

# Kemo-enzimatska kaskadna sinteza aldolnog produkta

---

**Burazer, Lucija**

**Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:046202>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-09**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Lucija Burazer

KEMO-ENZIMATSKA KASKADNA SINTEZA ALDOLNOG  
PRODUKTA

ZAVRŠNI 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

## Sažetak

U ovom radu proučavana je kaskadna reakcija koja se sastoji od oksidacije alkohola 3-klor-1,2-propandiola i aldolne adicije dihidroxiacetona na produkt oksidacije. Prvi stupanj je kemijska oksidacija alkohola do aldehida pomoću jodoksibenzojeve kiseline, a drugi stupanj aldolna adicija katalizirana enzimom D-fruktoza-6-fosfat aldolazom da bi se dobio odgovarajući aldolni produkt.

Kemijskom oksidacijom uspješno je dobiven aldehyd, a aldolni produkt se nije uspio sintetizirati.

Željeni aldolni produkt je mogući prekursor za iminošećere te je stoga ova reakcija od znanstvenog interesa.

**Ključne riječi:** kemijska oksidacija, enzimatska oksidacija, enzim, alkohol, aldol

## **Abstract**

The paper describes the oxidation of the alcohol 3-chloro-1,2-propanediol to the aldol product. The oxidation was carried out by a two stage cascade reaction. The first stage is the chemical oxidation of the alcohol to the aldehyde by iodoxybenzoic acid (IBX), and the second stage is the aldol addition of dihydroxyacetone (DHA) to the resulting aldehyde. The second stage is enzymatic oxidation because it is catalyzed by the enzyme D-fructose-6-phosphate aldolase (FSA) to give the corresponding aldol product.

Aldehyde was successfully obtained by chemical oxidation, however the aldol product could not be synthesized.

The desired aldol product is a precursor for iminosugars and therefore this reaction is of scientific interest.

**Key words:** chemical oxidation, enzymatic oxidation, enzyme, alcohol, aldol

## Sadržaj

1.Uvod .....	1
2.Opći dio .....	2
2.1. Biokatalizatori.....	2
2.1.1. Prednosti biokatalizatora .....	3
2.1.2. Nedostaci biokatalizatora .....	4
2.1.3. Podjela biokatalizatora .....	5
2.1.4. Aldolaze .....	6
2.1.5. FSA.....	7
2.2. Oksidacija IBX-om .....	7
2.3. Kaskadne reakcije .....	8
3. Eksperimentalni dio .....	9
3.1. Aparatura .....	9
3.1.1. Homogenizator .....	9
3.1.2. Centrifuga.....	9
3.1.3. pH metar .....	10
3.1.4 Aparatura za provođenje kemijske oksidacije alkohola .....	10
3.1.5. Aparatura za rotacijsku vakuum evaporaciju .....	11
3.1.6. Tresilica.....	12
3.1.7. Plinska kromatografija (GC) .....	13
3.1.8. Visoko učinkovita kapljevinska kromatografija (HPLC).....	13
3.1.9. Kapljevinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa .....	14
3.2. Analitičke metode .....	15
3.2.1. Određivanje koncentracije alkohola plinskom kromatografijom tijekom provedbe kemijske oksidacije .....	15
3.2.2. Određivanje koncentracije aldolnog produkta HPLC-om.....	16
3.2.3. Potvrda molekulske mase produkta LC-MS-om.....	17

3.3. Opis provođenja eksperimenta.....	17
3.3.1. Kemijska oksidacija alkohola 3-klorpropan-1,2-diola s IBX-om .....	17
3.3.2. Enzimski aldolna adicija s enzimom FSA.....	18
4. Rezultati i rasprava .....	19
4.1. Kemijska oksidacija alkohola jodoksibenzojevom kiselinom (IBX) .....	19
4.2. Enzimski aldolna adicija .....	20
5. Zaključak .....	24
6. Popis simbola.....	25
7. Prilog .....	25
7.1. Korištene kemikalije .....	25
7.2. Korišteni enzim.....	25
7.3. Baždarni pravac .....	25
8. Literatura .....	26

## 1.Uvod

Enzimi su vrlo djelotvorni katalizatori koji čine biokatalitičke procese konkurentnijima od kemijskih kataliza. Od početaka biokatalitičkog inženjerstva, razvijeno je i komercijalizirano niz procesa za proizvodnju vrijednih proizvoda. Unatoč velikom potencijalu enzima, njihova primjena na industrijskoj razini nailazi na probleme najviše zbog nepoželjnih svojstava u smislu stabilnosti, katalitičke učinkovitosti i specifičnosti. Kako bi se takvi nedostaci prevladali, znanstvenici su ispitali različite metode kao što su izolacija enzima iz prirodnih izvora, nasumične mutacije, imobilizacija. Tijekom osamdesetih i devedesetih godina prošlog stoljeća biokataliza se dodatno razvila zbog otkrića mnogo novih supstrata što je omogućilo sintetiziranje novih intermedijera. Nakon toga biokatalitički procesi su postepeno počeli zamjenjivati tradicionalne kemijske procese u mnogim područjima, pogotovo u industriji finih kemikalija, farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji.[1]

S razvojem novih tehnologija u biokatalitičkom inženjerstvu te sve većeg ekonomskog pritiska i društvene brige za okoliš, primjena enzima svakako će sve više rasti.[1]



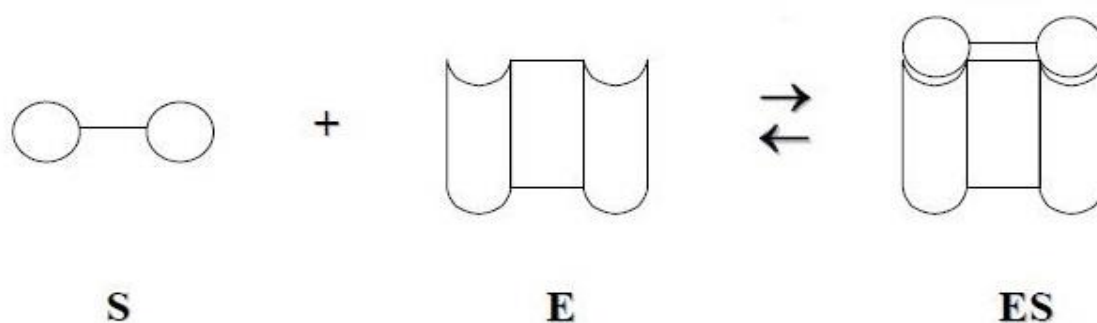
## 2.Opći dio

### 2.1. Biokatalizatori

Enzimi odnosno biološki katalizatori su globularni proteini koji ubrzavaju biokemijske reakcije u živoj stanici. Enzimi su organizirani u četiri strukturna nivoa. Primarnu strukturu čini slijed aminokiselina međusobno povezanih peptidnom vezom u polipeptidne lance. Međusobnim savijanjem polipeptidnih lanaca u spirale odnosno uzvojnice nastaje sekundarna struktura. Uzvojnice se stabiliziraju formiranjem vodikovih veza između amidnih i karbonilnih skupina peptida. Daljnim vezanjem preko kovalentnih veza, uzvojnice se dodatno uvijaju i tako čine tercijsku strukturu. Kvaterna struktura nastaje spajanjem u veće aglomerate pomoću disulfidnih mostova. [2]

Djelovanje enzima započinje tvorbom kompleksa sa supstratom. U tom je kompleksu enzim vezan uz supstrat Van der Waalsovima i elektrostatskim privlačenjem, vodikovom vezom ili rjeđe, kovalentnom vezom. Kompleksiranje mora biti brzo i reverzibilno, tako da se produkt odvaja od enzima odmah nakon reakcije i oslobađa enzim za daljnje katalitičko djelovanje. Kompleks nastaje na aktivnom mjestu enzima. To je područje enzima koje pobuđuje određenu reakciju. Aktivno mjesto mora imati pogodne atome i konfiguraciju za vezanje i katalizu.[3]

Specifičnost odnosa enzim-supstrat opisuje se kao mehanizam brava i ključ enzimske katalize (slika 2.1.).[3]

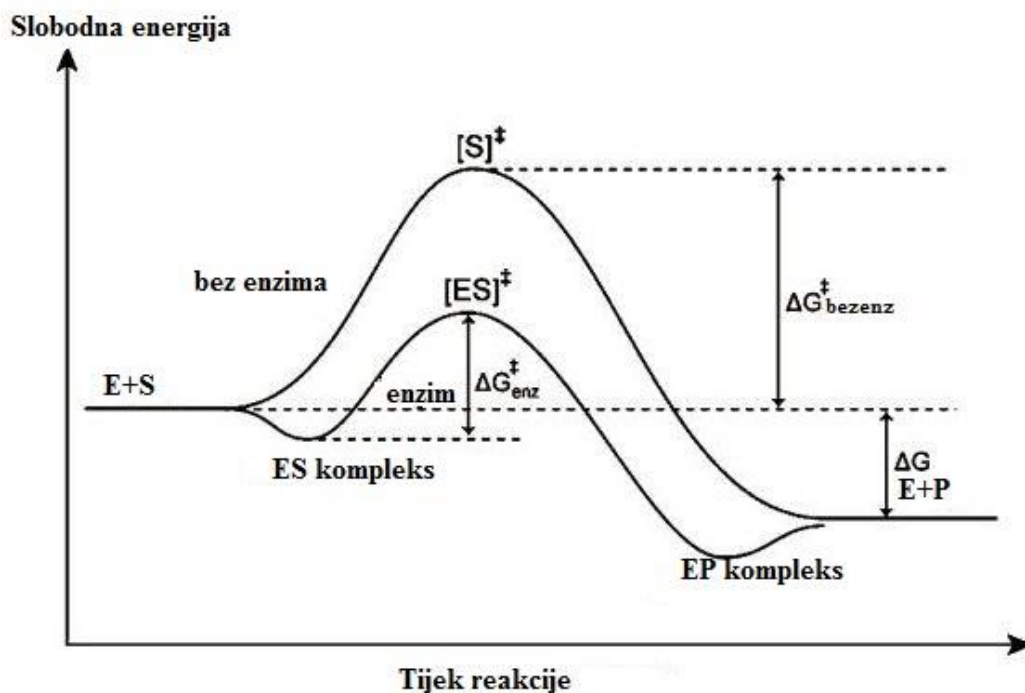


**Slika 2.1.** Shema mehanizma "ključ-brava" djelovanja enzima[3]

Međudjelovanja enzima i supstrata su trodimenzijska, što može objasniti činjenicu da jedan od enantiomera supstrata može biti biološki aktivan, a drugi inaktivan. Danas je dokazano da u nekim slučajevima nije nužna potpuna komplementarnost enzima i supstrata, jer do točnog pristajanja dolazi prilikom tvorbe kompleksa. U kompleksu enzim-supstrat također postoji i optimalno usmjerenje za reakciju, a valja uočiti i da enzim ne mijenja relativne energije reaktanata i produkata, već mijenja samo energiju aktivacije koja utječe na brzinu reakcije.[3]

### 2.1.1. Prednosti biokatalizatora

Sve enzimatski katalizirane reakcije se provode uz visoku reakcijsku selektivnost. Enzimi daleko nadmašuju ostale katalizatore s obzirom na kemoselektivnost, regioselektivnost i enantioselektivnost. Enzimi djeluju pri sobnim temperaturama te neutralnim pH vrijednostima. Objašnjenje kako enzimi mogu katalizirati reakcije u blagim uvjetima poput uvjeta u živoj stanici dao je L. Pauling. Enzim (E) i supstrat (S) formiraju kompleks (ES) mehanizmom "ključ - brava" (slika 2.2.). Supstrat se aktivira te dolazi do nastanka prijelaznog stanja ( $[ES]^\ddagger$ ) gdje je aktivacijska energija ( $\Delta G_{enz}^\ddagger$ ) značajno smanjena zbog stabilizacijskog djelovanja enzima u usporedbi s aktivacijskom energijom ( $\Delta G_{bezenz}^\ddagger$ ) reakcije bez enzima koja se odvija preko prijelaznog stanja  $[S]^\ddagger$ . Enzimski kataliza uobičajeno povećava brzinu reakcije  $10^6$  do  $10^{12}$  puta.[4][5]



**Slika 2.2.** Mehanizam katalize [4]

Enzimi nisu toksični. Obnovljivi su i prirodni katalizatori. Često se mogu kombinirati s drugim kemijskim katalizatorima pri čemu nastaje novi kemo-enzimatski proces. Također enzimi često daju znanstvenicima ideje za razvoj biomimetičke kemije čijim će se razvojem zasigurno unaprijediti reakcije.[5]

S obzirom da se enzimi dobivaju iz prirodnih izvora, a u biokatalizama se mogu koristiti ekološki benigni reagensi poput vode, kisika iz zraka, vodikov peroksid, ugljikov dioksid, enzimi su značajan dio u razvoju "zelene kemije". Tomu pridonose niski utrošak energije zbog blagih uvjeta te smanjenje sporednih reakcija i nusprodukata zbog svojstva selektivnosti.[5]

### 2.1.2. Nedostaci biokatalizatora

Unatoč nizu prednosti, biokatalizatori nailaze na probleme u širokoj primjeni u industrijskim procesima. Tri su glavna razloga:[5]

1. Razvoj biokatalize je spor, često je posljedica slučajnosti te ne slijedi pravila.
2. Biokatalizatori imaju vrlo usko područje stabilnosti s obzirom na temperaturu, otapala, pH vrijednosti.

3. Kontinuirani problem u biokatalizi je mali broj dobro karakteriziranih enzima u odnosu na kemijske katalizatore. Uz to, mali broj enzima je komercijalno dostupno čime se dodatno sprečava razvoj biokatalize.[5]

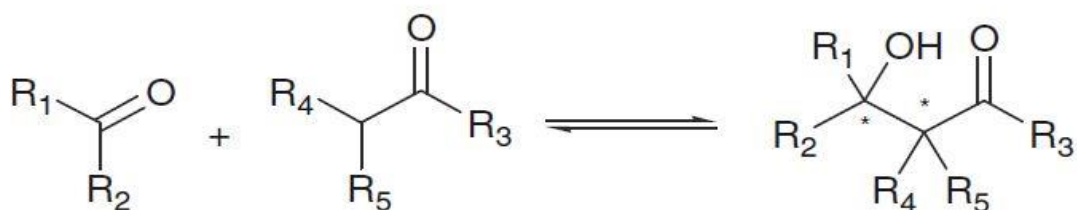
### 2.1.3. Podjela biokatalizatora

Enzimi su klasificirani prema pravilima IUBMB-a (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) u šest grupa:[6]

1. Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije oksidacije/redukcije i uključuju prijenos elektrona, atoma vodika i kisika.
2. Transferaze kataliziraju prijenos funkcionalne skupine od donora do prikladnog akceptora. S obzirom na funkcionalne skupine transferaze se dijele na devet podgrupa. Transferaze imaju važnu ulogu u staničnom metabolizmu.
3. Hidrolaze kataliziraju reakciju hidrolize i sudjeluju u kataboličkim procesima tako što dopremaju hranjive tvari do stanice. Većina enzima od tehnološke važnosti pripada ovoj skupini.
4. Liaze kataliziraju nehidrolitičko i neoksidacijsko cijepanje kemijskih veza. Dodatno se dijele u sedam grupa prema podložnoj vezi: C-C, C-O, C-N, C-S, C-X, P-O, itd. Među liazama posebno se ističu aldolaze koje često djeluju na povratne reakcije formiranja C-C veze. Liaze se također proučavaju za asimetrične sinteze optički aktivnih organskih spojeva.
5. Izomeraze kataliziraju reakcije pretvorbe supstrata u odgovarajući izomer odnosno molekulu jednakog broja i vrste atoma. Mali broj izomera se tehnološki iskorištava.
6. Ligaze kataliziraju formiranje kovalentne veze između dvije molekule. Imaju važnu ulogu u unutarstaničnim sintezama. Nažalost trenutno nemaju širu tehnološku uporabu.[6]

### 2.1.4. Aldolaze

Aldolaze su grupa enzima koja formira vezu između atoma ugljika. Stereoselektivne aldolne reakcije adicije katalizirane aldolazama predstavljaju zanimljivu alternativu naspram konvencionalnih kiralnih organsko kemijskih metoda za kemijsku i farmaceutsku industriju. Aldolaze su specifična grupa liaza koje kataliziraju reverzibilne stereoselektivne adicije donorskog spoja (nukleofila) na akceptorski spoj (elektrofil). Shema općenitog reakcijskog mehanizma kataliziranog aldolazama (slika 2.3.):[7]



**Slika 2.3.** Općeniti reakcijski mehanizam kataliziran aldolazama[7]

Mehanizam uključuje napad deprotoniranog  $\alpha$ -C atoma aldehida ili ketona na karbonilni atom drugog aldehida ili ketona dajući  $\beta$ -hidroksialdehid ili  $\beta$ -hidroksiketon. Donorski spoj za aldolaze je često nepromjenjiv, dok se akceptor može mijenjati što omogućuje korištenje biokatalizatora u asimetričnoj sintezi.[7]

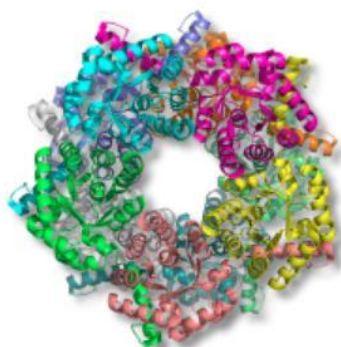
Aldolaze se mogu klasificirati, s obzirom na specifičnost prema donorskoj skupini, u pet grupa: piruvat aldolaze, dihidroksiaceton fosfat (DHAP) aldolaze, dihidroksiaceton (DHA) aldolaze, glicin/alaanin aldolaze i acetaldehid aldolaze.[7]

Biokataliza pomoću aldolaza nudi jedinstveno stereoselektivno i zeleno sredstvo za odvijanje stvaranja C-C veze. Nedavni napredak u ovom području, potpomognut proteinskim inženjerstvom i sekvencioniranjem proteina, uvelike je unaprijedilo sintezu od malih kiralnih polifunkcionalnih molekula do vrlo kompleksnih oligosaharidnih analoga s potencijalnim farmaceutskim značajem. Nadalje, aldolaze su se pokazale bitne za dobivanje novih tipova struktura omogućujući otkrića lijekova.[7]

### 2.1.5. FSA

D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA) (slika 2.4.) je enzim dobiven izolacijom iz bakterije *Escherichia coli*. FSA je robustan i sintetički koristan enzim s velikim potencijalom za visoko stereoselektivne aldolne adicije DHA, hidroksiacetona (HA) i hidroksibutanona prema velikom broju aldehida. Vrlo bitna karakteristika ovog enzima jest da lako prima nefosforilirani DHA kao donor, umjesto fosforiliranog DHAP koji je kemijski nestabilan i skup spoj i na kraju zahtjeva posebnu reakciju defosforilacije što stvara dodatne troškove.[7]

Nadalje, FSA je vrlo značajan enzim jer osim hidroksiketona može prihvatiti i glikolaldehide (GA) kao donorske supstrate što otvara vrata razvoju trenutnoj i stereoselektivnoj biokatalitičkoj sintezi aldola i sličnih kompleksnih analoga i derivata.[7][8]



**Slika 2.4.** Struktura FSA[8]

## 2.2. Oksidacija IBX-om

*O*-jodobenzojeva kiselina, IBX, je blagi oksidans za konverziju alkohola u aldehide ili ketone. IBX je netopljiva u većini organskih otapala osim u DMSO-u (dimetil sulfoksid). Unatoč tomu ona je vrlo efektan heterogeni oksidans u većini organskih otapala.[9]

Uobičajeno, IBX se otopi u DMSO-u za oksidaciju alkohola te se reakcija provodi na sobnoj temperaturi. Ponekad dodatak drugih otapala u reakcijsku smjesu dovodi do precipitacije IBX-a zbog čega oksidacija uspori ali svejedno bude efikasna. Zapravo se oksidacije s IBX-om mogu provoditi u drugim organskim otapalima s malim dodatkom dimetil sulfoksida, u kojima je IBX netopljiv. Suprotno očekivanom IBX oksidacije su

uspješnije kada se provode pri povišenim temperaturama i u smjesi organskih otapala, nego u otopini DMSO pri sobnoj temperaturi. Kao otapala najčešće se koriste etil acetat i 1,2-dikloroetan jer ne reagiraju s IBX-om niti otapaju sporedne produkte koji nastaju od IBX-a. To omogućuje vrlo efikasan reakcijski proces koji se sastoji od zagrijavanja alkohola u otopini navedenih otapala s IBX-om nakon čega slijedi jednostavna filtracija i koncentriranje željenog produkta.[10]

Također, nakon provedene oksidacije sporedni produkti IBX-a mogu se reoksidirati u aktivni oblik IBX-a. Regenerirani IBX ima jednaka svojstva i oksidacijsku snagu stoga se može ponovno koristiti. Na taj način netopljivost IBX-a umjesto nedostatka postaje njezina prednost.[10]

### **2.3. Kaskadne reakcije**

Kaskadne reakcije su slijedne kemijske transformacije u kojima je početni supstrat osmišljen tako da podliježe reakciji dajući produkt koji postaje supstrat za slijedeću reakciju u nizu. Postupak se ponavlja sve dok krajnji produkt ne postigne stabilnost u reakcijskim uvjetima. Kaskadne reakcije ne zahtijevaju izolaciju nastalih intermedijera. Ovakvom provedbom kemijskih reakcija uštedi se na reagensima, katalizatorima, otapalima te vremenu i utrošenoj energiji. Zbog toga su kaskadne reakcije jedno od sredstava za postizanje zelene kemije i ekonomičnih procesa proizvodnje čistih i farmaceutskih produkata.[11]

### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Aparatura

##### 3.1.1. Homogenizator

Uzorci pripremljeni za analizu prethodno su homogenizirani na GENIUS 2 VORTEX IKA (slika 3.1).



Slika 3.1. Homogenizator

##### 3.1.2. Centrifuga

Centrifugiranje uzoraka provedeno je na centrifugi proizvođača *Hettich*, model Universal 320R (slika 3.2).



Slika 3.2. Centrifuga



### 3.1.3. pH metar

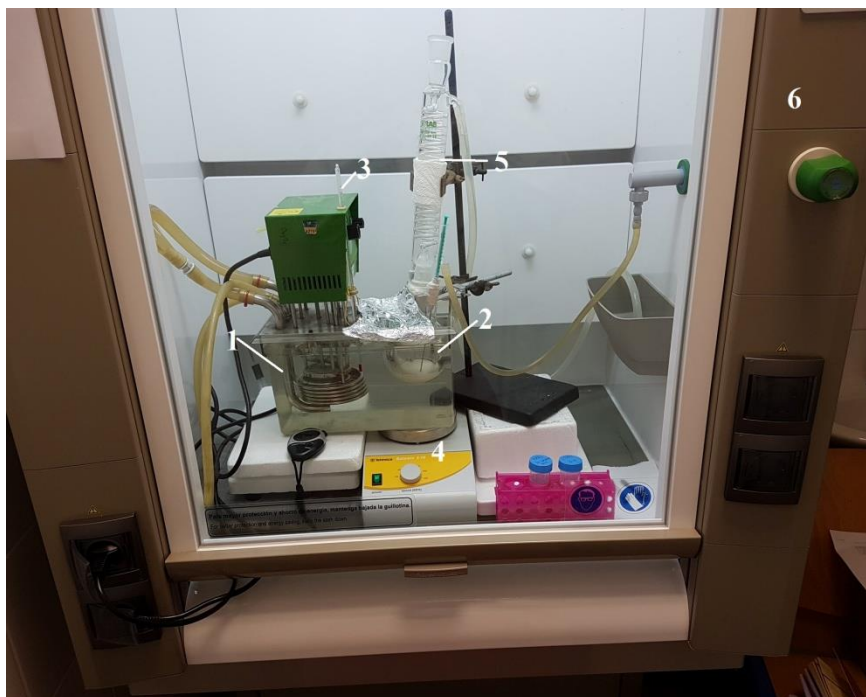
Za pripremu pufera i podešavanje pH vrijednosti otopine korišten je pH metar proizvođača *Schott Instruments* (slika 3.3).



Slika 3.3. pH metar

### 3.1.4 Aparatura za provođenje kemijske oksidacije alkohola

Kemijska oksidacija alkohola provedena je u tikvici uronjenoj u vodenu kupelj modela *Thermomix 1460*, pri stalnoj temperaturi koja je praćena s termometrom uronjenim u tikvicu. Na tikvicu je spojeno Liebigovo hladilo koje služi za kondenzaciju i povratak etil-acetata. Sadržaj tikvice miješao se magnetskom miješalicom proizvođača *Tehtnica* modela *Rotamix S-10*. Aparatura je bila smještena u digestoru (slika 3.4).



**Slika 3.4.** Aparatura za provođenje kemijske oksidacije alkohola: (1) vodena kupelj, (2) tikvica, (3) termometar, (4) magnetska miješalica, (5) Liebigovo hladilo, (6) digestor

### **3.1.5. Aparatura za rotacijsku vakuum evaporaciju**

Za koncentriranje uzorka i uklanjanje otapala korišten je rotavapor proizvođača *Heidolph* pri stalnoj temperaturi. Tikvica s uzorkom se rotira uronjena u vodenu kupelj. Pričvršćena je na sustav za hlađenje kroz koje prolazi otapalo. Otapalo hlađenjem prelazi u plinovito stanje, a zatim se kondenzira i sakuplja u tikvici za kondenzat. Rotacijska vakuum evaporacija omogućuje odvajanje otapala s niskim temperaturama vrelišta (slika 3.5).



**Slika 3.5.** Aparatura za rotacijsku vakuum evaporaciju: (1) tikvica s uzorkom, (2) sustav za hlađenje, (3) vodena kupelj, (4) tikvica za sakupljanje kondenzata

### 3.1.6. Tresilica

Prije analize na LC-MS-u produkt se miješao na tresilici, proizvođača *Biosan*, modelu PSU-10i (slika 3.6).



**Slika 3.6.** Tresilica

### 3.1.7. Plinska kromatografija (GC)

Tijek kemijske oksidacije alkohola s IBX-om praćen je na GC-u proizvođača Shimadzu, modela GC-2014 (slika 3.7).



Slika 3.7. GC

### 3.1.8. Visoko učinkovita kapljevinska kromatografija (HPLC)

Nakon provedene kemijske i enzimatske oksidacije, nastali produkt analiziran je na HPLC-u proizvođača Shimadzu s dodatnom opremom UV i RI detektora, istog proizvođača (slika 3.8).



**Slika 3.8. HPLC**

### **3.1.9. Kapljevinska kromatografija s tandemskom spektrometrijom masa**

Za potvrdu molekulske mase derivatiziranog produkta korišten je LC-MS proizvođača Shimadzu, model LCMS-2020 (slika 3.9).



**Slika 3.9. LC MS**

### **3.2. Analitičke metode**

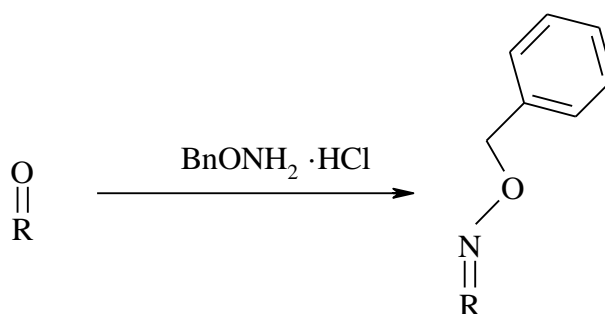
#### **3.2.1. Određivanje koncentracije alkohola plinskom kromatografijom tijekom provedbe kemijske oksidacije**

Koncentracija 3-klor-1,2-propandiola praćena je na Shimadzu plinskom kromatografu opremljenim s detektorom vodikova ionizirajućeg plamena na ZB-WAX koloni. Kolona je dimenzija 30 m x 0.53 mm i.d. x 1  $\mu\text{m}$ . Za analizu je korištena metoda vanjskog standarda. Pripremljene su 4 otopine etil-acetata razrijeđene redom 25, 40, 50 i 100 puta. Uzorci su otapani u etil acetatu. Korišten je helij kao plin nosioc pri protoku 17.6 mL min<sup>-1</sup>. Temperatura injektiranja je bila 80 °C i održavala se konstantnom tijekom 1 minute. Sa svakom slijedećom minutom temperatura je linearno rasla za 5 °C. Nakon što je postignuta temperatura od 230 °C, održavana je još 4 minute. Temperatura injektora je bila postavljena na 280°C, a temperatura detektora na 240 °C. Dobiveni su baždarni pravac (slika 7.1.) i baždarna krivulja (slika 7.2.) iz kojih je iščitana informacija s kojim

retencijskim vremenom pik alkohola izlazi. Time je omogućena analiza alkohola na GC-u i određeno je retencijsko vrijeme 3-klor-1,2-propandiola na 20.05 minuta.

### 3.2.2. Određivanje koncentracije aldolnog produkta HPLC-om

Tijek oksidacije i kaskadne reakcije praćen je na HPLC-u s UV-detektorom. Uzorci su prije analize derivatizirani kako bi se vidjeli u UV području pri valnoj duljini od 215 nm. Derivatizacija je provedena s *O*-benzilhidroksilamin hidrokloridom ( $\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$ ) (slika 3.10.).



**Slika 3.10.** Derivatizacija aldehida i aldola s  $\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$

5  $\mu\text{L}$  uzoraka otopljeno je u 50  $\mu\text{L}$  derivatizacijske otopine (130 mM  $\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$  otopljeno u otopini piridin:metanol:voda u volumnom omjeru 33: 15: 2). Nakon kratkog miješanja na homogenizatoru, dobivena otopina je održavana 5 minuta pri sobnoj temperaturi. Potom je dodano 500  $\mu\text{L}$  metanola nakon čega je uzorak centrifugiran 5 minuta pri 4 °C i 5000 okretaja po minuti. Na dnu epruvete istaložen je enzim, a s vrha je otpipetirano 400  $\mu\text{L}$  uzorka i preneseno u staklenu vialu za analizu.

Uzorci su analizirani na koloni Phenomenex Kinetex C18 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm) uz dvije mobilne faze. Mobilna faza A je bila otopina acetonitrila, vode i TFA (80:20:0.095 v/v), a mobilna faza B voda i TFA (0,1% v/v). Analiza je provedena gradijentnom metodom mijenjanjem koncentracije mobilne faze B od 90% do 0% tijekom 10 minuta. Zatim je koncentracija zadržavana na 0 % tijekom 2 minute. U sljedeće 3 minute slijedio je ponovni rast koncentracije mobilne faze B od 0 % do 90 % , a nakon postizanja 90 % -tne koncentracije zadržavana je još 1 minutu. Protok eluenta iznosio je 1.5 mL min<sup>-1</sup> pri 30 °C.

### 3.2.3. Potvrda molekulske mase produkta LC-MS-om

Kolona i uvjeti za LC-MS analizu bili su isti kao za HPLC osim što je umjesto TFA u mobilnoj fazi B korištena mravlja kiselina. LC-MS je dodatno opremljen izvorom elektrosprej ionizacije (ESI). Tijekom analize uzorci su bili pozitivno polarizirani. Primijenjeni su slijedeći uvjeti elektrosprej ionizacije: kapilarni napon iznosio je 1.10 kV, protok raspršivanjem plina  $1.5 \text{ L min}^{-1}$ , a protok plina za sušenje  $15 \text{ L min}^{-1}$ , pri temperaturi od  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

## 3.3. Opis provođenja eksperimenta

### 3.3.1. Kemijska oksidacija alkohola 3-klorpropan-1,2-diola s IBX-om

Za kemijsku oksidaciju alkohola otopljeno je  $420 \text{ }\mu\text{L}$  alkohola 3-klor-1,2-propandiola u  $48 \text{ mL}$  etil-acetata (EtAc) te je u smjesu dodano  $2.504 \text{ g}$  IBX-a. Oksidacija je provedena u aparaturi na slici 3.4. Prije spajanja u aparaturu, u tikvicu su stavljeni kamenčići za vrenje i magnet. Tikvica je spojena na Liebigovo hladilo. Hladilo je omogućavalo povratak u tikvicu onog dijela EtAc koji je tijekom reakcije isparavao. Tikvica je bila uronjena u vodenu kupelj. Ispod kupelji je bila smještena magnetska miješalica postavljena na  $300$  okretaja po minuti kako bi se omogućilo miješanje reakcijske smjese u tikvici. Kupelj je grijala reakcijsku smjesu na  $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Temperatura je praćena kontrolnim termometrom. Kada se postigla temperatura od  $48^{\circ}\text{C}$  uzet je nulti uzorak. Uzorak se uzimao staklenom iglom jer organski uzorci nepovoljno reagiraju s plastikom. Prije i poslije svakog korištenja staklena igla je dva puta isprana s EtAc. Nakon korištenja i ispiranja ostavljena je u digestoru da se osuši. Uzeti uzorak je morao biti pripremljen za analizu na GC-u. Bilo je potrebno otpipetirati  $30 \text{ }\mu\text{L}$  uzorka i promiješati na homogenizatoru prikazanim na slici 3.1. Potom je uzeta nova Eppendorf epruveta, otpipetirano je  $870 \text{ }\mu\text{L}$  EtAc i dodano  $30 \text{ }\mu\text{L}$  uzorka. Tako obrađeni uzorak je opet promiješan na homogenizatoru, a zatim  $5$  minuta centrifugiran pri  $1400$  okretaja po minuti. Centrifugiranjem je na dno epruvete istaložen IBX pa se mogao uzeti čisti uzorak. Uzeto je  $700 \text{ }\mu\text{L}$  uzorka i stavljeno u bočicu za analizu na GC-u.

Pri  $76 \text{ }^{\circ}\text{C}$  reakcijska smjesa je počela vrijeti. Pokrenuta je štoperica kojom se pratilo vrijeme reakcije.  $15$  minuta od početka vrijenja uzet je prvi uzorak. Uzorak je pripremljen



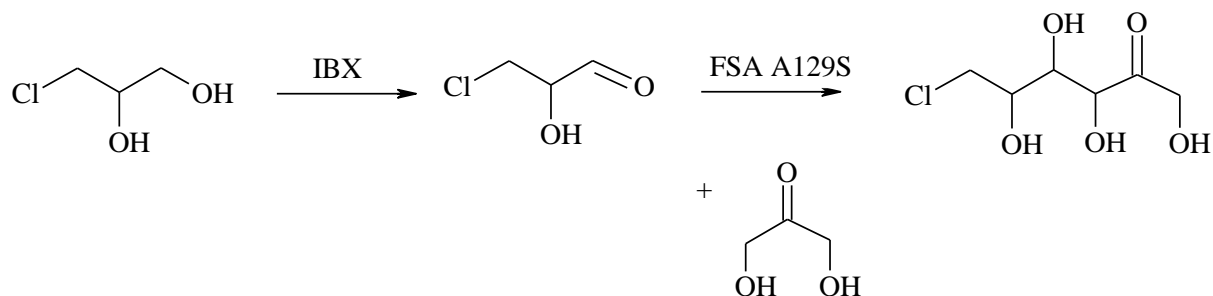
za GC analizu kako je opisano za nulti uzorak. Slijedeći uzorci su uzeti redom nakon 30 min, 60 min, 90 min, 120 min itd. Nakon što se reakcija provodila 7 h zaustavljena je, jer se prema rezultatima s GC-a koncentracija alkohola prestala smanjivati. Preostalom sadržaju u tikvici dodan je natrijev hidrogenkarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) s kojim su uklonjene zaostale količine IBX-a. Sadržaj je filtriran preko lijevka i filter papira. Iz filtrata je uzet posljednji uzorak za GC analizu.

### **3.3.2. Enzimaska aldolna adicija s enzimom FSA**

Enzimaska oksidacija provedena je na rotacijskom vakuum evaporatoru prikazanom na slici 3.5. U tikvicu je stavljeno 30 mL dobivenog aldehida iz kemijske oksidacije, 0.8676 g DHA, 75.2 mg enzima aldolaze FSA te 37.5 mL pufera trietanolamina hidroklorida (TEA-HCl) pH vrijednosti 7.5. Pufer je bio ranije pripremljen otapanjem 4.65 g TEA-HCl u vrlo čistoj vodi i postepenim dodavanjem natrijeva hidroksida (NaOH) do željene pH vrijednosti koja se pratila pH metrom vidljivim na slici 3.3. Prije nego što je tikvica stavljena na evaporator uzet je nulti uzorak. Tikvica je spojena na evaporator, uronjena u vodenu kupelj pri temperaturi od 25 do 27 °C. Temperatura je praćena na kontrolnom termometru. Unutar kupelji tikvica je rotirala brzinom 100 okr  $\text{min}^{-1}$ . Kada je sve bilo namješteno moglo se početi odbrojavati vrijeme na štoperici. U tikvici su nastala dva sloja, vodeni i organski. Organski sloj je sadržavao etil acetat, aldehyd te neizreagirani alkohol. Vodeni sloj su činili svi dodani sastojci: DHA, FSA, te pufer TEA-HCl. Tijekom evaporacije aldehyd je trebao preći u vodeni sloj gdje se odvijala aldolna adicija. Uzorci su uzimani iz vodenog sloja i potom derivatizirani. Uzimano je 10  $\mu\text{L}$  uzorka, od toga je 5  $\mu\text{L}$  stavljeno u  $\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$ , drugih 5  $\mu\text{L}$  u pufer. Miješani su na homogenizatoru, a potom je od drugih 5  $\mu\text{L}$  uzorka s puferom uzimano novih 5  $\mu\text{L}$  i stavljano u novi  $\text{BnONH}_2 \cdot \text{HCl}$ . Tijekom evaporacije koja se provodila 3 h i 27 minuta uzeto je 15 uzoraka. S obzirom da je svaki uzorak bio razrijeđen 2 puta, kao što je prethodno opisano, dobiveno je ukupno 30 uzoraka za HPLC analizu. Nakon što je evaporacija zaustavljena, uzeta je vodena faza za slučaj da se aldolna adicija nastavila i kako bi ista mogla biti praćena.

## 4. Rezultati i rasprava

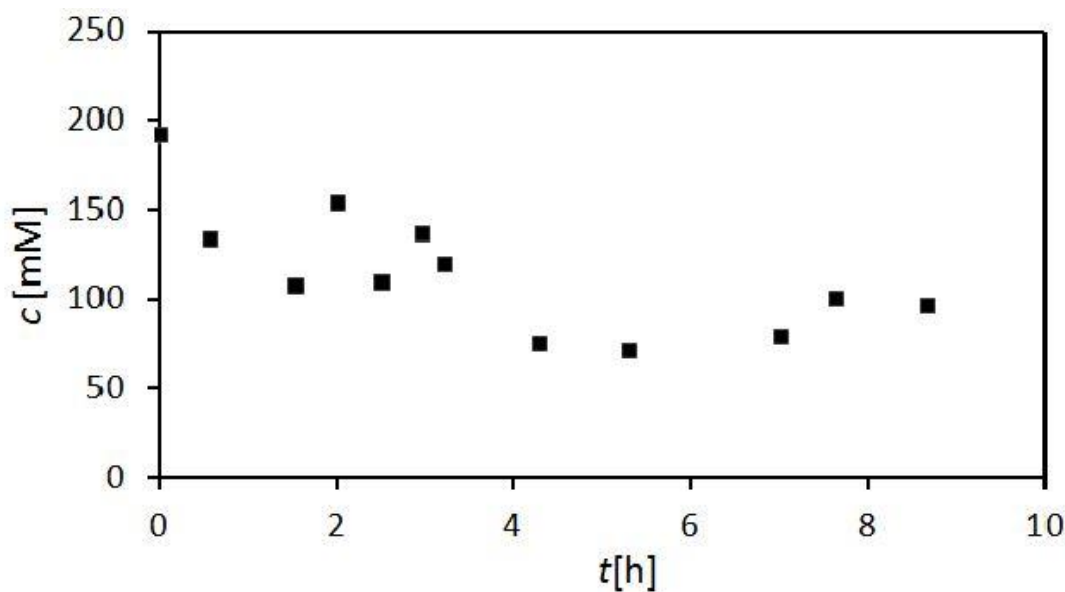
U ovom radu provedena je kemijska i enzimatska oksidacija alkohola s ciljem dobivanja aldolnog produkta. Najprije je sintetiziran aldehid kao međuprodukt za dobivanje aldola. Reakcija je kaskadna i odvijala se prema sljedećoj reakcijskoj shemi (slika 3.11.):



Slika 3.11. Shema kaskadne reakcije

### 4.1. Kemijska oksidacija alkohola jodoksibenzojevom kiselinom (IBX)

Konverzija alkohola u kemijskoj oksidaciji s IBX-om iznosila je 51% nakon 8,5 sati provođenja reakcije pri 77 °C. Nakon toga reakcija nije napredovala. Na slici 4.1. vidi se pad koncentracije alkohola tijekom kemijske oksidacije.

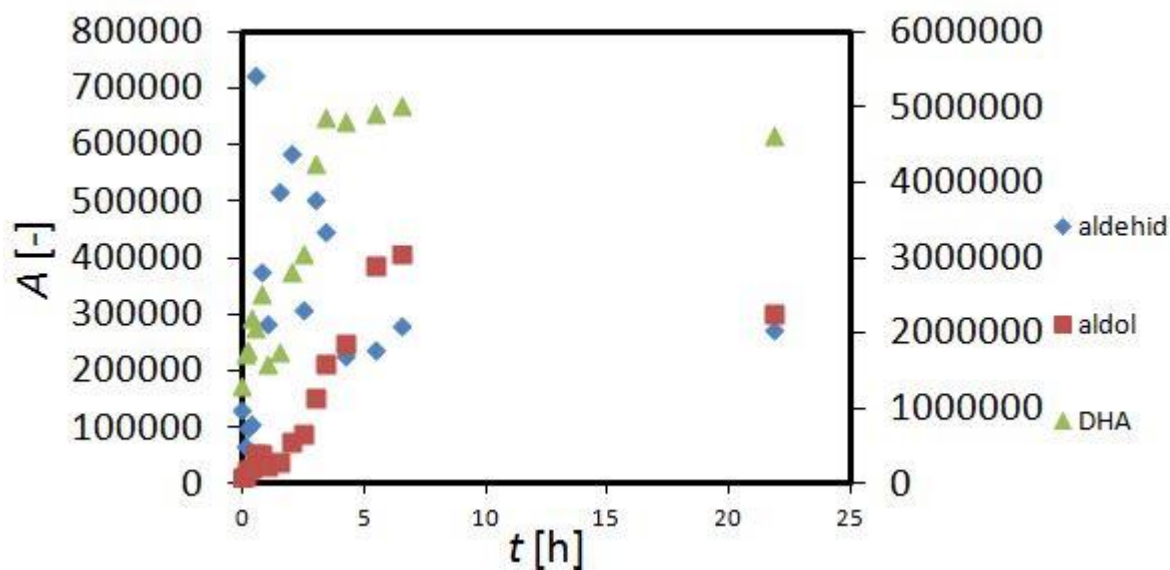


**Slika 4.1.** Koncentracija alkohola 3-klor-1,2-propandiola tijekom kemijske oksidacije (pri 77°C , tijekom 8,5h, u prisutnosti IBX-a)

Pad koncentracije alkohola tijekom oksidacije sugerira na nastanak željenog aldehida. Uspješnim dobivanjem aldehida omogućena je daljnja provedba eksperimeta odnosno enzimaska aldolna adicija dobivenog aldehida.

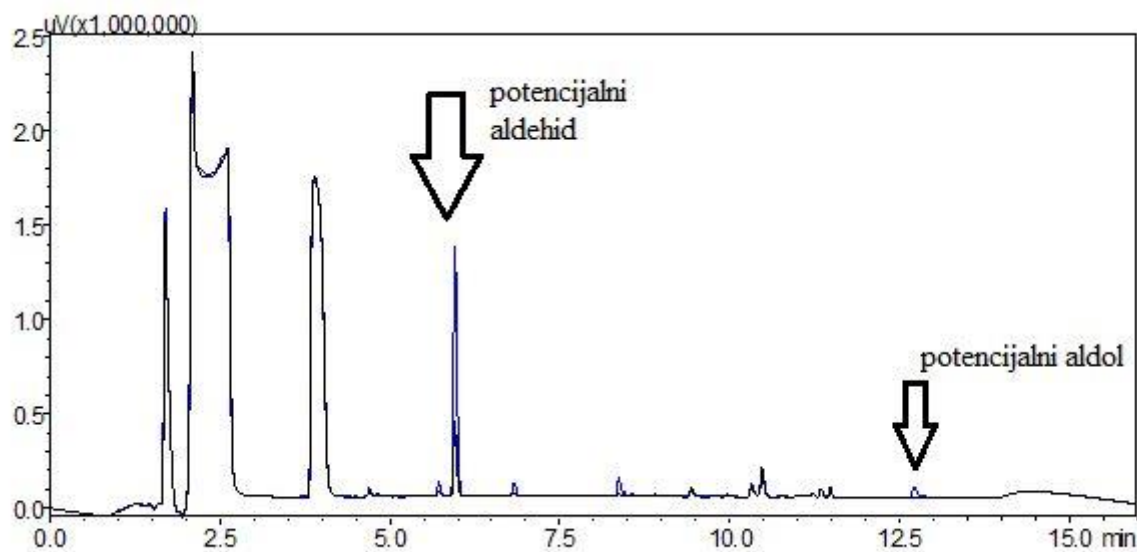
## 4.2. Enzimaska aldolna adicija

Enzimaska aldolna adicija provedena je na evaporatoru 3 sata i 45 minuta, nakon čega su uzorci odneseni na HPLC i LC-MS analizu. Na slici 4.2. je vidljivo je da površina pika za kojeg je pretpostavljeno da je aldehyd raste pa pada, te je vidljiv porast pika za koji je pretpostavljeno da predstavlja aldol.



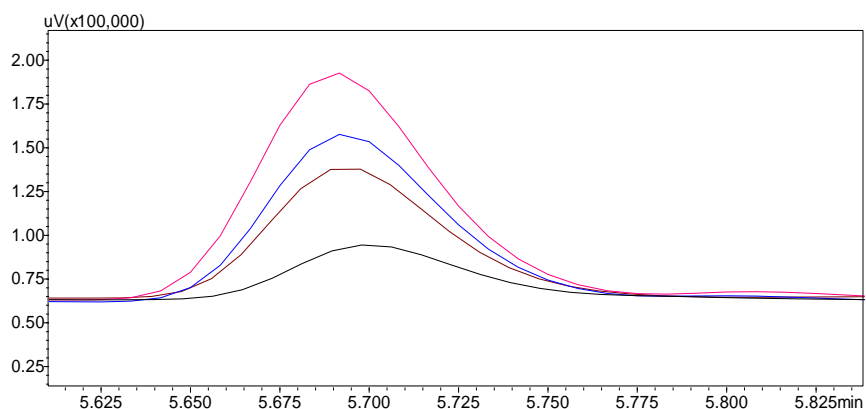
Slika 4.2. Sastav frakcija tijekom evaporacije

Nakon provedene HPLC analize bilo je vidljivo više pikova za potencijalni aldehid i aldol (slika 4.3.).

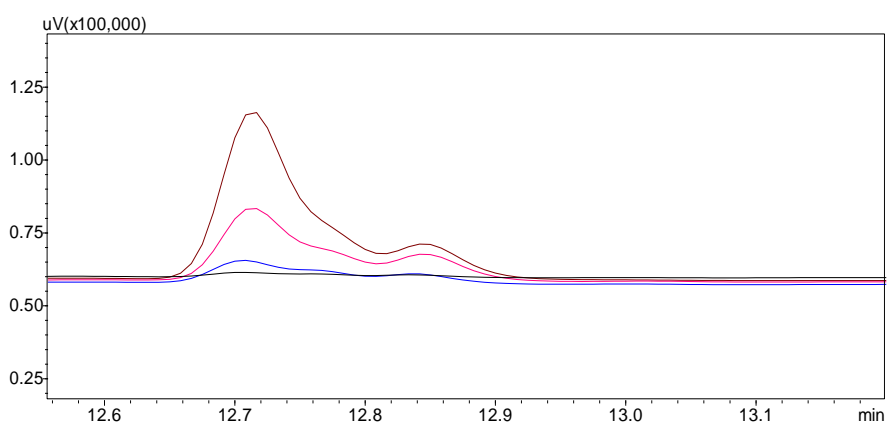


Slika 4.3. Kromatogram uzorka uzetog na početku evaporacije (crna boja) i uzorka uzetog na kraju evaporacije (plava boja)

Značajni porast koncentracije vidi se na 5,7 minuta te je taj pik uzet kao mogući aldehid (slika 4.4.), a pik vidljiv na 12,7 minuta uzet je kao potencijalni aldol (slika 4.5.).

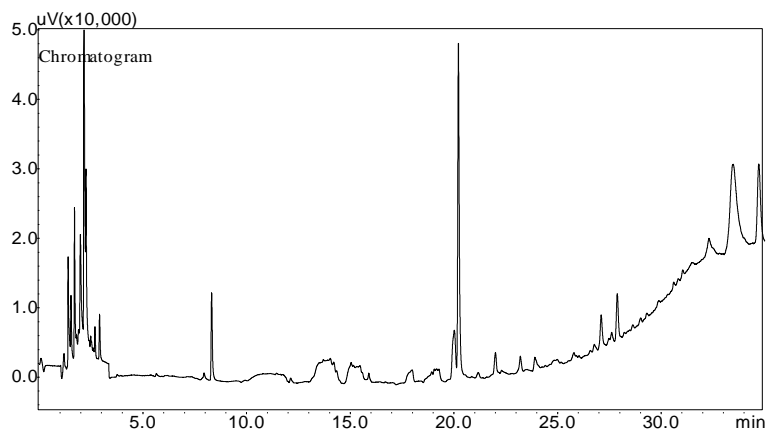


**Slika 4.4.** Kromatogram potencijalnog aldehida



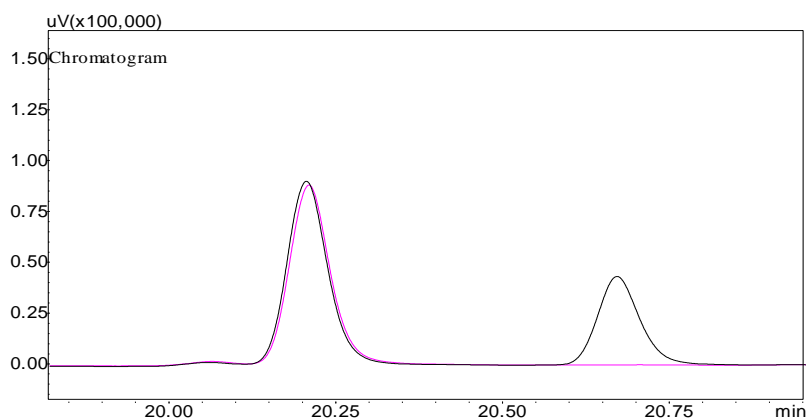
**Slika 4.5.** Kromatogram potencijalnog aldola

Zbog nepostojanja standarda za aldehyd i aldol, nije se moglo sa sigurnošću reći radi li se o željenim molekulama. Za potvrdu produkta provedena je analiza na LC-MS-u. Prije analize bilo je poznato da željeni aldehyd tj. njegov derivatizirani oblik ima molekulsku masu  $214 \text{ g mol}^{-1}$ , a molekulska masa derivatiziranog aldolnog produkta treba iznositi  $304 \text{ g mol}^{-1}$ . Nažalost LC-MS analiza nije potvrdila prisustvo niti aldehida niti aldola u produktu. Ni jedan od pikova na kromatogramu nije odgovarao traženim molekulskim masama. Jedino što se jasno vidi na kromatogramu jest pik od dihidroksiacetona i njegova molekulska masa od  $196 \text{ g mol}^{-1}$ .



**Slika 4.6.** Kromatogram LC-MS analize za uzorke uzete tijekom provođenja evaporatizacije

Na kromatogramu LC-MS analize (slika 4.6.) ponovno je jako izražen pik od alkohola na 20,206 minuta, a još je samo vidljiv dihidroxiaceton s retencijskim vremenom 20,672 minuta.



**Slika 4.7.** Kromatogram nakon kemijske oksidacije (crna boja) i nakon kaskadne reakcije (ružičasta boja)

Prvi pik sa slike 4.7. odgovara početnom alkoholu 3-klor-1,2-propandiolu, a drugi pik odgovara dihidroxiacetonu koji je potvrđen i molekulskom masom. Stoga je teško potvrditi je li reakcija provediva u opisanom obliku.

## 5. Zaključak

Kemijska oksidacija alkohola 3-klor-1,2-propandiola provedena je kako bi se dobio aldehidni međuprodukt potreban za enzimatsku aldolnu adiciju. Prema konverziji alkohola od 51% može se zaključiti da je ta reakcija bila uspješna. Slijedeći stupanj provedene kaskadne reakcije nije bio uspješan jer analizom na LC-MS-u nije potvrđen željeni aldolni produkt. Više je mogućih razloga za takav ishod provedenog eksperimenta. Aldehidi su nestabilni pa je moguće da međuprodukt nestaje u nekoj neidentificiranoj slijednoj reakciji.

Etil-acetat je topljiv u vodi do 8% i ima negativan utjecaj na aktivnost enzima FSA [12]. Aldehid može biti nestabilan u vodenim i organskim otapalima, te njegova visoka koncentracija u reakcijskoj smjesi može inhibirati aldolnu adiciju. Također, problem može stvoriti neizreagirani alkohol iz prvog stupnja kaskadne reakcije, na način da inhibira djelovanje enzima FSA. Dodatni problem proizlazi iz nedovoljnog poznavanja djelovanja samog enzima FSA. Naime djelovanje FSA nije još ispitano na supstratima koji su korišteni u eksperimentu te je njegova aktivnost upitna na istim.[7]

## 6. Popis simbola

A	površina ispod odziva	[-]
$c$	molarna koncentracija	[mM]
DHA	dihidroxiaceton	
DHAP	dihidroxiaceton fosfat	
DMSO	dimetilsulfoksid	
E	enzim	
[ES] ‡	kompleks enzim-supstrat	
EtAc	etil acetat	
FSA	fruktoza-6-fosfat aldolaza	
GA	glikolaldehid	
GC	plinska kromatografija	
HA	hidroksi aceton	
HPLC	kapljevinska kromatografija visokog učinka	
IBX	jodoksibenzojeva kiselina	
LC-MS	kapljevinska kromatografija s tandemskom spektroskopijom masa	
RI	indeks refrakcije	
S	supstrat	
TFA	triflouoctena kiselina	



## 7. Prilog

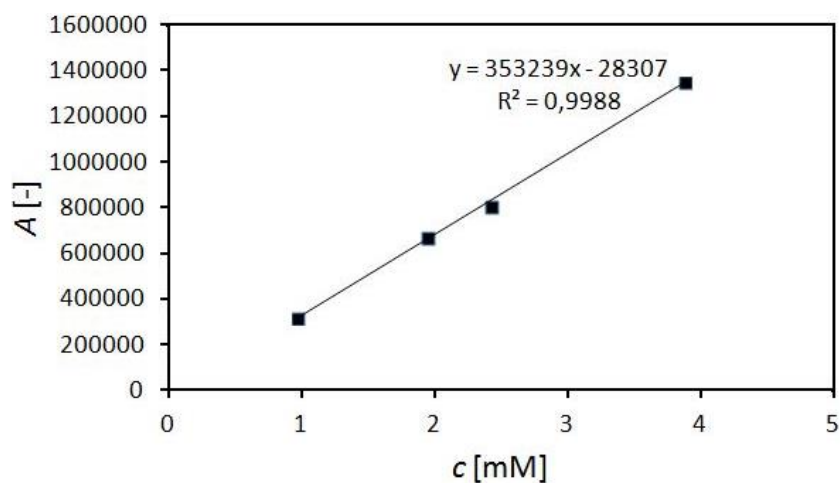
### 7.1. Korištene kemikalije

3-klor-1,2-propandiol, dihidroksiaceton (DHA), 2-jodoksibenzojeva kiselina (IBX), trifluorocetna kiselina (TFA), mravlja kiselina i acetonitril su kupljeni od proizvođača Sigma Aldrich (Njemačka).

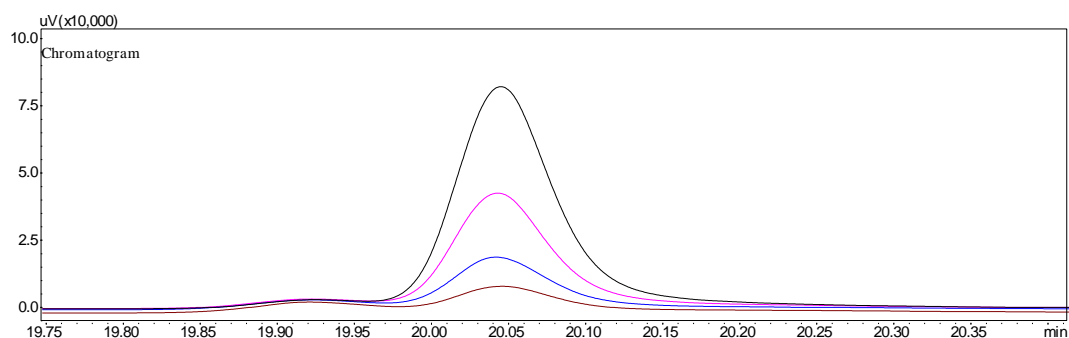
### 7.2. Korišteni enzim

D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA A129S) je bila pripremljena i pročišćena u laboratorijima IQAC-CSIC u Španjolskoj.

### 7.3. Baždarni pravac



Slika 7.1. Baždarni pravac za 3-klor-1,2-propandiol



Slika 7.2. Pik alkohola 3-klor-1,2-propandiola tijekom kemijske oksidacije

## 8. Literatura

- [1] Choi, J. M., Han S. S, Kim H. S.; Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnol Advances*, 33(7):1443-1454 (2015)
- [2] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L.; *Biokemija*, Školska knjiga, 2013., str. 27.-50.
- [3] Pine S. H.; *Organic Chemistry*, Školska knjiga, 1994. , str. 844.-846.
- [4] Shoda, S., Uyama, H., Kadokawa, J., Kimura S., Kobayashi, S.; Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis, *Chemical reviews*, 116(4):2307-2413 (2016)
- [5] Bommarius, S. A.; Biocatalysis: A Status Report, *The Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 6:319–345 (2015)
- [6] Illanes, A.; *Enzyme Biocatalysis - Principles and Applications*, Springer, 1-29 (2008)
- [7] Clapés, P., Fessner, W. D., Sprenger, G. A., Samland, A. K.; Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases, *Chemical Biology*, 14(2)154-167 (2010)
- [8] Castillo, A. J., Calveras, J., Casas, J., Mitjans, M., Vinardell, M. P., Parella, T., Inoue, T., Sprenger, A. G., Joglar, J., Clape's, P.; Fructose-6-phosphate Aldolase in Organic Synthesis: Preparation of D-Fagomine, N-Alkylated Derivatives, and Preliminary Biological Assays, *Organic letters*, 8(26)6067-6070 (2006)
- [9] More, J.D., Finney, N. S.; A simple and advantageous protocol for the oxidation of alcohols with *O*-Iodoxybenzoic acid (IBX), *Organic letters*, 4(17)3001-3003 (2002)
- [10] Zhdankin, V. V.; *Hypervalent Iodine Chemistry: Preparation, Structure and Synthetic Applications of Polyvalent Iodine Compounds* , John Wiley & Sons, 2014., str. 288.-296.
- [11] Nicolaou, K. C., Chen J. S.; The art of total synthesis through cascade reactions, *Chemical Society Reviews*, 38(11)2993-3009 (2009)
- [12] Sudar, M., Findrik, Z., Vasić- Rački, Đ.; Clapés, P., Lozano, C.; Mathematical model for aldol addition catalyzed by two D-fructose-6-phosphate aldolases variants overexpressed in *E. coli*, *Journal of biotechnology*, 167(3)191-200 (2013)