

Aktivnost ketoreduktaza pri oksidaciji diola

Matković, Valerija

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:149:514634>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Valerija Matković

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Valerija Matković

AKTIVNOST KETOREDUKTAZA PRI OKSIDACIJI DIOLA

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 2017.



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

Zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević, na pomoći, savjetima i strpljenju prilikom izrade ovog rada.

Posebno zahvaljujem mag. ing. oecoing. Morani Česnik, na uloženom trudu i vremenu tijekom izvođenja eksperimenata te na savjetima i pomoći prilikom pisanja rada.

Zahvaljujem se svojim roditeljima, obitelji i prijateljima na svojoj potpori tijekom studiranja.

SAŽETAK

U radu je opisana kaskadna reakcija koja objedinjuje reakciju oksidacije Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola (diol) te reakciju aldolne adicije dihidroksiacetona (DHA) na aldehid sintetiziran u koraku oksidacije.

Za reakciju oksidacije testirano je 18 ketoreduktaza, te je njihova aktivnost uspoređena s aktivnošću enzima alkohol dehidrogenaze iz jetre konja (HLADH) koji se ranije pokazao kao katalizator aktivan u proučavanoj oksidoredukciji. Ketoreduktaze i dehidrogenaze zahtijevaju prisutnost koenzima NAD⁺ ili NADP⁺. Među testiranim enzimima pronađena su 2 aktivna uz NAD⁺, te tri aktivna uz koenzim NADP⁺ u proučavanoj oksidoredukciji. Odabrani enzimi su korišteni za provedbu kaskadne reakcije u kojoj je nakon oksidoredukcije slijedila aldolna adicija dihidroksiacetona na aldehid katalizirana D-fruktoza-6-fosfat aldolazom (FSA). Za učinkovitu oksidaciju diola korištena je NADH oksidaza (NOX) za regeneraciju koenzima. Kaskadna reakcija je praćena preko koncentracije nastalog aldolnog produkta nakon 24 i 48 sati, koja je ujedno bila korištena i kao mjerilo uspješnosti provedene reakcije. Usprkos tomu što je u provedenim reakcijama nastao željeni produkt, zaključeno je da je među ispitanima HLADH najbolji katalizator za navedenu reakciju.

Ključne riječi: kaskadna reakcija, aldolna adicija, Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiol, ketoreduktaze, NADH oksidaza.

ABSTRACT

This paper describes a cascade reaction which combines the oxidation reaction of Cbz-*N*-3-amino-1,2-propanediol (diol) and the reaction of the aldol addition of dihydroxyacetone (DHA) to the aldehyde synthesized in the oxidation step.

18 ketoreductases were tested for oxidation reaction, and their activity was compared with the activity of alcohol dehydrogenase from horse liver (HLADH), which previously proved to be the catalyst active in the study of oxidation. Ketoreductases and dehydrogenases require the presence of NAD⁺ or NADP⁺ coenzyme. Among the tested enzymes, 2 were active in the studied reaction with NAD⁺, and three with coenzyme NADP⁺. The selected enzymes were used to carry out a cascade reaction in which following oxidation, the aldol addition of dihydroxyacetone to aldehyde catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase (FSA) was carried out. NADH oxidase (NOX) for coenzyme regeneration was used for the effective oxidation of diol. The concentration of the formed aldol product after 24 and 48 hours in the cascade reaction was followed and was used as a measure of the reaction effectiveness. In spite of the fact that the desired product was formed in all reactions, HLADH was still found to be the best catalyst for this reaction.

Keywords: cascade reaction, aldol addition, Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiol, ketoreductases, NADH oxidase

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Kataliza i katalizatori	2
2.2. Biokataliza	2
2.2.1. Biokataliza u farmaceutskoj industriji	3
2.3. Enzimi	3
2.3.1. Alkohol dehidrogenaza (ADH)	4
2.3.2. Aldolaze	5
2.3.3. Enzimski kinetika	5
2.4. Regeneracija koenzima	8
2.5. Kaskadne reakcije	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. Aparatura	11
3.1.1. Homogenizator	11
3.1.2. Spektrofotometar	11
3.1.3. Analitička vaga	12
3.1.4. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)	12
3.1.5. Tresilica	12
3.2. Analitičke metode	13
3.2.1. Određivanje aktivnosti spektrofotometrijskom metodom	13
3.2.2. Tekućinska kromatografija visokog učinka (HPLC)	15
3.2.3. Provođenje kaskadnih reakcija	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	20
4.1. Rezultati testa aktivnosti	20
4.2. Rezultati kaskadnih reakcija	21
5. ZAKLJUČAK	24
6. SIMBOLI	25
7. LITERATURA	26
8. PRILOG	28
9. ŽIVOTOPIS	29

1. UVOD

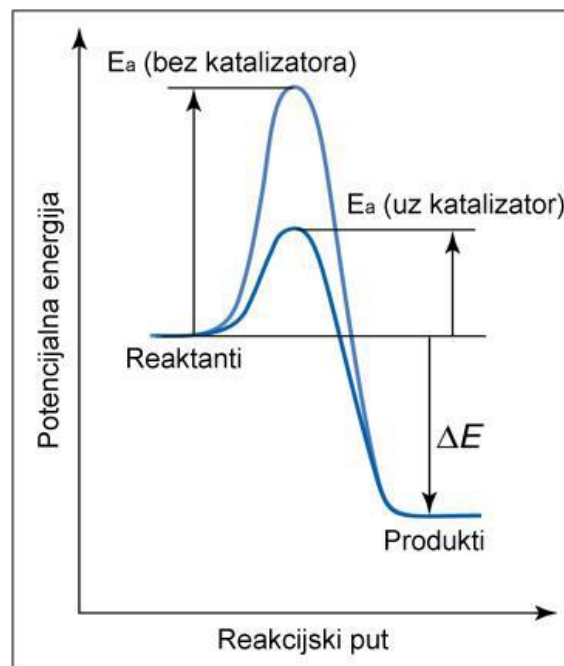
Prva saznanja o upotrebi enzima sežu u antičko doba. Enzimi su se tada rabili kao katalizatori prilikom proizvodnje vina, voćnih sokova, octa, te u drugim procesima fermentacije. Enzimi kataliziraju kemijske reakcije u biološkim sustavima. Spoznavši važnosti enzima u kemijskim reakcijama raste njihova primjena u biokatalizi.[1]

Industrija se sve više okreće uporabi enzima umjesto, klasičnih katalizatora. Enzimi su ekološki prihvatljiviji, a osim toga mogu se projektirati i funkcijski prilagoditi reakciji.[2]

2. OPĆI DIO

2.1. Kataliza i katalizatori

Da bi kemijska reakcija bila uspješna, odnosno da bi iz reaktanata nastao produkt, nastali međuprodukt mora svladati energetska barijeru koju nazivamo energijom aktivacije (E_a). Katalizatori ubrzavaju kemijsku reakciju tako što smanjuju energetska barijeru, odnosno energiju aktivacije kako je prikazano na slici 1. Katalizatori na brzinu reakcije djeluju tako što mijenjaju reakcijski mehanizam odnosno reakcijski put između reaktanata i produkata. Pritom ne utječu na položaj reakcijske ravnoteže jer jednako ubrzavaju naprednu i povratnu reakciju, zbog čega se konstanta kemijske ravnoteže ne mijenja. Izuzetci su slučajevi kada se reakcija odvija u više stupnjeva. Ukoliko katalizator sudjeluje u sporijem stupnju koji definira brzinu kemijske reakcije, onda će konstanta kemijske reakcije ovisiti i o koncentraciji katalizatora.[3]



Slika 1 Prikaz reakcijskih puteva sa i bez katalizatora

U većini je slučajevima dovoljna jako mala količina katalizatora zbog toga što se on ne mijenja tokom reakcije odnosno nakon nastajanja produkta, katalizator se oslobađa i može se ponovno vezati na reaktante.[3]

2.2. Biokataliza

Biokatalizu definiramo kao upotrebu enzima ili cijelih biljnih i životinjskih stanica kao biokatalizatora u sintezi. Biokatalizatori ne ulaze u konačne produkte reakcije, već iz reakcije

izlaze potpuno nepromijenjeni. Prilikom katalitičkog djelovanja dolazi do nastanka nestabilnog međuprodukta (aktivirani kompleks) vezanjem biokatalizatora i reaktanta, a što u konačnici rezultira oslobađanjem nepromijenjenog biokatalizatora i produkta reakcije.[5] Enzimi se koriste već stotinama godina prilikom proizvodnje alkohola fermentacijom ili za dobivanje sira enzimski potpomognutim raspadom mliječnih proteina. [5]

Razvoj novih enzima ide u smjeru njihove kontrolirane evolucije s ciljem da se dobije enzim koji će biti u potpunosti prilagođen određenome kemijskome procesu. Dizajn enzima podrazumijeva sintezu novih molekula s određenom funkcijom. Pritom su promjene pojedinih dijelova molekule proteina takve da uzrokuju predviđene promjene funkcije. Danas se svojstva enzima kao što su stabilnost, aktivnost, selektivnost i specifičnost supstrata mogu rutinski projektirati u laboratoriju.[6]

Trenutno postoji preko 100 različitih biokatalitičkih procesa implementiranih u farmaceutskoj, kemijskoj, poljoprivrednoj i prehrambenoj industriji. [6]

2.2.1. Biokataliza u farmaceutskoj industriji

Uporaba enzima u farmaceutskoj industriji ima prednost pred klasičnim katalizatorima zbog ranije navedenih svojstava enzima selektivnosti, aktivnosti, stabilnosti i specifičnosti. Najveću prednost enzimima daju regioselektivne i stereoselektivne osobine koje omogućuju sintezu enantio- i stereo-čistih produkata. Osim toga, enzimi omogućuju provedbu složenih sinteza u uvjetima sobne temperature i atmosferskog tlaka. [7]

U današnje se vrijeme sintetiziraju sve kompleksnije organske molekule s višestrukim kiralnim centrima. Biokataliza često služi kako bi se razložili kiralni centri ili kako bi se stvorili dodatni.[7]

2.3. Enzimi

Ukoliko klasične kemijske katalizatore zamijenimo enzimima, katalitička reakcija postaje biokatalitička reakcija. Enzimi su katalizatori koji sudjeluju u biokemijskim metaboličkim reakcijama živih organizama. To su proteinske makromolekule koje djeluju u blagim uvjetima biološkog sustava. Upotreba enzima u industrijskoj sintezi sve je češća. Provođenje enzimske sinteze u blagim reakcijskim uvjetima sprječava nepogodne procese poput izomerizacije i recemizacije. Enzimi su dobri katalizatori zbog svoje specifičnosti, učinkovitosti, biorazgradivosti, blagih reakcijskih uvjeta koji ne zahtijevaju velike količine utrošene energije, te zbog toga što se klasificiraju kao prirodni produkti. Nadalje enzimi su vrlo

specifični i selektivni za enantio-selektivno i regio-selektivno uvođenje funkcijskih skupina. Ukoliko je enzim enantio-selektivan, kao nusprodukt neće nastati neželjeni enantiomer koji u većini slučajeva ima negativno djelovanje u odnosu na željeni produkt. Enzimi su pogodni i za pripremu kiralnih spojeva, te za razdvajanje recemičnih smjesa. Nedostatci enzima kao katalizatora jesu njihova visoka cijena, kompleksna struktura, potreba za koenzimima, sklonost deaktivaciji, nestabilnost izvan prirodnog okruženja, mala aktivnost u nevodnom mediju.[8]

Enzime imenujemo s 4 broja koji redom označavaju vrstu enzima, vrstu kemijske grupe, vrstu kemijske grupe na koju enzim djeluje, te korelacijski broj za preciznije imenovanje. Dijelimo ih u 6 skupina ovisno o tome koje reakcije kataliziraju:

1. Oksidoreduktaze kataliziraju redoks reakcije sudjelujući pritom u prijenosu elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma.
2. Transferaze premještaju funkcijske skupine s donora na akceptor.
3. Hidrolaze kataliziraju reakcije hidrolize, te uglavnom ne zahtijevaju prisutnost koenzima.
4. Liaze kataliziraju reakcije nehidrolitičkih i neoksidativnih cijepanja kemijskih veza. Ovisno o tome koju kemijsku vezu cijepaju dijelimo ih u 7 grupa.
5. Izomerase kataliziraju reakcije kod kojih dolazi do pretvaranja molekule jednog izomera u drugi.
6. Ligaze kataliziraju reakcije spajanja molekula kovalentnom vezom. Za sada nema tehnoloških primjena ovih enzima zbog njihove kompleksnosti, nestabilnosti i visoke cijene.[9]

Pojedine skupine enzima zahtijevaju prisutnost koenzima u reakcijskoj smjesi. Koenzimi su molekule male molekulske mase koje su odgovorne za transport vodikovih iona, elektrona ili funkcionalnih skupina. [9]

U živim organizmima enzimi su katalizatori odgovorni za stanični metabolizam. Mogu biti proizvedeni ekstrakcijom iz stanica ili direktno iz živih organizama. Šezdesetih godina prošlog stoljeća 70% enzima je bilo ekstrahirano iz biljaka i životinja, dok se u današnje vrijeme većina enzima ekstrahira se iz mikroorganizama (npr. *E. coli*).[9]

2.3.1. Alkohol dehidrogenaza (ADH)

Alkohol dehidrogenaza katalizira oksidaciju alkohola u ketone i aldehide, te redukciju istih u alkohole. Pri tome u reakciji sudjeluje koenzim NAD(P)⁺. Zbog reverzibilnosti, reakcije

katalizirane enzimom ADH mogu se koristiti za sintezu kiralnih produkata, kao i za regeneraciju koenzima.[10]

Enzim alkohol dehidrogenaza može se pronaći u vinskoj mušici (*Drosophila melanogaster*), pekarskom kvascu (*Saharomices cerevisiae*), konjskoj jetri, te mnogim mikroorganizmima. Alkohol dehidrogenaza nalazi se u ljudskoj jetri gdje služi za razgradnju alkohola, te u sluznici želuca.[10]

2.3.2. Aldolaze

Aldolaze su važni biokatalizatori jer omogućavaju sintezu složenih molekula kao što su kiralni kompleksi i bioaktivni spojevi. Kataliziraju reverzibilno nastajanje C-C veza aldolnom adicijom nukleofilnog donora na elektrofilni aldehidni akceptor. Postoje dva mehanizma katalize uz aldolaze prema kojima ih svrstavamo u klasu jedan ili klasu dva. Aldolaze klase jedan karakterizira nastajanje Schiffove baze na aktivnom mjestu enzima kao intermedijer u reakciji. Mehanizmom aldolaza klase dva, dvovalentni metalni koenzim dovodi do aktivnog mjesta na enzimu, pritom se metalni koenzim ponaša kao Lewisova kiselina i aktivira supstrat, karbonilni donor. Aldolaze s drugim mehanizmom su stabilnije.[10]

Aldolaze se nalaze u većini organizama. Aldolaze klase jedan najčešće nalazimo kod viših eukariota, dok aldolaze klase 2 nalazimo kod nižih eukariota i prokariota. Aldolaze prve klase mogu se izolirati iz mišića zeca.[11]

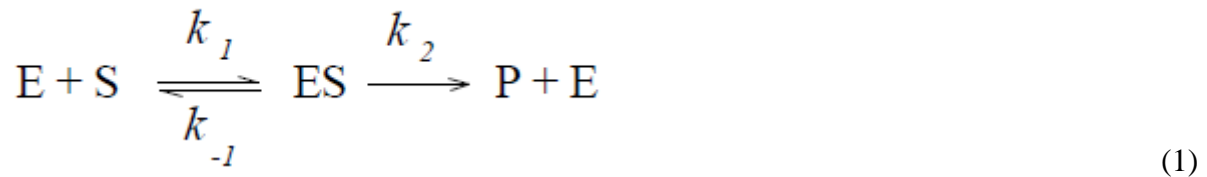
2.3.2.1. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA)

FSA je katalizator koji katalizira aldolnu adiciju, a pripada u prvu skupinu aldolaza. Dobivena je iz genetski modificirane *E. coli*. FSA se u korištenju prikazala kao robustan i koristan biokatalizator s potencijalom za visoku stereoselektivnost pri aldolnim adicijama dihidroksiacetona i hidroksiacetona na velik broj aldehida. FSA je DHA (dihidroksiacetone) ovisan enzim.[11]

2.3.3. Enzimska kinetika

Svrha enzima kao i svih drugih katalizator je ubrzavanje kemijske reakcije. Kako bi se mogla proučavati brzina enzimskih reakcija potrebno je poznavati kinetiku enzimskih reakcija.

Enzimsku kinetiku najlakše je objasniti na primjeru. Jednadžba (1) prikazuje kemijsku reakciju u kojoj reaktant (S) reagira s enzimom dajući kompleks enzim-supstrat (ES) koji se zatim raspada na produkt (P) i enzim (E) jednak onom na početku reakcije.[12]



Promjene koncentracija komponenata reakcije s vremenom mogu se opisati sljedećim jednažbama:

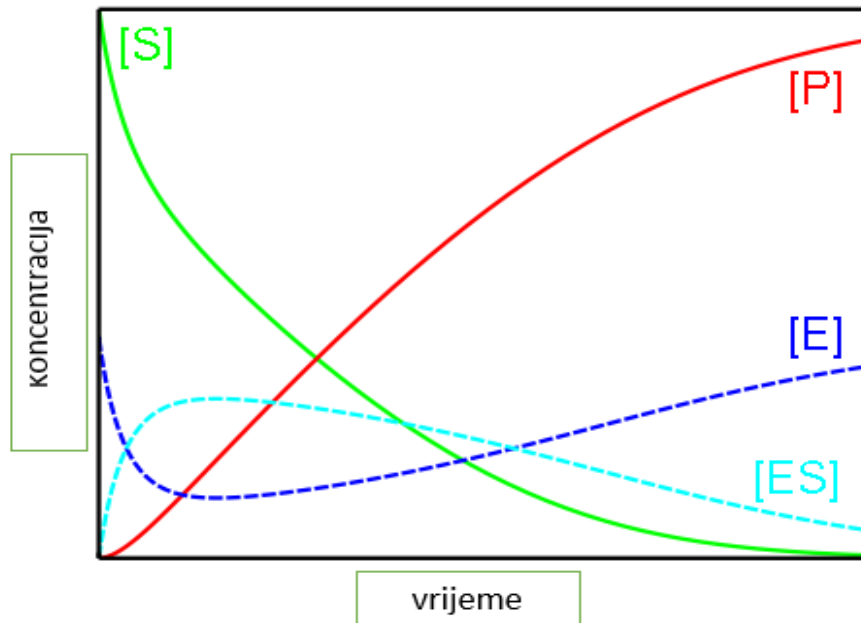
$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[S][E] + k_{-1}[ES] \quad (2)$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[S][E] + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (3)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = -k_1 + (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = r \quad (5)$$

Pritom r , označava reakcijsku brzinu. Reakcijska brzina je prema jednažbi (5) promjena koncentracije produkta s vremenom, te je proporcionalna koncentraciji kompleksa enzim-supstrat. Ostale jednažbe (2), (3) i (4) prikazuju promjene ostalih reakcijskih komponenata s vremenom.[12]



Slika 2 Ovisnost promjene koncentracije produkata(S), reaktanata(P), enzima(E) i kompleksa enzim- supstrat(ES) o vremenu

Na slici 2 prikazane su ovisnosti promjene koncentracije komponenata reakcije katalizirane enzimom u vremenu. Koncentracija reaktanata (S) neprestano opada dok na samom kraju reakcije ne dosegne minimum. Koncentracija produkata (P) neprestano raste, dok ne postigne maksimum na kraju reakcije. Koncentracija enzima (E) prvo pada do neke minimalne vrijednosti taj period označava nastanak kompleksa enzim-supstrat, nakon toga koncentracija enzima ponovno raste kako se kompleks enzim-supstrat raspada na produkt i enzim. Promjena koncentracije kompleksa enzim-supstrat prati koncentraciju enzima, odnosno gdje koncentracija enzima opada raste koncentracije kompleksa enzim-supstrat i obrnuto. Tijek kemijske reakcije katalizirane enzimom može podijeliti u tri faze. Prva faza obuhvaća vrijeme u kojem pada koncentracija enzima, a raste koncentracija kompleksa enzim-supstrat. Druga faza označava vrijeme u kojem reakcijska brzina raste do maksimalne vrijednosti. U trećoj fazi nastupa pad koncentracije kompleksa enzim-supstrat jer se do tada velika količina supstrata (reaktanta) pretvorila u produkt, pa dolazi do pomanjkanja supstrata. Reakcijska brzina zbog toga opada sve dok u konačnici ne postane nula.[12]

Izvod izraza koji opisuje enzimsku kinetiku može se pojednostaviti ukoliko se pretpostavi da nema raspada enzima te da uvijek isti sudjeluju u reakcijama.[12]

$$k_1[S][E] = (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (6)$$

$$[E]_0 = [E] + [ES] \quad (7)$$

$$[ES] = \frac{k_1[S][E]_0}{k_1[A] + k_{-1} + k_2} \quad (8)$$

$$r = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] = \frac{k_2[S][E]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [S]} = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]} \quad (9)$$

Ukoliko se izjednači reakcijska brzina nastajanja kompleksa enzim-supstrat i brzina njegovog raspada ne enzim i produkt dobije se jednažba (6). Jednažba (7) prikazuje ukupnu koncentraciju enzima u nekom vremenu koja je zbroj koncentracije slobodnog enzima i enzima koji se nalazi u kompleksu enzim-supstrat. Koncentracija kompleksa enzim-supstrat računa se prema jednažbi (8). Jednažba (9) služi za računanje brzine reakcije, odnosno promjena koncentracije produkta u vremenu. Ta se jednažba još naziva Michaelis-Menteničina jednažba koja u sebi sadrži dvije konstante, V_m i K_m . Konstanta V_m označava maksimalnu brzinu reakcije, a konstanta K_m označava koncentraciju supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne (V_m) i upućuje na afinitet enzima prema supstratu (niska vrijednost znači velik afinitet). Konstanta k_2 u jednažbi je katalitička konstanta te je proporcionalna brzini kemijske reakcije koju enzim katalizira. Omjer katalitičke i Michaelisove konstante, predstavlja katalitičku učinkovitost enzima koja se može smatrati mjerom specifičnosti supstrata. [12]

2.4. Regeneracija koenzima

Koenzimi su za razliku od enzima neproteinske građe. To mogu biti male organske molekule, metalni ioni ili neka druga jednostavna molekula. Koenzimi se vežu za proteinski dio enzima, mijenjaju njegovu konformaciju stvarajući tako katalitički aktivan enzim. Promjenom konformacije proteinskog dijela enzima nastaje aktivno mjesto sposobno za primanje supstrata i pretvaranje u produkt. Za razliku od enzima koji tokom kemijske reakcije ostaje nepromijenjen, koenzim se u reakciji mijenja. Koenzim moramo dodati u količini koja je u stehiometrijskom odnosu s količinom enzima. Zbog toga je koenzime potrebno regenerirati. [13]

Za potrebe regeneracije koenzima razvijene su mnoge *in situ* metode, što znači da se regeneracija se provodi u samom reaktoru. Metode regeneracije mogu se podijeliti u nekoliko kategorija: kemijske, biološke, fotokemijske, elektrokemijske i enzimatske. Kemijske metode vrlo su uspješne u regeneraciji, no imaju negativne posljedice poput pojave neželjenih nusprodukata, te zbog potrebe za primjenom skupih i toksičnih reagensa. Biološke i fotokemijske metode često se kombiniraju na način da se koenzim regenerira pomoću energije svjetla u prisutnosti mikroorganizama. Elektrokemijske metode omogućavaju regeneraciju koenzima primjenom elektrona dobivenih s elektrode. Enzimatska regeneracija koenzima može se provoditi dodatkom enzima koji katalizira reakciju regeneracije ili korištenjem enzima koji će katalizirati primarnu reakciju, a u isto vrijeme i reakciju regeneracije koenzima.[13]

Prilikom odabira metode regeneracije koenzima na umu treba imati nekoliko osnovnih zahtjeva:

- metoda mora biti praktična i jeftina,
- sustav regeneracije mora biti stabilan kroz duži period vremena,
- separacija produkata i nusprodukata ne smije biti komplicirana,
- enzimi i druge pritom korištene kemikalije moraju biti lako dostupne i jeftine, kao i korištena oprema,
- ne smije doći do reakcija između reaktanata i produkata primarne reakcije te reaktanata i produkata dodanih za regeneraciju koenzima,
- nastanak produkata mora biti termodinamički i kinetički povoljan proces,
- količina nastalog nusprodukta u procesu regeneracije mora biti zanemarivo mala u odnosu na količinu nastalog koenzima,
- redukcija koenzima NAD^+ mora biti regioselektivna jer će su suprotnom nastati djelomično neaktivan koenzim.[15]

NADH oksidaza (NOX) korištena u ovom radu služi za regeneraciju koenzima NAD^+ . NADH oksidaza (NOX) katalizira reakciju oksidacije NADH uz kisik. Kao produkti reakcije nastaju NAD^+ i voda ili vodikov peroksid ovisno o podrijetlu enzima. Pogodniji su enzimi kod kojih kao produkt reakcije nastaje voda jer je vodikov peroksid potencijalno štetan za enzime i primarnu kemijsku reakciju. [14]

2.5. Kaskadne reakcije

Ciljevi današnje industrije su razvoj procesa koji će nekoliko katalitičkih koraka integrirati u jedan višestupnjeviti katalitički kaskadni proces. Prednosti provođenja reakcija organske sinteze u jednom višestupnjevitom katalitičkom kaskadnom procesu su:[16]

- koristi se manje operacijskih jedinica, zbog čega je volumen reaktora i volumen korištenih otapala manji,
- reakcija traje kraće vremenske cikluse, uz veće iskorištenje te manju količinu nastalog otpada zbog čega su reakcije ekološki i ekonomski pogodnije,
- povezivanjem reakcija u kaskadu može se povoljno utjecati na reakcijsku ravnotežu tako da ju pomakne u smjeru nastanka produkta. Npr. produkt reakcije prvog stupnja je reaktant za reakciju drugog stupnja. Kako se produkt neprestano troši ravnoteža reakcije prvog stupnja pomaknuta je u smjeru nastajanja produkta, zbog čega je manja potreba za reaktantom na početku.[16]

Osim prednosti kaskadnih reakcija postoje i brojni nedostaci i problemi kod samog dizajna katalitičkih kaskada:

- međusobno nekompatibilni katalizatori,
- različite reakcijske brzine,
- teško je odrediti optimalne uvjete u kojima će se reakcija provoditi, pH vrijednost, temperaturu, pogodna otapala,
- recikliranje i uporaba katalizatora su vrlo komplicirani procesi, kao i procesi izolacije produkta. [16]

Kada se svi katalizatori, neovisno o tome radi li se o enzimima ili kemijskim katalizatorima, nalaze u reakcijskoj smjesi od samog početka govori se o katalitičkom kaskadnom procesu.[17]

Kaskadni proces je onaj u kojem se u istom reaktoru odvija više reakcija jedna za drugom, no nije obavezno da se svi katalizatori nalaze u reakcijskoj smjesi od samog početka. [17]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Homogenizator

Uzorci pripremljeni za analizu prethodno su homogenizirani na *MS2 Minishaker IKA* (slika3).



Slika 3 Homogenizator

3.1.2. Spektrofotometar

Uzorci pripremljeni za određivanje specifične aktivnosti enzima analizirani su na spektrofotometru model UV-1800 240 V proizvođača *Shimadzu* (slika4).



Slika 4 Spektrofotometar

3.1.3. Analitička vaga

Uzorci potrebni za provedbu eksperimenta vagani su na analitičkoj vagi proizvođača *Shimadzu* (slika 5) s točnošću na četiri decimalne.



Slika 5 Analitička vaga

3.1.4. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracije supstrata i produkata određivane su na HPLC-u *Shimadzu* (Japan) opremljenom s UV i IR detektorima istog proizvođača (slika 6).



Slika 6 HPLC proizvođača Shimadzu

3.1.5. Tresilica

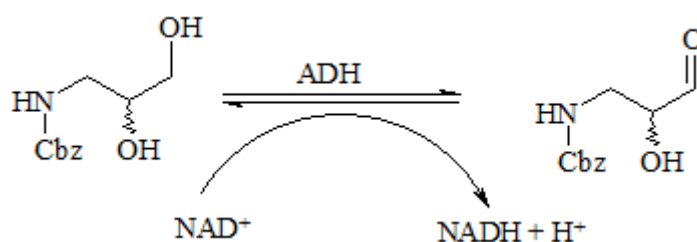
Tijekom provođenih reakcija bilo je potrebno konstantno miješati reaktor na tresilici *Tehtnica Vibromix 203 EVT* (slika 7) kako bi se osigurala homogenost reakcijske smjese.



Slika 7 Tresilica

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Određivanje aktivnosti spektrofotometrijskom metodom



Slika 8 Shema reakcije oksidacije aminoalkohola

Aktivnost ketoreduktaza u reakciji oksidacije diola je određena spektrofotometrijskom metodom, praćenjem koncentracije NADH, odnosno NADPH nastalog u reakciji. Iz dobivenih podataka ovisnosti koncentracije koenzima u vremenu je procijenjena početna reakcijska brzina. Mjerenje je provedeno pri valnoj duljini 340 nm tijekom 200 sekundi, u 50 mM TEA HCl puferu pH 8,0. Aktivnost enzima je izračunata prema jednadžbama (10) i (11).

$$V.A. = \frac{\frac{dABS}{dt} V_{uk}}{V_{enz} \cdot d \cdot \epsilon_{340, NADH}} \quad [\text{U mL}^{-1}] \quad (10)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{c_{enz}} \quad [\text{U mg}^{-1}] \quad (11)$$

U prikazanim jednadžbama $V.A$ označava volumnu aktivnost enzima, $S.A$ specifičnu aktivnost enzima. $dABS/dt$ je promjenu apsorbancije u vremenu dobivenu spektrofotometrijskom analizom, V_{uk} volumen kivete, V_{enz} volumen ADH, d je vrijednost udaljenosti kroz koju prolazi svjetlost u kiveti (1 cm), ϵ je ekstinkcijski koeficijent za NADH i NADPH pri valnoj duljini od 340 nm ($6,22 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), a c_{enz} je koncentracija enzima.

Za 18 enzima ketoreduktaza provedeni su testovi aktivnosti uz koenzime NAD^+ i NADP^+ (svaki zasebno), kako bi se istražilo koji enzimi imaju najveću aktivnost na promatrani supstrat.

3.2.1.1. Mjerenje aktivnosti enzima uz koenzim NAD^+

Tablica 1 Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri mjerenju aktivnosti ketoreduktaza uz koenzim NAD^+

Otopina	V [μL]	$c_{\text{temeljna otopina}}$ [mM]	c_u kiveti [mM]
<i>aminoalkohol</i>	750	117,3	88,0
<i>NAD^+</i>	150	70,1	10,5
<i>pufer</i>	50	50,0	50,0
<i>enzim</i>	50	10,0 mg mL^{-1}	0,5 mg mL^{-1}

Postupak analize na spektrofotometru proveden je tako da su priređene otopine diola, koenzima NAD^+ , pufera i enzima prema podacima zadanim u tablici 1. Sve su otopine rađene u 50 mM TEA HCl puferu pH 8,0. Ukupni volumen reakcijske smjese je pritom iznosio 1000 μl . Postupak se ponavljao 3 puta za svaki od 18 enzima te se uzimala prosječna vrijednost.

3.2.1.2. Mjerenje aktivnosti enzima uz koenzim NADP^+

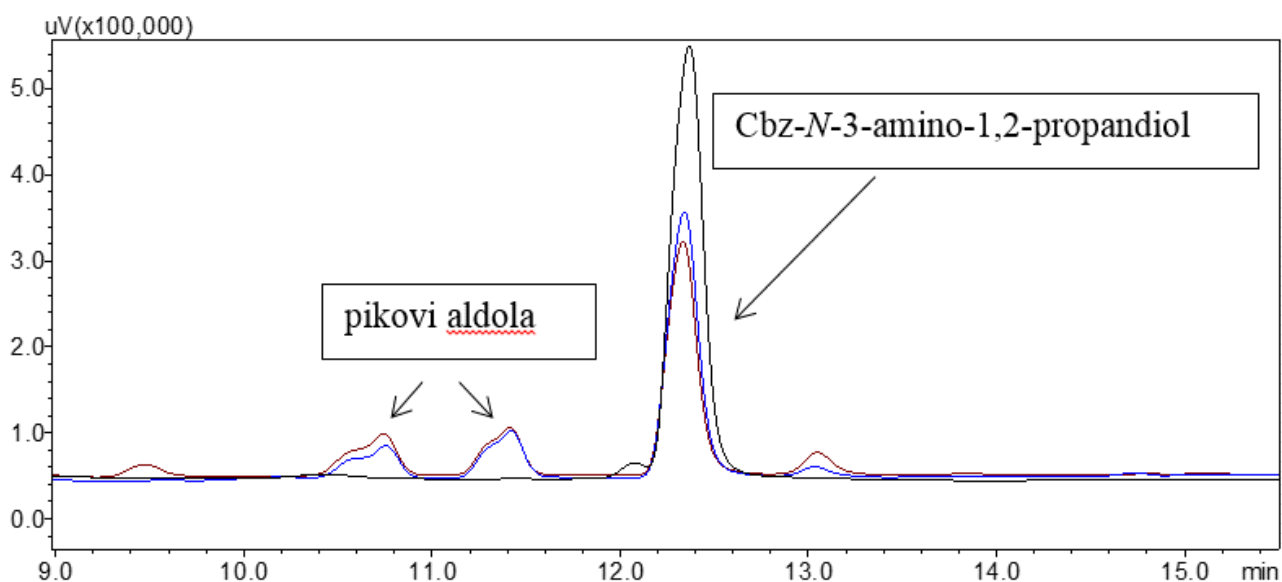
Tablica 2 Sastav reakcijske smjese u kiveti spektrofotometra pri mjerenju aktivnosti ketoreduktaza uz koenzim NADP^+

Otopina	V [μL]	$c_{\text{temeljna otopina}}$ [mM]	c_u kiveti [mM]
<i>aminoalkohol</i>	800	110,9	88,8
<i>NADP^+</i>	150	69,6	10,4
<i>enzim</i>	50	10,0 mg mL^{-1}	0,5 mg mL^{-1}

Za test aktivnosti uz koenzim NADP⁺ priređene su otopine s različitim enzimima prema podacima u tablici 2. Sve su otopine rađene u 50 mM TEA HCl puferu pH 8,0. Ukupni volumen otopine je iznosio 1000 µl. Postupak se ponavljao 3 puta za svaki od 18 enzima te se uzimala prosječna vrijednost.

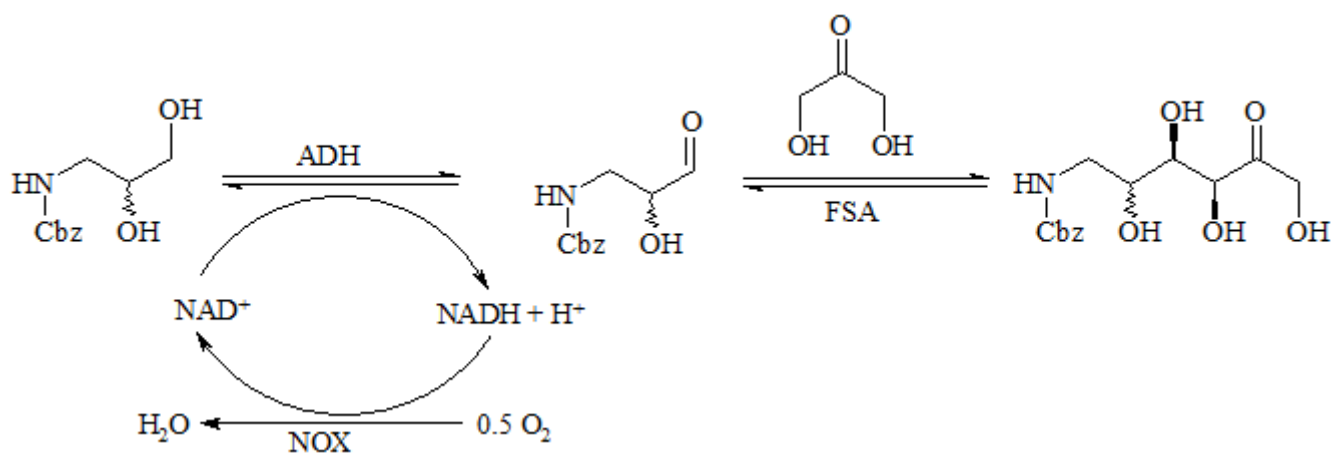
3.2.2. Tekućinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Mjerenje koncentracija alkohola i nastalog konačnog produkta aldola provedeno je kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC-om). Korištena je kolona *LiChrospher RP-18*, 100Å (5µm) 250x4,00mm, uz mobilne faze A (acetonitril, ultračista voda i TFA (80:20:0.095 v/v)) i B (ultračista voda i TFA (0,1% v/v)). Korištena je metoda ukupnog trajanja 30 minuta. Analiza je provedena gradijentnom metodom uz mijenjanje koncentracije eluenta B od 90-30% tijekom 25 minuta te 30-90% u vremenu od 25. do 29. minute, pri temperaturi 30°C i valnoj duljini 215 nm. Protok eluenta iznosio je 1 mL min⁻¹. Prije analize uzorak je razrijeđen u potrebnom omjeru s acetonitrilom. Kromatogram analiziranog alkohola Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola i nastalog produkta (dva pika aldola) prikazan je na Slika 9. Baždarni pravac se nalazi na slici 13 u Prilogu.



Slika 9 Kromatogram

3.2.3. Provođenje kaskadnih reakcija



Slika 10 Shema provedene kaskadne reakcije

Na Sliku 10 prikazana je shema kaskadne reakcije koja se provodi u reaktoru. Prvi stupanj proučavane kaskadne reakcije (slika 10) je oksidacija alkohola aminopropandiola katalizirana alkoholdehidrogenazom (ADH), odnosno ketoreduktazama koje su nakon testa aktivnosti odabrane kao najaktivnije. U reakciji nastaje aldehyd koji sudjeluje u reakciji aldolne adicije s dihidroxiacetonom dajući željeni produkt – aldol. Reakcija je katalizirana s enzimom FSA (D-fruktoza-6-fosfat aldolaza). Za aktivnost ketoreduktaza potreban je koenzim NAD(P)⁺ koje je potrebno regenerirati, pa se u smjesu dodaje NOX.

Kaskadne reakcije provođene su u kotlastom reaktoru na tresilici pri 1000 okretaja/min i 25°C. Volumen reakcijske smjese iznosio je 400,00 μl, koncentracija alkohola u reakcijskoj smjesi pritom je 20,00 mM, koncentracija koenzima NAD(P)⁺ je 1 mM, masena koncentracija enzima mijenja se ovisno o tome o kojem se enzimu radi, a zadane su u tablicama 3 i 4. U reakcijsku smjesu još se dodaje NOX čija koncentracija iznosi 0,02 mg mL⁻¹ u reakcijama s koenzimom NAD⁺, odnosno 3,25 mg mL⁻¹ u reakcijama s NADP⁺. Koncentracija dihidroxiacetata (DHA) iznosi 50,00 mM, a masena koncentracija FSA 0,02 mg mL⁻¹.

Tablica 3 Priprema reakcijskih smjesa uz koenzim NAD⁺

ENZIM	kREDY 51	kREDY 307
$V_{reaktor} / \mu\text{l}$	400,00	400,00
$V_{pufer} / \mu\text{l}$	218,40	218,40
$V_{alkohol} / \mu\text{l}$	86,33	86,33
$c_{alkohol} / \text{mM}$	20,00	20,00
$V_{NAD^+} / \mu\text{l}$	17,71	17,71
c_{NAD^+} / mM	1,00	1,00
$m_{kREDY} / \text{mg}(\text{stvarno})$	15,10	21,70
$\gamma_{kREDy} / \text{mg mL}^{-1}$	37,77	54,99
$S.A._{kREDy} / *10^{-4} \text{Umg}^{-1}$	79,42	54,55
$V.A._{kREDy} / \text{UmL}^{-1}$	0,30	0,30
$V_{NOX} / \mu\text{L}$	5,74	5,74
$Aktivnost_{NOX} / \text{U}$	0,02	0,02
$\gamma_{NOX} / \text{mgmL}^{-1}$	0,02	0,02
$V_{DHA} / \mu\text{L}$	54,05	54,05
c_{DHA} / mM	50,00	50,00
$V_{FSA} / \mu\text{L}$	17,77	17,77
$\gamma_{FSA} / \text{mgmL}^{-1}$	2,00	2,00

Tablica 4 Priprema i reakcijskih smjesa uz koenzim NADP⁺

ENZIM	kREDY 4	kREDY 6	kREDY 307
$V_{reaktor} / \mu\text{l}$	400,00	400,00	400,00
$V_{pufer} / \mu\text{l}$	91,21	91,21	91,21
$V_{alkohol} / \mu\text{l}$	86,33	86,33	86,33
$c_{alkohol} / \text{mM}$	20,00	20,00	20,00
$V_{NADP^+} / \mu\text{L}$	20,83	20,83	20,83
c_{NADP^+} / mM	1,00	1,00	1,00
$m_{kREDY} / \text{mg}_{(\text{stvarno})}$	1,30	5,10	5,20
$\gamma_{kREDy} / \text{mgmL}^{-1}$	3,16	12,60	12,79
$S.A.kREDy / *10^{-4}\text{Umg}^{-1}$	946,41	238,05	234,51
$V.A.kREDy / \text{UmL}^{-1}$	0,30	0,30	0,30
$V_{NOX} / \mu\text{L}$	129,81	129,81	129,81
$Aktivnost_{NOX} / \text{U}$	0,02	0,02	0,02
$\gamma_{NOX} / \text{mgmL}^{-1}$	3,25	3,25	3,25
$V_{DHA} / \mu\text{L}$	54,05	54,05	54,05
c_{DHA} / mM	50,0	50,0	50,0
$V_{FSA} / \mu\text{L}$	17,77	17,77	17,77
$\gamma_{FSA} / \text{mgmL}^{-1}$	2,00	2,00	2,00

U tablicama 3 i 4 prikazani su sastavi svih pet reakcijskih smjesa, po jedna za svaki odabrani enzim.

Sve reakcije provedene su ukupno 48h. Uzorci su uzimani na samom početku, takozvani nulti uzorak, nakon 24h, te nakon 48h. Bitno je da se uzorci iz svih reaktora uzimaju u isto vrijeme kako bi se mogle usporediti konverzija reaktanta, odnosno količina nastalog produkta što je i cilj provođenja ovih kaskadnih reakcija.

Uzorci su pripremani u dva razrjeđenja :

- 10x razrjeđenje: 20 μL uzorka dodano je u 180 μL acetonitrila, te je otopina promješana na tresilici i profiltrirana kako bi se uklonili enzimi u uzorku za HPLC.
- 100x razrjeđenje: 20 μL uzorka razrjeđenja 10x dodano je u 180 μL acetonitrila, te je otopina pomiješana na tresilici i profiltrirana kako bi se uklonili enzimi u uzorku za HPLC.

Tako pripremljeni uzorci analizirani su na HPLC-u. Priređena su dva razrijeđenja kako bi se jasno vidio pad koncentracije supstrata (raspon baždarnog pravca, Prilog 1.), a kako bismo istovremeno vidjeli nastajanje pikova produkta.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati testa aktivnosti

Tablica 5 Aktivnosti testiranih ketoreduktaza u reakciji oksidacije Cbz-N-3-amino-1,2-propandiola uz NAD^+ , odnosno $NADP^+$ u usporedbi s prethodno poznatim aktivnostima alkohol dehidrogenaza iz konjske jetre i kvasca

Enzim (KRED)	S.A. (NAD^+) mU mg ⁻¹	S.A. ($NADP^+$) mU mg ⁻¹
4	1,80	94,64
6	1,78	23,80
30	0,51	5,47
54	0,88	11,69
83	0,47	1,68
84	0,79	2,85
291	0,35	0,72
296	0,19	9,65
303	0,56	2,19
314	0,43	1,86
315	0,47	1,07
353	0,51	2,78
362	0,10	0,51
376	0,87	8,98
51	7,94	0,70
61	1,55	4,49
307	5,46	23,45
373	2,57	1,81
HLADH	21,13	4,81
Yeast ADH	0,50	-

U tablici 5 se nalaze svi enzimi kojima je testirana aktivnost na supstrat diol. Enzimi su pobrojani prema svojim numeričkim oznakama. U istoj tablici prikazane su i njihove aktivnosti izmjerene uz koenzime NAD^+ i $NADP^+$, svaki zasebno.

Uz koenzim NAD^+ najveću specifičnu aktivnost pokazuju enzimi označeni brojevima 51 i 307. Specifična aktivnost enzima 51 iznosi 7,94 mU mg⁻¹, a enzima 307 5,46 mU mg⁻¹.

Ukoliko se to usporedi s aktivnošću komercijalno korištenog enzima iz konjske jetre (HLADH) uz isti koenzim, vidi se da je njegova specifična aktivnost daleko veća i iznosi 21.13 mU mg⁻¹. Najveću specifičnu aktivnost uz NADP⁺ pokazuju enzimi označeni brojevima 4, 307 i 6. Pritom specifična aktivnost enzima 4 iznosi 94,64 mU mg⁻¹, enzima 307, 23,45 mU mg⁻¹ i enzima 6, 23,80 mU mg⁻¹.

Može se primijetiti da je specifična aktivnost enzima označenog brojem 4 uz NADP⁺, veća od specifične aktivnosti komercijalnog enzima, HLADH uz NADP⁺.

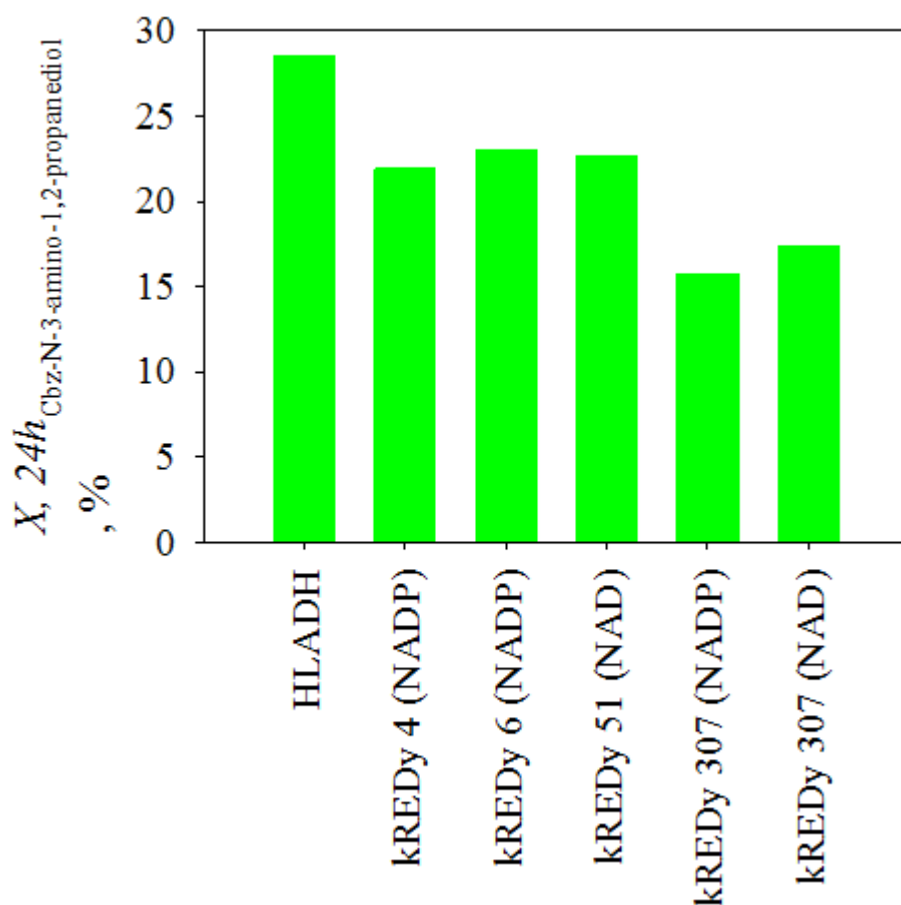
HLADH je komercijalno dostupan enzim koji katalizira reakcije oksidacije razgranatih alkohola. Njegova aktivnost za supstrat je također izmjerena (uz koenzim NAD⁺) kako bi se mogla usporediti aktivnost drugih, novih enzima s njom i kako bi se odabrali samo oni koji imaju približnu jednaku ili veću aktivnost od HLADH-a. Prethodno prikazana aktivnost izmjerena korištenjem alkohol dehidrogenaze iz kvasca je vrlo niska i pokazalo se da taj enzim nije prikladan za korištenje u ovom reakcijsom sustavu.

4.2. Rezultati kaskadnih reakcija

Kaskadne reakcije provedene su s odabranim enzimima uz odgovarajuće koenzime: 51 (NAD⁺), 307 (NAD⁺), 4 (NADP⁺), 307 (NADP⁺), 6 (NADP⁺).

Iz dobivenih podataka prikazanih na slici 13 vidi se da niti jedan od enzima ne daje konverziju reaktanta veću od konverzije uz komercijalni enzim HLADH. No konverzija uz odabrane enzime je dovoljno velika da bi ih se uzelo u obzir prilikom provođenja ove kaskadne reakcije.

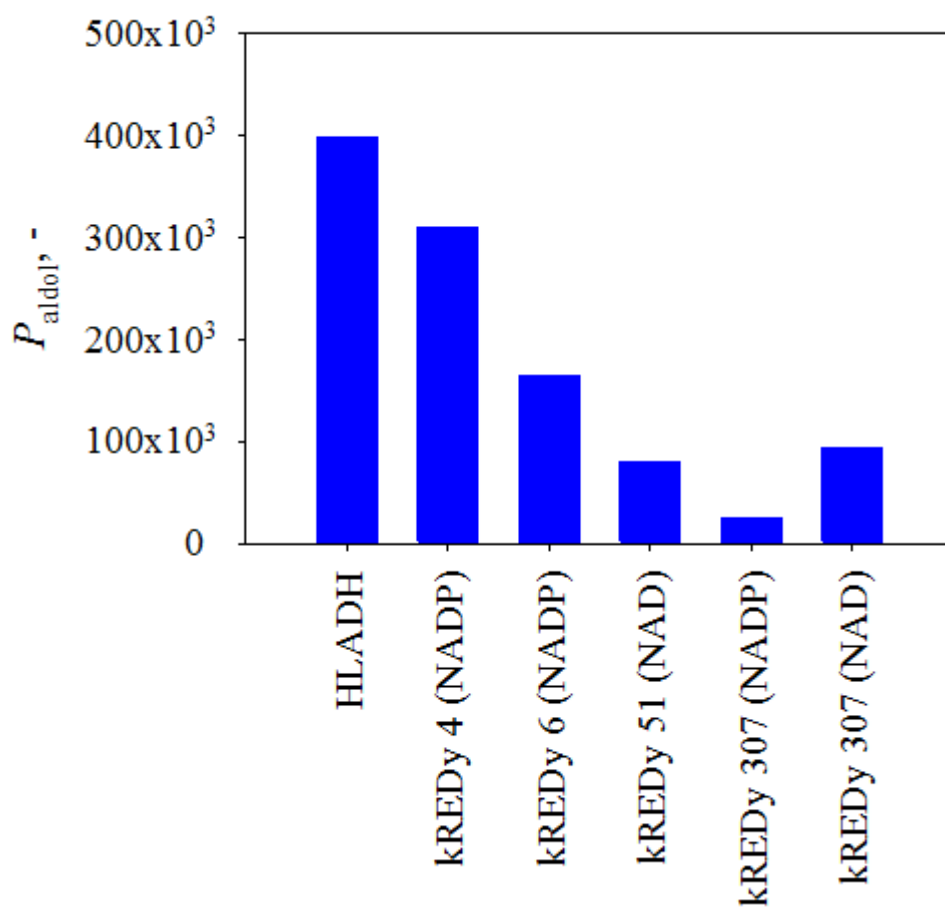
Najveću konverziju pokazuje enzim 6 uz koenzim NADP⁺, a slijede ga 51 uz koenzim NAD⁺, te 4 uz koenzim NADP⁺. Nešto manju konverziju pokazuje 307 uz oba koenzima. Uz NAD⁺ veću, dok uz NADP⁺ manju.



Slika 11 Konverzija Cbz-N-3-amino-1,2-propandiol nakon 24 h

Aldolni produkt dobiven ovom kaskadnom reakcijom nije komercijalno dostupan. Umjesto određivanja prave koncentracije praćena je površina pika (ukupno dva pika) aldolnog produkta na kromatogramu HPLC-a.

Rezultati prikazani na slikama 11 i 12 pokazuju da je najbolji komercijalni enzim HLADH jer se uz njega dobije najviše aldolnog produkta. Za većinu odabranih enzima količina nastalog produkta je znatno manja od količine nastale uz HLADH. Najviše aldolnog produkta nastalo je uz enzim kREDY 4 i koenzim NADP⁺, a redom ga slijede kREDY 6 uz NADP⁺, zatim kREDY 307 uz NAD⁺, kREDY 51 uz NAD⁺, dok je najmanje aldolnog produkta nastalo uz kREDY 307 s koenzimom NADP⁺.



Slika 12 Površine ispod pikova nastalog produkta – aldola

5. ZAKLJUČAK

Komercijalno dostupan enzim HLADH je među ispitanima najbolji katalizator reakcije oksidacije diola. Među testiranim ketoreduktazama, najbolja se pokazala kREDY 4 uz koenzim NADP⁺ jer pokazuje najveću konverziju reaktanta Cbz-*N*-3-amino-1,2-propandiola i najveću količinu nastalog aldolnog produkta.

Optimiranjem ovog reakcijskog sustava bi bilo moguće poboljšati njegovu uspješnost.

6. SIMBOLI

HLADH	alkohol dehidrogena iz konjske jetre	
ADH	alkoholdehidrogenaza	
NAD ⁺	nikotin amid dinukleotid	
NADP ⁺	nikotin amid dinukleotid fosfat	
NOX	nikotin amid dinukleotid oksidaza	
HPLC	tekućinska kromatografija visokog učinka	
TEA	trietanolamin	
kREDY	ketoreduktaze	
DHA	dihidroksiacetone	
FSA	D-fruktoza-6 fosfat aldolaza	
ϵ	ekstinkcijski koeficijent	[M ⁻¹ cm ⁻¹]
V	volumen	[μ L]
V.A.	volumna aktivnost enzima	[U / mL]
S.A.	specifična aktivnost enzima	[U / mg]
c	molarna koncentracija	[mmol / dm ³]
t	vrijeme	[min, ili s]
γ	masena koncentracija	[mg / cm ³]
E_a	energija aktivacije	[kJ mol ⁻¹]
k	konstanta kemijske ravnoteže	[s ⁻¹]
r	brzina kemijske reakcije	[mol / dm ³ s]
V_m	maksimalna brzina reakcije, [U cm ⁻³ , ili U mg ⁻¹]	
K_m	Michaelisova konstanta	[mmol / dm ³]

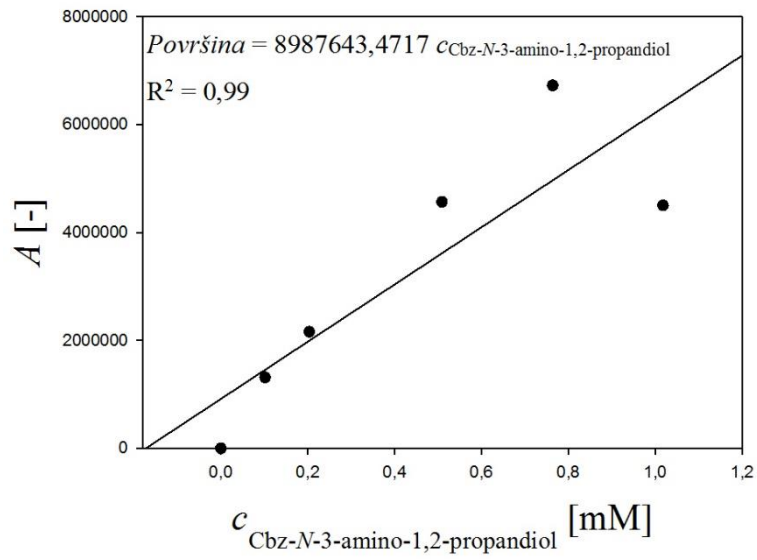
7. LITERATURA

1. S. Zrnčević, Kataliza i katalizatori, Hinus, str.1-3.
2. Zaks A.(2001); Industrial biocatalysis, Current Opinion in Chemical Biology, 5:130–136.
3. P. Atkins, L. Jones, L. Laverman; Chemical Principles The Quest for Insight, 6th edition, str. 649-653.
4. S. Zrnčević, Kataliza i katalizatori, Hinus, str. 23-56,
5. D. J. Pollard, J. M. Woodley, Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, Trends in Biotechnology Vol.25, No.2, str66-67.
6. R.N.Patel, Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis, Elsevier, Coordination Chemistry Reviews, Vol.252, 2008, str.660-662.
7. D. J. Pollard, J.M. Woodley, Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, Trends in Biotechnology Vol. 25, No.2, 2007, 66-67.
8. M. Sudar, Z. Findrik, Đ. Vasić-Rački, A. Soler and P. Clapes, A new concept for production of (3S,4R)-6-[(benzyloxycarbonyl)amino]-5,6-dideoxyhex-2-ulose, a precursor of D-fagomine, RSC Advances,vol.5, 2015, str.69819-69820
9. Illanes A. (2008); Enzyme Biocatalysis, Principles and applications, Springer, str. 1-19
10. M. Sudar, Z. Findrik, Đ. Vasić-Rački, P. Clapés, C. Lozano (2013); Mathematical model for aldol addition catalyzed by two D-fructose-6-phosphate aldolases variants overexpressed in *E. coli*, Journal of Biotechnology, Vol.167, 2013, str.191–200
11. P. Clapés, W. D. Fessner; Enzymatic direct aldol additions. In: Molander, G.A. (Ed.), Science of Synthesis. Stereoselective Synthesis 2. Stereoselective Reactions of Carbonyl and Imino Groups. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2011, str 677–734.
12. H. Bisswanger; Enzyme kinetic principles and methods, Wiley-VCH, 2002 str. 55-80.
13. A. Vrsalović Presečki, Đ. Vasić-Rački, Mathematical modelling of the dehydrogenase catalyzed hexanol oxidation with coenzyme regeneration by NADH oxidase, Process Biochemistry, vol44, 2009, str.54-61
14. Z. Findrik, I. Šimunović, Đ. Vasić-Rački, Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* in the reaction of L-amino acid oxidation, Biochemical Engineering Journal Vol.88, 2008, str319–327.
15. A. Weckbecker, H. Groger, W. Hummel, Regeneration of Nicotinamide Coenzymes, Principles and Applications for the Synthesis of Chiral Compound, Adv Biochem Engin,Vol.55, 2010, str1-48.

16. R. Wohlgemuth, Perspective Interfacing biocatalysis and organic synthesis, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol.82, 2007, str.1055–1062
17. C. Simons, U. Hanefeld, I.W.C.E. Arends, T. Maschmeyer, R. A. Sheldon, Towards catalytic cascade reactions: asymmetric synthesis using combined chemo-enzymatic catalysts, *Topics in Catalysis* Vol. 40, 2006, str. 35-40.

8. PRILOG

PRILOG 1.



Slika 11 Baždarni pravac za određivanje koncentracije Cbz-N-3-amino-1,2-propandiola

9. ŽIVOTOPIS

Valerija Matković [REDACTED] 2012. godine završava Prirodoslovno matematičku gimnaziju u Bjelovaru. Iste godine upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer Ekoinženjerstvo. 2015 prebacuje se na smjer Kemijsko inženjerstvo istog fakulteta.