mjerenje utjecaja koncentracije diola, bakrovih iona i kisika na aktivnost enzima. Kao supstrati su korišteni racemična smjesa diola, ali i čisti *R*- i *S*- izomeri diola, kako bi se pokazalo je li enzim enantioselektivan.

Postojanje produkta enzimatske reakcije oksidacije alkohola ispitano je kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti i kombinirane tehnike kapljevinske kromatografije i masene spektrometrije. Provedena je i kaskadna reakcija u kojoj je oksidacija alkohola kombinirana s aldolnom adicijom uz enzim D-fruktoza-6-fosfat aldolazu (FSA).

Ključne riječi: enzimatska oksidacija, galaktoza oksidaza, alkohol, specifična aktivnosti

ABSTRACT

In this work, enzymatic alcohol oxidation catalyzed by galactose oxidase was studied. We were interested in the specific activity of galactose oxidase to the alcohol substrate. Measurement of the effect of diol, copper ions and oxygen concentration on enzyme activity was performed. The racemic alcohol was tested as substrate, but also the *R*- and *S*-isomers.

The existence of enzymatic reaction products was tested by high-performance liquid chromatography and combined liquid chromatography and mass spectrometry techniques. Cascade reactions of alcohol oxidation and aldol addition to D-fructose-6-phosphate aldolase (FSA) were also performed.

Keywords: enzymatic oxidation, galactose oxidase, alcohol, specific activity

Sadržaj

1.	UVOD	1
2.	OPĆI DIO.....	2
2.1.	ENZIMI	2
2.1.1.	Svojstva enzima	2
2.1.2.	Klasifikacija enzima	3
2.1.3.	Enzimski kataliza	3
2.1.4.	Oksidoreduktaze	5
2.1.5.	Galaktoza oksidaza	6
2.1.6.	Peroksidaze.....	7
2.2.	KASKADNE REAKCIJE.....	8
2.3.	KEMIJSKA OKSIDACIJA ALKOHOLA	9
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	10
3.1.	APARATURA	10
3.1.1.	Analitička vaga	10
3.1.2.	Homogenizator	10
3.1.3.	Poluautomatska pipeta	11
3.1.4.	Spektrofotometar	11
3.1.5.	pH metar i magnetska miješalica	12
3.1.6.	Aparatura za ispitivanje utjecaja koncentracije kisika na aktivnost galaktoza oksidaze.....	13
3.1.7.	Centrifuga	14
3.1.8.	Kapljevinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	14
3.3.	ANALITIČKE METODE.....	17
3.3.1.	Određivanje specifične aktivnosti galaktoza oksidaze pomoću spektrofotometra	17
3.3.2.	Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC).....	18
3.3.4.	Određivanje utjecaja koncentracije <i>S</i> -diola i <i>R</i> -diola na aktivnost galaktoza oksidaze	19
3.3.5.	Mjerenje utjecaja koncentracije bakra na aktivnost galaktoza oksidaze	21
3.3.6.	Mjerenje utjecaja kisika na aktivnost galaktoza oksidaze tijekom oksidacije diola u aldehid	21
4.	REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1.	Određivanje utjecaja koncentracije <i>S</i> -diola i <i>R</i> -diola na aktivnost galaktoza oksidaze.....	23
4.2.	Mjerenje utjecaja koncentracije bakra na aktivnost galaktoza oksidaze	24
4.3.	Mjerenje utjecaja kisika na aktivnost galaktoza oksidaze tijekom oksidacije diola u aldehid	25
4.4.	Oksidacija diola i kaskadna reakcija u kotlastom reaktoru	26
4.5.	Dihidroksiaceton kao supstrat	27
5.	ZAKLJUČAK	29
6.	LITERATURA.....	30
7.	PRILOZI	32

1. UVOD

Danas je kemijska industrija pod velikim pritiskom da kemijsku proizvodnju učini manje štetnom za okoliš i nezavisnijom od fosilnih goriva [1]. Biokataliza se razvila kao dodatak tradicionalnim kemijskim procesima proizvodnje raznih kemikalija i lijekova, a prometnula se u glavnu alternativu za tradicionalnu kemijsku proizvodnju [2]. Uspoređujući je s kemijskom katalizom, biokataliza ima brojne prednosti kao što su visoka efikasnost, visoka selektivnost (regioselektivnost, kemijska selektivnost, enantioselektivnost) te povoljniji utjecaj na okoliš [3]. Iako je do nedavno bila malo prisutna u proizvodnji, danas je nezamjenjiva u kemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

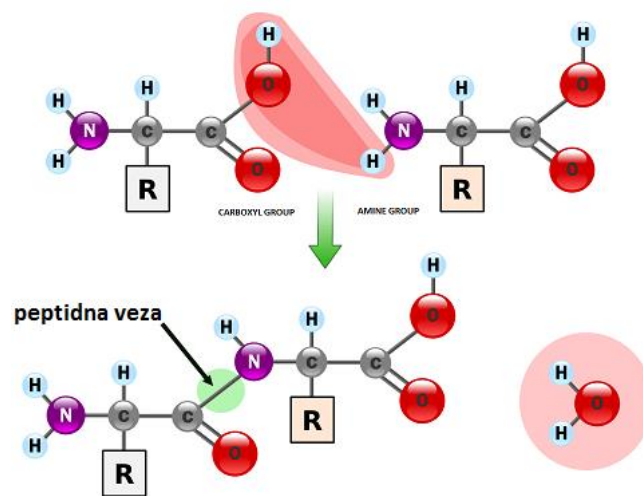
Enzimi se zahvaljujući svojim dobrim karakteristikama mogu primijeniti kao katalizatori u mnogobrojnim kemijskim reakcijama, no njihova praktična primjena često je ograničena komercijalnom dostupnošću i cijenom. Postoje mnogi problemi i izazovi koje je potrebno riješiti kako bi se biokatalitičke reakcije mogle primjenjivati u industriji u većem broju, a neki od njih su niska topljivost, nestabilne reakcijske komponente i zahtjevi za učinkovitim prijenosom kisika [2]. Iako su danas vrlo čest predmet istraživanja, i dalje možemo reći da pripadaju među slabo istražene sustave, osobito ako u obzir uzmemo enzime iz morskih ekosustava [4].

2. OPĆI DIO

2.1. ENZIMI

2.1.1. Svojstva enzima

Enzimi su specifična skupina proteina. Sastoje se od velikog broja aminokiselina koje su kovalentno povezane peptidnom vezom. Peptidna veza se uspostavlja između ugljikova atoma karboksilne skupine i atoma dušika na α -amino skupini (slika 2.1). S obzirom na svojstva i prirodu skupine vezane na α -ugljikovom atomu aminokiseline, razlikuju se i svojstva aminokiselina, a u konačnici i samih enzima [5].



Slika 2.1. Formiranje peptidne veze između karbonilne i amino skupine dviju aminokiselina [6]

U biološkim reakcijama imaju ulogu katalizatora, odnosno odgovorni su za ubrzanje kemijskih reakcija. Nazivaju se i biokatalizatorima jer sudjeluju u mnogim kemijskim reakcijama u biološkim sustavima [1]. Najbitnije karakteristike enzima su specifičnost i katalitička moć. Specifični su i po reakciji koju kataliziraju i po izboru supstrata, tj. reaktanata. Specifičnost vezanja supstrata i optimalan raspored aktivnog mjesta čine enzime vrlo moćnima i pogodnima za provedbu brojnih reakcija. Da bi stanica bila funkcionalna, potrebna je koordinacija svih reakcija koje se u njoj odvijaju, a enzimi tome neizmjerljivo mnogo doprinose. Zato možemo reći da imaju ključnu ulogu u životu same stanice, ali i životu općenito. U reakcijama mogu se koristiti u dva osnovna oblika: kao pročišćeni enzimi i kao enzimi u cijelim stanicama (živim ili neživim) [1].

2.1.2. Klasifikacija enzima

Razvojem biokatalize rastao je broj poznatih enzima i njihovih funkcija. Najčešće jedan enzim katalizira jednu kemijsku reakciju ili nekoliko vrlo srodnih kemijskih reakcija. Danas ih je poznato više od 200 te je uveden sustav njihova klasificiranja koji uzima u obzir njihovu reakcijsku specifičnost i specifičnost prema supstratu [1]. Takva podjela bila je prijeko potrebna s obzirom da nerijetko isti enzimi imaju dva ili više imena, odnosno dva različita enzima imaju isti naziv. Svakom enzimu dodijeljen je četveroznamenkasti broj (eng. enzyme commission number ili EC number) u kojem prva znamenka govori o pripadnosti jednom od 6 glavnih razreda, druga i treća znamenka govore kojem podrazredu i podskupini pripada, a četvrta označava gdje enzim pripada u podskupini [1].

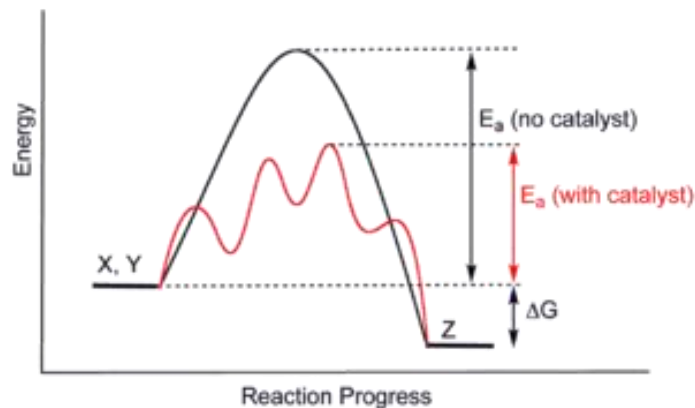
Enzimi sa sličnim reakcijskim specifičnostima grupirani su u 6 osnovnih razreda:

1. OKSIDOREDUKTAZE – enzimi koji kataliziraju prijenos redukcijskih ekvivalenata iz jednog u drugi redoks sustav
2. TRANSFERAZE – kataliziraju prijenos različitih grupa s jedne na drugu molekulu
3. HIDROLAZE – kataliziraju prijenos grupa, no akceptor je uvijek molekula vode, odnosno kataliziraju reakcije u kojima dolazi do hidrolize
4. LIAZE (SINTAZE) – enzimi koji kataliziraju reakcije eliminacije uz stvaranje dvostruke veze ili reakcije adicije na dvostruku vezu
5. IZOMERAZE – kataliziraju premještanje skupina unutar molekule, ne uzrokuju promjene bruto sastava supstrata
6. LIGAZE (SINTETAZE) – enzimi koji su ovisno o energiji, povezani su s hidrolizom nukleozidnih trifosfata, a kataliziraju reakcije vezivanja

2.1.3. Enzimska kataliza

Kataliza je proces koji povećava brzinu kojom reakcija dostiže ravnotežu, a *biokataliza* je zapravo kataliza u kojoj je katalizator enzim [1]. Brzina postizanja reakcijske ravnoteže ovisi o slobodnoj aktivacijskoj energiji, a katalizator i/ili enzim smanjuje tu reakcijsku barijeru i ubrzava reakciju (slika 2.2.). Enzimi ne mijenjaju reakcijsku ravnotežu reakcije koju kataliziraju već samo ubrzavaju postizanje te ravnoteže. Smanjivanjem energije aktivacije osiguravaju kraći reakcijski put koji reaktanti moraju proći u svojoj pretvorbi u produkte. Bez prisutnosti enzima, reakcijski put bio bi puno duži, odnosno sama reakcija odvijala bi se u mnogo dužem vremenskom periodu. Također, enzimi osiguravaju pravilnu orijentaciju

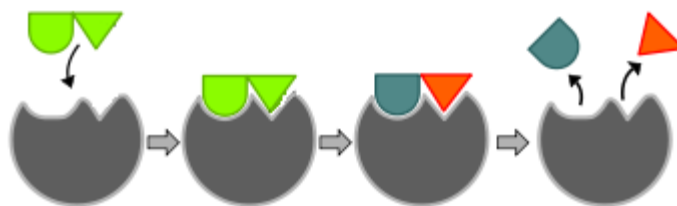
molekula koje se sudaraju, odnosno enzima i supstrata, što omogućuje da se reakcija počne odvijati [5].



Slika 2.2. Energija aktivacije sa i bez katalizatora

Prvi korak enzimske katalize je stvaranje kompleksa *enzim-supstrat* koji nastaje vezivanjem supstrata za *aktivno mjesto* enzima. Aktivno mjesto enzima je područje na enzimu koje veže supstrat i na raspolaganje stavlja aminokiselinske ostatke koji izravno sudjeluju u stvaranju ili kidanju kemijske veze. Vrlo je složena trodimenzionalna tvorevina koja se sastoji od stotina aminokiselinskih ostataka koji se nazivaju katalitičkim skupinama [5]. Veza enzima i supstrata je vrlo slaba, najčešće su vezani Van der Waalsovom i elektrostatskim privlačenjem, vodikovom vezom ili rjeđe, kovalentnom vezom. Enzimi su vrlo izbirljivi pri vezivanju supstrata i upravo ih to čini toliko specifičnim [7].

Najjednostavnije objašnjenje načina vezivanja točno određenog supstrata za aktivno mjesto enzima je *model ključ-brava* njemačkog biokemičara Emila Fischera koji slikovito opisuje da „supstrat koji se veže na aktivno mjesto enzima mora imati točno određeni oblik (slika 2.3), a aktivno mjesto je modelirano na način da se supstrat savršeno uklopi u njega i onemogućuje vezivanje drugih molekula, odnosno pretpostavlja se potpuna komplementarnost enzima i supstrata“ [5]. Iako je takav model vrlo jednostavan i niti približno ne daje dovoljno dobre odgovore o načinu rada enzima, vrlo je slikovit i daje osnovno objašnjenje zašto su enzimi toliko specifični prema supstratima, odnosno dobro opisuje stereospecifičnost katalize. Dokazano je da u nekim slučajevima nije nužna potpuna komplementarnost enzima i supstrata, jer do točnog pristajanja dolazi prilikom tvorbe kompleksa.



Slika 2.3. Mehanizam vezanja supstrata

Enzimima je često potrebna pomoć drugih molekula kako bi mogli postići svoju (potpunu) aktivnost. Molekule koje im u tome pomažu nazivaju se koenzimima ili kofaktorima. To su male organske molekule koje sudjeluju u enzimski kataliziranoj reakciji. Mogu se kovalentno vezati na enzim ili se nalaziti u otopini oko enzima u slobodnom stanju [7]. Često funkcioniraju kao prenositelji elektrona, specifičnih atoma ili funkcionalnih skupina koje se prenose u reakciji. Aktivnost enzima može se i inhibirati, a to je vrlo važan proces na kojem se temelji djelovanje brojnih lijekova i otrovnih tvari. Inhibicija enzima može biti reverzibilna ili ireverzibilna. U ireverzibilnoj inhibiciji, inhibitor se kovalentno veže na enzim i usporava disocijaciju s enzima. Reverzibilna inhibicija nastaje brzim uspostavljanjem ravnoteže između inhibitora i enzima [5].

2.1.4. Oksidoreduktaze

Oksidoreduktaze su skupina enzima koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije uz primanje ili otpuštanje vodikovih atoma ili elektrona. Najčešće kataliziraju redoks reakcije u metaboličkim procesima, ali moguća je i njihova primjena u brojnim redoks reakcijama koje su od velike važnosti za industriju. Oksidoreduktaze se dijele na dehidrogenaze, oksidaze, oksigenaze i peroksidaze [8]. Dehidrogenaze kataliziraju prijelaz elektrona sa supstrata na nikotinamid adenin dinukleotidni kofaktor (NAD^+). Oksidaze kataliziraju prijelaz vodika sa supstrata na molekularni kisik te kao nusprodukt ove reakcije nastaje vodikov peroksid (koriste FAD kao redoks centar). Oksigenaze imaju zadaću katalizirati oksidaciju supstrata molekularnim kisikom, a kao reducirani produkt nastaje voda. Peroksidaze kataliziraju oksidaciju supstrata pomoću vodikova peroksida. Poznato je da oksidaze kataliziraju oksidaciju hemiacetala u laktone, alkohola u aldehide, amina u imine, NADH ili NADPH u NAD^+ i NADP^+ te oksidaciju karboksilnih kiselina do α,β -nezasićenih karbonilnih spojeva. Istraživanjem i uspoređivanjem reakcija koje se odvijaju u prirodi i onih u industriji, došlo se do zaključka da oksidoreduktaze mogu biti od velike koristi i važnosti i u industrijski relevantnim reakcijama.

2.1.5. Galaktoza oksidaza

Reakcije oksidacije jedne su od najvažnijih reakcija u kemijskoj i farmaceutskoj industriji, a često se provode uz plemenite metale koji imaju ulogu katalizatora. Reakcije oksidacije katalizirane enzimima, odnosno biokatalizatorima, potencijalno mogu zamijeniti mnoge kemijski katalizirane reakcije oksidacije u farmaceutskoj i kemijskoj industriji [8]. Najvažniji razlog razmatranja i istraživanja biokatalitičkih reakcija oksidacije je vrlo visoka stereoselektivnost i regioselektivnost enzima [9], ali i vrlo mali utjecaj na okoliš u odnosu na klasične kemijske reakcije oksidacije koje generiraju vrlo velike količine otpadnih tvari, koriste štetna i toksična organska otapala i zahtijevaju dodatne sintezne korake da bi se osigurala zaštita i uklanjanje nestabilnih funkcionalnih skupina.

Enzim galaktoza oksidaza pokazala se kao vrlo dobar biokatalizator za oksidaciju primarnih i sekundarnih alkohola do njihovih odgovarajućih aldehida i ketona [8]. Odlikuje se visokom stabilnošću i vrlo dobrom aktivnošću. Galaktoza oksidaza i njezini srodnici kataliziraju reakcije oksidacije širokog raspona supstrata s mogućom industrijskom primjenom. Iako ima vrlo dobre karakteristike, postoje brojni zahtjevi koji se moraju ispuniti da bi provedba takve reakcije bila uspješna pa je stoga njezina primjena u industriji nešto otežana. Katalitički mehanizam galaktoza oksidaze može se opisati sa takozvanim „ping-pong“ mehanizmom, gdje je oksidacija alkoholnih supstrata jedna katalitička polureakcija koju slijedi reoksidacija enzima s redukcijom kisika do vodikova peroksida u drugoj polureakciji [8].

Najvažniji faktori koji utječu na stabilnost i aktivnost galaktoza oksidaze su:

- a) prisutnost kisika
- b) vrsta i koncentracija pufera
- c) vrsta iona i ionska jakost
- d) kofaktori

Stabilnost enzima i dovoljna **opskrba kisikom** od presudne su važnosti za provedbu procesa temeljenih na oksidaciji jer upravo je opskrba kisikom tijekom reakcije često ograničavajući čimbenik u provedbi reakcije u kojima kao katalizatori sudjeluju oksidaze [10]. Tome je razlog spor prijenos kisika iz plinovite u tekuću fazu uzrokovan niskom topljivošću kisika u vodi pri normalnim uvjetima (0,268 mM pri 25 °C). Zbog njegove niske topljivosti, niske su i pokretačke sile za prijenos mase. Najmanja promjena koncentracije kisika imati će veliki utjecaj na reakcijsku brzinu. Pri niskoj koncentraciji kisika, brzina prijenosa kisika biti će visoka, dok će specifična brzina reakcije biti niska, i obrnuto, pri visokoj koncentraciji kisika

(blizu zasićenja), brzina prijenosa kisika će biti niska, a specifična brzina reakcije visoka [5]. Brzina prijenosa kisika može se povećati primjenom obogaćenog zraka, tj. zraka s povećanim sadržajem kisika i/ili pri uvjetima povećanog tlaka zraka u reaktoru, što povećava pokretačku silu za transfer kisika povećanjem koncentracije zasićenja kisika. **Koncentracija i tip pufera** u kojem će se reakcija odvijati, također su esencijalni za aktivnost galaktoza oksidaze. Galaktozi oksidazi često se dodaju bakreni ioni, odnosno otopina bakrovih soli u reakcijsku smjesu [8]. Bakreni ioni imaju ulogu kofaktora te osiguravaju punu aktivnost enzima galaktoza oksidaze. Najlakši, najučinkovitiji i najjeftiniji način dodatka bakra je u obliku topljive bakrene soli (npr. CuSO_4 , CuCl_2). Ioni također utječu na aktivnost i stabilnost enzima kroz interakcije s nabijenim grupama na proteinu, tj. enzimu i s molekulama vode koje okružuju molekulu enzima. Ionska jakost je ključna za aktivnost galaktoza oksidaze: aktivnost se povećava sa povećanjem ionske jakosti pufera [5]. Stabilnost enzima značajno se smanjuje kada se on nalazi u sustavima gdje postoje granice faza plin-kapljevina. No, to nije slučaj kod galaktoza oksidaze. Dokazano je da mjehurići nastali aeracijom dodatno aktiviraju galaktoza oksidazu.

2.1.6. Peroksidaze

Vodikov peroksid, koji nastaje tijekom oksidacije alkohola, inhibira i deaktivira galaktoza oksidazu pa je potrebno njegovo uklanjanje iz reakcijske smjese. Najefektivnija kataliza je ona u kojoj se 1 mol vodikova peroksida razgrađuje u 1 mol vode i $\frac{1}{2}$ mol kisika. Tijekom katalize, galaktoza oksidaza nepovratno se inhibira vodikovim peroksidom, a kada se nalazi u stanju mirovanja, pokazuje veliku stabilnost prema vodikovom peroksidu [8]. Dodatkom peroksidaze smanjuje se mogućnost inhibicije galaktoza oksidaze vodikovim peroksidom te se regenerira otopljeni kisik i omogućuje se daljnja oksidacija alkohola. Peroksidaza iz hrena (*eng.* Horseradish peroxidase, HRP) dugo vremena se smatrala aktiviranim oblikom galaktoza oksidaze. No, ona zapravo aktivira, tj. reaktivira galaktoza oksidazu oksidacijom nastalog vodikova peroksida. Oksidans poput peroksidaze ključan je za potpunu aktivnost enzima jer vraća radikal u aktivno mjesto.

Anorganski oksidansi, poput kalijeva fericianida, čine se jeftinijom opcijom od peroksidaze, ali oni stvaraju dodatne probleme i troškove jer često nastaju neželjeni nusprodukti koje je potrebno izdvojiti, ali također smanjuju i ukupnu učinkovitost samog procesa oksidacije alkohola.

2.2. KASKADNE REAKCIJE

Kaskadne reakcije zapravo su višestupanjske organske sinteze koje se odvijaju u jednom reaktoru, a u koje su uključeni i katalitički koraci. Svi katalizatori (uključujući i enzimске i kemijske) nalaze se u reakcijskoj smjesi od početka do kraja reakcije. Takva višestupanjska sinteza koja se odvijaju u jednom reaktoru ima niz prednosti, kao što su:

- manji broj operacijskih jedinica
- manji volumeni otapala i reaktora
- kraći radni ciklusi
- veća produktivnost
- manje otpada
- nije potrebna izolacija intermedijera

U vremenu kada se sve više govori o utjecaju industrije, osobito kemijske, na okoliš, ovakav pristup razvoju procesa iznimno je zanimljiv i isplativ. Odvijanje višestupanjske sinteze u jednom reaktoru donosi brojne ekološke, ali i ekonomske uštede i koristi [11]. Kaskadne reakcije sve su više prisutne u suvremenim organskim sintezama, koje za cilj imaju proizvesti i efikasne i elegantne kemijske reakcije. Povezivanjem niza reakcija, reakcijska ravnoteža može se pomaknuti prema nastanku produkta, što dovodi do ušteda utrošenih reaktanata. Iako kaskadne reakcije imaju mnogo prednosti, njihovo projektiranje i provođenje dosta je zahtjevno jer se trebaju uskladiti brojni čimbenici koji utječu na uspješnost provođenja reakcije. Katalizatori koji se upotrebljavaju često su nekompatibilni jedni s drugima, reakcijske brzine mogu se uvelike razlikovati, potrebno je pronaći optimalne pH vrijednosti, optimalne uvjete temperature i tlaka, otapala koja će osigurati dobru topljivost i još mnogo toga [12]. Tijekom sinteze, mogu nastati brojni nusprodukti, osobito ako dođe do odstupanja od idealnih uvjeta, izolacija i izdvajanje produkata mogu biti vrlo kompleksni. Imajući na umu da se enzimski procesi odvijaju u sličnim uvjetima (vodeni medij, sobna temperatura i tlak), planiranje i provedba kaskadnog procesa može se olakšati.

2.3. KEMIJSKA OKSIDACIJA ALKOHOLA

Oksidacija alkohola u aldehide i/ili ketone česta je reakcija u kemijskoj industriji. Umjesto nešto zahtjevnije enzimske reakcije oksidacije, često se primjenjuje kemijska oksidacija alkohola [12]. U te svrhe koriste se jaki oksidansi anorganskog podrijetla, vrlo često na bazi joda. Molekularni jod sam po sebi ima vrlo jak oksidacijski potencijal za oksidiranje različitih supstrata pa je vremenom razvijen jednostavan i praktičan proces oksidacije alkohola pomoću *o*-jodoksibenzojeve kiseline ili IBX-a [13].

Oksidacija alkohola pomoću IBX-a je vrlo jednostavan proces. Otopina alkohola zagrijava se u prisutnosti suspendiranog IBX-a nakon čega slijedi filtracija i uklanjanje otapala. Uz to što ovaj proces ima visok stupanj konverzije supstrata, omogućava i ponovnu upotrebu oksidansa nakon regeneracije. IBX je netopljiva u većini organskih otapala. Prvo poznato organsko otapalo u koje je bila topljiva bilo je DMSO (dimetil sulfoksid), no ubrzo su otkrivena i druga organska otapala u kojima je topljiva, ponajprije zbog štetnosti DMSO-a. Otkriveno je da je IBX topljiv u većini organskih otapala pri povišenim temperaturama [13].

Industrijska primjena IBX oksidacije alkohola dugo je bila ograničena zbog sigurnosnih problema koje je IBX stvarao: pod utjecajem zagrijavanja nerijetko je dolazilo do njegovog eksplozivnog raspada. Taj problem riješilo je otkriće stabilizirane formule IBX-a, tzv. SIBX (stabilizirana IBX). To je bijeli, neeksplozivni prah sastava 49% IBX-a, 29% izoftalne kiseline te 22% benzojeve kiseline [14].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. APARATURA

3.1.1. Analitička vaga

Potrebne količine uzoraka za provedbu eksperimenta odvagane su pomoću analitičke vage *Shimadzu* prikazane na slici 3.1.



Slika 3.1. Analitička vaga

3.1.2. Homogenizator

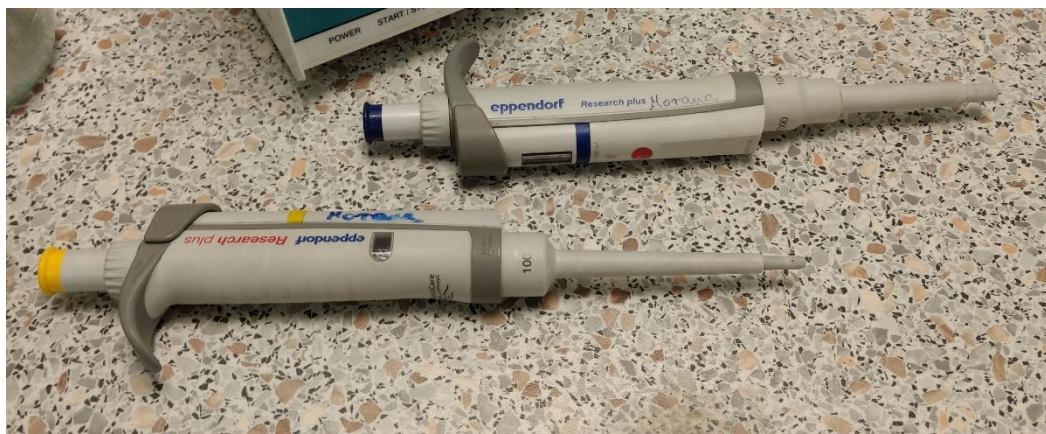
Postizanje homogenosti uzoraka i otopina korištenih u eksperimentima osigurano je upotrebom homogenizatora *IKA VORTEKS GENIUS 3* prikazanog na slici 3.2. Svaki uzorak je homogeniziran tijekom pripreme i neposredno prije samog eksperimenta.



Slika 3.2. Homogenizator

3.1.3. Poluautomatska pipeta

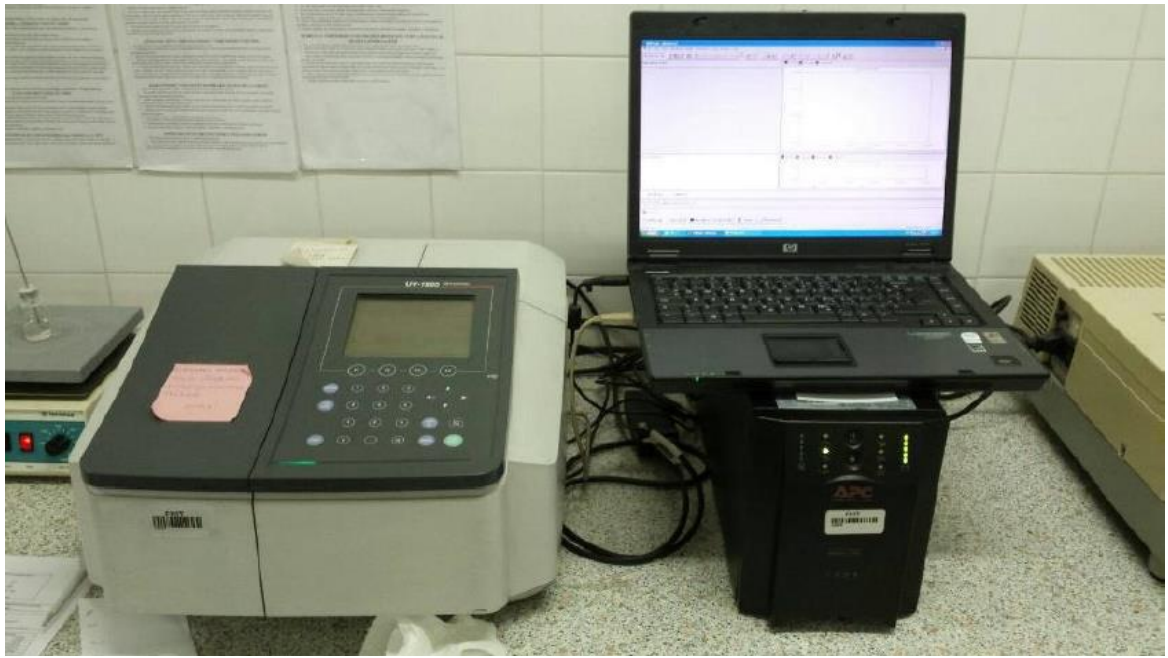
Otopine uzoraka pripremane su pomoću poluautomatskih pipeta marke *Eppendorf* prikazanih na slici 3.3. koje su osigurale točno i precizno dodavanje odgovarajućih volumena otopina kod pripremanja uzoraka potrebnih za provedbu eksperimenta.



Slika 3.3 Poluautomatske pipete

3.1.4. Spektrofotometar

Specifična aktivnost enzima galaktoza oksidaze određivana je i praćena pomoću spektrofotometra UV-1800 proizvođača *Shimadzu*. Uređaj je spojen na računalo i pomoću programskog paketa omogućena je brža analiza dobivenih rezultata. Uređaj i računalo prikazani su na slici 3.4.



Slika 3.4. Spektrofotometar spojen s računalom

3.1.5. pH metar i magnetska miješalica

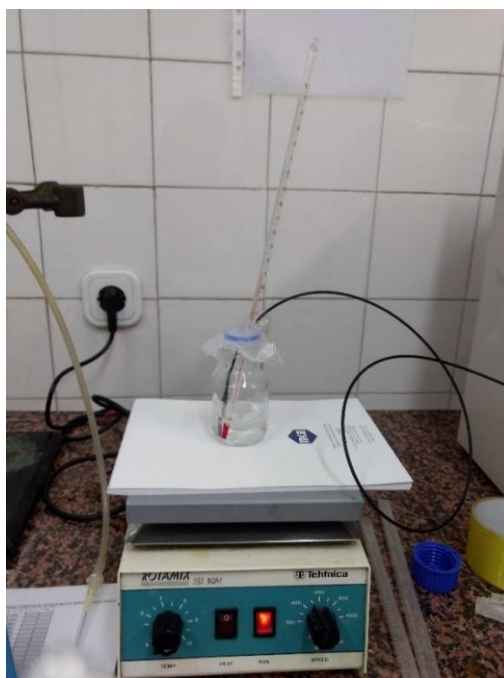
Za pripremu fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,0 korištena je pH metar proizvođača *Shott* prikazan na slici 3.5. Tijekom podešavanja pH vrijednosti, otopina je miješana pomoću magnetske miješalice također prikazane na slici 3.5.



Slika 3.5. pH metar i magnetska miješalica

3.1.6. Aparatura za ispitivanje utjecaja koncentracije kisika na aktivnost galaktoza oksidaze

Tijekom ispitivanja utjecaja koncentracije kisika na aktivnost galaktoza oksidaze temeljna otopina alkohola miješana je na magnetskoj miješalici u Schottovoj boci (slika 3.6.) te se pomoću kisikove elektrode pratio udio kisika u otopini (slika 3.7.). Udio kisika u otopini regulirao se upuhivanjem dušika u otopinu. Praćena je temperatura temeljne otopine pomoću termometra.



Slika 3.6. Schottova boca s otopinom alkohola, termometar i magnetska miješalica



Slika 3.7. Schottova boca s kisikovom elektrodom i iglom za upuhivanje dušika

3.1.7. Centrifuga

Uzorci su centrifugirani na centrifugi Universal 320 R, proizvođača *Hettich*. Centrifuga je prikaza na slici 3.8.



Slika 3.8. Centrifuga

3.1.8. Kapljevinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Koncentracije uzoraka produkata i zaostalih reaktanata analizirane su pomoću kapljevinske kromatografije visoke djelotvornosti s UV detektorom proizvođača *Shimadzu*. Uređaj je prikazan na slici 3.9.



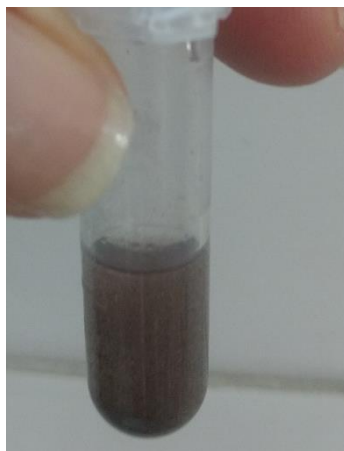
Slika 3.9. Uređaj za kromatografiju visoke djelotvornosti

3.2. KEMIKALIJE

Tijekom izrade ovog rada korištene su slijedeće kemikalije:

- *O*-dianisidin
- 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina) ili ABTS
- Galaktoza oksidaza (GOD)
- Peroksidaza iz hrena (POD)
- Kalijev fosfatni pufer, 100 mM, pH = 7,0
- Natrijev fosfatni pufer, 100 mM, pH = 7,0
- Amonijev sulfat
- Ultra čista voda
- Racemična smjesa diola
- Čisti enantiomeri diola, *R*-diol i *S*-diol

Otopina *o*-dianisidina pripravljena je otapanjem praškastog *o*-dianisidina u ultra čistoj vodi. S obzirom da se *o*-dianisidin ne otapa u potpunosti, nastaje heterogena smeđa suspenzija; vidljiva na slici 3.10.



Slika 3.10. Otopina *o*-dianisidina

Otopina ABTS-a dobiva se otapanjem praškastog ABTS-a u 100 mM puferu. Dobivena otopina intenzivne je zelene boje (slika 3.11.).



Slika 3.11. Otopina ABTS-a

Otopina diola, i racemične smjese i čistih enantiomera, pripravljena je razrjeđivanjem koncentriranih otopina diola pomoću 100 mM pufera, pH 7,0.

Otopina galaktoza oksidaze također se priprema otapanjem praškastog enzima galaktoza oksidaze u 100 mM puferu, pH 7,0.

Otopina peroksidaze iz hrena priprema se otapanjem praškaste peroksidaze u otopini 3,2 M amonijeva sulfata koju dobivamo otapanjem čvrstog amonijeva sulfata u ulara-čistoj vodi.

3.3. ANALITIČKE METODE

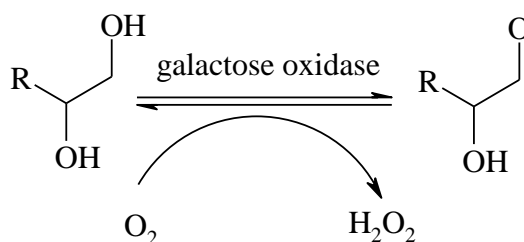
3.3.1. Određivanje specifične aktivnosti galaktoza oksidaze pomoću spektrofotometra

Aktivnost enzima galaktoza oksidaze prema alkoholnom supstratu određivana je spektrofotometrijskom metodom [10]. Aktivnost enzima praćena je pomoću *o*-dianisidina u prvim eksperimentima, a kako nisu dobiveni dobri rezultati, kasnije pomoću ABTS-a. Specifična aktivnost galaktoza oksidaze računata je prema slijedećim jednadžbama:

$$V.A = \frac{\frac{dA}{dt} \times V_{uk}}{V_{GOD} \times d \times \varepsilon} \quad [\text{U ml}^{-1}] \quad (1)$$

$$S.A = \frac{V.A}{c_{GOD}} \quad [\text{U mg}^{-1}] \quad (2)$$

U prvim mjerenjima, oksidacija alkohola katalizirana galaktozom oksidazom (slika 3.12.) praćena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije, uz prisutnost *o*-dianisidina. Uloga *o*-dianisidina je prevođenje vodikova peroksida, nusprodukta oksidacije alkohola u aldehid, u vodu, kako ne bi inhibirao galaktoza oksidazu [10]. Dodatkom peroksidaze u reakcijsku otopinu osigurana je kataliza redukcije vodikova peroksida u vodu. Provedeno je 5 mjerenja u kojima je varirana koncentracija diola, *o*-dianisidina te GOD-a u reakcijskoj smjesi, sa svrhom nalaženja optimalnih omjera za provedbu eksperimenta. Enzim galaktoza oksidaza nije pokazivala aktivnost tijekom ovih spektrofotometrijskih mjerenja.



Slika 3.12. Shema reakcije oksidacije alkohola pomoću galaktoza oksidaze

Nakon dodatnog istraživanja literature i traženja odgovora zašto galaktoza oksidaza ne pokazuje aktivnost prema alkoholnom supstratu, *o*-dianisidin zamijenjen je s ABTS-om [8]. Aktivnost galaktoza oksidaze testirali smo sa čistim enantiomerima alkoholnog supstrata, te nakon provedbe eksperimenta, dobili smo potvrdu aktivnosti galaktoza oksidaze.

3.3.2. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Za separaciju i analizu sastava reakcijske smjese nakon oksidacije diola korištena je kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC). Proces separacije započinje injektiranjem uzorka u mobilnu fazu, koja se pod visokim tlakom kreće kroz kolonu punjenu stacionarnom fazom. Na učinkovitost separacije utječe izbor stacionarne i mobilne faze, te sama brzina protoka kroz kolonu. HPLC se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu [15].

Za analizu korištena je kolona Phenomenex Kinetix Core-Shell Technology C18, 15 μm , 4,6x250mm. Mobilna faza A sastojala se od vode i trifluoroctene kiseline, a mobilna faza B od 0,095% trifluoroctene kiseline s dodatkom smjese $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ u omjeru 4:1. Brzina protjecanja mobilnih faza iznosila je 1,5 mL/min, detekcija se odvijala na 250nm, a temperatura kolone bila je 30°C. Prije analize supstrata i produkata, napravljena je derivatizacija uzoraka s $\text{BnONH}_2\text{xHCl}$. Nakon dodatka otopine za derivatizaciju, uzorci su stavljeni 5 minuta na tresilicu pri 25°C, potom je dodan metanol nakon čega je uzorak centrifugiran pri brzini od 14 000 okretaja u minuti na 4°C tijekom 5 minuta. Centrifugiranjem se istaložio enzim, a gornja faza je korištena za analizu. Gradijent eluiranja mobilne faze B iznosio je 10-100% tijekom 10 minuta, a zatim 2 minute 100% mobilne faze B i konačno 100-10% mobilne faze B kroz 3 minute i 10% faze B kroz 1 minutu. Ukupno vrijeme analize iznosilo je 16 minuta.

3.3.3. LC-MS masena spektrometrija

Osnovni princip masene spektrometrije (MS) je stvaranje iona iz anorganskih ili organskih spojeva određenom metodom za odvajanje tih iona na temelju njihovog odnosa mase i naboja (m/z), te njihovo otkrivanje, kvantitativno ili kvalitativno [16]. Masena spektrometrija se najčešće kombinira s tekućinskom kromatografijom (LC-MS ili LC-MS/MS), gdje se izvor iona analita nalazi u otopini, iako se može spojiti i s plinskom kromatografijom (GC-MS ili GC-MS/MS).

Uvjeti i kolona korištena za LC-MS analizu (slika 3.13. i 3.14.) uzoraka isti su kao kod HPLC analize, samo što se umjesto trifluoroctene kiseline koristila mravlja kiselina. Za ovu analizu korištena je kromatografija visoke djelotvornosti sa DAD i MS detekcijom proizvođača *Shimadzu*. Za potvrdu molekulske težine vrha derivatiziranog pika produkta korištena je metoda praćenja iona. Maseni spektrometar opremljen je izvorom elektrosprej ionizacije (ESI) i djelovao je u pozitivnom polarnom načinu rada. Primijenjeni su slijedeći uvjeti elektrosprej

ionizacije: kapilarni napon iznosio je 1.10 kV, protok raspršivanjem plina 1.5 L min^{-1} , a protok plina za sušenje 15 Lmin^{-1} , pri temperaturi od $300 \text{ }^\circ\text{C}$.



Slika 3.13. Maseni spektrofotometar



Slika 3.14. Maseni spektrofotometar

3.3.4. Određivanje utjecaja koncentracije S-diola i R-diola na aktivnost galaktoza oksidaze

Ekperimenti za određivanje aktivnosti galaktoza oksidaze i utjecaja koncentracije alkoholnog supstrata na njezinu aktivnost provedeni su na slijedeći način: u prvom eksperimentu, u kvarcnu kivetu je pomoću poluautomatske pipete stavljeno (redom) određena količina kalijevog fosfatnog pufera, pripremljene otopine diola, POD-a te *o*-dianisidina. Sve zajedno je inkubirano na $25 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 5 minuta. Nakon inkubacije, dodana je određena količina GOD-a, sadržaj kvarcne kivete je promiješan naglim i brzim okretanjem gore-dolje te je kiveta umetnuta u spektrofotometar i započeto je snimanje apsorbancije na 436 nm tijekom

150 sekundi. Ukupni volumen pripremljene reakcijske otopine iznosio je 1000 μL . Analizom podataka nije utvrđena aktivnost galaktoza oksidaze.

Iako neuspješan, ovaj eksperiment bio je temelj za razvoj slijedećih ispitivanja. Kalijev fosfatni pufer zamijenjen je s natrijevim fosfatnim puferom, a *o*-dianisidin s ABTS-om. Apsorbancija je mjerena na 405 nm umjesto prvobitnih 436 nm. Kao supstrat korištena je racemična smjesa diola. Prethodna istraživanja su pokazala da je galaktoza oksidaza najaktivnija u natrijevom fosfatnom puferu. Dokazano je i da puferi sa slobodnim hidroksilnim OH skupinama (npr. fosfati) imaju interakcije s neaktivnim polureduciranim oblikom galaktoza oksidaze. Prema podacima iz literature, pripremljene su i otopina Triton-X 100 i albumin govedeg seruma (BSA), koje u narednim eksperimentima neće biti korištene.

Tablica 3.1. Otopine potrebne za provedbu eksperimenta s ABTS-om

Pripremljene otopine	Koncentracija otopine
amonijev sulfat	3,2 M
diol	101,04 mM
GOD	10 mg/mL
POD	0,903 mg/mL
ABTS	100 mM
BSA	$2,5 \cdot 10^{-3}$ g/ml
Triton-X 100	$5 \cdot 10^{-3}$ g/ml

U kvarcnu kivetu dodani su natrijev fosfatni pufer, otopina diola, POD, ABTS, BSA i Triton-X 100 te je kvarcna kiveta stavljena na inkubaciju na 25 °C tijekom 5 minuta. Nakon završetka inkubacije, dodan je GOD te je provedeno spektrofotometrijskom mjerenje apsorbancije pri 405 nm, a potom i pri 420 nm. Eksperiment je pokazao da se pri 420 nm zapaža aktivnost galaktoza oksidaze u prisutnosti diola te ABTS-a koji reducira vodikov peroksid na vodu i POD-a koji katalizira reakciju redukcije. Specifična aktivnost iznosila je 0,0091 U/mg. Proveden je i „slijepi test“ bez enzima koji nije dao pozitivne rezultate, tj. dobivena je potvrda da se u prisutnosti galaktoza oksidaze odvija enzimatska reakcija, tj. enzimatska kataliza. Snimljen je i cijeli spektar ABTS-a pri 420 nm i 405 nm te nisu nađene razlike u apsorbanciji. Ostala mjerenja izvedena su pri valnoj duljini od 420 nm.

U slijedećim mjerenjima varirana je koncentracija dodanog *S*-diola, a potom i *R*-diola, dok je koncentracija galaktoza oksidaze držana konstantnom.

3.3.5. Mjerenje utjecaja koncentracije bakra na aktivnost galaktoza oksidaze

Ispitan je je utjecaj bakra na aktivnost galaktoza oksidaze dodavanjem otopine bakrova (II) klorida u reakcijsku otopinu u kivetu. Bakar se u literaturi navodi kao kofaktor koji osigurava punu aktivnost galaktoza oksidaze. Korištene koncentracije bakra preuzete su također iz iste literature. Kao supstrat, korišten je *R*-diol.

3.3.6. Mjerenje utjecaja kisika na aktivnost galaktoza oksidaze tijekom oksidacije diola u aldehyd

Pripremljene su otopine *S*-diola, galaktoza oksidaze, ABTS-a, peroksidaze, bakrova (II) klorida te otopina amonijeva sulfata. Njihove koncentracije prikazane su u Tablici 3.2. Koncentrirana otopina *S*-diola razrjeđuje se sa natrijevim fosfatnim puferom, a u istom puferu pripremaju se otopine ABTS-a, GOD-a i bakrovog klorida. Otopina amonijeva sulfata razrjeđuje se ultra čistom vodom, te se potom u dobivenoj otopini otapa POD.

Tablica 3.2. Otopine potrebne za mjerenje utjecaja kisika

Pripremljene otopine	Koncentracija otopine
<i>S</i> -diol	58,003 mM
GOD	40 mg/mL
POD	0,903 mg/mL
ABTS	100 mM
CuCl ₂	5 mM
amonijev sulfat	3,2 M

Temeljna otopina alkohola *S*-diola miješana je na magnetskoj miješalici u Schottovoj boci i termostatorana na 26 °C. Brzina miješanja podešena je na 500 okretaja/min. Izmjerena je vodljivost otopine alkohola pri 26 °C te je ona iznosila 9,8 μS/cm. Udio kisika u otopini alkohola reguliran je upuhivanjem dušika.

Opis provedbe eksperimenta: pri različitim koncentracijama kisika, iz Schottove boce uzeto je 856 μ L otopine alkohola te je ona prenesena u kvarcnu kivetu te su potom redom dodani odgovarajući volumeni otopine POD-a, ABTS-a, bakrova (II) klorida i GOD-a. Kiveta je zatvorena, promućkana i stavljena u spektrofotometar na mjerenje.

3.3.7. Provođenje reakcija oksidacije i razvoj kaskade

Za potrebe daljnjih analiza, pokrenuta je reakcija oksidacije alkohola pomoću galaktoza oksidaze te je reakcija praćena tijekom 24 h. Reakcijska otopina pripremljena je miješanjem 100 mM natrijevog fosfatnog pufera, otopina *S*-diola koncentracije 200 mM, galaktoza oksidaze koncentracije 10 mg/mL i bakrova (II) sulfata koncentracije 0,05 mM. Iz reakcijske otopine, izuzimani su uzorci za analizu na HPLC-u i LC-MS-u i to u vremenu 0 h, 1 h, 6 h i 24 h nakon pokretanja reakcije.

Kromatogrami analiziranih uzoraka nakon reakcije oksidacije diola nalaze se u prilogu 1, slike 7.1. i 7.2. Primjer baždarnog pravca za određivanje koncentracije *S*-diola prikazan je u prilogu 1, slika 7.3.

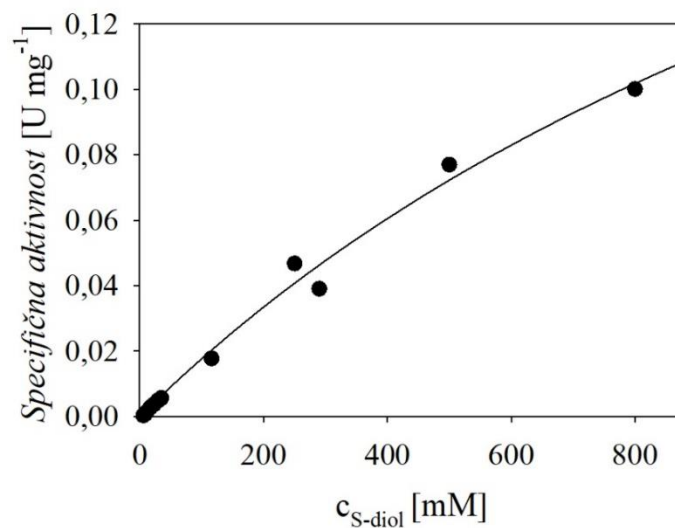
Također istovremeno je pokrenuta kaskadna reakcija oksidacije diola i aldolne adicije. Reakcijska otopina pripremljena je miješanjem istih kemikalija kao i za reakciju oksidacije te u istim koncentracijama uz dodatak dihidroksiacetona (DHA) koncentracije 200 mM, *D*-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA) koncentracije 5 mg/mL te katalaza. Uloga enzima *D*-fruktoza-6-fosfat aldolaze je kataliza aldolne adicije dihidroksiacetona na produkt reakcije oksidacije diola. Također, ova kaskadna reakcija praćena je tijekom vremena i izuzimani su uzorci nakon 0h, 1h, 6h i 24h od pokretanja reakcije i analizirani su na HPLC-u i LC-MS-u.

Kromatogram analiziranih uzoraka nakon provedbe kaskadne reakcije oksidacije i aldolne adicije nalaze se u prilogu 2, slika 7.4.

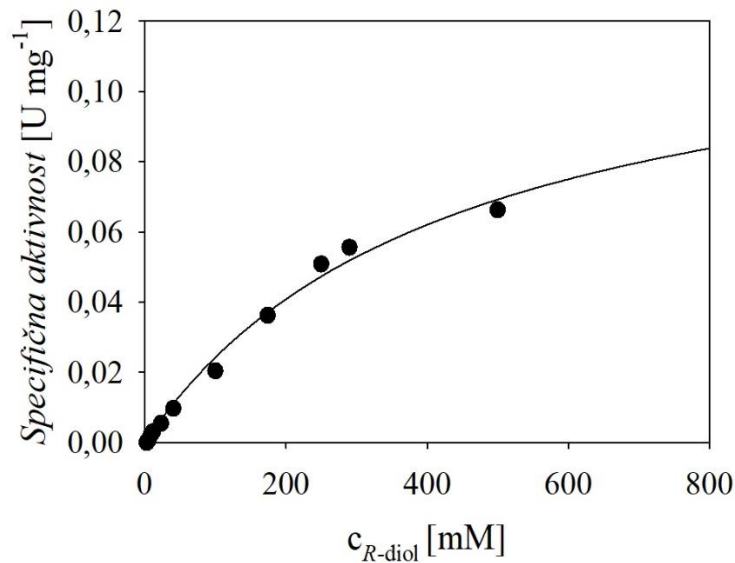
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Određivanje utjecaja koncentracije S-diola i R-diola na aktivnost galaktoza oksidaze

Ekperimentalni podaci dobiveni variranjem koncentracija S-diola i R-diola te analizom aktivnosti galaktoza oksidaze pomoću spektrofotometra, pokazuju da aktivnost galaktoza oksidaze raste s porastom koncentracije oba enantiomera (slike 4.1 i 4.2). Mjerenje aktivnosti u prisutnosti *o*-dianisidina nije uspješno provedeno vjerojatno zbog njegovog tamnosmeđeg obojenja koje je pobijalo boju galaktoza oksidaze koja je također smeđe nijanse ($\lambda = 426 \text{ nm}$).



Slika 4.1. Utjecaj koncentracije S-diola na specifičnu aktivnost galaktoza oksidaze (natrijev fosfatni pufer, pH 7.0, 25 °C, $c_{\text{GOD}} = 20 \text{ mg/mL}$)



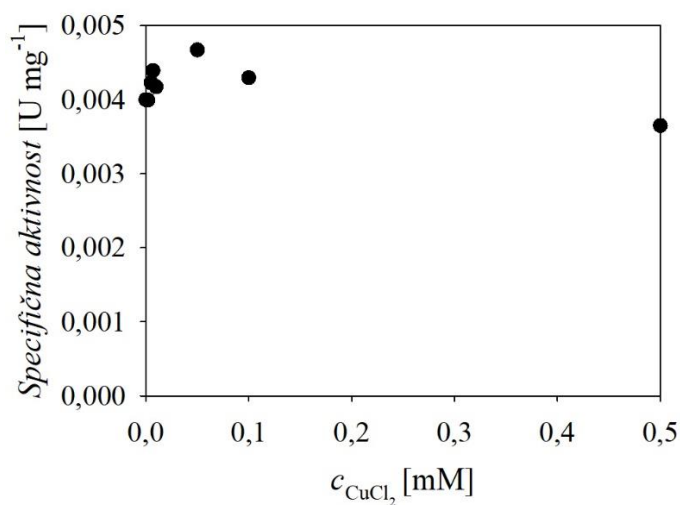
Slika 4.2. Utjecaj koncentracije *R*-diola na specifičnu aktivnost galaktoza oksidaze (natrijev fosfatni pufer, pH 7.0, 25 °C, $c_{\text{GOD}} = 20 \text{ mg/mL}$)

Eksperimentalni podaci (slike 4.1 i 4.2) su korišteni za procjenu kinetičkih parametara prikazanih u tablici 4.1. Iz njihovog trenda se može zaključiti da se radi o Michaelis-Menteničinoj kinetici. Kinetički parametri pokazuju da je afinitet enzima prema oba supstrata loš jer je Michaelisova konstanta vrlo visoka. Stoga je potrebna vrlo visoka koncentracija supstrata kako bi se postigla visoka aktivnost enzima. Ipak, koncentracija diola u otopini je ograničena njegovom topljivosti, pa se u realnosti u reaktoru ipak postižu manje aktivnosti enzima od onih maksimalnih navedenih u tablici 4.1.

4.2. Mjerenje utjecaja koncentracije bakra na aktivnost galaktoza oksidaze

Provedena su mjerenja aktivnosti galaktoza oksidaze u prisutnosti bakrovih iona. Dobiveni rezultati (slika 4.3) pokazuju kako bakrovi ioni nemaju preveliki utjecaj na aktivnost galaktoza oksidaze. U području koncentracija do 0,13 mM vidi se blagi porast aktivnosti, a pri većoj koncentraciji od 0,5 mM vidi se i blagi pad aktivnosti. Naime, određena se koncentracija bakra može naći već vezana u strukturi enzima, međutim tijekom postupaka izolacije i pročišćavanja često dolazi do gubitka kofaktora, pa je stoga ovaj eksperiment pokazao da su već vrlo niske koncentracije bakrovih iona u otopini od 0,5 mM dovoljne za postizanje

maksimalne aktivnosti enzima. U Prilogu 4. navedene su aktivnosti galaktoza oksidaze pri različitim koncentracijama bakrovih iona.

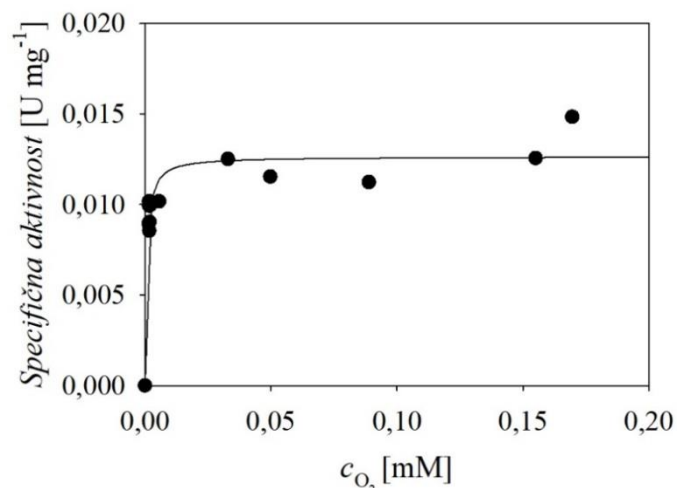


Slika 4.3. Utjecaj koncentracije bakrovih iona na specifičnu aktivnost galaktoza oksidaze (natrijev fosfatni pufer, pH 7.0, 25 °C, $c_{\text{GOD}} = 20$ mg/mL)

U daljnjim mjerenjima dodavana je otopina bakrova (II) sulfata kako bi se time garantirala maksimalna aktivnost enzima u reaktoru.

4.3. Mjerenje utjecaja kisika na aktivnost galaktoza oksidaze tijekom oksidacije diola u aldehid

Utjecaj kisika na aktivnost galaktoza oksidaze vidljiv je na slici 4.4. Vidljivo je da smanjenjem koncentracije kisika u otopini aktivnost galaktoza oksidaze se smanjuje, pri koncentraciji od 0 mM, galaktoza oksidaza ne pokazuje nikakvu aktivnost. To je bilo i za očekivati s obzirom da oksidaze zahtijevaju kisik kao supstrat u reakciji. Stoga bez kisika nema reakcije. Prikazani eksperimentalni podaci pokazuju trend Michaelis-Menteničine kinetike te je ovaj model korišten za procjenu Michaelisove konstante za kisik prikazane u tablici 4.1. Kako se radi o vrlo niskoj vrijednosti konstante ($K_m^{\text{O}_2}$) može se zaključiti da će enzim i u otopini nezasićenoj kisikom pokazivati maksimalnu aktivnost. U praksi je to za oksidaze vrlo važno jer aeracija značajno komplicira izvedbu reaktora, te može negativno utjecati na stabilnost proteina.



Slika 4.4. Utjecaj koncentracije kisika na specifičnu aktivnost galaktoza oksidaze (natrijev fosfatni pufer, pH 7.0, 25 °C, $c_{GOD} = 40$ mg/mL)

Tablica 4.1. Procijenjeni kinetički parametri za oksidaciju diola kataliziranu s galaktoza oksidazom.

Parametar	Mjerna jedinica	Vrijednost
$V_m^{S\text{-diol}}$	U/mg	$0,320 \pm 0,068$
$K_m^{S\text{-diol}}$	mM	$1716,1 \pm 486,8$
$V_m^{R\text{-diol}}$	U/mg	$0,275 \pm 0,038$
$K_m^{R\text{-diol}}$	mM	$1146,3 \pm 192,1$
$K_m^{O_2}$	μ M	$0,613 \pm 0,131$

4.4. Oksidacija diola i kaskadna reakcija u kotlastom reaktoru

Za potrebe daljnjeg istraživanja, provedena je oksidacija diola i kaskadna reakcija oksidacije i aldolne adicije u kotlastom reaktoru. Reakcije su praćene pomoću HPLC-a i LC-MS masene spektrometrije. Praćenjem reakcija na HPLC-u, koristeći pritom derivatizacijske metode, utvrđeno je da dolazi do konverzije supstrata, međutim putem LC-MS analize nije dokazano prisustvo željenog produkta (aldehida, odnosno aldola u kaskadnoj reakciji). Na LC-MS kromatogramu pojavljuje se pik na na RT 20.672 min (prilog 1., slika 7.2.) koji se smanjuje tijekom reakcije. Taj pik odgovara dihidroksiacetonu. Može se zaključiti da u reakciji dolazi do oksidacije dihidroksiacetona, te zbog ove neželjene reakcije, nije moguće dobiti aldolni produkt.

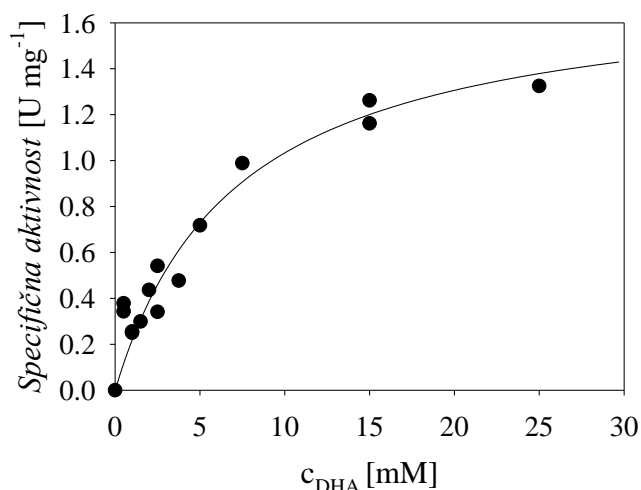
Ovaj eksperiment pokazuje da je za dobivanje željenog aldolnog produkta potrebno koristiti neki drugi enzim umjesto galaktoza oksidaze za oksidaciju diola koji neće oksidirati dihidroksiaceton, ali također neće uzrokovati niti neke druge dodatne neželjene reakcije.

4.5. Dihidroksiaceton kao supstrat

Provedba reakcije oksidacije *S*-diola u reaktoru bila je neuspješna. Analiza dobivenih kromatograma i masenih spektara pokazala je da niti jedan pik koji raste tijekom reakcije ne odgovara očekivanom produktu.

Analizom reakcije oksidacije te kaskadne reakcije oksidacije i aldolne adicije utvrđeno je da je dihidroksiaceton (DHA) primarni supstrat za galaktoza oksidazu, odnosno da je specifičnost galaktoza oksidaze jače izražena prema dihidroksiacetonu nego prema alkoholnom supstratu.

Navedena tvrdnja potvrđena je provođenjem analize utjecaja koncentracije dihidroksiacetona na aktivnost galaktoza oksidaze. Mjerenje je provedeno u istim uvjetima kao i ostala mjerenja. Varirane su koncentracije dihidroksiacetona uz konstantnu koncentraciju galaktoza oksidaze. Iz podataka prikazanih na slici 4.5. se može vidjeti trend Michaelis-Menteničine kinetike, a u tablici 4.2. su procijenjeni kinetički parametri ovog modela. Potvrđena je veća specifična aktivnost nego kod alkoholnog supstrata, kao i značajno bolji afinitet enzima prema DHA kao supstratu, što znači da je provedba kaskadne reakcije vrlo upitna radi neželjene oksidacije kosupstrata potrebnog za aldolnu adiciju.



Slika 4.5. Utjecaj koncentracije dihidroksiacetona na aktivnost galaktoza oksidaze (natrijev fosfatni pufer, pH 7.0, 25 °C, $c_{\text{GOD}} = 20$ mg/mL)

Tablica 4.2. Procijenjeni kinetički parametri za oksidaciju DHA kataliziranu s galaktoza oksidazom

Parametar	Mjerna jedinica	Vrijednost
V_m	U/mg	$1,774 \pm 0,130$
K_m^{DHA}	mM	$7,167 \pm 1,137$

5. ZAKLJUČAK

Enzimi i enzimski katalizatori imaju vrlo široki spektar primjene za različita istraživanja, ali i za industrijsku primjenu. U ovom radu dokazana je aktivnost galaktoza oksidaze prema alkoholnom supstratu, diolu. Aktivnost galaktoza oksidaze mjerena je spektrofotometrijski, uz prisutnost ABTS-a koji je spriječio inhibiciju galaktoze oksidaze prevodeći vodikov peroksid, nusprodukt oksidacije alkohola, u vodu. Provođenjem enzimski katalizirane oksidacije alkohola, dokazano je da uistinu postoje brojni faktori koji utječu na uspješno provođenje reakcije, što u konačnici utječe na složenost reakcije. Povećanjem koncentracije alkoholnog supstrata, aktivnost galaktoza oksidaze raste do zasićenja aktivnog mjesta enzima. Prisutnost kisika ima veliki utjecaj na aktivnost galaktoza oksidaze, pa tako u uvjetima bez kisika, ona potpuno gubi svoju aktivnost prema supstratu. Prisutnost bakrovih iona vrlo je važna za aktivnost galaktoza oksidaze te već niske koncentracije bakrovih iona osiguravaju punu aktivnost enzima. Provedena je i kaskadna reakcija oksidacije i aldolne adicije koja je, nakon analize, pokazala kako galaktoza oksidaza pokazuje veću specifičnost prema dihidroxiacetonu, nego prema alkoholnom supstratu.

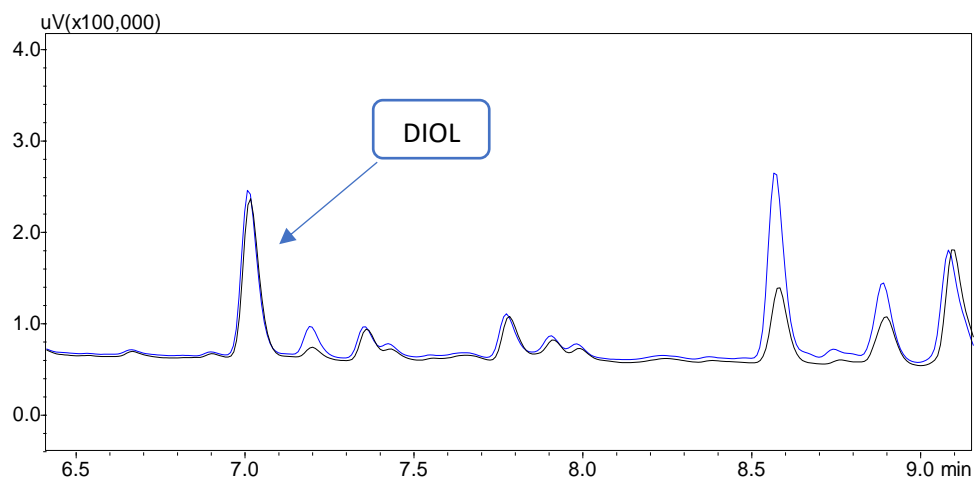
6. LITERATURA

- [1] W. Saibi, S. Abdeljalil, K. Masmoudi, A. Gargouri, Biocatalysts: Beautiful creatures, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 426 (2012), 1-5
- [2] A. Zaks; Industrial biocatalysis, *Current Opinion in Chemical Biology* 5 (2001), 130–136
- [3] D. J. Pollard, J. M. Woodley; Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, *Coordination Chemistry Reviews* 252 (2008) 659–701
- [4] A. Trincone; Potential biocatalysts originating from sea environments, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 66 (2010) 241–256
- [5] L. Stryer ; *Biokemija*, Školska knjiga, Zagreb 1991., str. 90.-102.
- [6] www.shtreber.com/amino-kiseline-i-proteini (pristup 5.kolovoz 2018.)
- [7] S.H. Pine; *Organic Chemistry - Fifth Ed.*, McGraw-Hill, 1987., str. 844-847
- [8] A. T. Pedersen, W. R. Birmingham, G. Rehn, S. J. Charnock, N. J. Turner, J. M. Woodley; Process Requirements of Galactose Oxidase Catalyzed Oxidation of Alcohols, *Organic Process Research & Development* 19(11) (2015) 1580–1589
- [9] A. M. Klibanov, B. N. Alberti, M. A. Marletta; Stereospecific oxidation of aliphatic alcohols catalyzed by galactose oxidase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2 (1987) 804-808
- [10] Z. Findrik, A. Vrsalović Presečki, Đ. Vasić-Rački; The influence of aeration on activity and operational stability of two snake venom amino acid oxidases, *Biochemical Engineering Journal* 60 (2012) 91– 98
- [11] E. Garcia-Junceda, , *Multi-Step Enzyme Catalysis: biotransformations and chemoenzymatic synthesis*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2008., str. 109-110.
- [12] A. L. Concia, C. Lozano, J. A. Castillo, T. Parella, J. Joglar, P. Clapes; *D*-Fructose-6-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Cascade Chemical-Enzymatic Preparation of Sugar-Related Polyhydroxylated Compounds, *Chemistry a European Journal* 15 (2009), 3808 – 3816
- [13] T. Dohi, Y. Kita; *Oxidizing Agents, Iodine Chemistry and Applications*, First Ed.. Ed T. Kaiho. John Wiley & Sons, Inc., 2015., str. 227.-301.

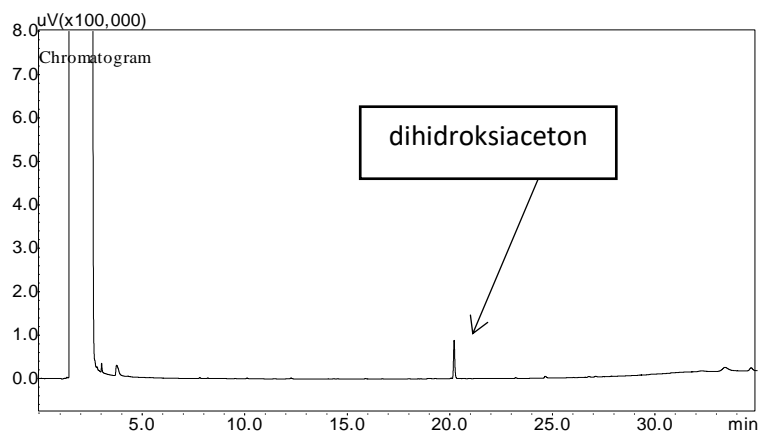
- [14] J. D. More, N. S. Finney; A Simple and Advantageous Protocol for the Oxidation of Alcohols with *o*-Iodoxybenzoic Acid (IBX), *Organic Letters* 4(17) (2002), 3001-3003
- [15] S. Luterotti , Uvod u kemijsku analizu, 3. izd., Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2009., str. 222-224
- [16] J.H. Gross: Introduction U Mass spectrometry, Springer-Verlag, Berlin, 2004., str 1-6.
- [17] D. Stevenson, A. R. Jones; Production of (*S*)-3-chlorolactaldehyde from (*S*)- α -chlorohydrin by boar spermatozoa and the inhibition of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase *in vitro*, *Journals of Reproduction & Fertility Ltd* 74 (1985), 157-165
- [18] A. Liese, M. Villela Filho; Production of fine chemicals using biocatalysis, *Current Opinion in Biotechnology* 10 (1999), 595–603

7. PRILOZI

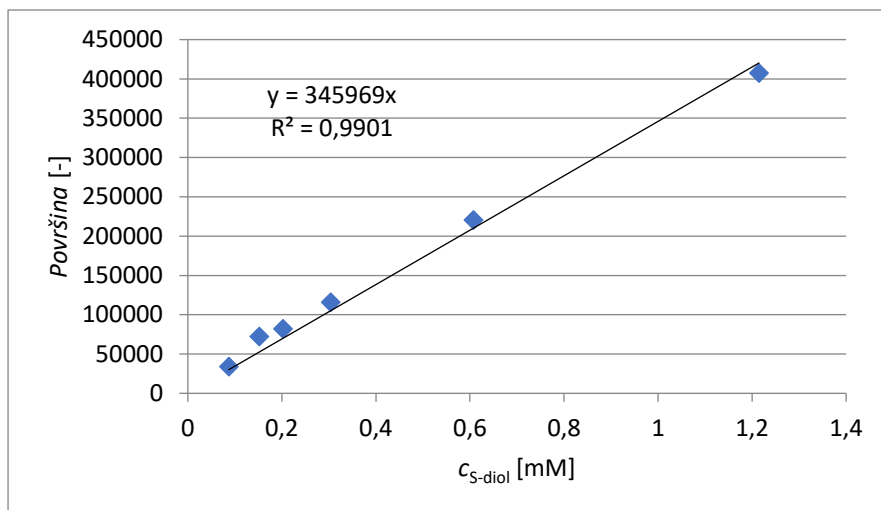
PRILOG 1. Oksidacija alkohola pomoću galaktoze oksidaze



Slika 7.1. HPLC kromatogram analiziranog uzorka nakon provedbe reakcije oksidacije alkohola diola

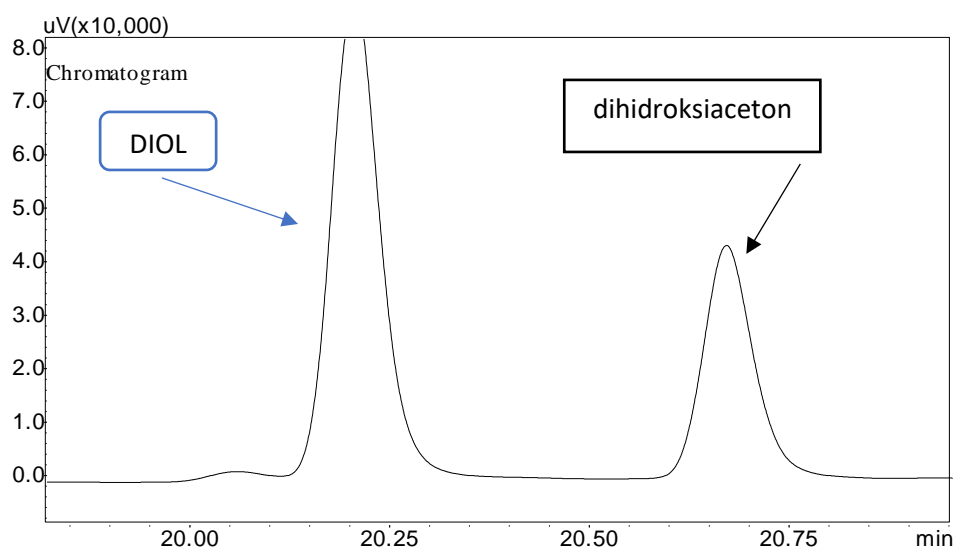


Slika 7.2. GC-MS kromatogram analiziranog uzorka nakon provedbe reakcije oksidacije diola



Slika 7.3. Baždarni pravac za određivanje koncentracije S-diola tijekom reakcije oksidacije

PRILOG 2. Provedba kaskadne reakcije



Slika 7.3. Kromatogram analiziranog uzorka nakon provedbe kaskadne reakcije

