

Kinetika oksidacije N-Cbz-3-amino-1,2-propandiola katalizirane s alkohol dehidrogenazom iz konjske jetre

Skendrović, Dino

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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:149:220357>

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

Dino Skendrović

KINETIKA OKSIDACIJE N-CBZ-3-AMINO-1,2-PROPANDIOLA
KATALIZIRANE S ALKOHOL DEHIDROGENAZOM IZ KONJSKE JETRE

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv.prof.dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitne komisije:

izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.

izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2016.

Sažetak

U ovom radu opisana je kemijska i enzimatska oksidacija aminoalkohola Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola. Kemijska oksidacija provedena je uz pomoć jodoksibenzojeve kiseline, a enzimatska uz alkohol dehidrogenazu iz konjske jetre.

Provedena je je Cbz-zaštita aminokiseline kako bi se dokazalo da je ona nusprodukt navedenih metoda oksidacije.

Određena je i kinetika reakcije oksidacije aminoalkohola katalizirana s alkohol dehidrogenazom iz konjske jetre te su procijenjeni kinetički parametri na temelju Michaelis-Menteničinog modela.

Ključne riječi: kemijska oksidacija, enzimatska oksidacija, enzim, aminoalkohol, aldehid, Cbz zaštita

Abstract

Chemical and enzymatic oxidation of the amino alcohol Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiol is described in this work. Chemical oxidation was carried out by iodoxybenzoic acid and enzymatic oxidation by horse liver alcohol dehydrogenase.

Cbz-protection of amino acid was carried out to prove its existence as by-product of our oxidation methods.

Kinetics of the amino alcohol oxidation catalyzed by horse liver alcohol dehydrogenase was determined and the kinetics parameters were estimated with Michaelis-Menten model.

Key words: chemical oxidation, enzymatic oxidation, enzyme, amino alcohol, aldehyde, Cbz protection

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Enzimi	2
2.1.1. Enzimi općenito	3
2.2.2. Podjela enzima.....	3
2.2.3. Alkohol dehidrogenaza.....	4
2.2.4. Regeneracija koenzima.....	5
2.2.5. NADH oksidaza.....	6
2.3. Kaskadne reakcije.....	6
2.4. IBX oksidacija.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. Aparatura.....	9
3.1.1. Kapljevska kromatografija visokog učinka (HPLC).....	9
3.1.2. Aparatura za pročišćavanje uzoraka	9
3.1.3. Magnetska miješalica	10
3.1.4. Analitička vaga	10
3.1.5. Homogenizator	11
3.1.6. Spektrofotometar	12
3.1.7. Aparatura za provođenje kemijske oksidacije aminoalkohola.....	12
3.1.8. Aparatura za vakuum evaporaciju	13
3.1.9. Tankoslojna kromatografija (TLC).....	13
3.1.10. pH metar	14
3.1.11. Centrifuga	14
3.1.12. Lijevak za odjeljivanje.....	15
3.2. Analitičke metode.....	15
3.2.1. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze (ADH) iz konjske jetre spektrofotometrijskom metodom.....	15
3.2.2. Određivanje aktivnosti ADH iz konjske jetre u povratnoj reakciji redukcije	16
3.2.3. Određivanje utjecaja pH vrijednosti na aktivnost ADH iz jetre konja.....	17
3.2.4. Mjerenje koncentracije reaktanata i produkata kapljevskom kromatografijom visokog učinka (HPLC)	17
3.3. Kemijska oksidacija aminoalkohola s jodoksibenzojevom kiselinom (IBX)	18
3.4. Vakuum evaporacija etil acetata nakon kemijske oksidacije Cbz- <i>N</i> -3-amino-1,2-propandiola	18
3.5. Određivanje kinetike oksidacije Cbz- <i>S</i> -3-amino-1,2-propandiola	19
3.6. Enzimatska oksidacija aminoalkohola.....	20
3.7. Cbz-zaštita aminokiseline.....	21
3.8. Pročišćavanje aldehida preparativnom kromatografijom	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
4.1. Kemijska oksidacija aminoalkohola jodoksibenzojevom kiselinom (IBX) i pročišćavanje aldehida preparativnom kromatografijom.....	23
4.2. Cbz-zaštita aminokiseline <i>N</i> -izoserin	26
4.3. Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost ADH iz konjske jetre	27
4.4. Kinetika oksidacije Cbz- <i>S</i> -3-amino-1,2-propandiola	28
4.5. Mjerenje aktivnosti ADH iz konjske jetre u povratnoj reakciji na aldehyd	30
4.6. Enzimatska oksidacija aminoalkohola.....	30
5. ZAKLJUČAK	32
6. POPIS SIMBOLA.....	33
7. PRILOZI	34
8. LITERATURA.....	37

1. UVOD

Biokataliza je tehnologija koja je u današnje vrijeme prepoznata kao jedan od najboljih izbora za pripremu širokog raspona kemijskih spojeva. To je primjetno ne samo u akademskim krugovima u svrhu istraživanja, već i u kemijskoj, prehrambenoj i farmaceutskoj industriji. Za veliku količinu spojeva sinteza temeljena na enzimatskoj katalizi se pokazala ne samo kao konkurentna klasičnim kemijskim metodama, već je u nekim slučajevima i superiornija.

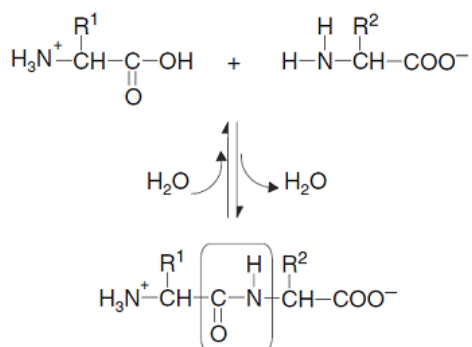
Usprkos navedenome, biokataliza do relativno nedavno nije bila prvi izbor sinteze u znanosti i industriji. Razlog tome su bili pretpostavljeni i dokazani nedostaci kao što je uzak raspon supstrata, ograničena postojanost, slaba efikasnost te cijena. Ali uz razvoj tehnologije, otkrića novih enzima te boljih načina vođenja procesa, većina ovih nedostataka je u današnje vrijeme značajno reducirana te se biokataliza u znanosti i industriji sve više prepoznaje kao koristan alat za sintezu uz već poznate klasične metode (Drauz 2002).

2. OPĆI DIO

2.1. Enzimi

2.1.1. Enzimi općenito

Enzimi su proteini koji se sastoje od velikog broja aminokiselina koje se kovalentno vežu preko peptidne veze koja se formira između ugljikova atoma karboksilne skupine te atoma dušika α -amino skupine. Ovisno o prirodi R skupine, aminokiseline mogu nepolarne (hidrofobne) ili polarne (s nabojem ili bez naboja) i njihova raspodjela uzduž proteinske molekule određuje njihovo ponašanje (Illanes 2008).

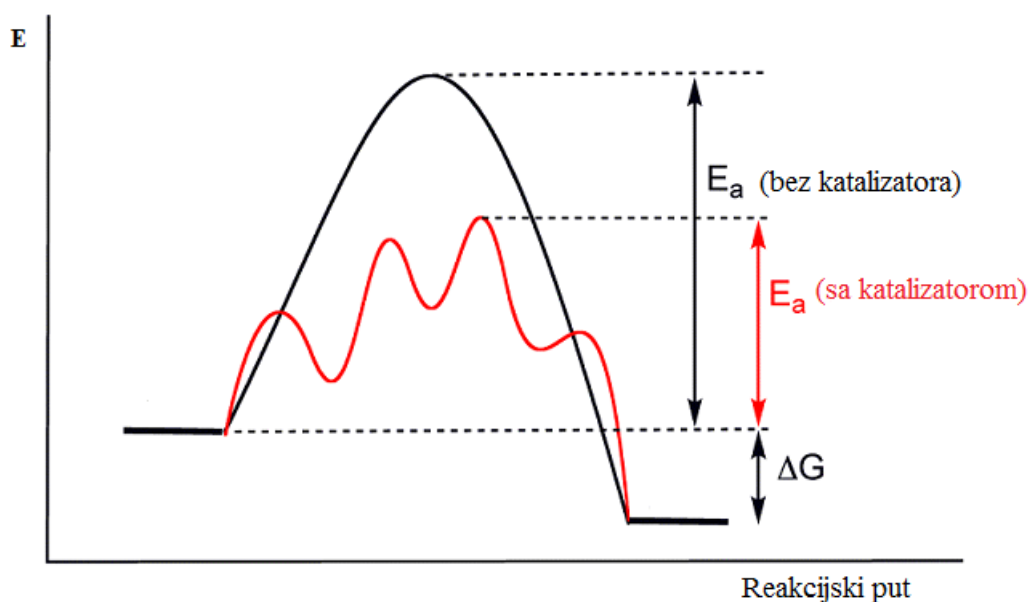


Slika 2.1. Formacija peptidne veze između dvije susjedne α -amino kiseline

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, dijelu strukture enzima koje pobuđuje određenu reakciju (Pine 1987).

Specifičnost odnosa enzim-supstrat opisuje se kao mehanizam brava i ključ enzimske katalize. Međudjelovanja 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 (Pine 1987).

Kao što vidimo na slici 2.2., katalizatori, u našem slučaju enzimi, snižavaju energiju aktivacije koju je potrebno postići da bi došlo do kemijske reakcije (Illanes 2008).



Slika 2.2. Mehanizam katalize

Većina enzima također zahtjeva i pomoć manjih molekula kako bi funkcionirali kao katalizatori, a te molekule nazivamo koenzimima ili kofaktorima. Koenzimi su organske molekule male molekularne mase koje se reverzibilno vežu s enzimima i nisu dio njegove strukture. Koenzimi vezani za enzime sudjeluju u samoj reakciji te se zbog toga ponekad nazivaju i kosupstrati. Često funkcioniraju kao prenositelji elektrona, specifičnih atoma ili funkcionalnih skupina koje se prenose u reakciji.

Jedno od važnijih svojstava enzima je specifičnost prema supstratu. To svojstvo znači da se enzimi mogu povezati samo s određenim supstratima, to jest trebaju posjedovati funkcionalne skupine koje će moći učvrstiti supstrat na aktivnom mjestu, kako bi se reakcija mogla odvijati (Illanes 2008).

2.2.2. Podjela enzima

Enzimi se prema IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) dijele u idućih 6 skupina:

1. Oksidoreduktaze – enzimi koji kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije koje uključuju prijenos elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma. Postoje 22 podvrste, od

kojih su za industriju najznačajniji dehidrogenaze koje oksidiraju supstrat prijenosom vodikova atoma na koenzim (NAD^+ , NADP^+ , FAD^+) koji djeluje kao akceptor.

2. Transferaze – enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalne skupine sa donora na prihvatljivog akceptora. Postoji 9 podvrsta, ovisno o kemijskoj prirodi skupine koja se prenosi. Zahtijevaju koenzime za rad te su isključivo unutarstanični.
3. Hidrolaze – enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize. Postoji 12 podvrsta ovisno o tipu prihvatljive veze. Većina enzima koji imaju tehnološku primjenu pripadaju ovoj skupini. Većina za rad ne zahtijeva koenzime.
4. Liaze – enzimi koji kataliziraju reakcije ne-hidrolitičkog i ne-oksidativnog cijepanja kemijskih veza. Postoji 7 podvrsta ovih enzima, ovisno o tipu prihvatljive veze. Većina je unutarstanična, a neke ne zahtijevaju koenzime za rad.
5. Izomeraze – enzimi koji kataliziraju reakcije konverzije supstrata u izomer, tojest spoj sa istim brojem i tipom atoma. Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu izomera koji se proizvodi.
6. Ligaze – enzimi koji kataliziraju reakcije kovalentnog povezivanja dvaju molekula. Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu veze koja se formira (Illanes 2008).

2.2.3. Alkohol dehidrogenaza

Alkohol dehidrogenaze (ADH) su prisutne u svim organizmima. Imaju vrlo širok raspon specifičnosti za supstrate te igraju važnu ulogu u velikom broju fizioloških procesa, ali je često teško dokazati njihovu fiziološku funkciju.

ADH je odgovoran za biološku oksidaciju i sintezu etanola i drugih alkohola u mnogim organizmima. Detaljno je istražen i opisan u nižim eukariotima kao što je *Saccharomyces cerevisiae*, u biljkama kao kukuruz i žito, u *Drosophila melanogaster* te u sisavcima kao što su miš, konj i čovjek. U svima opisanima količine i tip ADH ovise o fiziološkim uvjetima te tipu tkiva ili organa (Pateman 1983).

Alkohol dehidrogenaze se mogu podijeliti u sljedeće kategorije ovisno o specifičnosti prema kofaktoru: (1) NAD(P) , (2) pirolo-kinolin kinon, heme, ili kofaktor F_{420} te (3) flavin adenin dinukleotid (FAD). NAD- ili NADP- ovisne alkohol dehidrogenaze se često dijele u tri manje kategorije: cink ovisne ADH, kratko lančane ADH te željezom aktivirane ADH. Neke od NAD(P)- ovisnih dehidrogenaza su također u rodu s još jednom kategorijom, a to su aldo-keto reduktaze. Ta grupa enzima se sastoji od NAD(P)- ovisnih oksidoreduktaza, koje su

većinom monomerni protein koji veži nikotinamid kofaktor bez Rossmannovog strukturnog motiva (Reid 1994).

Postoji veliki interes za korištenje stabilnih alkohol dehidrogenaza u prehrambenoj, farmaceutskoj i kemijskoj industriji, za proizvodnju aldehida, ketona i kiralnih alkohola. Proizvodnja kiralnih alkohola je naročito poželjna zato jer je to važan korak u sintezi kiralno čistih farmaceutskih agensa (Machielsen 2005).

2.2.4. Regeneracija koenzima

Za primjenu sinteza ovisnih o koenzimima u velikim razmjerima, regeneracija koenzima je vrlo bitan faktor. NAD koenzimi, pogotovo u svojoj reduciranoj formi su preskupi da bi se koristili u stehiometrijskim omjerima. Uz to, regeneracija je isplativ način da se termodinamički nepovoljne reakcije pomaknu prema nastajanju produkta na način da ih uparimo s reakcijama regeneriranja koenzima. Primjena kofaktora se izražava kao TTN (total turnover number) koji se definira kao molovi produkta formiranih po molu kofaktora korištenih u reakciji (Hummel 1999).

Postoje razne metodologije za regeneraciju koenzima koje dopuštaju korištenje katalitičkih količina koenzima. Da bi te metode bile ekonomične i praktične, postoje određeni uvjeti koji moraju biti zadovoljeni. Najbitniji uvjet je da TTN, tj. molovi produkta formiranih po molu koenzima mora biti zadovoljavajuće visok. TTN od 10^3 do 10^5 su u većini slučajeva dovoljni da bi regeneracija bilo ekonomski povoljna. Ovo sve naravno jako ovisi o cijeni koenzima u usporedbi s cijenom produkta kojeg proizvodimo. Ako je vrijednost produkta velika, TTN može biti niži. Suprotno tome, ako je cijena koenzima veća, TTN će morati biti veći. TTN također odražava i druge bitne faktore, kao što su koncentracija i degradacija koenzima u vremenu, regioselektivnost regeneracije, brzina katalize te vrijeme reakcije (Woodyer 2006).

Uz sve to, dostupnost i stabilnost regenerativnih enzima ili reagenasa tokom procesa je važan uvjet. Oprema također mora biti uvijek dostupna, jeftina te jednostavna za upravljanje. Regeneracija mora biti povoljna kinetički i termodinamički. Reagensi ili nusprodukti reakcije se ne smiju miješati s izolacijom produkta ili drugih komponenti sistema (npr. regeneracijski kosupstrat ili proizvod se ne smije miješati sa sintetskim enzimima), osim ako se ne mogu lako ukloniti. Kako bi svi ovi uvjeti bili zadovoljeni, enzimatske reakcije su najčešći izbor za regeneraciju koenzima (Woodyer 2006).

Primarni faktor je selektivnost, koja mora biti 99.99993% kako bi se postigao TTN od 10^6 . Postoji vrlo malo primjera gdje je katalizator koji nije enzim bio toliko efikasan. Kemijske i elektrokemijske metode često nemaju tako visoku selektivnost i nekompatibilne su s drugim komponentama enzimatske reakcije. Usprkos tome, u nekim slučajevima je kemijska regeneracija efikasnija od najboljih dostupnih enzimatskih procesa (Woodyer 2006).

2.2.5. NADH oksidaza

Kao što smo već spomenuli, korištenje koenzima, u našem slučaju NAD^+ , u stehiometrijskim omjerima je neisplativo. Regeneracija koenzima je stoga vrlo bitna, jer pojednostavljuje izolaciju produkta, sprječava inhibiciju produkta koenzimom te može pokrenuti termodinamički nepovoljne reakcije uparivanjem s povoljnim reakcijama regeneracije. Postoje razne metode za postizanje tog cilja, a jedna od jednostavnijih je regeneracija s nekim drugim enzimom kojeg dodajemo u naš reakcijski sustav. Za regeneraciju NAD^+ , korištenje NADH oksidaze je dobar izbor (Sudar 2014).

NADH-oksidaza je flavoprotein koji oksidira NADH u NAD^+ pomoću usporedne reakcije molekularnog kisika u vodu u četvero-elektronskoj redukciji (Nox-2 enzimi) ili vodikov peroksid u dvo-elektronskoj redukciji (Nox-1 enzimi). Opcija s dobivanjem vode je naravno puno prihvatljivija s obzirom na negativan utjecaj koji bi vodikov peroksid mogao imati na enzime i samu reakciju. Najveća prednost korištenja NADH oksidaze za regeneraciju NAD^+ koenzima je ta što katalizira nepovratnu reakciju koja potom pomiče ravnotežu primarne reakcije na stranu formiranja produkta. Iako se NADH oksidaza čini kao najbolji izbor za regeneraciju NAD^+ , njena stabilnost tokom reakcije može biti veliki problem u nekim slučajevima (Sudar 2014).

2.3. Kaskadne reakcije

Iako u eksperimentalnom dijelu ovog rada kaskadne reakcije nisu obrađene, temelj su većeg projekta kojeg je ovaj rad dio pa ih stoga valja spomenuti. Kaskadne reakcije predstavljaju fascinantnu granu organske kemije, granu koja je kroz zadnjih par godina subjekt intenzivnih istraživanja, čemu svjedoči pojavljivanje velikog broja znanstvenih radova koji istražuju razne aspekte tih procesa.

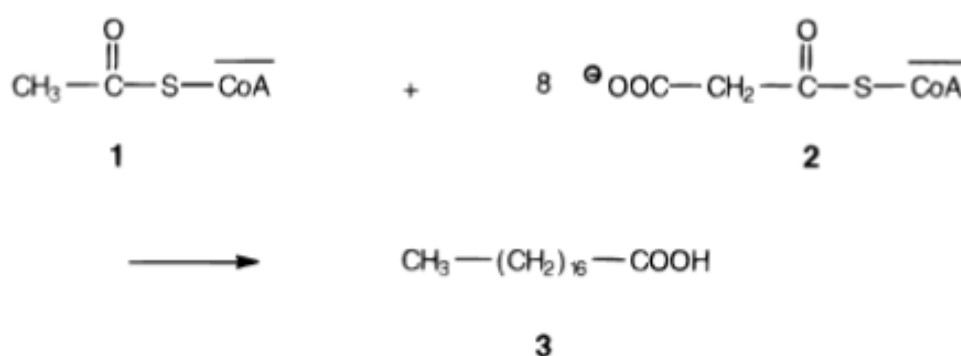
Neporeciva korisnost kaskadnih reakcija je već dobro utemeljena, te uključuje štednju vremena, rada i resursa te smanjenje stvaranja otpada. Zbog tih razloga, kaskadne reakcije

možemo svrstati u “zelenu kemiju”, jer je ušteda koju ostvarimo nakon više uzastopnih transformacija u jednom sintetskom procesu vrlo zamjetna. Naprimjer, samo jedno otapalo te postupak obrade i pročišćavanja mogu biti dostatni za dobivanje produkta koji bi se inače morao sintetizirati preko više individualnih koraka. Ove metode će tijekom sljedećih godina postajati sve važnije, jer i kemičari i javnost općenito teže efektivnijim i odgovornijim metodama za upravljanje s ograničenim resursima planeta Zemlje (Nicolaou 2006).

Sinteza orijentirana stvaranju specifičnog produkta je ultimativni test reakcijskog dizajna i primjenjivosti. Dizajn kaskada takav da se dobiju specifične tražene molekule složene strukture i stereokemijske kompleksnosti predstavlja značajan intelektualni izazov i može biti vrlo impresivna djelatnost u sintezi prirodnih produkta. Kaskadne reakcije stoga nemjerljivo pridonose i znanosti i umjeću potpune sinteze, sa sobom noseći ne samo povećanu efikasnost već i poboljšanje planiranja same sinteze (Nicolaou 2006).

Prednost kaskadnih reakcija je u tome da nema potrebe za izolacijom reakcijskih intermedijera, što rezultira boljim prinosima i manjim korištenjem kemikalija (Sudar 2015).

U prirodi su kaskadne reakcije česta pojava iako direktna usporedba s reakcijama u laboratoriju nije moguća zbog učešća velikog broja enzima koji kataliziraju razne stupnjeve reakcije. Jedan klasičan primjer kaskadne reakcije u prirodi je biosinteza masnih kiselina krećući od acetata. Reakcija (slika 2.3.) staje nakon postavljanja acetata **1** kao početne jedinice sa 8 ekvivalentnih jedinica malonil-ScoA **2** koji daju ili palmitinsku ili stearinsku kiselinu **3**. Takvu razinu kontrole je teško imitirati u laboratorijskoj tikvici (Tietze 1996).



Slika 2.3. Biosinteza masnih kiselina

2.4. IBX oksidacija

Molekularni jod sam po sebi ima vrlo jak oksidacijski potencijal za oksidiranje različitih supstrata. Iz tih razloga se često koristi kao ekonomični agens za oksidiranje te pokretanje transformacija, kao što je rana oksidacija sulfida, aromatskih spojeva te raznih molekula koje koriste funkcionalne skupine sa kisikom (Kaiho 2014).

Za naše potrebe, IBX (*o*-jodbenzojeva kiselina) slovi kao dobar oksidans za konverziju alkohola u aldehide ili ketone. IBX je praktički netopiva u većini organskih otapala, te je ta netopivost bila glavni razlog što je prošlo puno vremena od otkrića same IBX, pa do njene praktične primjene u DMSO (dimetil sulfoksid), koje je duže vrijeme bilo jedino poznato otapalo u kojem se IBX može otopiti. Usprkos tome, korištenje DMSO kao otapala nije preporučljivo s obzirom na njegovu štetnost. Iz tog razloga tražene su nove metode, te je otkriveno da je IBX topiv u većini organskih otapala pri povišenim temperaturama. EtOAc (etil-acetat) i DCE (1,2-dikloretnan) su u tom slučaju najbolji izbor s obzirom da su inertni i nusprodukti su im netopljivi na sobnoj temperaturi pa nije potrebno dodatno pročišćavanje nakon filtracije. Reakcije u drugim otapalima daju bolje prinose i kraće vrijeme reakcije, ali zahtjevaju dodatno kromatografsko pročišćavanje (More 2002).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracije uzoraka supstrata i produkata određivane su pomoću HPLC-a s UV detektorom. Uređaj proizvođača *Shimadzu* prikazan je na slici 3.1.



Slika 3.1. HPLC

3.1.2. Aparatura za pročišćavanje uzoraka

Izolacija aldehida provedena je raznim metodama na uređaju za preparativnu kromatografiju ÄKTAprime Plus proizvođača *GE Healthcare*. Uređaj je prikazan na slici 3.2.



Slika 3.2. Uređaj za preparativnu kromatografiju koji se sastoji od: 1) epruvete s frakcijama, 2) kolona s uzorkom, 3) kolona s punilom, 4) eluent A, 5) eluent B

3.1.3. Magnetska miješalica

Miješanje i otapanje provedeno je na magnetskoj miješalici *Tehnica MM-540* prikazanoj na slici 3.3.



Slika 3.3. Magnetska miješalica

3.1.4. Analitička vaga

Svi uzorci korišteni za provedbu eksperimenta vagani su na analitičkoj vagi proizvođača *Shimadzu* prikazanoj na slici 3.4.



Slika 3.4. Analitička vaga

3.1.5. Homogenizator

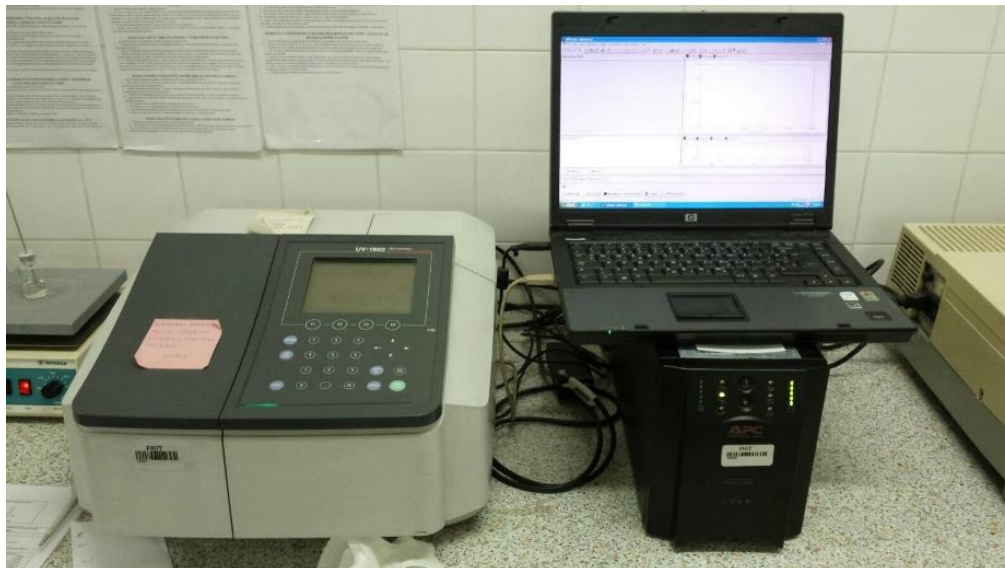
Svi uzorci su prije analize bili homogenizirani na uređaju *MS2 Minishaker IKA* prikazanom na slici 3.5.



Slika 3.5. Homogenizator

3.1.6. Spektrofotometar

Uzorci za određivanje specifične aktivnosti enzima analizirani su na spektrofotometru UV-1800 240 V proizvođača *Shimadzu*, prikazanom na slici 3.6.



Slika 3.6. Spektrofotometar

3.1.7. Aparatura za provođenje kemijske oksidacije aminoalkohola

Kemijska oksidacija aminoalkohola provedena je u tikvici koja se nalazi u vodenoj kupelji modela *Julabo*, pri stalnoj temperaturi koja je praćena s termometrom uronjenim u tikvicu. Liebigovo hladilo služi za kondenzaciju etil-acetata te povratak u tikvicu. Aparatura je prikazana na slici 3.7.



Slika 3.7. Aparatura za provođenje kemijske oksidacije alkohola koja se sastoji od: 1) tikvica, 2) vodena kupelj, 3) termometar, 4) Liebigovo hladilo

3.1.8. Aparatura za vakuum evaporaciju

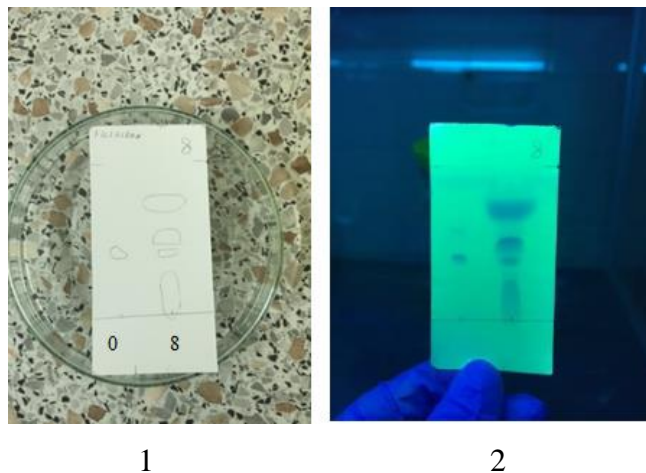
Postupak koncentriranja uzorka i isparavanja otapala proveden je u tikvici s uzorkom zagrijavanoj na termostatu *Devarot* pri stalnoj temperaturi. Tijekom procesa uzorak je spojen s vodenom kupelji koja djeluje kao sustav za hlađenje. Aparatura sadrži i vakuum pumpu koja omogućava evaporaciju otapala pri nižoj temperaturi (slika 3.8).



Slika 3.8. Aparatura za vakuum evaporaciju koja se sastoji od: 1) vodena kupelj s tikvicom, 2) sustav za hlađenje, 3) vakuum pumpa, 4) vodena kupelj niske temperature, 5) hladna vodena kupelj s tikvicom

3.1.9. Tankoslojna kromatografija (TLC)

Tankoslojna kromatografija na pločicama *TLC Silica gel 60 F254* prikazanim na slici 3.9. korištena je za praćenje procesa kemijske oksidacije.



Slika 3.9. Tankoslojna kromatografija pod 1) prirodnim svjetlom i 2) UV svjetlom

3.1.10. pH metar

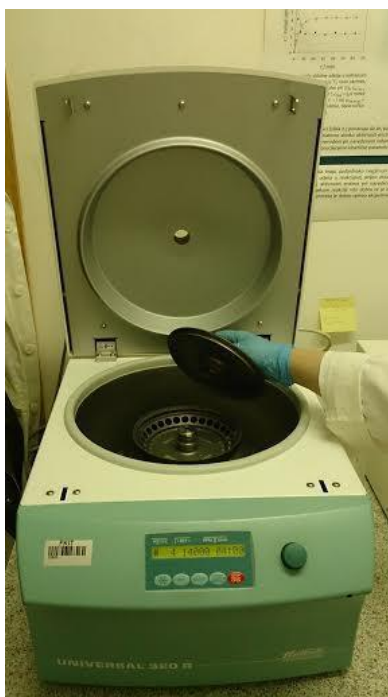
Za podešavanja pH vrijednosti otopina i pripremu pufera korišten je pH metar proizvođača *Schott* prikazan na slici 3.10.



Slika 3.10. pH metar

3.1.11. Centrifuga

Centrifugiranje uzoraka provedeno je na centrifugi *Universal 320 R*, proizvođača *Hettich*, prikazanoj na slici 3.11.



Slika 3.11. Centrifuga

3.1.12. Lijevak za odjeljivanje

Za ekstrakciju uzoraka zaštićene Cbz-aminokiseline korišten je lijevak za odjeljivanje prikazan na slici 3.12.



Slika 3.12. Lijevak za odjeljivanje

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Određivanje aktivnosti alkohol dehidrogenaze (ADH) iz konjske jetre spektrofotometrijskom metodom

Aktivnost enzima ADH određena je spektrofotometrijskom metodom praćenja koncentracije NADH koji u reakciji nastaje redukcijom iz NAD^+ , što se na spektrofotometru očitava kao snažna apsorpcija valne duljine od 340 nm (Walker 1992). Reakcija koja je provedena je enzimatska oksidacija aminoalkohola katalizirana enzimom ADH uz pomoć koenzima NAD^+ . Reakcija je provedena s Cbz-S-3-amino-1,2-propandiolom kao supstratom u 50 mM TEA HCl puferu pH vrijednosti 8,0. Mjerenje je provođeno 300 sekundi pri valnoj duljini 340 nm, a uzorci bez enzima su termostatirani u vodenoj kupelji pri 25 °C u trajanju od 5 minuta. Reakcijska smjesa prikazana je u tablici 3.1. Aktivnost enzima računata je prema jednadžbama (1) i (2).

$$V.A = \frac{\frac{dABS}{dt} V_{uk}}{V_{enz} \cdot d \cdot \epsilon_{340, NADH}} \quad [\text{U mL}^{-1}] \quad (1)$$

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

U navedenim jednadžbama $V.A.$ prikazuje volumnu aktivnost enzima, $dABS/dt$ je nagib pravca dobiven spektrofotometrijskom analizom, V_{uk} je volumen reakcijske smjese u kiveti, V_{enz} je volumen dodane otopine ADH, d je vrijednost udaljenosti kroz koju prolazi svjetlost u kiveti (1 cm), ϵ je ekstinkcijski koeficijent za NADH pri valnoj duljini od 340 nm ($6,22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), c_{enz} je koncentracija enzima, a $S.A.$ je specifična aktivnost enzima.

Tablica 3.1. Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri mjerenju aktivnosti ADH

Otopina	aminoalkohol	NAD ⁺	pufer	ADH
V [μL]	100	50	800	50
$c_{\text{temeljna otopina}}$ [mM]	113,74	94,21	50,00	10,00 mg mL ⁻¹
c_u kiveti [mM]	11,37	4,76	50,00	0,50 mg mL ⁻¹

3.2.2. Određivanje aktivnosti ADH iz konjske jetre u povratnoj reakciji redukcije

Cbz-*N*-3-amino-2-hidroksipropanal je sintetiziran kemijskim putem te potom pročišćen na kromatografskoj koloni kako bi se potvrdilo da je ADH iz konjske jetre enzim koji katalizira oksidoredukciju s ispitivanim zaštićenim supstratom. Frakcijama koje smo odabrali pH je podešen na 8,0 dodatkom 50 mM TEA HCl pufera pH 8,0 te je ta otopina korištena za određivanje aktivnosti enzima ADH iz konjske jetre. Sastav otopine prikazan je u tablici 3.2.

Mjerenje je provedeno tijekom 300 sekundi pri valnoj duljini 340 nm, a uzorci bez enzima su termostatorani u vodenoj kupelji pri 25 °C tijekom 5 minuta. Reakcije su provedene u 50 mM TEA HCl puferu pH 8,0 a točna koncentracija aldehida nije bila poznata zbog nedostupnog standarda.

Tablica 3.2. Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri mjerenju aktivnosti ADH s aldehidom

Otopina	aldehid	NADH	pufer	ADH
V [μL]	x	50	900-x	50
$c_{\text{temeljna otopina}}$ [mM]	x	2,35	50,00	10,00 mg mL ⁻¹
c_u kiveti [mM]	x	0,12	x	0,50 mg mL ⁻¹

3.2.3. Određivanje utjecaja pH vrijednosti na aktivnost ADH iz jetre konja

Volumna aktivnost enzima ADH je određena u različitim puferima i pH vrijednostima. Mjerenja su provedena s Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiolom kao supstratom. Smjesa korištena prilikom mjerenje aktivnosti prikazana je u tablici 3.1., a korišteni puferi i njihove pH vrijednosti u tablici 3.3.

Tablica 3.3. Prikaz pufera i pripadajućih pH vrijednosti

Pufer	pH [-]
fosfatni, 50 mM	5,4
fosfatni, 50 mM	6,0
fosfatni, 50 mM	6,7
fosfatni, 50 mM	7,7
TEA HCl, 50 mM	7,0
TEA HCl, 50 mM	7,5
TEA HCl, 50 mM	8,0
Tris HCl, 50 mM	7,0
Tris HCl, 50 mM	8,0
Tris HCl, 50 mM	9,0
Glicin NaOH, 50 mM	9,0

3.2.4. Mjerenje koncentracije reaktanata i produkata kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC)

Za separaciju i analizu molekula u ovom radu 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.

3.2.4.1. Određivanje koncentracije aminoalkohola na LiChrospher koloni

Koncentracija aminoalkohola praćena je na koloni LiChrospher RP-18, 100Å (5µm) 250x4 mm, uz mobilne fazu A (ultračista voda, acetonitril i TFA (80:20:0.095 v/v)) i mobilnu fazu B (ultračista voda i TFA(0,1 % v/v)). Korištene su dvije metode opisane u nastavku.

a) Metoda 30 minuta

Analiza je provedena gradijentnom metodom mijenjanjem koncentracije eluenta B od 90% do 30% tijekom 25 minuta te od 30% do 90% u vremenu od 25. do 29. minute pri temperaturi od 30 °C i valnoj duljini 215 nm. Protok eluenta je iznosio 1 mL min⁻¹. Uzorak je prije analize bio razrijeđen s acetonitrilom u potrebnom omjeru.

Kromatogram analiziranih Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola i Cbz-*N*-izoserina metodom 30 minuta prikazan je u prilogu 1. na slici 7.1. Primjer baždarnog pravca prikazan je u prilogu 2. na slici 7.2.

b) Metoda 20 minuta

Analiza je provedena kombinacijom izokratne i gradijentne metode mijenjanjem koncentracije eluenta B od 70% do 62% tijekom 5 minuta, potom izokratno na 62% u vremenu od 5-6 minute, od 6 do 8 minute gradijentno od 62% do 61%, od 8 do 9 minute izokratno na 61%, 9 do 17 minute gradijentno od 61% do 40% i potom od 17 do 19,5 minute od 40% do 70%. Mjerenje je provedeno pri temperaturi od 30 °C i valnoj duljini 215 nm. Protok eluenta je iznosio 1 mL min⁻¹. Uzorak je prije analize bio razrijeđen s acetonitrilom u potrebnom omjeru.

Kromatogram analiziranih Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola i Cbz-*N*-izoserina metodom 20 minuta prikazan je u prilogu 3. na slici 7.3. Primjer baždarnog pravca prikazan je u prilogu 4. na slici 7.4.

3.3. Kemijska oksidacija aminoalkohola s jodoksibenzojevom kiselinom (IBX)

Za kemijsku oksidaciju aminoalkohola otopljeno je 0,61 g Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola u etil-acetatu volumena 58,00 mL te je potom dodano 1,47 g IBX-a. Otapanje je provedeno pri 800 okr. min⁻¹ na magnetskoj miješalici *Tehtnica MM-540* prikazanoj na slici 3.3. Kemijska oksidacija je provedena u vodenoj kupelji temperature 80 °C (temperatura vrenja etil-acetata je 77 °C) koja je dio aparature prikazanoj na slici 3.7. Liebigovo hladilo je korišteno za povratak isparenog etil-acetata natrag u reaktor. Proces kemijske oksidacije trajao je 4 sata, tokom kojih je svakih 40 minuta bila provedena analiza uzoraka na HPLC-u. Tijekom reakcije su također bili uzimani i uzorci za analizu na TLC-u. Uzorci su bili analizirani na pločicama *TLC Silica gel 60 F254* prikazanima na slici 3.9., a mobilna faza je bila smjesa kloroform : metanol u omjeru 5:1.

3.4. Vakuum evaporacija etil acetata nakon kemijske oksidacije Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola

Evaporacija, tj. isparavanje kapljevine, je postupak kojim se dobiva veća koncentracija tražene tvari isparavanjem neželjenih tvari. Zato je ovdje korištena vakuum evaporacija kako bi se uklonio etil-acetat nakon kemijske oksidacije alkohola i sinteze zaštićenog Cbz-*N*-

izoserina. Za proces vakuum evaporacije potrebna je složena aparatura koja je prikazana na slici 3.8. Temperatura vodene kupelji u kojoj se nalazio uzorak volumena 7,5 mL je između 45 °C i 50 °C, tlak sustava je između 500 i 470 mbar, temperature ledene vodene kupelji koja djeluje kao sustav za hlađenje je 10 °C, kao i temperatura završnog dijela hladne vodene kupelji u kojoj se prikuplja etil-acetat. Nakon evaporacije koja je trajala 3,5 sata u tikvici je dobiveno 3 mL uzorka.

3.5. Određivanje kinetike oksidacije Cbz-S-3-amino-1,2-propandiola

Kinetika enzima ADH iz konjske jetre određena je u reakciji oksidacije Cbz-S-3-amino-1,2-propandiola.

Uzorci su prije dodavanja enzima bili termostatorani u vodenoj kupelji pri 25 °C tokom 5 minuta. Mjerenja su provedena spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 340 nm, te u puferu 50 mM TEA HCl pH 8,0.

Koncentracija NAD^+ je prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije aminoalkohola na specifičnu aktivnost enzima bila konstantna. Sastav reakcijske smjese u kivetu spektrofotometra nalazi se u tablici 3.4.

Tablica 3.4. Sastav reakcijske smjese u kivetu pri ispitivanju utjecaja koncentracije aminoalkohola na specifičnu aktivnost enzima ADH iz konjske jetre

Otopina	aminoalkohol	NAD^+	pufer	ADH
$V[\mu\text{L}]$	x	150	800-x	100
$c_{\text{temeljna otopina}} [\text{mM}]$	151,80	60,92	50,00	10,00 mg mL ⁻¹
$c_{\text{u kivetu}} [\text{mM}]$	x	9,14	x	1,00 mg mL ⁻¹

Koncentracija aminoalkohola je prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije NAD^+ na specifičnu aktivnost enzima bila konstantna. Sastav reakcijske smjese u kivetu spektrofotometra dan je u tablici 3.5.

Tablica 3.5. Sastav reakcijske smjese u kivetu pri ispitivanju utjecaja koncentracije NAD^+ na specifičnu aktivnost enzima ADH iz konjske jetre

Otopina	aminoalkohol	NAD^+	pufer	ADH
$V[\mu\text{L}]$	750	x	150-x	100
$c_{\text{temeljna otopina}} [\text{mM}]$	204,81	60,57	50,00	10,00 mg mL ⁻¹
$c_{\text{u kivetu}} [\text{mM}]$	150,53	x	x	1,00 mg mL ⁻¹

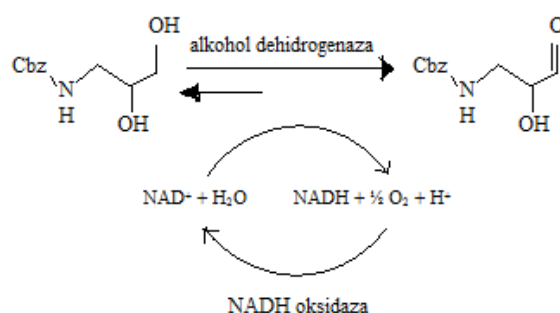
Koncentracije aminoalkohola i NAD^+ su prilikom ispitivanja utjecaja koncentracije NADH na specifičnu aktivnost enzima bile konstantne. Sastav reakcijske smjese u kivetu spektrofotometra dan je u tablici 3.6.

Tablica 3.6. Sastav reakcijske smjese u kivetu pri ispitivanju utjecaja koncentracije NADH na specifičnu aktivnost enzima ADH iz konjske jetre

Otopina	aminoalkohol	NAD^+	NADH	pufer	ADH
$V[\mu\text{L}]$	200	150	x	600-x	50
$c_{\text{temeljna otopina}} [\text{mM}]$	789,52	63,31	0,92	50,00	10,00 mg mL^{-1}
$c_{\text{u kivetu}} [\text{mM}]$	157,90	9,50	x	x	1,00 mg mL^{-1}

3.6. Enzimatska oksidacija aminoalkohola

Enzimatska oksidacija Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola provedena je u kotlastom reaktoru. Shema reakcije prikazana je na slici 3.13. Reakcija je katalizirana enzimom alkohol dehidrogenazom iz konjske jetre uz prisustvo koenzima NAD^+ i enzima NADH oksidaze (NOX) koji služi za regeneraciju koenzima.



Slika 3.13. Shema reakcije oksido-redukcije aminoalkohola Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola

Reakcija je provedena u dva paralelna eksperimenta u kotlastom reaktoru radi utvrđivanja ponovljivosti eksperimentalnih podataka. Reakcije su se odvijale pri sobnoj temperaturi uz konstantno miješanje na tresilici pri 400 okr min^{-1} tijekom 72 sata. Reakcije su provedene u 100 mM TEA HCl puferu pH 8,0. Volumen reakcijske smjese iznosio je 200 μL , a sastav otopine je prikazan u tablici 3.7.

Tablica 3.7. Sastav otopine u reaktoru za provođenje enzimatske oksidacije Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola

Otopina	aminoalkohol	NAD ⁺	NADH	puffer	ADH
V[μ L]	19,80	10,10	94,70	55,40	20,00
<i>c</i> _{temeljna otopina} [mM]	100,90	19,86	0,63	100,00	100,00 mg mL ⁻¹
<i>c</i> _{u kiveti} [mM]	10,00	1,00	x	100,00	10,00 mg mL ⁻¹

Tokom provođenja reakcija u određenim vremenskim intervalima uzimani su uzorci za analizu na HPLC-u metodom 20 minuta i metodom 30 minuta. Uzorci su filtrirani i razrijeđeni u acetonitrilu prije analize.

3.7. Cbz-zaštita aminokiseline

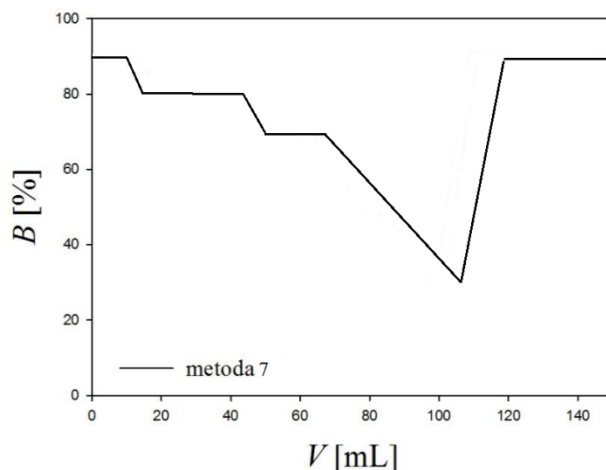
Aminokiselina Cbz-*N*-izoserin je nusprodukt reakcije oksidacije Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola. Iz tog razloga zaštićujemo izoserin Cbz zaštitom kako bi se dokazalo prisustvo navedene aminokiseline u reakcijskoj smjesi prilikom enzimatske oksidacije aminoalkohola.

Otopljeno je 0,1211 g izoserina i 0,2020 g natrijevog hidrogenkarbonata (NaHCO₃) u 1,59 mL ultračiste vode i 4,75 mL kloroforma. Smjesa je miješana pri 800 okr min⁻¹ na magnetskoj miješalici *Tehtnica MM-540* prikazanoj na slici 3.3. Nakon toga je slijedio postupak hlađenja pri 0 °C i dodavanje 0,21 mL benzil-kloroformata čime je započela reakcija koja je trajala 24 sata pri temperaturi 25 °C. Tijekom reakcije vršena je analiza uzoraka na HPLCu. Po završetku reakcije rađen je postupak evaporacije, nakon kojeg je volumen vodene faze uzorka aminokiseline bio 5 mL, te je dodano 3 mL ultračiste vode i 10 mL etil-acetata. Potom je uslijedilo centrifugiranje na centrifugi prikazanoj na slici 3.11. pri 5000 okr min⁻¹ tokom 10 min pri temperaturi 4 °C i odvajanje gornjeg organskog sloja. Postupak je ponovljen 4 puta u istim uvjetima.

Nakon toga je izvršeno ispiranje otopinama soli. Prva otopina soli je NaHCO₃ koncentracije 80 mg mL⁻¹ otopljena u vodi a druga je natrijev klorid (NaCl) koncentracije 375 mg mL⁻¹ otopljena u vodi. Nakon što su otopine pripravljene u lijevku za odjeljivanje prikazanom na slici 3.12., izvršen je postupak ispiranja aminokiseline dodavanjem 3 puta po 2 mL otopine NaHCO₃ i nakon toga otopine NaCl volumena 1 mL. Potom je uslijedilo centrifugiranje pri prethodno navedenim uvjetima. Nakon ispiranja uzorka ukupni volumen iznosio je 40 mL. Nakon evaporacije vidljivi su kristalići Cbz zaštićene aminokiseline u tikvici.

3.8. Pročišćavanje aldehida preparativnom kromatografijom

Nakon kemijske oksidacije Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola te evaporacije kapljevito dijela, potrebno je provesti separaciju aldehida od ostatka smjese. Izolacija je provedena na uređaju ÄKTAprime Plus prikazanom na slici 3.2. na koloni *GE Healthcare* 40x1 cm, $V=31,4$ mL s 10-15 g punila *LiChroprep Rp-18* (25-40 μm). Eluenti korišteni za izolaciju su eluent A (acetonitril, ultračista voda i TFA (80:20:0,095 v/v)) i eluent B (ultračista voda i TFA (0,1 % v/v)). Prije izolacije uzorak je filtriran zbog zaostalog IBX-a nakon postupka kemijske oksidacije. U 2 mL filtriranog uzorka dodan je eluent A u volumenu 8 mL. Otopina je miješana na magnetskoj miješalici kako bi se uzorak homogenizirao, te je nakon toga bio pokrenut proces izolacije. Proces izolacije ponovljen je par puta da bi se utvrdila najbolja metoda izolacije aldehida. Primjer jedne od metoda prikazan je na slici 3.14. Metode se sastoje od variranja gradijentnih i izokratnih dijelova eluenta B. Nakon prikupljanja frakcija uzorci su analizirani na HPLC-u metodom 20 minuta.



Slika 3.14. Grafički prikaz metode 7 za izolaciju aldehida na uređaju za pročišćavanje uzorak preparativnom kromatografijom

4. REZULTATI I RASPRAVA

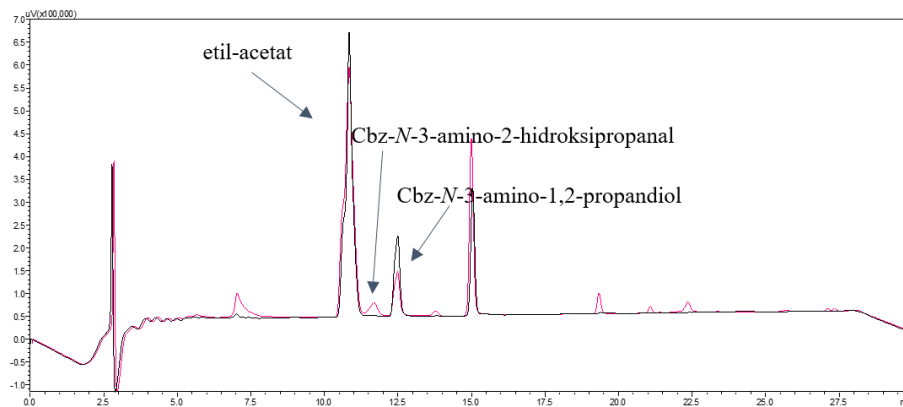
U ovom radu provedena je kemijska i enzimatska oksidacija aminoalkohola. Željeni produkt reakcije je aminoaldehid, a mogući nusprodukt oksidacije je aminokiselina Cbz-*N*-izoserin koja je u radu sintetizirana kako bi se potvrdilo i dokazalo da nastaje kao nusprodukt. Ispitan je utjecaj pH vrijednosti na aktivnost komercijalnog enzima alkohol dehidrogenaze iz konjske jetre. Određena je kinetika komercijalne ADH iz konjske jetre u proučavanoj reakciji oksidacije. Aminoaldehid dobiven kemijskom oksidacijom je pročišćen i korišten za dokazivanje aktivnosti enzima alkohol dehidrogenaze u povratnoj reakciji redukcije.

4.1. Kemijska oksidacija aminoalkohola jodoksibenzojevom kiselinom (IBX) i pročišćavanje aldehida preparativnom kromatografijom

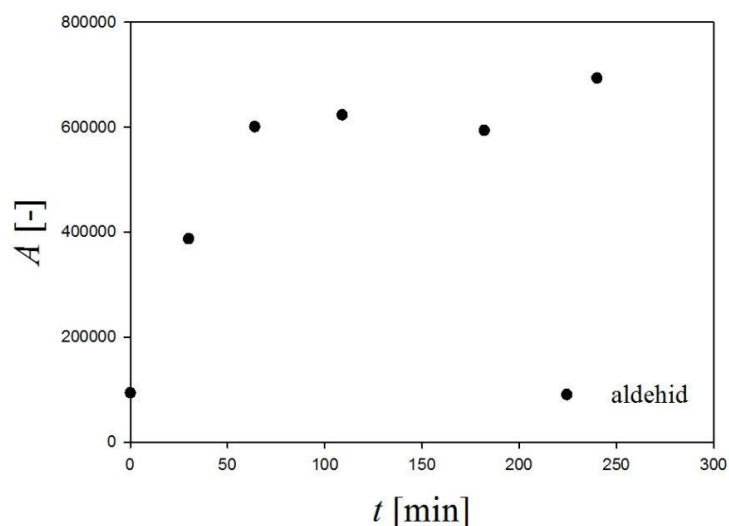
Kemijska oksidacija aminoalkohola je provedena radi uspostavljanja analitičke metode praćenja reakcije oksidacije s HPLC-om. Zbog nepostojanja standarda za produkt trebalo se odrediti gdje on izlazi na kromatogramu da bi se mogla pratiti enzimatska oksidacija. Rezultati su prikazani na slici 4.1. a pik aminoaldehida vidljiv je na 11,6 min.

Na slici 4.2. je prikazana promjena koncentracije aminoaldehida tokom reakcije te je vidljiv porast površine pika. Na slici 4.3. je vidljivo da koncentracija aminoalkohola tijekom kemijske reakcije opada. Uz spomenutu analizu uzoraka na HPLC-u također je i praćena reakcija na TLC-u čiji su rezultati prikazani na slici 4.4. Promjena je vidljiva pod UV svjetlom što upućuje na nastajanje aminoaldehida. Konverzija aminoalkohola je po završetku oksidacije iznosila 45,9 %. Nakon kemijske oksidacije započet je proces pročišćavanja aldehida preparativnom kromatografijom.

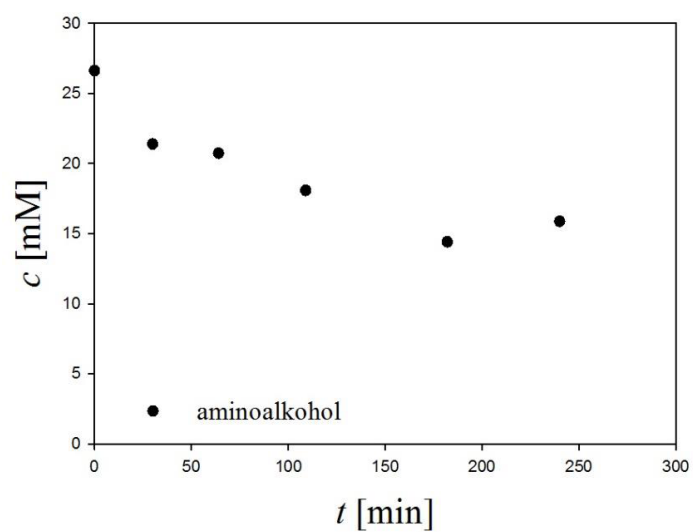
Proces pročišćavanja odvija se prikupljanjem frakcija izoliranog i pročišćenog aldehida koje se potom analiziraju kako bi se utvrdila koncentracija aldehida. Najveća koncentracija aldehida tokom pročišćavanja prisutna je u frakcijama 17-23. Površine pikova aminoalkohola, aminoaldehida i aminokiseline u ovisnosti o broju frakcije pokazuju uspješnost separacije, što je vidljivo na slici 4.5.



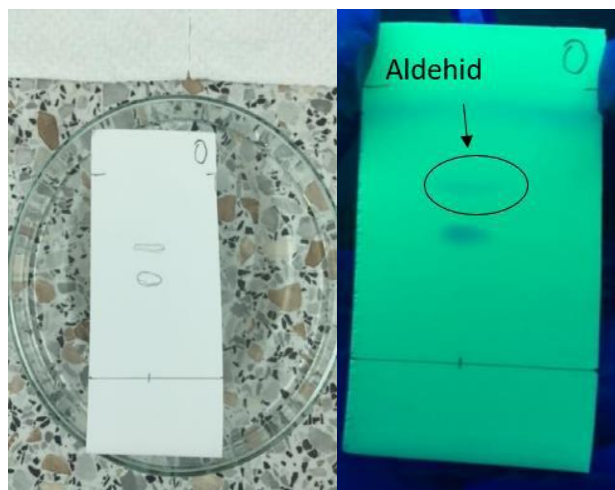
Slika 4.1. Kromatogram kemijske oksidacije aminoalkohola s jodoksibenzojevom kiselinom metodom 30 minuta ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $m_{\text{Cbz-N-3-amino-1,2-propandiol}} = 0,61\text{ g}$, $V_{\text{etil-acetat}} = 58\text{ mL}$, $m_{\text{IBX}} = 1,47\text{ g}$, crna linija – uzorak u 0 h, roza linija – uzorak u 4 h)



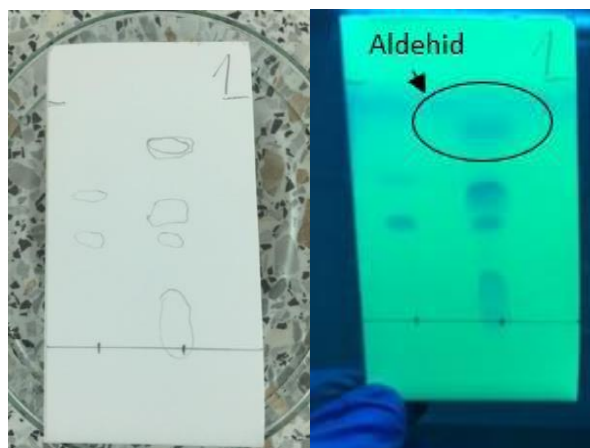
Slika 4.2. Koncentracije aminoaldehida tijekom kemijske oksidacije ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $m_{\text{Cbz-N-3-amino-1,2-propandiol}} = 0,61\text{ g}$, $V_{\text{etil-acetat}} = 58\text{ mL}$, $m_{\text{IBX}} = 1,47\text{ g}$)



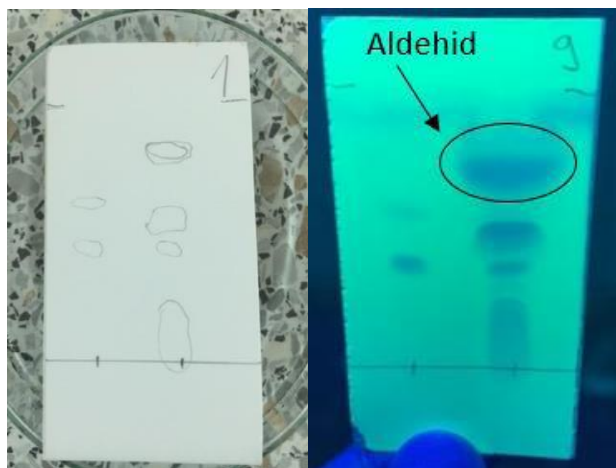
Slika 4.3. Koncentracije aminoalkohola tijekom kemijske oksidacije ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$, $m_{\text{Cbz-N-3-amino-1,2-propandiol}} = 0,61\text{ g}$, $V_{\text{etil-acetat}} = 58\text{ mL}$, $m_{\text{IBX}} = 1,47\text{ g}$)



a)

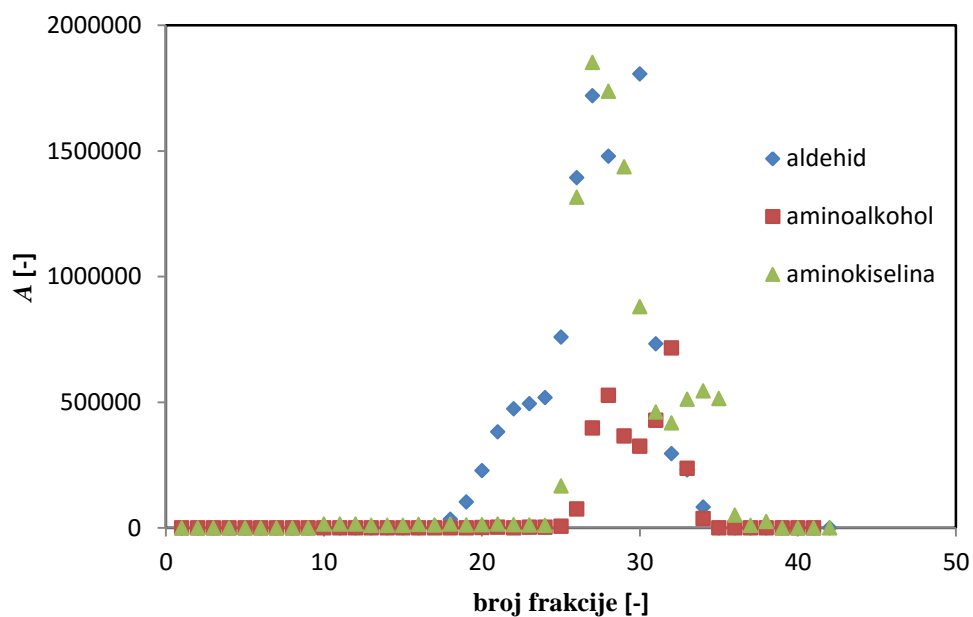


b)



c)

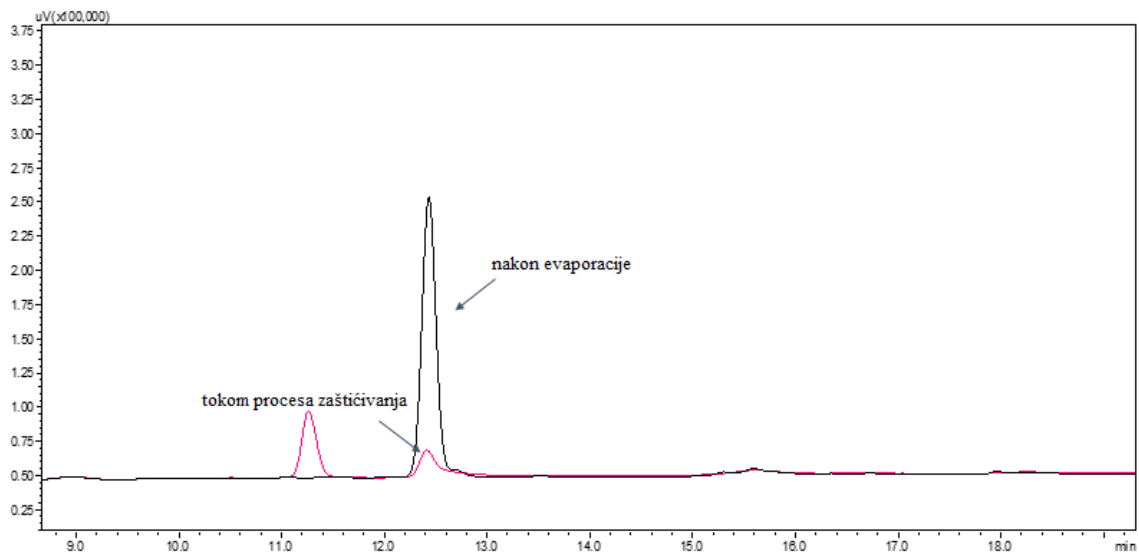
Slika 4.4. Tijek praćenja reakcije kemijske oksidacije na TLC-u pod prirodnim i UV svjetlom na a) početku reakcije, b) nakon 40 minuta i c) kraju reakcije



Slika 4.5. Sastav frakcija tijekom pročišćavanja aminoaldehida

4.2. Cbz-zaštita aminokiseline *N*-izoserin

Rezultat Cbz-zaštite izoserina prikazan je na kromatogramu na slici 4.6., na kojem se vidi odziv uzorka aminokiseline tokom procesa zaštićivanja te odziv uzorka nakon evaporacije. Vidljiva velika razlika u površini pokazuje uspješnost zaštićivanja i izolacije. Završni rezultat zaštićivanja vidi se u obliku nastalih kristalića aminokiseline na slici 4.7.



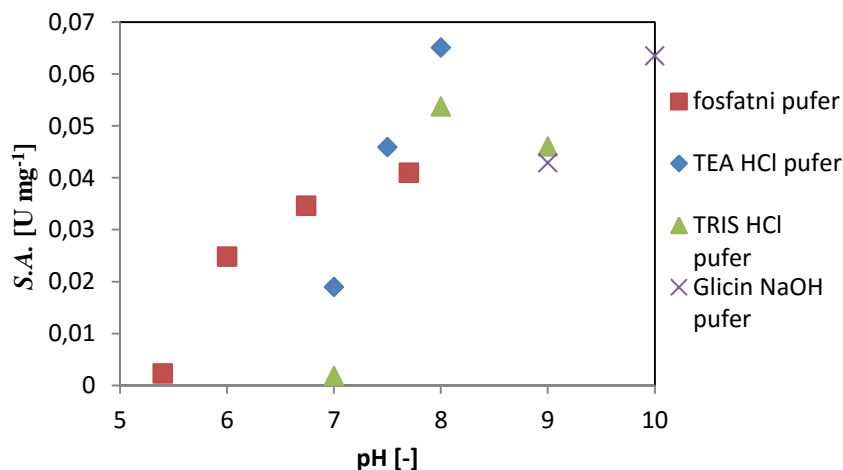
Slika 4.6. Kromatogram zaštićene aminokiseline Cbz-*N*-izoserin tijekom i nakon evaporacije



Slika 4.7. Kristalići zaštićene aminokiseline nakon vakuum evaporacije

4.3. Utjecaj pH vrijednosti na aktivnost ADH iz konjske jetre

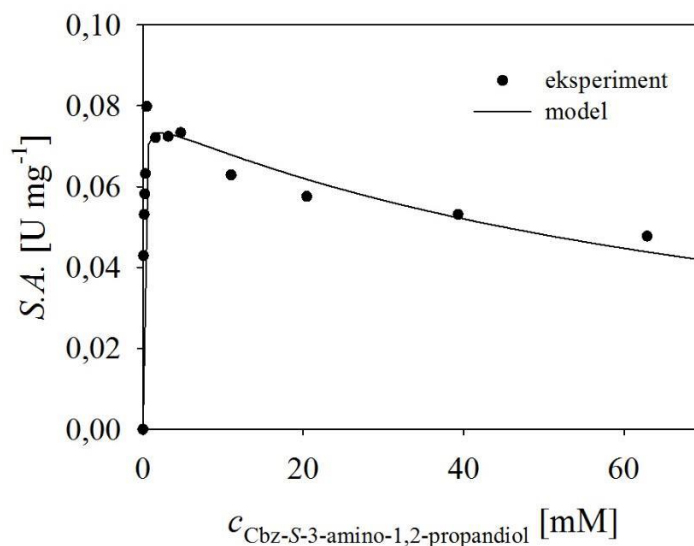
Provedena su mjerenja aktivnosti ADH iz konjske jetre u puferima različitih pH vrijednosti. Mjerenja su provedena uz Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiol kao supstrat. Rezultati su prikazani na slici 4.8. Vidi se da enzim pokazuje najveću aktivnost u 50 mM TEA HCl puferu pH 8,0. Ta pH vrijednost i pufer su korišteni u daljnim istraživanjima.



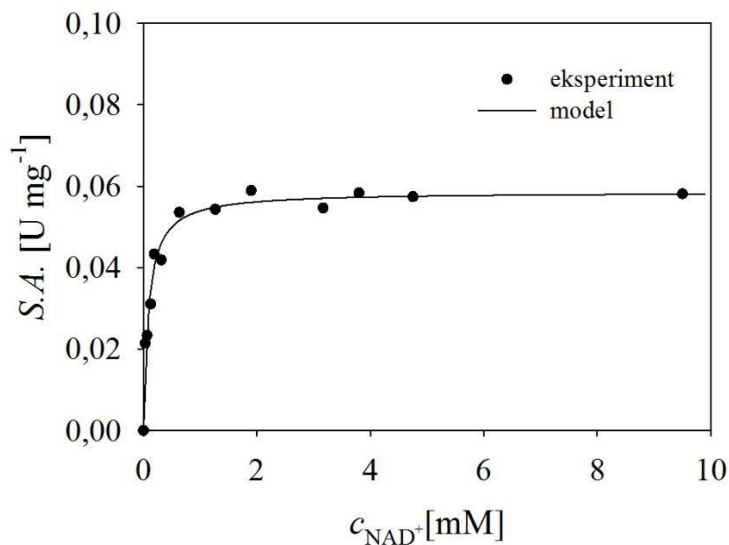
Slika 4.8. Ovisnost specifične aktivnosti ADH iz konjske jetre o pH vrijednosti (25 °C, 50 mM TEA HCl pufer, $\gamma_{ADH} = 0,50 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{NAD^+} = 4,76 \text{ mM}$, $c_{Cbz-S-3-amino-1,2-propandiol} = 11,37 \text{ mM}$)

4.4. Kinetika oksidacije Cbz-S-3-amino-1,2-propandiola

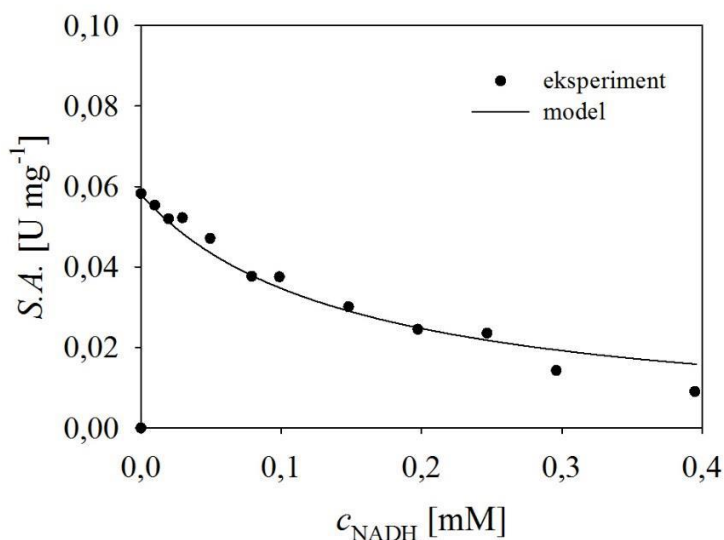
Utjecaj koncentracija Cbz-S-3-amino-1,2-propandiola, NAD^+ i NADH na specifičnu aktivnost ADH iz konjske jetre vidljiv je na slikama 4.9., 4.10. i 4.11.. Na slici 4.9. se vidi da visoke koncentracije Cbz-S-3-amino-1,2-propandiola imaju inhibicijski učinak na enzim, pa su rezultati opisani Michaelis-Menteničinim kinetičkim modelom uz inhibiciju supstratom.



Slika 4.9. Utjecaj koncentracije Cbz-S-3-amino-1,2-propandiola na specifičnu aktivnost ADH iz konjske jetre u reakciji oksidacije Cbz-S-3-amino-1,2-propandiola (25 °C, 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0, $\gamma_{ADH} = 0,50 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{NAD^+} = 9,50 \text{ mM}$)



Slika 4.10. Utjecaj koncentracije NAD^+ na specifičnu aktivnost ADH iz konjske jetre u reakciji oksidacije Cbz-S-3-amino-1,2-propandiola (25°C , 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0, $\gamma_{\text{ADH}} = 0,50 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{NAD}^+} = 9,50 \text{ mM}$)



Slika 4.11. Utjecaj koncentracije NADH na specifičnu aktivnost ADH iz konjske jetre u reakciji oksidacije Cbz-S-3-amino-1,2-propandiola (25°C , 50 mM TEA HCl pufer pH 8,0, $\gamma_{\text{ADH}} = 0,50 \text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{NAD}^+} = 9,50 \text{ mM}$)

Na slici 4.10. se vidi da se utjecaj koncentracije NAD^+ na specifičnu aktivnost enzima može opisati Michaelis-Menteničinom kinetikom. Na slici 4.11. se može vidjeti da porastom koncentracije NADH dolazi do smanjenja specifične aktivnosti enzima, što ukazuje na pojavu

inhibicije. Iz eksperimentalnih podataka prikazanih na slikama 4.9.-4.11. procijenjeni su kinetički parametri prikazani u tablici 4.1.

Tablica 4.1. Kinetički parametri enzima ADH iz konjske jetre procijenjeni iz eksperimentalnih rezultata prikazanih na slikama 4.9. - 4.11.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_m	U mg^{-1}	$0,077 \pm 0,003$
$K_m^{\text{Cbz-S-3-amino-1,2-propandiol}}$	mM	$0,062 \pm 0,014$
$K_i^{\text{Cbz-S-3-amino-1,2-propandiol}}$	mM	$82,649 \pm 18,143$
$K_m^{\text{NAD}^+}$	mM	$0,086 \pm 0,011$
K_i^{NADH}	mM	0.0013 ± 0.0001

4.5. Mjerenje aktivnosti ADH iz konjske jetre u povratnoj reakciji na aldehid

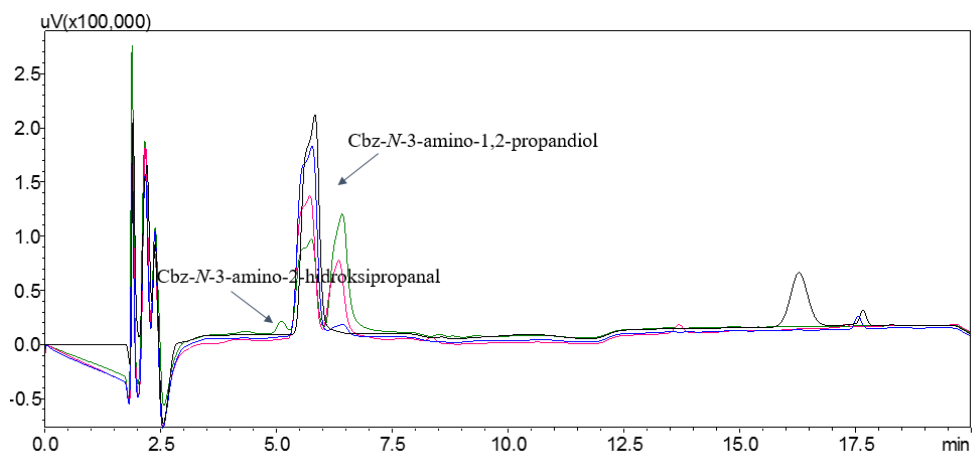
Dobiveni rezultati se nalaze u tablici 4.2., i iz njih je vidljivo da enzim pokazuje aktivnost na aminoaldehid. Koncentracija korištenog aminoaldehida nije određena zbog nepostojećeg standarda. Dobiveni rezultati pokazuju da je ADH iz konjske jetre enzim koji katalizira oksidoredukciju aminoalkohola u aminoaldehid.

Tablica 4.2. Specifična aktivnost ADH iz konjske jetre na pročišćeni aminoaldehid

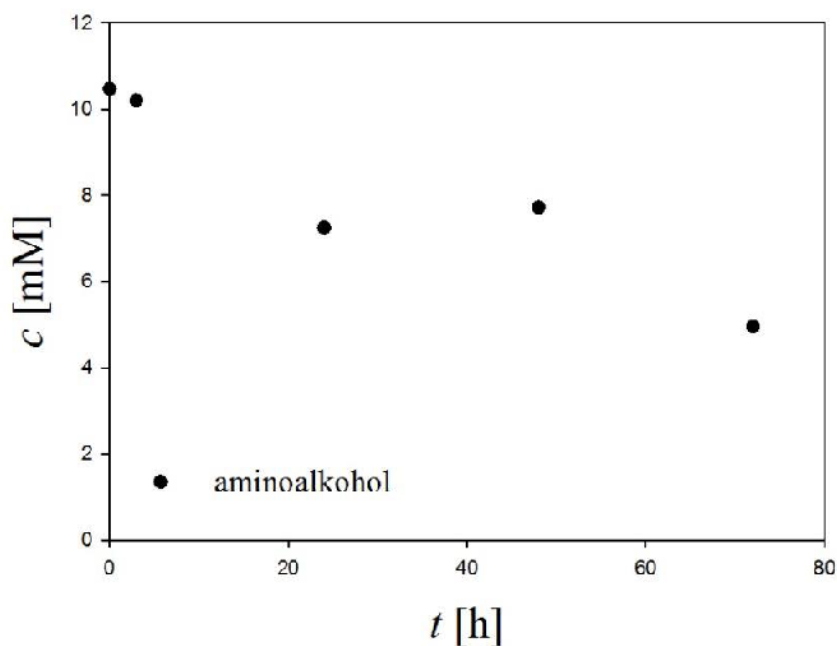
$V_{\text{aminoaldehid}} [\mu\text{L}]$	25	50	150
S.A. [U mg^{-1}]	0,0390	0,0447	0,0332

4.6. Enzimatska oksidacija aminoalkohola

Reakcija oksidacije aminoalkohola katalizirana je enzimom ADH iz konjske jetre, uz prisustvo NADH oksidaze za regeneraciju koenzima, a kao produkt nastaje aminoaldehid. Kromatogram na slici 4.12. prikazuje promjene u koncentracijama analita u uzorcima uzetim nakon 0, 3, 24 i 72 sata. Prema vidljivom pik u 5,1 minuti može se zaključiti da je nastao željeni produkt, a pik aminoalkohola se smanjuje tijekom reakcije. Na slici 4.13. prikazana je koncentracija aminoalkohola koja je s vremenom padala. Maksimalne postignuta konverzija aminoalkohola tijekom 72-satne reakcije iznosila je 52,6 %.



Slika 4.12. Kromatogram uzoraka tijekom enzimatske oksidacije aminoalkohola mjerenih metodom 20 minuta (crna linija = uzorak u 0 h, plava linija = uzorak u 3 h, roza linija = uzorak u 24 h i zelena linija = uzorak u 72 h)



Slika 4.13. Koncentracija aminoalkohola tokom enzimatske oksidacije (25°C , 100 mM TEA HCl pufer pH 8,0, $\gamma_{\text{ADH}}=10\text{ mg mL}^{-1}$, $c_{\text{NAD}^+} = 1\text{ mM}$, $c_{\text{Cbz-N-amino-1,2-propandiol}} = 10,05\text{ mM}$, $V.A.\text{NOX} = 0,1\text{ U mL}^{-1}$)

5. ZAKLJUČAK

Kemijska oksidacija Cbz-*N*-3-1,2-propandiola provedena je kako bi se uspostavila analitička metoda, tj. omogućila analiza enzimatske oksidacije aminoalkohola. Prema konverziji aminoalkohola od 45,9 % možemo zaključiti da je reakcija bila uspješna. Enzimatskom oksidacijom Cbz-*N*-3-1,2-propandiola kataliziranom enzimom ADH iz konjske jetre postignuta je konverzija aminoalkohola od 52,6 %.

Određena je kinetika enzimatske oksidoredukcije aminoalkohola s alkohol dehidrogenazom iz konjske jetre, a kinetiku je bilo moguće opisati s Michaelis-Menteničinim modelom uz inhibiciju supstratom. Iz dobivenih kinetičkih parametara vidljiv je i značajan inhibicijski učinak NADH na enzim u reakcijama oksidoredukcije.

Nakon izolacije kemijski dobivenog produkta Cbz-*N*-3-amino-2-hidroksipropanala preparativnom kromatografijom, spektrofotometrijski je testirana njegova redukcija uz NADH i ADH čime je dokazano da je ADH iz konjske jetre enzim koji katalizira proučavanu reakciju oksidoredukcije.

6. POPIS SIMBOLA

A	površina ispod odziva	[-]
ABS	apsorbancija	[-]
ADH	alkohol dehidrogenaza	
c	molarna koncentracija	[mM]
C_{bz}	karboksibenzojeva skupina	
$c_{\text{temeljna otopina}}$	molarna koncentracija temeljne otopine	[mM]
$c_{\text{u kiveti}}$	molarna koncentracija otopine u kiveti	[mM]
d	udaljenosti kroz koju prolazi svjetlost u kiveti	[cm]
$\epsilon_{340, NADH}$	specifična konstanta za NADH pri valnoj duljini 340 nm	
γ	masena koncentracija	[mg mL ⁻¹]
$HPLC$	kapljevinska kromatografija visokog učinka	
IBX	jodoksibenzojeva kiselina	
K_i	konstanta inhibicije	[mmol / dm ³]
K_m	Michaelisova konstanta	[mmol / dm ³]
m	masa	[g ili mg]
NAD^+	nikotinamid adenin dinukleotid	
$NADH$	nikotinamid adenin dinukleotid – reducirani oblik	
NOX	NADH oksidaza	
$S.A.$	specifična aktivnost enzima	[U / mg]
T	temperatura	[°C]
t	vrijeme	[min ili h]
TFA	trifluorocetna kiselina	
TLC	tankoslojna kromatografija	
UV	ultraljubičasto svjetlo	
V	volumen	
$V.A.$	volumna aktivnost enzima	[U / mL]
V_{enz}	volumen dodanog enzima	[μL]
V_m	maksimalna brzina reakcije	[U mg ⁻¹]
V_{uk}	ukupni volumen u kiveti spektrofotometra	[μL]

7. PRILOZI

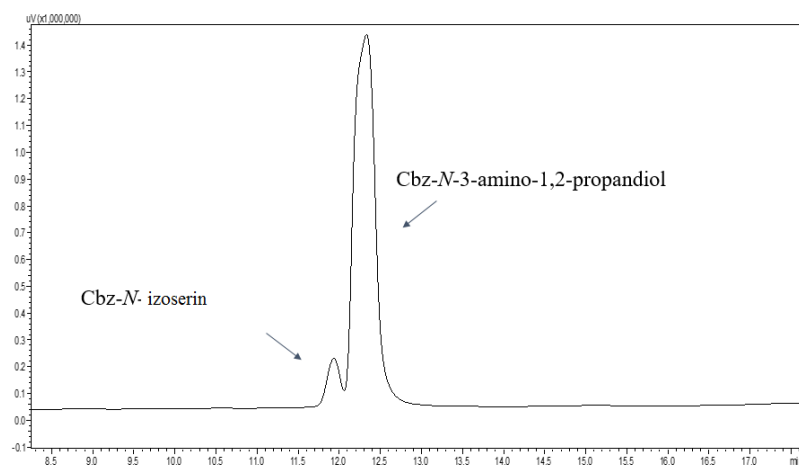
PRILOG 1. Slika 7.1. Kromatogram analiziranih Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola i Cbz-*N*-izoserina metodom 30 minuta

PRILOG 2. Slika 7.2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije Cbz-*N*-amino-1,2-propandiola metodom 30 minuta

PRILOG 3. Slika 7.3. Kromatogram analiziranih Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola i Cbz-*N*-izoserina metodom 20 minuta

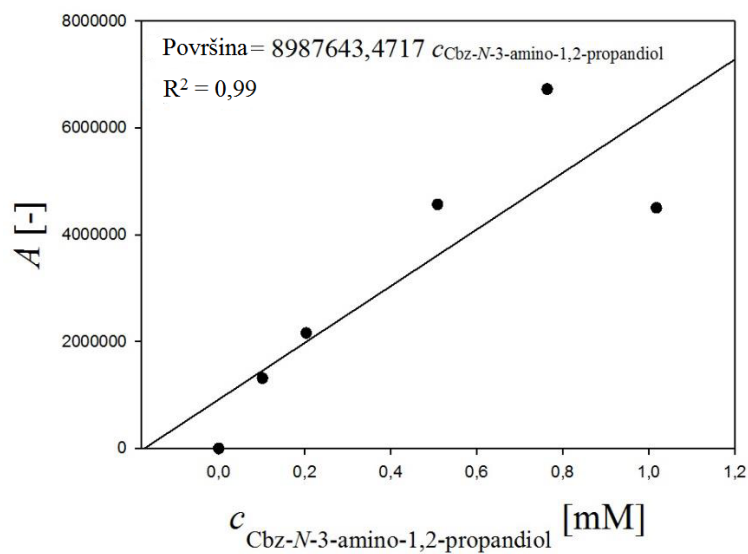
PRILOG 4. Slika 7.4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije Cbz-*N*-amino-1,2-propandiola metodom 20 minuta

PRILOG 1.



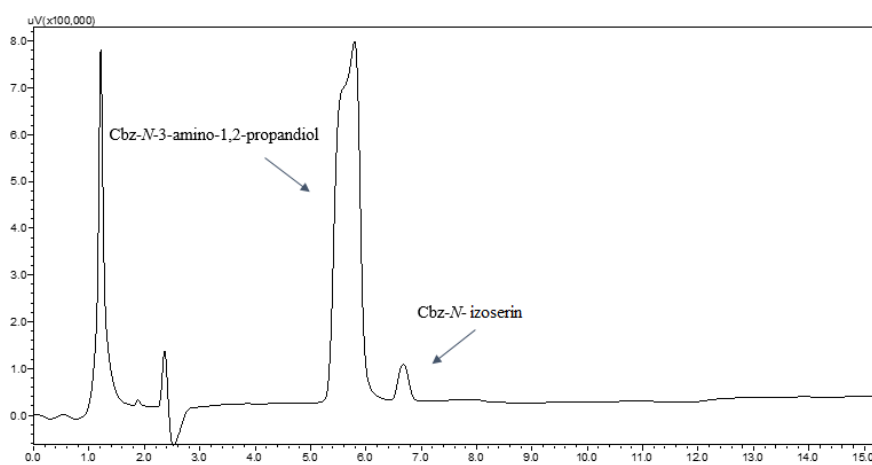
Slika 7.1. Kromatogram analiziranih Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola i Cbz-*N*-izoserina metodom 30 minuta

PRILOG 2.



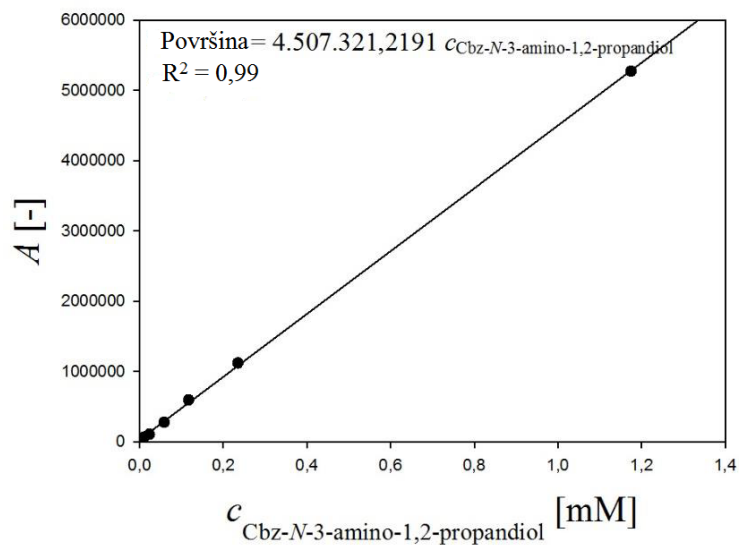
Slika 7.2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije Cbz-*N*-amino-1,2-propandiola metodom 30 minuta

PRILOG 3.



Slika 7.3. Kromatogram analiziranih Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola i Cbz-*N*-izoserina metodom 20 minuta

PRILOG 4.



Slika 7.4. Baždarni pravac za određivanje koncentracije Cbz-*N*-amino-1,2-propandiola metodom 20 minuta

8. LITERATURA

- K. Drauz, H. Waldmann; Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Wiley, 3 (2002)
- W. Hummel; Large-scale applications of NAD(P)-dependent oxidoreductases: recent developments, Trends in Biotechnology, 17(12):487-92 (1999)
- A. Illanes; Enzyme Biocatalysis - Principles and Applications, Springer, 1-29 (2008)
- T. Kaiho; Iodine chemistry and applications, Wiley, 277 (2014)
- R. Machielsen, A.R. Uria, S.W.M. Kengen, J. van der Oost; Production and characterization of a thermostable alcohol dehydrogenase that belongs to the aldo-keto reductase superfamily, Applied and Environmental Microbiology, 72 (1) 233-238 (2006)
- 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) 3001-3003 (2002)
- K.C. Nicolaou, D.J. Edmonds, P.G. Bulger; Cascade reactions in total synthesis, Angewandte Chemie International Edition, 45, 7134-7186 (2006)
- J.A. Pateman, C.H. Doy, J.E. Olsen, U. Norris, E.H. Creaser, M. Hynes; Regulation of Alcohol Dehydrogenase (ADH) and Aldehyde Dehydrogenase (ALDDH) in *Aspergillus nidulans*, Proceedings of the Royal Society of London 217, 243-264 (1983)
- S.H. Pine; Organic Chemistry - Fifth Edition, McGraw-Hill, 844-847 (1987)
- M.F. Reid, C.A. Fewson; Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases, Critical Reviews in Microbiology, 20(I):13-56 (1994)
- M. Sudar, Z. Findrik, Đ. Vasić-Rački, A. Soler, Pere Clapes; A new concept for production of (3*S*,4*R*)-6-[(benzyloxycarbonyl)amino]-5,6-dideoxyhex-2-ulose, a precursor of D-fagomine, RSC Advances, 5, 69819 (2015)
- M. Sudar, Z. Findrik, M. Vuković Domanovac, Đ. Vasić-Rački; Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactococcus lactis*, Biochemical Engineering Journal, 88, 12-18 (2014)
- L.F. Tietze; Domino reactions in organic synthesis, Chem. Rev., 96, 115-136 (1996)
- J.R.L. Walker; Spectrophotometric determination of enzyme activity: Alcohol Dehydrogenase (ADH), Biochemical Education, 20(1), 42-43 (1992)
- R.D. Woodyer, T. Johannes, H. Zhao; Regeneration of cofactors for enzyme biocatalysis, Enzyme Technology, 83-101 (2006)