

# Određivanje aktivnosti saharoza fosforilaze HPAE-PAD metodom

---

**Krsnik, Antonia**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:521159>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-10**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Antonia Krsnik**

0058215974

**ODREĐIVANJE ENZIMSKE AKTIVNOSTI SAHAROZA**  
**FOSFORILAZE HPAE-PAD METODOM**  
**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet:** Biotehnologija 1

**Mentor:** prof. dr. sc. Anita Slavica

**Zagreb, 2021.**

*Ovaj rad je izrađen u Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju piva i slada u Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.*

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**  
**Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku biotehnologiju i tehnologiju piva i slada**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti**  
**Znanstveno polje: Biotehnologija**

### ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI SAHAROZA FOSFORILAZE HPAE-PAD METODOM

**Antonia Krsnik, 0058215974**

**Sažetak:** Aktivnost enzima može se uspješno popratiti određivanjem koncentracije supstrata i/ili produkata enzimske reakcije i to metodama visoko učinkovite tekućinske kromatografije. Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7) se koristi u industrijskoj proizvodnji  $\alpha$ -glukozilglicerola, koji nastaje regioselektivnom glukozilacijom glicerola. Anionsko-izmjenjivačka kromatografija visoke učinkovitosti sa pulsnom amperometrijskom detekcijom (HPAE-PAD) pokazala se kao metoda pogodna za određivanje koncentracije svih spojeva koji sudjeluju u reakciji koju katalizira saharoza fosforilaza, a time i procijenu aktivnosti ovoga enzima. Stoga su u ovome završnome radu objedinjeni ključni parametri HPAE-PAD metode za određivanje koncentracije spojeva od interesa, kao i njena teorijska pozadina, čime je poduprta prikladnost HPAE-PAD metode za određivanje aktivnosti saharoza fosforilaze. Posebna pozornost je posvećena fizikalno-kemijskim svojstvima odabranih ugljikohidrata i industrijski važnih i visoko vrijednih biokemikalija, koji nastaju konverzijom ovih supstrata. Dodatno, pobliže su opisani uvjeti pri kojima bi se odabrana analitička metoda provodila i dati su očekivani rezultati za slučaj kada bi analiza ovom metodom bila provedena.

**Ključne riječi:**  $\alpha$ -glukozilglicerol, HPAE-PAD metoda, saharoza fosforilaza

**Rad sadrži:** 33 stranice, 13 slika, 3 tablica, 43 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Anita Slavica

**Datum obrane:** 9. srpnja 2021.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb**  
**Faculty of Food Technology and Biotechnology**  
**University undergraduate study of Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**  
**Laboratory of Biochemical Engineering, Industrial Microbiology, Malting and Brewing Technology**

**Scientific area: Biotechnical Sciences**  
**Scientific field: Biotechnology**

### **DETERMINATION OF ACTIVITY OF SUCROSE PHOSPHORYLASE BY HPAE-PAD METHOD**

**Antonia Krsnik, 0058215974**

**Abstract:** Enzyme activity can be successfully followed by determination of substrates and/or products concentration by high-pressure liquid chromatography methods. Sucrose phosphorylase (EC 2.4.1.7) is employed in industrial manufacturing of  $\alpha$ -glucosylglycerol which is produced by regioselective glucosylation of glycerol. High pressure anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAE-PAD) is a suitable method for concentration determination of all compounds involved in a reaction catalyzed by the sucrose phosphorylase, and therefore for estimation of the enzyme activity. Therefore, in this graduate thesis all key parameters of the HPAE-PAD method for concentration determination of all given compounds were comprised, as well as a theoretical background of the method. In this way suitability of the HPAE-PAD method for sucrose phosphorylase activity estimation was supported. Special attention was paid to physical and chemical properties of selected carbohydrates and industrially important high-added value biochemicals obtained by conversion of those substrates. In addition, analytical conditions and expected results of predicted analysis by the HPAE-PAD method were described in many details.

**Key words:**  $\alpha$ -glucosylglycerol, HPAE-PAD method, sucrose phosphorylase

**Thesis contains:** 33 pages, 13 figures, 3 tables, 43 references

**Original in:** Croatian

**Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb**

**Mentor:** Prof. dr. sc. Anita Slavica, PhD

**Defence date:** July 9<sup>th</sup> 2021

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Teorijski dio</b> .....	2
<b>2.1. Određivanje enzimске aktivnosti</b> .....	2
2.1.1. Enzimi i enzimska aktivnost .....	2
2.1.2. Kontinuirane i diskontinuirane metode za određivanje enzimске aktivnosti .....	3
2.1.3. Primjena HPLC metoda kao diskontinuiranih metoda za određivanje enzimске aktivnosti	5
<b>2.2. Visoko učinkovita ionsko-izmjenjivačka kromatografija</b> .....	7
2.2.1. Mehanizam i primjena.....	7
2.2.2. Odabir stacionarne i mobilne faze.....	7
2.2.3. Karakteristike detektora.....	9
<b>2.3. Amperometrijska detekcija iona izdvojenih visoko učinkovitom ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom</b> .....	10
2.3.1. Princip rada i vrste detektora.....	10
2.3.2. Pulsna amperometrijska detekcija (PAD).....	11
<b>2.4. Visokovrijedni biotehnoški proizvod <math>\alpha</math>-glukozilglicerol (GG)</b> .....	12
2.4.1. Sinteza GG u industrijskom mjerilu.....	13
2.4.2. Karakteristike industrijski primijenjene saharoza fosforilaze .....	15
2.4.3. Fizikalno-kemijska svojstva visokovrijednih biotehnoških spojeva.....	16
<b>2.5. HPAE-PAD metoda za određivanje aktivnosti saharoza fosforilaze</b> .....	18
2.5.1. Princip metode .....	18
2.5.2. Izbor kromatografske kolone.....	22
2.5.3. Priprema uzorka i parametri HPAE-PAD metode za praćenje aktivnosti saharoza fosforilaze .....	23
2.5.3.1. Priprema uzorka .....	23
2.5.3.2. Priprema standarda.....	24
2.5.3.3. Priprema i protok mobilne faze .....	24
2.5.3.4. Temperatura kolone.....	25
2.5.3.5. Redoslijed eluiranja i retencijska vremena spojeva od interesa .....	26
<b>3. ZAKLJUČCI</b> .....	28
<b>4. LITERATURA</b> .....	29

# 1. Uvod

Jedan od načina procjene enzimске aktivnosti je određivanje koncentracije supstrata i/ili produkata enzimске reakcije i to metodama visoko učinkovite tekućinske kromatografije (engl. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) (Lambeth i Muhonen, 1994). U tom slučaju se može pratiti opadanje koncentracije supstrata tj. porast koncentracije novoformiranog spoja odnosno produkta enzimski katalizirane reakcije. Određivanje koncentracije supstrata i/ili produkta temelji se na određivanju površine ispod pika, koji odgovara supstratu odnosno produktu enzimске reakcije u kromatogramu dobivenom nakon HPLC analize. Ova se površina uspoređuje s površinom ispod pika za standard odgovarajućeg spoja, bilo da se radi o supstratu i/ili produktu reakcije.

Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7) je citoplazmatski enzim koji je izoliran iz stanica heterofermentativne bakterije mliječne kiseline *Leuconostoc mesenteroides* (Luley-Goedl i sur., 2010). Pročišćeni se enzim koristi u industrijskoj proizvodnji  $\alpha$ -glukozilglicerola (GG), koji nastaje regioselektivnom glukozilacijom glicerola. U ovoj reakciji donor D-glukoze može biti saharoza i onda je ovaj disaharid glavni supstrat opisane enzimске reakcije. U ovoj reakciji transglukozilacije akceptor glukozilne skupine je glicerol. Drugi produkti koji također nastaju u ovoj enzimski kataliziranoj reakciji su: D-fruktoza, D-glukoza i fosforilirana D-glukoza (Luley-Goedl i sur., 2010).

Anionsko-izmjenjivačka kromatografija visoke učinkovitosti sa pulsnom amperometrijskom detekcijom (engl. High Pressure Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAE-PAD) pokazala se kao metoda pogodna za određivanje koncentracije ugljikohidrata i srodnih spojeva (Rohrer, 2013). Glavna je pretpostavka da se ovom kromatografskom metodom mogu odrediti koncentracije svih gore navedenih spojeva reakcije koju katalizira saharoza fosforilaza, a time i procijeniti aktivnost ovoga enzima.

Cilj ovoga završnoga rada je bio objediniti ključne parametre HPAE-PAD metode za određivanje koncentracije različitih ugljikohidrata od interesa, kao i njenu teorijsku pozadinu. Posebna pozornost je posvećena fizikalno-kemijskim svojstvima odabranih ugljikohidrata (monosaharida i saharoze) i spojeva koji nastaju njihovom konverzijom (npr. alkoholnih šećera), na temelju kojih je potvrđena prikladnost HPAE-PAD metode za određivanje koncentracije ovih industrijski važnih i visoko vrijednih biokemikalija.

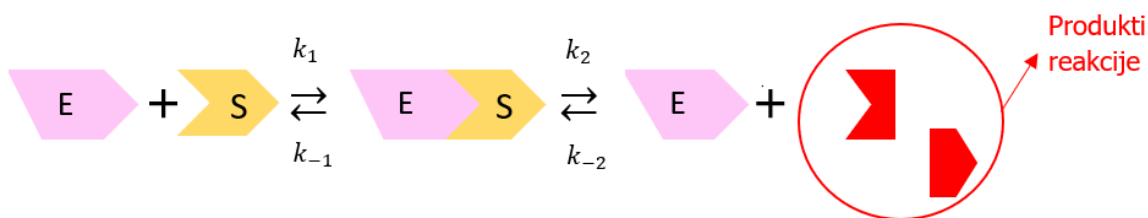
Krajnji cilj ovoga završnog rada je teorijski poduprijeti prikladnost HPAE-PAD metode za određivanje aktivnosti saharoza fosforilaze, pobliže opisati uvjete pri kojima bi se odabrana analitička metoda provodila i dati pretpostavku te očekivani rezultat na temelju teorijskog znanja, u slučaju kada bi analiza ovom metodom bila provedena.

## 2. Teorijski dio

### 2.1. Određivanje enzimske aktivnosti

#### 2.1.1. Enzimi i enzimska aktivnost

Enzimi odnosno biokatalizatori su najčešće molekule proteina, koje imaju svojstvo ubrzanja katalizirane reakcije i to zbog smanjenja energije aktivacije. Enzimi reagiraju sa supstratom (sinonim za reaktant u enzimskoj reakciji), koji se specifično veže u aktivno mjesto enzima te dolazi do formiranja enzim - supstrat kompleksa. Supstrat se zatim prevodi u novonastali produkt, a enzim iz reakcije izlazi nepromijenjen (Slika 1.). Skoro sve reakcije u živim organizmima katalizirane su enzimima te su zbog toga predmet raznih istraživanja (Welling i sur., 1994).



**Slika 1.** Shematski prikaz enzimske reakcije (prilagođeno iz Welling i sur., 1994). E, enzim; S, supstrat;  $k$  – konstante brzina odgovarajućih reakcija.

Jedno od najbitnijih svojstava svakog enzima je enzimska aktivnost. Enzimska aktivnost se može definirati kao brzina enzimske reakcije i može se izraziti kao koncentracija transformiranog supstrata ili koncentracija novo-nastalog produkta u jedinici vremena (Roberts i Gibb, 2013). Kao jedinica aktivnosti određenog enzima koristi se i internacionalna jedinica (engl. International Unit, IU), koja definira koncentraciju enzima koji je potreban za konverziju 1  $\mu\text{mol}$  supstrata u jednoj minuti u produkt u definiranim uvjetima (Pace i sur., 1989).

Brzina enzimske reakcije može se odrediti mjerenjem početne brzine reakcije uz korištenje Michaelis-Menteničine jednadžbe (Bhagavan i Ha, 2015). Da bi se izračunala brzina enzimske reakcije, potrebno je pratiti promjenu koncentracije supstrata i/ili produkata u jedinici vremena. Prilikom mjerenja početne brzine reakcije ona ovisi o koncentraciji supstrata i neće doći do povratne reakcije, jer je pri opisanim uvjetima koncentracija produkta niska. Za procjenu brzine enzimske reakcije se može koristiti Michaelis-Menteničina jednadžba, koja opisuje kinetiku enzimske reakcije prvoga reda u kojoj inicijalna brzina ove reakcije ovisi prvenstveno o koncentraciji supstrata (Lorsch, 2014).

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.1.)$$



U jednadžbi (2.1.)  $V$  je brzina formiranja produkta,  $S$  je koncentracija supstrata,  $K_m$  Michaelisova konstanta, koja je jednaka koncentraciji supstrata pri kojoj se postiže polovica maksimalne brzine enzimske reakcije ( $V_{max}$ ). Vrijednost Michaelisove konstante pokazuje koliki je afinitet enzima za određeni supstrat. Niske vrijednosti ove konstante upućuju na visoki afinitet enzima prema određenom supstratu i obrnuto - visoka vrijednost  $K_m$  upućuje na mali afinitet enzima prema supstratu. Maksimalna brzina enzimske reakcije ( $V_{max}$ ) je teoretska brzina pri kojoj bi sva aktivna mjesta enzima zauzeta supstratom (Lorsch, 2014).

Da bi aktivnost enzima bila uspješno određena i to uz korištenje opisanoga modela enzimske kinetike (jednadžba 2.1.), potrebno je odrediti koncentraciju supstrata i/ili novonastalog produkta kontinuiranim ili diskontinuiranim metodama pogodnim za određivanje koncentracije spojeva od interesa (Welling i sur., 1994) i to kroz određeni vremenski period.

### 2.1.2. Kontinuirane i diskontinuirane metode za određivanje enzimske aktivnosti

Za određivanje aktivnosti enzima osmišljeni su razni pristupi i sve ih se može podijeliti u dvije veće skupine, a to su kontinuirane i diskontinuirane metode. Osnovna razlike između ovih dviju skupina metoda je način izvođenja. Kod kontinuiranih metoda utrošak supstrata odnosno formiranje produkta određuje se kontinuirano tj. nije potrebno enzimsku reakciju prvotno zaustaviti. Kod diskontinuiranih metoda enzimsku reakciju je potrebno prvo zaustaviti, izdvojiti spojeve prisutne u reakcijskoj smjesi te onda odrediti njihovu pojedinačnu koncentraciju. Za obje metode presudno je da se supstrat(i) i produkt(i) razlikuju po određenom svojstvu kako bi se na temelju definiranoga svojstva uspješno oba (ili više) spoj(ev)a odredila njihova koncentracija.

Kod kontinuiranih metoda promjene u koncentraciji supstrata i produkta najčešće se prate spektrofotometrijski tj. mjerenjem apsorbancije zračenja svjetlosti u ultraljubičastom i/ili vidljivom (UV/Vis) području (Harris i Keshwani, 2009). Pri tome se koncentracija spojeva može izračunati prema Lambert-Beerovom zakonu (jednadžba 2.2; Worsfold, 2005).

$$A = c * l * \xi \quad (2.2)$$

Apsorbancija ( $A$ ) izmjerena pri određenoj valnoj duljini svjetlosti proporcionalna je molarnom ekstinkcijskom koeficijentu  $\xi$  ( $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), koncentraciji otopljenog spoja  $c$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) i širini kivete kroz koju prolazi svjetlo  $l$  (cm). Ukoliko se kontinuirano prati promjena apsorbancije pri određenoj valnoj duljini svjetlosti, a do koje dolazi zbog smanjenja koncentracije supstrata i povećanja

koncentracije produkta, i poznaje početna koncentracija enzima u reakcijskoj smjesi, može se izračunati enzimska aktivnost u definiranim uvjetima (Worsfold, 2005; Harris i Keshwani, 2009).

$$\text{Aktivnost } (\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}) = \frac{v}{[E_0]} = \frac{\left(\frac{dA}{dt}, \text{min}^{-1}\right)}{(\xi, \text{ml } \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1})(l, \text{cm})([E_0], \text{mg ml}^{-1})} \quad (2.3.)$$

Ovdje valja napomenuti ograničenja u primjeni spektrofotometrijskih metoda. Tako nije moguće pratiti koncentraciju baš svih spojeva od interesa, jer svi ovi spojevi ne apsorbiraju ili minimalno apsorbiraju UV/Vis zračenje. U takvim slučajevima pribjegava se alternativnim kontinuiranim metodama, kao što su fluorescencija ili fosforescencija.

Određivanje aktivnosti pojedinih enzima iziskuje primjenu diskontinuiranih metoda. Kao što je već prije rečeno, da bi se ovakav tip metode mogao primijeniti, potrebno je enzimsku reakciju u određenim vremenskim intervalima zaustaviti te provesti detaljnu pripremu uzorka za analizu odabranom diskontinuiranom metodom. Priprema izuzetog uzorka, u kojem se nalaze spojevi čiju koncentraciju želimo odrediti, podrazumijeva primjenu određenih postupaka i/ili tehnika na temelju kojih je moguće razdvojiti supstrat(e) od novonastalih produk(a)ta. Postupci pripreme uzorka trebaju biti učinkoviti u smislu da ne utječu na koncentraciju pojedinog spoja tijekom enzimski katalizirane reakcije (Harris i Keshwani, 2009).

U okvirima novijih istraživanja posebno često se koristi pouzdana diskontinuirana metoda - tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (engl. High Pressure Liquid Chromatography, HPLC). Primjenom različitih principa ove metode (npr. ionska izmjena, gel filtracija, tekućinska kromatografija obrnutih faza) moguće je postići izuzetno zadovoljavajuće rezultate što se tiče razdvajanja spojeva iz reakcijske smjese. Pri tome je važan i odabir odgovarajućeg detektora, koji ima mogućnost detekcije spojeva od interesa i to na temelju njihovih karakterističnih fizikalno-kemijskih svojstava. Tako se može pratiti vrijeme elucije supstrata i/ili produkata i, naknadno, iz površine ispod svakog izdvojenog pika u dobivenom kromatogramu, odrediti njihova koncentracija (Albertson i Grof, 2007).

### 2.1.3. Primjena HPLC metoda kao diskontinuiranih metoda za određivanje enzimске aktivnosti

HPLC metode se kao instrumentalne tehnike koriste za određivanje koncentracije supstrata i produkata tj. aktivnosti enzima kroz više od četrdeset godina. Neki od biotehnoški interesantnih enzima, čija je aktivnost definirana pomoću HPLC metoda, su: *N*-(5-amino-5-karboksipentanoil)-L-cisteinil-D-valin sintaza ili ACV sintetaza (EC 6.3.2.26), asparagin sintetaza (EC 6.3.5.4), kolagenaza (EC 3.4.24.3),  $\beta$ -galaktozidaza (EC 3.2.1.23), urokinaza (EC 3.4.21.31) itd. (Welling i sur., 1994).

Za uspješno provođenje ove metode potrebno je odabrati primjenjivu stacionarnu fazu s odgovarajućim funkcionalnim skupinama u HPLC koloni za razdvajanje spojeva u određenom uzorku koji se analizira, zatim prikladnu mobilnu fazu kao i detektor (Houck i Siegel, 2015).

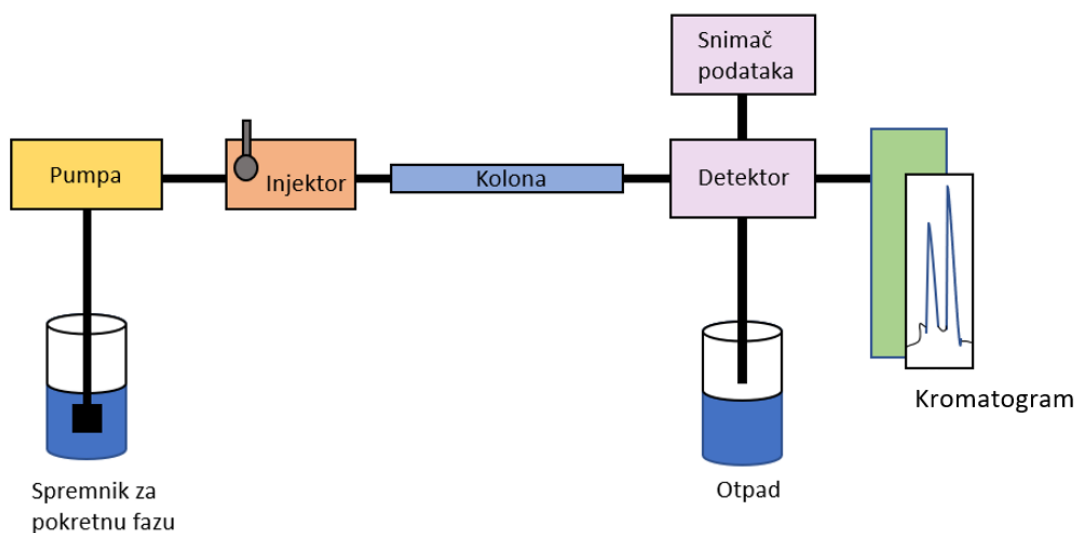
Stacionarna (ili nepokretna) faza HPLC kolone jedna je od najbitnijih elemenata kromatografske analize i odabire se na temelju ključnog svojstva spojeva koje se želi razdvojiti u ovoj koloni (Gika i sur., 2016). Sastojci uzorka, koje želimo razdvojiti tijekom HPLC analize, stupaju u kontakt sa stacionarnom fazom. O vrsti interakcija između spojeva i stacionarne faze ovisi vrijeme zadržavanja ili retencijsko vrijeme ( $t_R$ ) svakog pojedinačnog spoja iz uzorka i za svaki spoj je potrebno imati različito retencijsko vrijeme. Dakle, svaki spoj iz uzorka treba se eluirati s HPLC kolone uz različita retencijska vremena. Eluciju svakog spoja detektira odgovarajući detektor i bilježi kao pojedinačni pik na rezultirajućem kromatogramu.

Protokom mobilne (pokretne) faze se sastojci uzorka nanose na odabranu HPLC kolonu i ovom se fazom eluiraju s kolone u otopini, koja zatim dopjeva u komoricu detektora. Nakon detekcije eluirani spojevi se mogu sakupljati u frakcije i potom koristiti za daljnju analizu. Odabir mobilne faze također ovisi o svojstvima spojeva čija se koncentracija prati kao i o odabranoj HPLC koloni. Vrlo često se koristi voda odgovarajuće čistoće, određena organska otapala i/ili puferne otopine. Potrebno je izbjegavati sve mobilne faze koje mogu reagirati sa spojevima koji se analiziraju. Mobilne faze se pripremaju iz kemikalija visoke čistoće kako prilikom HPLC analize i detekcije ne bi došlo do neželjenih oštećenja HPLC sustava i nemogućnosti analize (Cummins i sur., 2017).

Danas je u primjeni veliki broj detektora, a neki od njih su: UV detektori, elektrokemijski detektori, fluorometrijski detektori, RI (engl. refractive index) detektori i drugi. Neki spojeva se ne mogu detektirati, već je potrebno prvo provesti derivatizaciju ovih spojeva tj. modificirati i/ili obilježiti željeni spoj. Derivatizacijom spojeva može se dobiti intenzivniji signal, koji se tada lakše detektira (Houck i Siegel, 2015). Derivatizacija spojeva, npr. supstrata, nije uvijek nužna te se izbjegava pri određivanju enzimске aktivnosti kako ne bi došlo do smetnji prilikom formiranja kompleksa enzim - supstrat (Welling i sur., 1994).

Za uspješno provođenje analize uzorka HPLC metodom (Slika 2.) tj. određivanje identiteta i koncentracije spojeva od interesa potrebno je koristiti standarde. Standard određenog spoja ponajprije služi kako bi se odredilo retencijsko vrijeme odabranoga spoja, a zatim i kako bi se odredila koncentracija analiziranog spoja i to usporedbom površine ispod pika standarda i površine ispod pika spoja prisutnog u uzorku s identičnim retencijskim vremenom. Zasebna kategorija je tzv. unutarnji standard, a to je standard koji se dodaje u uzorak i koji ima slična fizikalno-kemijska svojstva kao i spoj koji se analizira, a na taj način, nakon HPLC analize, utvrđuje se njegovo retencijsko vrijeme. Pomoću standarda se formira baždarni dijagram (ovisnost površine ispod pika standarda/spoja o njegovoj koncentraciji) i na temelju jednadžbe pravca ovoga dijagrama je moguće izračunati koncentraciju spoja od interesa u svakome analiziranome uzorku (Harris i Keshwani, 2009).

Zbog jednostavnosti izvedbe, selektivnosti, kratkog vremena analize, visoke rezolucije, širokog izbora detektora te ekonomičnosti procesa, HPLC metode su široko zastupljene u istraživanjima enzimske kinetike (Lambeth i Muhonen, 1994).



**Slika 2.** Shematski prikaz HPLC sustava.

## 2.2. Visoko učinkovita ionsko-izmjenjivačka kromatografija

### 2.2.1. Mehanizam i primjena

Visoko učinkovita kromatografija na ionskom izmjenjivaču se koristi kako bi se iz otopine tj. smjese spojeva izdvojili ioni i/ili polarne molekule (Fallon i sur., 1987). Ukoliko molekularni ion pri određenim uvjetima u otopini ima pozitivan ukupni naboj, koristi se kationski izmjenjivač, čija stacionarna faza sadrži funkcionalne grupe s negativnim nabojem (npr. karboksilnu skupinu,  $\text{COO}^-$ ). Tada ove funkcionalne skupine vezane za nosač stupaju u elektrostatske interakcije s molekularnim ionima suprotnoga naboja (pozitivnoga) iz uzorka. Nasuprot tomu, molekularni ioni s negativnim nabojem stupit će u interakciju i izdvojit će se na anionskom izmjenjivaču, koji ima funkcionalne skupine s pozitivnim nabojem na svojoj stacionarnoj fazi (npr. amino skupine) (Gottschalk, 2011).

Eluiranje iona, koji su se specifično vezali za određene funkcionalne skupine stacionarne faze, provodi se najčešće promjenom ionske jakosti ili promjenom pH vrijednosti mobilne faze, koja se propušta kroz kolonu tj. cijeli HPLC sustav. Ioni koji su se slabije vezali (ioni koji imaju manji ukupni naboj) eluirat će se iz HPLC kolone prije nego ioni koje su se jače vezali (imaju veći ukupni naboj) na stacionarnu fazu HPLC kolone. S obzirom na jačinu vezanja ovih iona razlikovat će se i njihova retencijska vremena (Corbier i sur., 2014).

Primjena ionsko-izmjenjivačke kromatografije visoke učinkovitosti je vrlo široka i koristi se za izdvajanje, detekciju i određivanje koncentracije brojnih biotehnoški interesantnih spojeva s određenim nabojem, npr. aminokiselina, nukleotida, ugljikohidrata, itd. (Fallon i sur., 1987) i to najčešće u farmaceutskoj industriji.

### 2.2.2. Odabir stacionarne i mobilne faze

HPLC kolona, koja se koristi za izdvajanje sastojaka uzorka ionskom izmjenom, obično je napunjena česticama smole anorganskog ili organskog podrijetla na koju su kovalentno vezane određene funkcionalne grupe s definiranim nabojem. Izuzetno je važno da stacionarna (nepokretna) faza bude inertna, netopljiva, da može podnositi visoke tlakove uobičajene pri HPLC analizi i da se izmjena iona odvija relativno brzo. Neke od smola organskog podrijetla koje se koriste kao stacionarna faza u ionsko-izmjenjivačkoj HPLC koloni su celuloza, dekstrani i sintetske polimerne smole; dok se od smola anorganskog podrijetla koriste alumosilikati, gline, hidratizirani oksidi, a posebice pelikularne (opnaste) čestice smole (Bolanča i Ukić, 2013).

Čestice stacionarne faze ili nosača je potrebno aktivirati dodatkom željenih funkcionalnih skupina na njihovoj površini. Odabir funkcionalnih grupa (skupina), koje se koriste za aktivaciju ovih čestica,

ovisi o vrsti ionske izmjene koja se planira koristiti u HPLC analizi. Ako se radi o kationskoj izmjeni - na nosač se vežu najčešće fosfatna, karboksilna ili sulfonatna funkcionalna skupina. S druge strane, kod anionske izmjene, površina nosača obično ima amino skupine. Broj funkcionalnih grupa vezanih na nosač utjecat će na kapacitet ionskog izmjenjivača, a predstavlja koncentraciju iona koja se može izmijeniti na određenom ionskom izmjenjivaču (Gottschalk, 2011).

Kao mobilna faza u ionsko izmjenjivačkoj kromatografiji učestalo se koriste različite vodene otopine soli. U nekim slučajevima soli se otpaju u organskim otapalima, npr. u metanolu ili acetonitrilu i to u cilju promjene selektivnost stacionarne faze (Fallon i sur., 1987). Kao što je već ranije spomenuto, podešavanjem ionske jakosti pokretne (mobilne) faze može se utjecati na retencijsko vrijeme spojeva od interesa iz uzorka. Tijekom elucije iona iz uzorka, koji su vezani na specifičnu funkcionalnu skupinu na stacionarnoj fazi HPLC kolone, protokom mobilne faze definiranoga sastava dolazi do zamjene vezanih iona sa ionima iz mobilne faze. Moguće je razlikovati tzv. slabe i jake mobilne faze. Kod tzv. jakih mobilnih faza ioni iz uzorka, koji su vezani za kolonu, se brzo eluiraju. Takva je mobilna faza po svojim fizikalno-kemijskim svojstvima slična stacionarnoj fazi. Suprotno tome tzv. slaba mobilna faza sporo eluira ione vezane na HPLC kolonu i njezina fizikalno-kemijska svojstva su bitno različita od svojstava stacionarne faze (Kopaciewicz i Regnier, 1983).

Elucija vezanih molekulskih iona se može provoditi izokratno ili gradijentno. Kada se provodi izokratna elucija iona vezanih na kolonu, sastav mobilne faze ostaje nepromijenjen tijekom cijelog postupka. Kod gradijentne elucije kemijski sastav mobilne faze se mijenja kako HPLC analiza napreduje. S obzirom da molekulski ioni imaju različite afinitete za interakcije s funkcionalnim skupinama stacionarne faze, tijekom gradijentne elucije uz promjenu koncentracije soli u mobilnoj fazi postiže se elucije najprije iona koji imaju najmanji afinitet za određenu funkcionalnu skupinu. Ovi se ioni eluiraju već pri protoku mobilne faze s vrlo niskom koncentracijom soli. S povećanjem koncentracije soli u mobilnoj fazi eluiraju se ioni s tzv. srednjim afinitetom za funkcionalnu skupinu, a zadnji se eluiraju ioni koje su najčvršće vezani na kolonu tj. koji imaju najveći afinitet za vezanje za određenu funkcionalnu skupinu. Ove je ione potrebno eluirati mobilnom fazom sa visokom koncentracijom soli (Schellinger i Carr, 2006).

### 2.2.3. Karakteristike detektora

Elektrokemijski detektori, kao što su amperometrijski i konduktometrijski detektori, vrlo se često koriste za detekciju iona nakon njihova izdvajanja (separacije) na ionsko-izmjenjivačkoj HPLC koloni (Schäfer i sur., 2019).

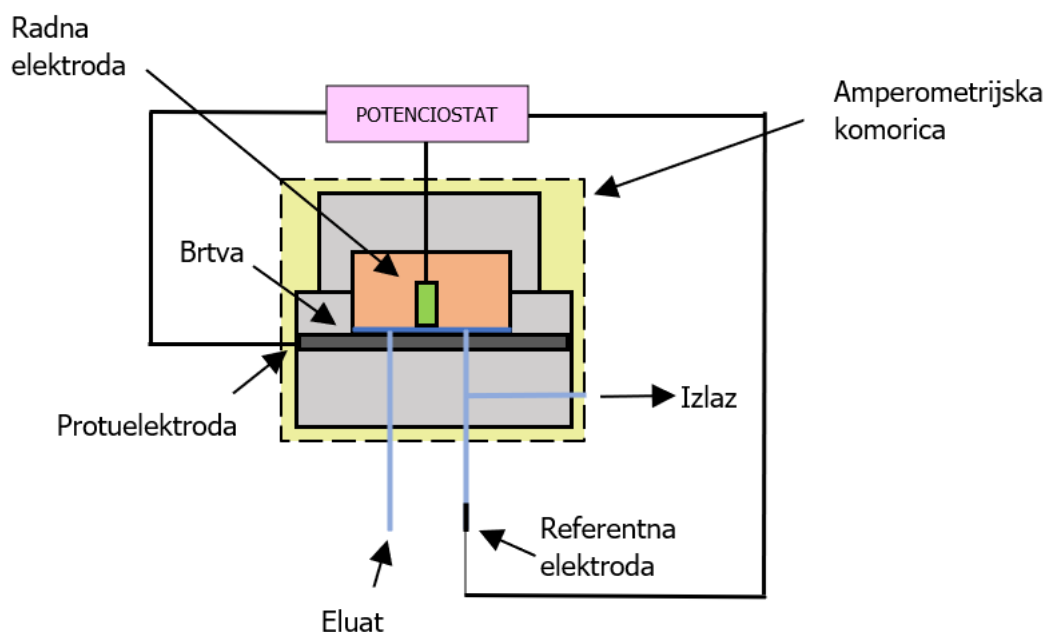
Kod konduktometrijske detekcije mjeri se jačina struje koja nastaje usljed migracije iona (eluiranih kroz određeno vrijeme s HPLC kolone) u električnom polju između dvije elektrode. Ovo se mjerenje odvija u konduktometrijskoj komorici s dvije elektrode, koje su dio Wheatstonovog mosta (Bolanča i Ukić, 2013).

Amperometrijski detektor može se koristiti za detekciju spojeva koji disociraju u otopini tj. mobilnoj fazi. Dakle  $pK_a$  ovih spojeva treba biti barem identičan pH vrijednosti mobilne faze ili manji od pH vrijednosti mobilne faze (Rocklin, 1991).

## 2.3. Amperometrijska detekcija iona izdvojenih visoko učinkovitim ionsko-izmjenjivačkom kromatografijom

### 2.3.1. Princip rada i vrste detektora

Amperometrijski detektor (Slika 3.) je komorica u kojoj su smještene tri elektrode: radna elektroda, referentna elektroda i protuelektroda (Schäfer i sur., 2019). Tijekom reakcija oksidacije ili redukcije iona analita, koje se odvijaju zbog razlike elektrodnog potencijala između referentne i radne elektrode, na površini radne elektrode se dobiva tok elektrona tj. električna energija određene jakosti. Jakost ove električne energije ( $I$ , A) je signal za amperometrijski detektor. Ovom metodom moguće je analizirati anorganske i organske spojeve prisutne u uzorku u vrlo malim koncentracijama ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Neki od podtipova amperometrijske detekcije su integrirana amperometrijska detekcija, trodimenzionalna (3D) amperometrija i pulsna amperometrijska detekcija (Rocklin, 1991), koja će detaljnije biti opisana u nastavku (ovdje ispod).

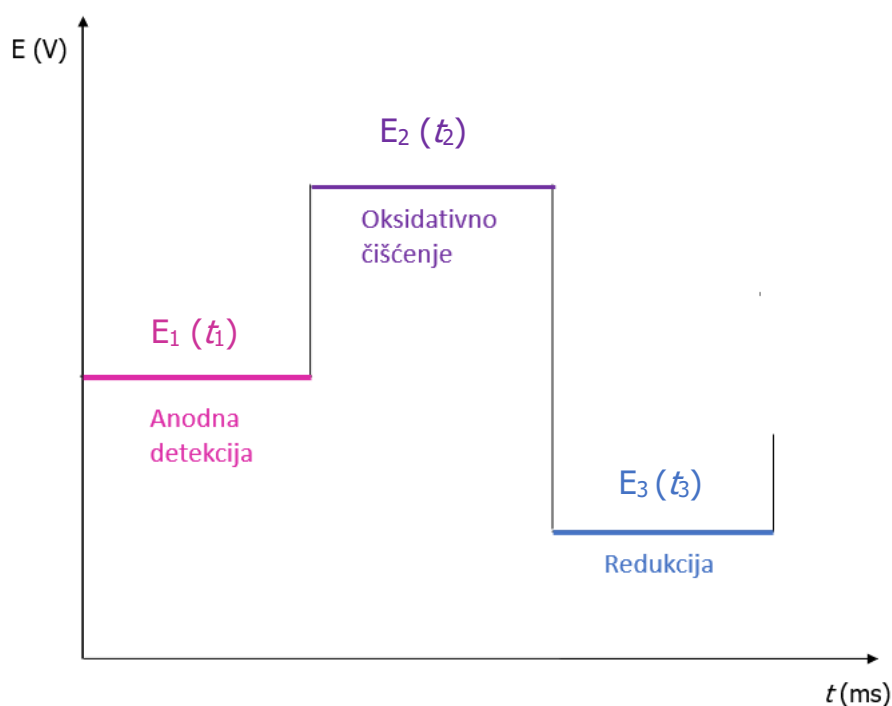


**Slika 3.** Amperometrijski detektor (prilagođeno iz Bolanča i Ukić, 2013).



### 2.3.2. Pulsna amperometrijska detekcija (PAD)

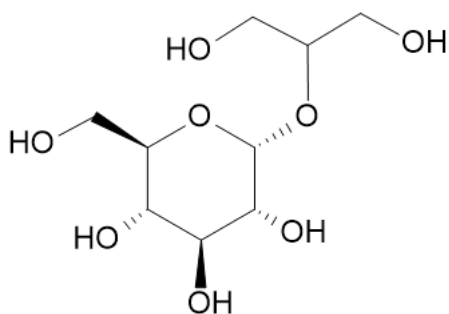
Detektor kod pulsne amperometrijske detekcije (PAD) prima signal kako je to već opisano kod amperometrijske detekcije (poglavlje 2.3.1.). I ovdje je signal jakost električne energije, koja nastaje kao posljedica redoks reakcije na površini radne elektrode u amperometrijskoj komorici. Međutim, kod PAD su tri različita ponavljajuća potencijala –  $E_1$ ,  $E_2$  i  $E_3$ , koja djeluju na radnu elektrodu u različitim vremenima –  $t_1$ ,  $t_2$  i  $t_3$  (Rohrer, 2013). Tijekom elucije iona s ion-izmjenjivačke HPLC kolone kroz određeno retencijsko vrijeme i prolaska iona kroz komoricu detektora dolazi do redoks reakcije na površini radne elektrode te se jakost struje mjeri pri potencijalu  $E_1$ . Zbog formiranja produkta ove redoks reakcije u komorici detektora, koji zaostaje na radnoj elektrodi i tako je onečišćuje, primjenjuje se drugi pozitivniji potencijal  $E_2$ . Primjenom ovoga potencijala se oksidativno ukloni produkt redoks reakcije koji je nastao pri  $E_1$  i zaostao na radnoj elektrodi. Nakon  $E_2$  slijedi primjena  $E_3$ . Primjenom ovoga potencijala ( $E_3$ ) dolazi do redukcije radne elektrode te je ova elektroda u komorici amperometrijskoga detektora nanovno spremna za uporabu i može se primijeniti potencijal  $E_1$  (Slika 4.) (Rocklin, 1991).



**Slika 4.** Izmjena triju potencijala ( $E_1$ ,  $E_2$  i  $E_3$ ) kroz tri vremenska perioda ( $t_1$ ,  $t_2$  i  $t_3$ ) kod PAD (prilagođeno iz Bolanča i Ukić, 2013).

## 2.4. Visokovrijedni biotehnološki proizvod $\alpha$ -glukozilglicerol (GG)

2-*O*-( $\alpha$ -D-glukopiranozil)-*sn*-glicerol (GG) (Slika 5.) je spoj od iznimne važnosti za (mikro)organizme poput biljaka, alga i bakterija, u čijim stanicama je ovaj spoj detektiran i to u ekstremnim uvjetima. GG pripada skupini osmolita i unutrastanično se sintetizira u reakciji koju katalizira saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7) i to u nepovoljnim uvjetima, koji mogu biti izazvani visokim koncentracijama soli, sušom i slično. Sintezom GG umanjuje se utjecaj nepovoljnih uvjeta na stanicu koja sintetizira ovaj spoj. Zbog toga je ovaj visoko vrijedni spoj našao svoju primjenu u kozmetičkoj industriji i to kao sastojak različitih hidratantnih kozmetičkih pripravaka. Istražuje se i utjecaj GG na stabilizaciju proteina i stanica te kao alternativa saharozi, ali alternativa koja ne sudjeluje u formiranju karijesa (Luley-Goedl i sur., 2010).



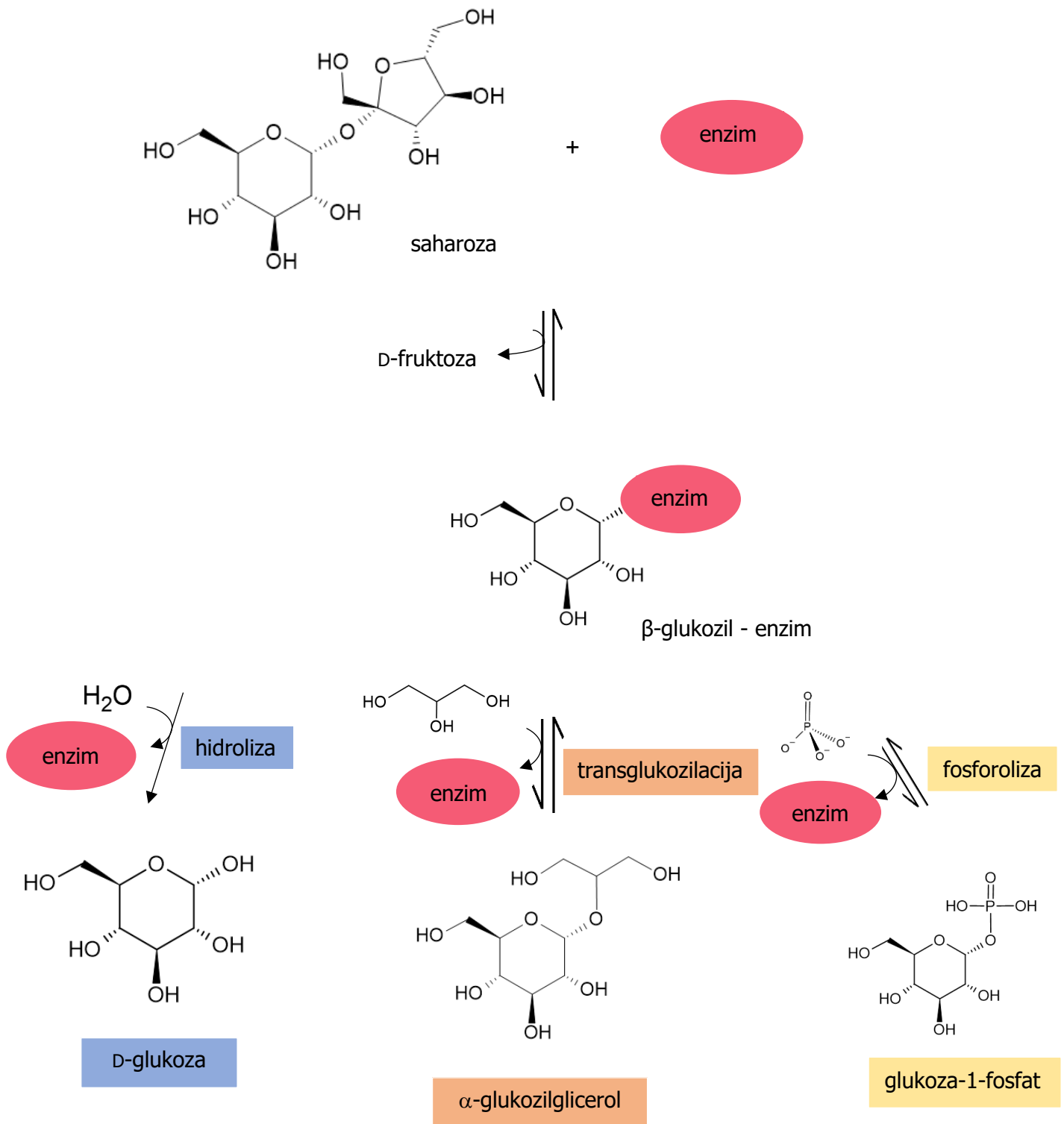
**Slika 5.** Kemijska struktura 2-*O*-( $\alpha$ -D-glukopiranozil)-*sn*-glicerola.

#### 2.4.1. Sinteza GG u industrijskom mjerilu

Proizvodnja GG u industrijskom mjerilu provodi se enzimski kataliziranom reakcijom (Luley-Goedl i sur., 2010). Ovu reakciju katalizira saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7) i gen koji kodira ovaj enzim izoliran je iz bakterije *Leuconostoc mesenteroides* (Kitao i Nakano, 1992). Saharozna fosforilaza se u industrijskoj primjeni dobiva nakon heterologne ekspresije ovoga gena u stanicama bakterije *Escherichia coli* (Luley-Goedl i sur., 2010).

Supstrat za ovaj enzim može biti disaharid saharoza te se reakcija može odvijati u tri različita smjera (Slika 6.). Saharozna u interakciji s enzimom formira međuprodukt  $\beta$ -glukozil - enzim i izdvaja se D-fruktoza. Hidroliza ovoga kompleksa je jedna od triju mogućih reakcija u kojoj dolazi do ireverzibilnog raspadanja  $\beta$ -glukozil - enzima na D-glukozu i enzim. Preostale dvije moguće reakcije su reverzibilne. Jedna od njih je reakcija fosforolize kompleksa  $\beta$ -glukozil - enzim, koja je analogna reakciji hidrolize, no umjesto vode u ovoj reakciji sudjeluje fosfatna grupa. Produkti ove reakcije su glukoza-1-fosfat i enzim. Druga reverzibilna reakcija u kojoj se raspada kompleks  $\beta$ -glukozil - enzim, koja je u industrijskoj primjeni najpoželjnija, je regioselektivna enzimska reakcija transglukozilacije. U ovom slučaju akceptor glukozilne skupine prihvaća glukozil iz kompleksa  $\beta$ -glukozil - enzim. U ovoj reakciji može nastati produkt GG ukoliko akceptor - alkohol glicerol prihvati glukozil na svojoj 2-OH skupini (Luley-Goedl i sur., 2010).

U industrijskoj proizvodnji najveći prinos GG, koji je dobiven u opisanoj reakciji transglukozilacije, postiže se kada je u reakcijskoj smjesi puno veća koncentracija glicerola nego saharoze. Tako je zabilježen prinos ovoga visokovrijednog proizvoda od 85 % kada je koncentracija glicerola 2,5 puta veća od koncentracije saharoze u reakcijskoj smjesi (Luley-Goedl i sur., 2010). Pri takvim uvjetima nepoželjna reakcija hidrolize kompleksa  $\beta$ -glukozil - enzim je zanemariva. Tvrtka Bitop AG (Njemačka) proizvodi GG i to pomoću enzima saharozna fosforilaze i ovaj se biotehnološki proizvod može naći na tržištu pod imenom Glycoin® (Luley-Goedl i sur., 2010).



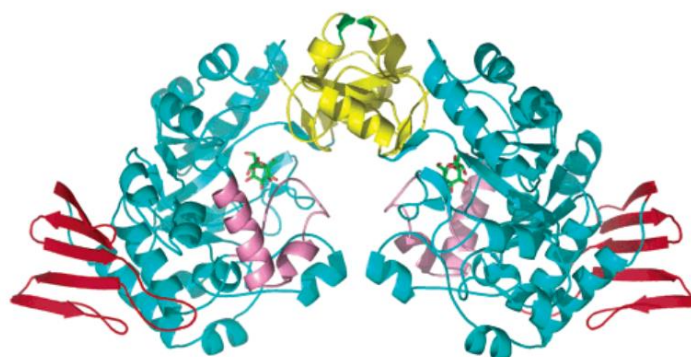
**Slika 6.** Reakcije konverzije saharoze u reakcijama koje katalizira enzim saharoza fosforilaza (prilagođeno iz Luley-Goedl i sur., 2010).

#### 2.4.2. Karakteristike industrijski primijenjene saharoza fosforilaze

Saharoza fosforilaza je citosolni enzim svrstan u obitelj enzima glikozid-hidrolaza (GH, EC 3.2; Cantarel i sur., 2009) i to u grupu enzima GH13, za koje je, osim reakcije hidrolize glikozidne veze, svojstvena i reakcija transglukozilacije (Franceus i Desmet, 2020). Sastoji se od oko 500 aminokiselina i iskazuje aktivnost kao monomer i dimer (Slika 7.). Aktivnost ovoga enzima nije ovisna o kosupstratima i kofaktorima (Luley-Goedl i sur., 2010). Saharoza fosforilaza istražena je detaljnije samo u par slučajeva, kao npr. enzim izoliran iz *L. mesenteroides*, no geni koji kodiraju za ovaj enzim okarakterizirani su i kod drugih vrsta (Russell i sur., 1988; Fournie i sur., 1994).

U suvremenoj biotehnološkoj proizvodnji primjena ovog enzima se širi, a najviše se koristi u proizvodnji fosforiliranih ugljikohidrata, glukozyda i rijetko prisutnih tzv. prirodnih ugljikohidrata i to u reakcijama transglukozilacije, kako je već prije opisano u ovome radu za najistraženiju takvu reakciju u kojoj je donor glukozyda saharoza, a akceptor glukozyda glicerol. Donori glukozyda koji se mogu koristiti u reakcijama transglukozilacije su: saharoza, glukoza-1-fosfat i  $\alpha$ -D-glukopiranozil-1-fluorid. Saharoza se smatra ponajboljim supstratom - donorom glukozyda. Formiranje različitih glukozyda, koji doprinose poželjnim svojstvima krajnjih proizvoda u prehrambenoj, farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji, moguća je zbog velikog broja akceptora glukozydne skupine. Neki od akceptora su ugljikohidrati, alkoholni šećeri i karboksilne kiseline (Franceus i Desmet, 2020).

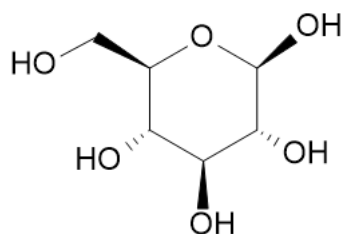
Kod određivanja aktivnosti saharoza fosforilaze potrebno je iz reakcijske smjese, koja bi prema prije opisanim reakcijama sadržavala: saharozu, fruktozu, glukozyu, glukoza-1-fosfat, glicerol i GG, razdvojiti sve spojeve pomoću ionskog izmjenjivača i detektirati ih pomoću odgovarajućeg detektora, npr. PAD. S obzirom da se radi o ugljikohidratima i njihovim derivatima, u nastavku su opisana neka fizikalno-kemijska svojstva ovih spojeva, koja bi bila relevantna za provedbu navedene HPLC metode s detekcijom.



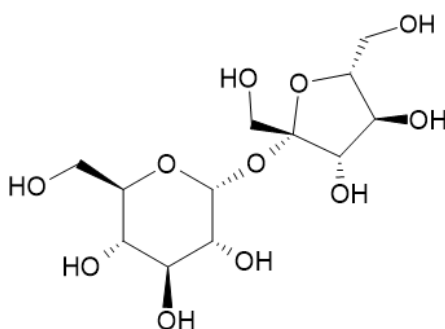
**Slika 7.** Homodimer saharoza fosforilaze, koja je izolirana iz bakterije *Bifidobacterium adolescentis* (prilagođeno iz Sprogøe i sur., 2004).

### 2.4.3. Fizikalno-kemijska svojstva visokovrijednih biotehnoloških spojeva

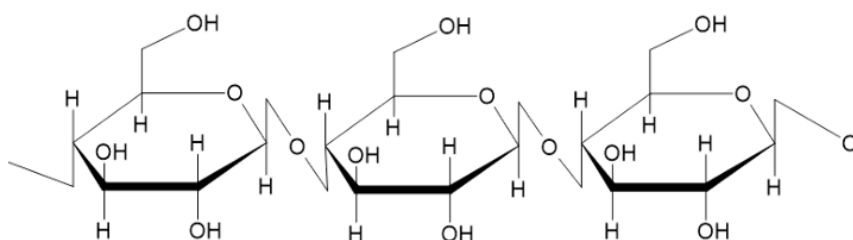
Fizikalno-kemijska svojstva visoko vrijednih biotehnoloških spojeva određena su njihovom primarnom strukturom (Linhard i Bazin, 2011). Ugljikohidrati imaju karakterističnu strukturu ketona ili aldehida i brojne hidroksilne (-OH) skupine vezane na ugljikove atome, pa se zbog ove karakteristične strukture još nazivaju polihidroksi ketoni ili polihidroksi aldehidi. Ugljikohidrati se mogu podijeliti na: monosaharide - jednostavne ugljikohidrate građene od tri, četiri, pet ili šest atoma ugljika (Slika 8.), oligosaharide – složenije ugljikohidrate načinjene od dva do desetak monosaharida (Slika 9.), i polisaharide – kompleksne ugljikohidrate građene od više od 10 monosaharida (Slika 10.; Tzia i sur., 2012).



**Slika 8.** Kemijska struktura D-glukoze.



**Slika 9.** Kemijska struktura saharoze.

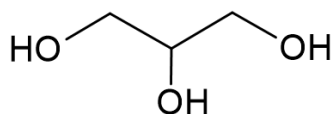


**Slika 10.** Kemijska struktura trimera  $\beta$ -D-glukoze, koja je dio celuloze.

Na fizikalna svojstva visoko vrijednih biotehnoloških proizvoda mogu utjecati veličina molekule, tip glikozidne veze i pripadajuće funkcionalne grupe. Ukoliko nisu modificirani, ugljikohidrati su dobro topljivi u vodi i polarnim otapalima. Ugljikohidrati su uglavnom stabilne molekule, no svi monosaharidi te pojedini oligosaharidi i polisaharidi, koji imaju slobodnu ketonsku ili aldehidnu skupinu, su reaktivni i mogu biti reducirajući spojevi u redoks reakcijama. Ugljikohidrati mogu apsorbirati vrlo malo svjetla iz ultraljubičastog i vidljivog dijela spektra, pa se njihova koncentracija teže određuje spektrofotometrijskim metodama od drugih vrsta kromofornih spojeva. No, modifikacijom osnovne strukture ugljikohidrata moguće je povećati apsorpciju svjetlosti i odrediti tj. pratiti koncentraciju ovih spojeva.

Jedno od kemijskih svojstava ugljikohidrata, koje se koristi u biotehnološkoj industrijskoj proizvodnji, je mogućnost njihova sudjelovanja u redoks reakcijama. Oksidacija karakteristične aldehidne skupine rezultira nastankom glikonske (aldonske) kiseline. Da bi oksidacija primarne i sekundarne hidroksilne skupine ugljikohidrata do karboksilne skupine bila moguća, potrebno je u reakcijsku smjesu dodati odgovarajući spoj - oksidans, kao što je npr. kromatska kiselina ( $K_2CrO_4$ ; Linhard i Bazin, 2011). Ukoliko dolazi do redukcije ugljikohidrata tj. karbonilne skupine, u ovoj će reakciji nastati alkoholni šećeri (Tzia i sur., 2012).

Alkoholni šećeri, npr. glicerol (Slika 11.), slabo apsorbiraju svjetlost iz ultraljubičastog i vidljivog dijela spektra, pa se ne detektiraju spektrofotometrijskim metodama. Topljivost ovih spojeva u vodi zavisi o temperature otopine i povećava se s povećanjem ove temperature. Ugljikohidrate mogu razgraditi samo neki enzimi, a dosta su stabilni i u otopinama kiselina i lužina čak i pri povišenim temperaturama (Schiweck i sur., 2000). Alkoholne grupe ugljikohidrata reaktivne su i mogu sudjelovati u reakcijama oksidacije (Grembecka, 2018).



**Slika 11.** Kemijska struktura glicerola.

## 2.5. HPAE-PAD metoda za određivanje aktivnosti saharoza fosforilaze

### 2.5.1. Princip metode

Svojtvo koje posjeduju ugljikohidrati, alkoholni šećeri i  $\alpha$ -glukozilglicerol (GG) jest da imaju visoku  $pK_a$  vrijednost, što ih svrstava u skupinu slabih kiselina. Povećanjem pH otopine u kojoj su otopljeni ovi spojevi i to iznad odgovarajućih pripadajućih  $pK_a$  vrijednosti, ovi spojevi poprimaju strukturu oksianiona tj. imaju ukupni negativan naboj i zbog toga se mogu iz otopine izdvojiti na anionskom izmjenjivaču, koji ima funkcionalne skupine s pozitivnim nabojem (Corradini i sur., 2012). Kako svaki od ovih spojeva ima različitu  $pK_a$  vrijednost, tako će imati i različita retencijska vremena i moći će se izdvojiti iz smjese ovom HPLC metodom. Ukoliko se usporede  $pK_a$  vrijednosti monosaharida, alkoholnih šećera i glukozida, može se uočiti da monosaharidi imaju manje  $pK_a$  vrijednosti od ostale dvije skupine spojeva. Monosaharidi se smatraju najkiselijim iz ove tri skupine spojeva i iz HPLC kolone se eluiraju na kraju jer imaju jače elektrostatske interakcije sa funkcionalnim skupinama u ovoj koloni. Ova kiselost upravo potječe od protona karbonilne skupine monosaharida (Hardy i Rohrer, 2007). Redukcijom karbonilne skupine mijenja se njihova kiselost. Alkoholni šećeri se eluiraju sa kolone nešto prije monosaharida, dok najkraće retencijsko vrijeme imaju glukozidi, koji su najslabije kiseline te imaju najveće  $pK_a$  vrijednosti (Tablica 1.) i najslabije se vežu sa funkcionalnim skupinama u HPLC koloni (Cataldi i sur., 2000). Na ovaj se način može pretpostaviti redosljed eluiranja spojeva iz ove tri skupine, potrebno je za svaku pojedinu smjesu spojeva provesti eksperimentalnu analizu te utvrditi kojim će se redosljedom odvijati elucija spojeva iz smjese iz kolone.

**Tablica 1.** Konstante disocijacija ( $pK_a$ ) odabranih ugljikohidrata u vodi pri 25 °C (preuzeto i prilagođeno iz Rohrer, 2013).

spoj	$pK_a$ vrijednost
fruktoza	12,03
glukoza	12,28
galaktoza	12,39
sorbitol	13,60
$\alpha$ -metilglukozid	13,71

Elucija spojeva, koji su se vezali na funkcionalne skupine u HPLC koloni, postiže se promjenom pH vrijednosti mobilne faze tj. dodatkom jake lužine (npr. otopine NaOH). Koncentracija lužina, koje



se ovdje koriste, kreću se u rasponu od  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  do  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , ovisno o tome koji spoj se želi eluirati.

S obzirom da reducirani oblici ugljikohidrata, kao što su šećerni alkoholi i glukozidi, formiraju najslabije veze sa funkcionalnim grupama u koloni, njihova elucija postiže se pri nižim koncentracijama lužine. Sukladno tome, oni spojevi koji su jače vezani za kolonu, eluiraju se uz protok mobilne faze s višom koncentracijom lužine. Pri tome se za takve spojeve uz npr. NaOH u mobilnu fazu dodaje natrijev acetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), jer ovaj drugi spoj ima veći afinitet za funkcionalne skupine na stacionarnoj fazi u koloni, koje imaju pozitivan naboj. Na ovaj se način jače vezani spojevi u HPLC koloni eluiraju uz kraće retencijsko vrijeme. Natrijev acetat se ne detektira u komorici detektora, što je vrlo važno kod određivanja koncentracije spojeva koji se eluiraju s kolone. Najčešće se primjenjuje izokratsko eluiranje sa ujednačenim sastavom mobilne faze (otopine lužine) tijekom cijele HPLC analize. Ovaj je način eluiranja manje kompleksan, ali HPLC analiza dulje traje (Hardy i Rohrer, 2007).

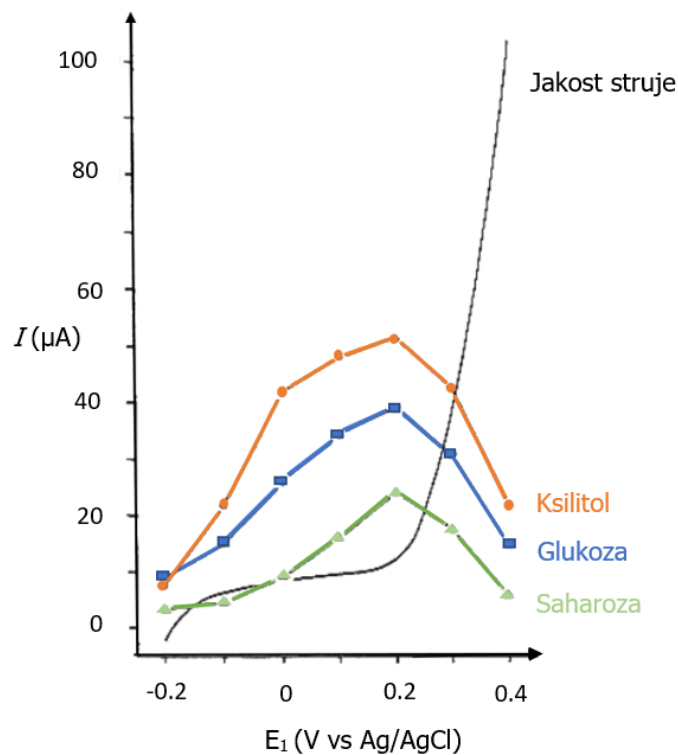
Bolje izdvajanje spojeva iz otopine s pomoću HPLC metode i kraće trajanje ove analize postiže se primjenom gradijentnog eluiranja. U tom slučaju koncentracija NaOH se tijekom analize kontinuirano mijenja. Na početku elucije koncentracija NaOH u mobilnoj fazi je niska te se s kolone eluiraju slabije vezani spojevi. Daljnjim povećanjem koncentracije NaOH postiže se elucija i ostalih komponenti tj. spojeva, koji su se jače vezali na funkcionalne skupine u HPLC koloni. Ovaj princip je osobito važan kod eluiranja monosaharida, koji imaju slične  $pK_a$  vrijednosti, a čime se postiže veća selektivnost HPLC metode odnosno bolje razdvajanje sličnih monosaharida (Corradini i sur., 2012). Kod gradijentne elucije potrebno je odrediti koliko je promjena koncentracije NaOH u mobilnoj fazi velika. Ukoliko dođe do prevelike pomjene pH vrijednosti mobilne faze, može se oštetiti detektor (Rohrer, 2013).

Eluirani spojevi se detektiraju u komorici PAD. Kao što je već prije navedeno, derivatizacija spojeva u ovom slučaju nije potrebna te se ovom metodom mogu detektirati spojevi čija je koncentracija izražena u  $\text{pmol L}^{-1}$ . Ugljikohidrati koji se na ovaj način analiziraju, trebaju biti oksido-redukcijski aktivni, odnosno u prisustvu elektrode načinjene od plemenitog metala, primjenom pozitivnog potencijala, na površini elektrode mogu se oksidirati, što rezultira nastankom struje čija je jačina proporcionalna brzini oksido-redukcijske reakcije. Elektrode koje se ovdje koriste izrađene su od platine i zlata. Zlatna elektroda se može koristiti samo za lužnate otopine, dok se platina može koristiti i za kisele otopine. Referentna elektroda koja se pritom koristi je Ag/AgCl elektroda (Corradini i sur., 2012).

Kod ove metode se uzastopno ponavljaju tri različita potencijala, koji djeluju na radnu elektrodu, i potrebno je eksperimentalno odrediti te tri vrijednosti potencijala cikličkom voltametrijom. Kod ovog postupka jedan od potencijala se mijenja dok se druga dva drže konstantnim te se na taj način odrede optimalne vrijednosti za svaku od tri vrijednosti potencijala koji će se primjenjivati tijekom detekcije eluiranih spojeva (Slika 4.). Uz vrijednosti potencijala ( $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ ), određuju se i prikladna vremena

( $t_1$ ,  $t_2$  i  $t_3$ ) koja su potrebna da bi potencijali djelovali na elektrodu. Potencijal  $E_1$  smatra se najvažnijim pošto se kod tog potencijala mjeri jakost struje nastale oksidacijom ugljikohidrata.

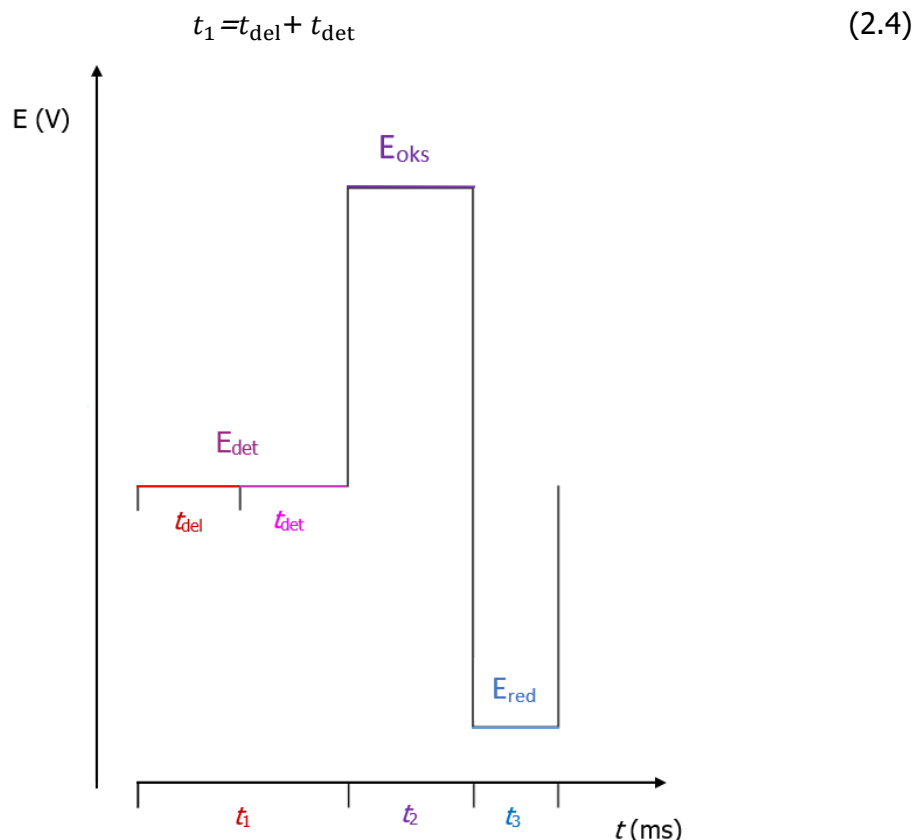
Provedeno je istraživanje te je dokazano da je moguće pri istom potencijalu izmjeriti jakost struje za tri različita ugljikohidrata, odnosno maksimalan odziv elektrode postiže se kod iste vrijednosti potencijala  $E_1$  za alkoholni šećer ksilitol, saharozu i glukozu (Slika 12.). Razlog tomu je taj da jakost struje ne ovisi o redoks potencijalu spojeva, već o tome u kakvom je stanju površina elektrode na koju se primjenjuje  $E_1$ , obzirom da površina elektrode sudjeluje u oksido-redukcijskoj reakciji (Rocklin, 1991).



**Slika 12.** Jakost struje ( $I$ ,  $\mu A$ ), koja nastaje usljed oksidacije triju različitih spojeva pri različitim vrijednostima potencijala  $E_1$  (V) (prilagođeno iz Rohrer, 2013).

Nakon  $E_1$ , primjenjuje se pozitivniji potencijal  $E_2$ , pri kojem se površina elektrode u potpunosti oksidira i time se uklone nus-produkti oksidacije ugljikohidrata. Slijedi potencijal  $E_3$ , koji ima nižu vrijednost od potencijala  $E_2$ , pri kojem dolazi do redukcije oksidirane elektrode i nakon toga je elektroda ponovno spremna za korištenje. Kod primjene  $E_1$  potencijala razlikuju se dva različita vremenska perioda primjene ovoga potencijala -  $t_{del}$  (od engl. delay period) i  $t_{det}$  (od engl. detection period) (Slika 13.). Vrijeme koje je potrebno da struja određene jakosti, koja je nastala prilikom promjene potencijala od  $E_3$  do  $E_1$  iščezne, je  $t_{del}$ . Nakon  $t_{del}$  slijedi  $t_{det}$  i tijekom ovoga vremenskoga perioda se mjeri jakost električne energije, koja je nastala isključivo usljed oksidacije ugljikohidrata.

Vremenski period ( $t_1$ ) kroz koji potencijal  $E_1$  djeluje na elektrodu, je sukladno tomu zbroj dvaju vremenskih perioda, kako slijedi (Corradini i sur., 2012):



**Slika 13.** Tri naizmjenična potencijala ( $E_1 = E_{\text{det}}$ ;  $E_2 = E_{\text{oks}}$ ;  $E_3 = E_{\text{red}}$ ) koji se izmjenjuju tijekom detekcije ugljikohidrata HPAE-PAD metodom kroz vremena  $t_1$  ( $t_1 = t_{\text{del}} + t_{\text{det}}$ ),  $t_2$  ( $t_{\text{oks}}$ ) i  $t_3$  ( $t_{\text{red}}$ ) (prilagođeno prema Corradini i sur., 2012).

Kod HPAE-PAD metode nije potrebna derivatizacija ugljikohidrata, a metoda je vrlo osjetljiva i selektivna. Nadalje, nakon izdvajanja određenih spojeva iz otopine po principu anionske izmjene, spojevi s neutralnim nabojem ili spojevi s pozitivnim nabojem neće biti detektirani pulskom amperometrijskom detekcijom (Rohrer, 2013). Prednost ove metode je i da se detekcija svih spojeva iz otopine/smjese može postići u samo jednoj analizi.

### 2.5.2. Izbor kromatografske kolone

Jaki anionski izmjenjivači prikladni su za izdvajanje karakterističnih spojeva iz otopine u kojoj se odvijala biokemijska reakcija koju katalizira saharoza fosforilaza, a mogu se dobiti od nekoliko proizvođača, kao što je npr. Thermo Scientific™ Dionex™ (Dionex CarboPac MA1 kolona). Ovi izmjenjivači smatraju se najboljima za razdvajanje reduciranih ugljikohidrata, kao što su to alkoholni šećer i glikozidi (Grembecka, 2018). Primjenom ovih izmjenjivača moguće je izdvojiti i monosaharide koji nemaju naboj (npr. D-glukoza, D-fruktoza) kao i disaharide (npr. saharoza) iz smjese, pri čemu je retencijsko vrijeme ovih spojeva nešto duže od šećernih alkohola, jer se ovi spojevi čvrsto vežu za funkcionalne skupine kolone (Rohrer, 2013).

Jaki anionski izmjenjivači sastoje se od stacionarne faze, koja je načinjena od vinilbenzil klorid divinilbenzena s promjerom čestica od 8,5 µm. Površina čestica stacionarne faze je aktivirana alkil kvartarnim amonijevim grupama. Nereducirani ugljikohidrati stvaraju jače interakcije sa funkcionalnim grupama stacionarne faze u ovoj koloni, pa su potrebne veće koncentracije NaOH u mobilnoj fazi, kako bi došlo do skraćivanja retencijskog vremena i cjelokupne analize. U ovom slučaju pogodno je primijeniti gradijentnu eluciju i mijenjati sastav mobilne faze promjenom koncentracije NaOH. Pri tome treba uzeti u obzir da se time mijenja i redoslijed elucije komponenata vezanih u koloni. Ono što još karakterizira ovu kolonu je njena kemijska stabilnost. Ova HPLC kolona uspješno razdvaja sastojke otopine pri tlakovima do 14 MPa i u rasponu pH vrijednosti 0 - 14, što je vrlo važno u ovom konkretnom slučaju pošto se elucija odvija vrlo bazičnom otopinom (Rohrer, 2013).

Prije propuštanja uzorka kroz analitičku HPLC kolonu, preporuča se prethodno pročišćavanje uzorka, posebice biotehnoloških uzoraka, primjenom predkolone. Predkolona se koristi kako bi se smanjila koncentracija sastojaka biotehnoloških uzoraka koji bi mogli opteretiti analitičku HPLC kolonu, a koji se ne analiziraju niti utječu na analizu sastojaka od interesa. Primjenom predkolone se produžuje trajanje analitičke HPLC kolone (Thermo Fisher Scientific Inc., 2013).

Jaki anionski izmjenjivači mogu se primijeniti i za analizu reakcijske smjese u kojoj svoju aktivnost iskazuje saharoza fosforilaza (Wang i sur., 2015). Potvrđena je mogućnost analize staničnog ekstrakta cijanobakterija ovom kolonom u cilju određivanja koncentracije GG i saharoze.

### 2.5.3. Priprema uzorka i parametri HPAE-PAD metode za praćenje aktivnosti saharoza fosforilaze

#### 2.5.3.1. Priprema uzorka

Priprema uzorka vrlo je važan postupak koji prethodi razdvajanju sastojaka uzorka (D-glukoza, D-fruktoza, glicerol, saharoza, GG, glukoza-1-fosfat) pomoću HPLC kolone. U industrijskom mjerilu za analizu se obično koristi nepročišćeni stanični ekstrakt (engl. crude cell extract) bakterije *Escherichia coli*. Kao i drugi ekstrakti stanica i ovaj stanični ekstrakt sadrži puno različitih spojeva (Luley-Goedl i sur., 2010). Neke od ovih spojeva, koji nisu od interesa za ovu analizu, je potrebno ukloniti iz uzorka prije HPLC analize kako bi se izbjegle interferencije sa sastojcima od interesa i ne bi dodatno opteretio PAD.

Uzorak se obično filtrira kroz filter s veličinama pora od 0,45 µm, čime je moguće ukloniti nepoželjne čestice iz uzorka, koje bi mogle začepiti kolonu i uzrokovati oštećenja HPLC sustava.

Daljnja priprema uzorka ovisi o drugim otopljenim sastojcima reakcijske smjese u kojoj se određivala aktivnost saharoza fosforilaze. Kada se koristi jaki anionski izmjenjivač kao HPLC kolona, uzorak ne bi trebalo sadržavati visoku koncentraciju soli. Ovi se spojevi mogu vezati na funkcionalne skupine kolone i tako remete vezanje spojeva od interesa, što ima za posljedicu promjenu njihova vremena zadržavanja. Osim toga, soli mogu oštetiti radnu elektrodu PAD. Visoka koncentracija aniona u uzorku također je nepoželjna obzirom da anioni mogu preuzeti ulogu eluensa (mobilne faze). Ovaj problem se može riješiti ukoliko se u uzorku za HPLC analizu prethodno smanji koncentracija soli, npr. dijalizom ili propuštanjem uzorka kroz predkolonu. U uzorku ne bi trebalo biti niti natrijevog dodecil-sulfata (engl. sodium dodecyl sulphate, SDS), detergenta koji se ireverzibilno veže na funkcionalne skupine kolone. Detergenti se mogu ukloniti iz uzorka ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Na sličan način mogu se ukloniti organska otapala iz uzorka, jer utječu na retencijsko vrijeme spojeva od interesa. Dodatno, spojevi koje imaju amino skupinu (npr. proteini, peptidi i amino kiseline) utječu na rad detektora i potrebno ih je ukloniti ili barem smanjiti njihovu koncentraciju prije HPLC analize. Metode taloženja mogu se koristiti za uklanjanje proteina iz uzorka. Za uklanjanje lipida može se primijeniti ekstrakcija tekuće - tekuće. Hidroksilirani spojevi, kao što su npr. alkohol i tris(hidroksimetil)aminometan (TRIS) pufer, mogu utjecati na rad PAD i mogu se ukloniti iz uzorka dijalizom (Thermo Fisher Scientific Inc., 2013).

### 2.5.3.2. Priprema standarda

Određivanje koncentracije svakog sastojka uzorka od interesa (koji sudjeluje u enzimskoj reakciji kataliziranoj saharoza fosforilazom), može se odrediti pomoću baždarnog dijagrama za svaki sastojak (spoj). Za izradu baždarnog dijagrama potrebno je pripremiti pojedinačne čiste otopine svakog spoja i to otopine različitih koncentracija u određenom rasponu. Priređene otopine spojeva se analiziraju optimiranom HPAE-PAD metodom. Osim retencijskih vremena za svaki spoj, ovo analizom se dobiju površine ispod svakog pika u kromatogramu, koje se stave u odnos sa koncentracijama pripremljenih standardnih otopina. Tako se dobije baždarni dijagram i posljedično jednadžba pravca u određenom rasponu koncentracija za svaki spoj. Primjenom jednadžbe pravca za svaki standard – spoj može se utvrditi koncentracija spoja od interesa, koji sudjeluje u enzimskoj reakciji (Albertson i Grof, 2007). U opisanom slučaju priređuju se i HPAE-PAD metodom određuju retencijska vremena i površina ispod pikova u kromatogramu ovih spojeva: D-glukoze, D-fruktoze, glicerola, saharoze, GG i glukoza-1-fosfata. Tako se mogu dobiti šest različitih jednadžbi pravaca, pomoću kojih se može izračunati koncentracija svakog od ovih šest spojeva u reakcijskoj smjesi.

### 2.5.3.3. Priprema i protok mobilne faze

Kao mobilna faza obično se koristi otopina natrijevog hidroksida (NaOH) uz dodatak natrijeva acetata ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ). Za pripremu mobilne faze koristi se deionizirana vode visokog stupnja (HPLC) čistoće i, obično, 50 %-tna otopina NaOH. Pelete NaOH potrebno je izbjegavati, jer u kontaktu sa zrakom dolazi do formiranja dodatnog sloja karbonata na njihovoj površini, što može utjecati na HPLC analizu i detekciju spojeva od interesa. Još je bitno da deionizirana voda visokog stupnja (HPLC) čistoće sadrži čim manje otopljenih plinova, pa tako i ugljikovog dioksida ali i borata iz vode, koji utječu na analizu uzoraka HPAE-PAD metodom. Takva deionizirana voda visokog stupnja (HPLC) čistoće ima karakterističnu vodljivost (preporuča se maksimalna vodljivost od  $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) i nije kontaminirana različitim mikroorganizmima, drugim nečistoćama i česticama promjera većeg od  $0,2 \mu\text{m}$ . Kao metoda za pripremu vode za mobilnu fazu može se koristiti UV zračenje.

Priprema pokretne (mobilne) faze odvija se kroz nekoliko postupaka. Obično se koristi deionizirana voda visokog stupnja (HPLC) čistoće i otplinjava sonikacijom kroz određeni vremenski period (npr. 30 - 60 s). Završetak otplinjavanja vode za mobilnu fazu može se prepoznati po izostanku mjehurića koji izlaze iz mobilne faze. Nakon toga se u ovako priređenu vode dodaje određeni volumen 50 %-tne otopine NaOH, kako bi se priredila otopina NaOH potrebne koncentracije. Priređena otopina čuva se u plastičnim bocama, jer NaOH reagira sa silikatima i boratima iz stakla, pa se tako zapravo

zagađuje mobilna faza. Kod pripreme eluensa potrebno je izbjegavati izlaganje ove otopine zraku i to zbog otapanja ugljikova dioksida u priređenoj otopini. Naime, u otopinama koje imaju pH vrijednosti iznad 12, kod kojih se provodi ova metoda, iz ugljikovog dioksida nastaje karbonatni anion, koji posjeduje veliki afinitet za vezanje na kolonu s pozitivno nabijenim funkcionalnim skupinama. Tako se može narušiti vezanje spojeva od interesa iz uzorka koji se analizira, mijenja se njihovo retencijsko vrijeme, smanjuje se selektivnost kolone, rezolucija i učinkovitost HPAE-PAD metode. Potpuno odsustvo karbonata iz otopine mobilne faze se ne može postići, ali je njihovu koncentraciju svesti na minimum. To se može postići ukoliko se pripremljena otopina čuva u zatvorenoj plastičnoj boci u atmosferi He npr. pod tlakom od 34 do 55 MPa (Rohrer, 2017).

Ukoliko se iz kolone eluira spoj koji ima visoki afinitet za vezanje na funkcionalnu skupinu, npr. glukozu-fosfat, u mobilnu fazu se može dodati i natrijev acetat. Tada je tijekom elucija koncentracija NaOH konstantna, dok se tijekom elucije povećava koncentracija natrijeva acetata. Natrijev acetat se dodaje u priređenu otopinu NaOH, kako se zasebna otopina natrijeva acetata ne bi kontaminirala.

Preporučeni protok mobilne faze kroz jake anionske izmjenjivače varira, a primjer je protok od  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$  za analitičku HPLC kolonu dimenzija 4 x 250 mm (Rohrer, 2013).

#### 2.5.3.4. Temperatura kolone

Tijekom HPLC analize uzoraka HPAE-PAD metodom obično se održava sobna temperatura analitičke kolone, a u nekim slučajevima može biti i nešto povišena, npr.  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (Wang i sur., 2015).

### 2.5.3.5. Redosljed eluiranja i retencijska vremena spojeva od interesa

Na temelju eksperimentalnih podataka iz dostupne literature (Rohrer, 2013; Wang i sur., 2015), može se predložiti redosljed eluiranja i retencijska vremena spojeva od interesa (Tablice 2. i 3.).

**Tablica 2.** Redosljed eluiranja analiziranih spojeva uz korištenje 0,6 ili 0,8 mol L<sup>-1</sup> NaOH kao mobilne faze pri protoku ove faze od 0,4 mL min<sup>-1</sup> i temepraturi kolone od 30 °C (Rohrer, 2013; Wang i sur., 2015).

redosljed eluiranja	spoj
1.	glicerol
2.	D-glukoza
3.	D-fruktoza
4.	GG
5.	saharoza
6.	glukoza-1-fosfat

Kod elucije spojeva pobrojanih u Tablici 2. iz CarboPac MA1 kolone eluensom s 600 mmolL<sup>-1</sup> NaOH, glicerol se eluira prvi i njegovo retencijsko vrijeme ( $t_R$ ) je ispod 10 min. Pri istim uvjetima D-glukoza i D-fruktoza sporije se eluiraju od glicerola i detektiraju se nakon 20 minuta. Saharoza se eluira među zadnjima i to između 40 i 50 minuta (Rohrer, 2013). HPLC razdvajanje GG i saharoze je uspješno provedeno sa 800 mmol L<sup>-1</sup> NaOH kada se GG eluira između 10 i 15 minuta, dok se saharoza može detektirati nakon 24 min (Wang, et al., 2015).

Obzirom da su ovdje opisane HPLC analize provedene u istoj koloni pri istovjetnom protoku mobilne faze i temperaturi i istim detektorom, ali uz različite koncentracije NaOH u eluensu, napravljena je usporedba  $t_R$  svakog od gore navedenog spoja. Pri tome valja istaknuti da se je u oba slučaja analizirala saharoza i GG, a njihova vremena zadržavanja su se razlikovala u ova dva slučaja (Tablica 3.).



**Tablica 3.** Redosljed eluiranja analiziranih spojeva iz Dionex CarboPac MA1 kolone i njihova retencijska vremena ( $t_R$ ) tijekom HPAE-PAD analize. Koncentracija NaOH u mobilnoj fazi naznačena je u tablici, protok mobilne faze je bio  $0,4 \text{ mL min}^{-1}$ , a temperatura kolone  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  (Rohrer, 2013; Wang i sur., 2015).

$c(\text{NaOH}) \text{ (mmol L}^{-1}\text{)}$	600	800
spojevi	$t_R \text{ (min)}$	
glicerol	9	n.a.
D-glukoza	22	n.a.
D-fruktoza	26	n.a.
saharoza	43	25
GG	n.a.	16

n.a. nije analizirano

### 3. ZAKLJUČCI

Na temelju podataka opisanih u ovome završnom radu moguće je izvesti nekoliko ključnih zaključaka:

1. Aktivnost enzima u biotehnološkoj industriji je jedno od njihovih ključnih svojstava, koje se može procijeniti na temelju određivanja promjene koncentracije supstrata i/ili produkata enzimski katalizirane reakcije. U cilju procjene enzimске aktivnosti vrlo često se koristi visoko učinkovita tekućinska kromatografija (HPLC).
2. Saharoza fosforilaza (EC 2.4.1.7) katalizira industrijski važnu reakciju transglukozilacije glicerola i jedan od krajnjih produkata ove reakcije je visoko vrijedan biotehnološki proizvod 2-*O*-( $\alpha$ -D-glukopiranozil)-*sn*-glicerol (GG), koji ima primjenu prvenstveno u kozmetičkoj industriji, ali i u drugim područjima biotehnologije.
3. Za određivanje aktivnosti ovoga industrijskog biokatalizatora predložena je anionsko-izmjenjivačka kromatografija visoke učinkovitosti sa pulsnom amperometrijskom detekcijom (HPAE-PAD), kojom se može odrediti koncentracija svih spojeva prisutnih u reakcijskoj smjesi: saharoze, D-fruktoze, D-glukoze, glicerola, GG i glukoza-1-fosfata, i to samo jednom analizom.
4. Predloženi su ključni parametri HPAE-PAD analize ove reakcijske smjese, kako slijedi: tip anionsko-izmjenjivačke HPLC kolone s predkolonom; sastav mobilne faze (0,6 ili 0,8 mmol L<sup>-1</sup> NaOH uz dodatak CH<sub>3</sub>COONa) za separaciju i gradijentnu eluciju pobrojanih spojeva; zatim protok mobilne faze (0,4 mL min<sup>-1</sup>), temperatura kolone (30 °C) kao i redosljed elucije ovih spojeva od interesa. Na temelju dostupnih literaturnih podataka, može se očekivati ovaj redosljed eluiranja: (1) glicerol, (2) D-glukoza, (3) D-fruktoza, (4) GG, (5) saharoza i (6) glukoza-1-fosfat.
5. Bez obzira na dostupne podatke, svakako je potrebno eksperimentalno utvrditi i optimizirati ključne parametre HPAE-PAD metode kao i redosljed elucije spojeva koji sudjeluju u reakciji koju katalizira saharoza fosforilaza.

## 4. LITERATURA

Albertson P. L., Grof C. P. (2007) Application of high performance anion exchange-pulsed amperometric detection to measure the activity of key sucrose metabolising enzymes in sugarcane. *Journal of Chromatography B*, **845**(1): 151-156.

Bhagavan N., Ha C.-E. (2015) *Essentials of Medical Biochemistry*, 2.izd., Academic Press, str. 66.

Bolanča T., Ukić Š. (2013) *Ionska kromatografija*, Interna skripta; Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, str. 62-71.

Cantarel B. I., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. (2009) The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acid Research*, **37**: 233-238.

Cataldi T. R. I., Campa C., De Benedetto G. E. (2000) Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **368**(8): 739-758.

Corbier M., Schrag D., Raimondi S. (2014) Ion Exchange-High-Performance Liquid Chromatography (IEX-HPLC). U: *Monoclonal Antibodies*, 2. izd., Ossipow V., Fischer N., ur., *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, Humana Press. str. 501-506.

Corradini C., Cavazza A., Bignardi C. (2012) High-Performance Anion-Exchange Chromatography Coupled with Pulsed Electrochemical Detection as a Powerful Tool to Evaluate Carbohydrates of Food Interest: Principles and Applications. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, **2012**: 1-13.

Cummins P. M., Rochfort K. D., O'Connor B. F. (2017) *Ion-Exchange Chromatography: Basic Principles and Application*. U: *Protein Chromatography - Methods and Protocols*, 2. izd., Walls D., Loughran S., ur., Humana Press. str. 209-223.

Fallon A., Booth R., Bel L. (1987) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Applications of HPLC in Biochemistry*, Volume 17., 1. izd., Elsevier Science, str. 44.; 47.; 55.

Fournier P., de Ruffray P., Otten L. (1994) Natural instability of *Agrobacterium vitis* Ti plasmid due to unusual duplication of a 2.3-kb DNA fragment. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **7**(2): 164-172.

Franceus J., Desmet T. (2020) Sucrose Phosphorylase and Related Enzymes in Glycoside Hydrolase Family 13: Discovery, Application and Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, **21**(7): str. 1-19.

Gika H., Kaklamanos G., Manesiotis P., Theodoridis G. (2016) Chromatography: High-Performance Liquid Chromatography. U: Encyclopedia of Food and Health, 1. izd., Caballero B., Finglas P., Toldra F., ur., Elsevier Ltd. str. 93-99.

Gottschalk U. (2011) Overview of Downstream Processing in the Biomanufacturing Industry. U: Comprehensive Biotechnology, 3. izd., Moo - Young, M., ur., Elsevier B.V., str. 669-682.

Grembecka M., (2018) Sugar Alcohols. U: Encyclopedia of Analytical Science, 3. izd., Worsfold P., Townshend A., Poole C., Miro M., ur., Elsevier Inc. str. 1-10.

Hardy M., Rohrer J. (2007) High-pH Anion-Exchange Chromatography (HPAEC) and Pulsed Amperometric Detection (PAD) for Carbohydrate Analysis. U: Comprehensive Glycoscience: From Chemistry to Systems Biology, 1. izd., Kamerling H., ur., Elsevier Ltd. str. 303-327.

Harris T. K., Keshwani M. M. (2009) Measurement of Enzyme Activity. U: Methods in Enzymology; Guide to Protein Purification, 2. izd., Burgess R. R., Deutscher M. P., ur., Elsevier Inc. str. 57-71.

Houck M. M., Siegel J. A. (2015) Fundamentals of Forensic Science, 3. izd., Elsevier Ltd., str. 130.; 141.

Jia X., Kang J., Yin H. (2016) A simple and rapid method for measuring  $\alpha$ -D-phosphohexomutases activity by using anion-exchange chromatography coupled with an electrochemical detector. e1517 <https://doi.org/10.7717/peerj.1517>.

Kitao S., Nakano E. (1992) Cloning of the sucrose phosphorylase gene from *Leuconostoc mesenteroides* and its overexpression using a 'sleeper' bacteriophage vector. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **73**(3): 179-184.

Kopaciewicz W., Regnier F. E. (1983) Mobile phase selection for the high-performance ion-exchange chromatography of proteins. *Analytical Biochemistry*, **133**(1): 251-259.

Lambeth D. O., Muhonen W. W. (1994) High-performance liquid chromatography-based assays of enzyme activities. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, **656**(1): 143-157.

Linhard R. J., Bazin H. G. (2011) Properties of Carbohydrates. U: *Glycoscience: Chemistry and Chemical Biology I-III*, Fraser-Reid B., Tatsuta K., Thiem J., ur., Springer. str. 53-61.

Lorsch, J. R. (2014) Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part A, Volume 536, 1. izd., Academic Press. str.5

Luley-Goedl C., Sawangwan T., Mueller M., Schwarz A., Nidetzky B. (2010) Biocatalytic Process for Production of  $\alpha$ -Glucosylglycerol Using Sucrose Phosphorylase. *Food Technology and Biotechnology*, **48**(3): 276–283.

Meyer, V. R. (2005) Chromatography - Overview. U: *Encyclopedia of Analytical Science*, 2. izd., Worsfold P., Townshend A., Poole C., ur., Elsevier Ltd. str. 720-729.

Pace M., Mauri P., Pietta P., Agnellini D. (1989) High-performance liquid chromatography determination of enzyme activities in the presence of small amounts of product. *Analytical Biochemistry*, **176**(2): 437-439.

Roberts S. R., Gibb A. J. (2013) Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs. U: Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development, 1. izd., Ganellin R., Roberts S., Jefferis R., ur., Elsevier Ltd. str. 1-55.

Rocklin R. D. (1991) Detection in Ion Chromatography. *Journal of Chromatography*, **546**: 175-187.

Rohrer, J. (2013) Analysis of Carbohydrates by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD), Thermo Fisher Scientific, <<https://www.thermofisher.com/hr/en/home.html>>. Pristupljeno 22. ožujak 2021.

Rohrer, J. (2017) Eluent Preparation for High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection - Technical note 71, Thermo Fisher Scientific Inc., <<https://www.thermofisher.com/hr/en/home.html>>. Pristupljeno 10. svibnja 2021.

Russell R., Mukasa H., Shimamura A., Ferretti J. (1988) *Streptococcus mutans* gtfA gene specifies sucrose phosphorylase. *Infection and Immunity*, **56**(10): 2763-2765.

Schäfer, H., Läubli, M., Dörig, R. (2019) Ion Chromatography, Metrohm AG <<https://www.metrohm.com/en>>. Pristupljeno 19. svibnja 2021.

Schellinger A. P., Carr P. W. (2006) Isocratic and gradient elution chromatography: A comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *Journal of Chromatography A*, **1109**(2): 253-266.

Schiweck H., Bär A., Vogel R., Schwarz E., Kunz M. (2000) Sugar Alcohols. U: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5. izd., Gehartz W., Kellersohn G. S. T., Elvers B., Hawkins S., Winter U., ur., Verlag Chemie. str. 1-27.

Sprogøe D., Van Den Broek L. A. M., Mirza O., Kastrup J. S., Voragen A. G. J., Gajhede M., Skov L. K. 2004. Crystal Structure of Sucrose Phosphorylase from *Bifidobacterium adolescentis*. *Biochemistry*, **43**(5): 1156-1162.

Thermo Fisher Scientific Inc. (2013) Dionex CarboPac MA1 - Column Product Manual, <<https://www.thermofisher.com/hr/en/home.html>>. Pristupljeno 7. svibnja 2021.

Tzia C., Giannou V., Lebesi D., Chranioti C. (2012) Chemistry and Functional Properties of Carbohydrates and Sugars (Monosaccharides, Disaccharides, and Polysaccharides). U: Sweeteners: Nutritional Aspects, Applications and Production Technology, 1. izd., Varzakas T., Labropoulos A., Anestis S., ur., CRC Press. str. 11-44.

Wang, X., Fa Y., Le S., Duan Y., Huang H., Wang Z. (2015) Determination of Sucrose and Glucosylglycerol in Intracellular Extracts of Cyanobacteria by Anion Exchange Chromatography. *Advance Journal of Food Science and Technology*, **9**(11): 882-885.

Welling, G. W., Scheffer, A. J., Welling-Wester S. (1994) Determination of enzyme activity by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications*, **659**(1-2): 209-225.

Worsfold, P. J. (2005) Spectrophotometry. U: *Encyclopedia of Analytical Science*, 2. izd., Worsfold P., Townshend A., Poole C., ur., Elsevier Ltd. str. 318-321.

## Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

*Antonia Krsnik*

---

Antonia Krsnik