

Primjena analize osjetljivosti parametara na modelu kaskadne reakcije

Cvetić, Barbara

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:282574>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-03**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Cvetić

PRIMJENA ANALIZE OSJETLJIVOSTI PARAMETARA NA MODELU KASKADNE
REAKCIJE

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitne komisije:

Prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Doc. dr. sc. Martina Sudar

Prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2020.

SAŽETAK

Napredak kiralne tehnologije i sposobnost proizvodnje enantiomerno čistih spojeva imaju važan utjecaj na dizajn, istraživanje i razvoj lijekova. U ovome radu provedena je analiza osjetljivosti parametara na modelu kaskadne reakcije. Ispitivana kaskadna reakcija sastoji se od tri reakcijska koraka: *i.* otvaranje (*S*)-epoksida i (*R*)-epoksida cijanatnim ionima, *ii.* otvaranje (*S*)-epoksida i (*R*)-epoksida bromidnim ionima, *iii.* zatvaranje prstena dibromoalkohola. Prva dva stupnja provedena su u prisustvu enzima halogenhidrin-dehalogenaze. Analiza osjetljivosti parametara provedena je za model kinetičke rezolucije i dinamičke kinetičke rezolucije, odnosno proveden je niz simulacija matematičkog modela. Budući da je kod kinetičke rezolucije maksimalni prinos samo 50 % te da je dosta teško odvajanje optički aktivnog supstrata i produkta, simulacije su provedene i za model dinamičke kinetičke rezolucije, odnosno uz dodatak bromidnih iona. Dobiveni su grafički prikazi ovisnosti odstupanja optičke čistoće (*ee*) od nulte *ee* vrijednosti o vrijednosti pojedinog parametra. Utjecaj vrijednosti pojedinog parametra na *ee* pri kinetičkoj rezoluciji promatran je pri 48 %-tnoj konverziji supstrata, dok je pri dinamičkoj kinetičkoj rezoluciji promatran pri 100 %-tnoj konverziji supstrata. Svi ispitani kinetički parametri imaju utjecaj na promjenu odstupanja *ee* od nulte vrijednosti, neki u cijelom ispitivanom području, a neki samo u djelu ispitivanog područja.

Ključne riječi: kinetička rezolucija, dinamička kinetička rezolucija, matematičko modeliranje, halogenhidrin-dehalogenaza, epoksid, oksazolidinon, enzimska reakcijska kinetika, optička čistoća.

ABSTRACT

Advances in chiral technology and the ability to produce enantiomerically pure compounds have an important impact on drug design, research, and development. In this paper, the sensitivity analysis of the parameters on the cascade reaction model is performed. The investigated cascade reaction consists of three reaction steps: *i.* opening of (*S*)-epoxide and (*R*)-epoxide with cyanate ions, *ii.* opening of (*S*)-epoxide and (*R*)-epoxide with bromide ions, *iii.* closing the dibromoalcohol ring. The first two steps were performed in the presence of the enzyme halohydrin dehalogenase. The sensitivity analysis of the parameters was performed for the model of kinetic resolution and dynamic kinetic resolution, ie a series of simulations of the mathematical model were performed. Since the maximum yield at kinetic resolution is only 50 % and it is quite difficult to separate the optically active substrate and product, simulations were performed for the model of dynamic kinetic resolution, ie with the addition of bromide ions. Graphical representations of the dependence of the deviation of the optical purity (*ee*) from the zero *ee* value on the value of an individual parameter were obtained. The influence of the value of an individual parameter on *ee* at kinetic resolution was observed at 48 % substrate conversion, while at dynamic kinetic resolution it was observed at 100 % substrate conversion. All examined kinetic parameters have an influence on the change of the deviation *ee* from the zero value, some in the whole examined area, and some only in a part of the examined area.

Key words: kinetic resolution, dynamic kinetic resolution, mathematical modeling, halohydrin dehalogenase, epoxide, oxazolidinone, enzyme reaction kinetics, optical purity.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Kataliza i biokataliza	2
2.1.1. Biokataliza u industriji	3
2.1.2. Biokataliza u nevodenom mediju	3
2.2. Enzimi	4
2.2.1. Struktura enzima.....	4
2.2.2. Princip ključ-brava	5
2.2.3. Denaturacija i inaktivacija enzima	6
2.2.4. Klasifikacija enzima	7
2.2.5. Halogenhidrin-dehalogenaze	8
2.2.5.1. Struktura HDDH.....	8
2.2.5.2. Biokataliza s HDDH.....	9
2.3. Optički čiste tvari	10
2.3.1. Kiralnost.....	10
2.3.1.1. Kiralnost lijekova	10
2.3.1.2. Epoksidi.....	11
2.3.1.3. Oksazolidinoni.....	11
2.3.2. Dobivanje optički čistih tvari	12
2.3.2.1. Kinetička rezolucija.....	13
2.3.2.2. Dinamička kinetička rezolucija	14
2.4. Kaskadne reakcije.....	15
2.5. Modeliranje biotransformacija	16
2.5.1. Faktori koji utječu na brzinu enzimski katalizirane reakcije	17
2.5.1.1. Koncentracija supstrata	17
2.5.1.2. Temperatura.....	18
2.5.1.3. pH.....	18
2.5.2. Michaelis-Menteničina kinetika	19
2.5.2.1. Michaelis-Menteničina jednadžba	20
2.5.2.2. Važni zaključci kod Michaelis-Menteničine kinetike	20
2.5.3. Kotlasti reaktor	23
3. MATEMATIČKO MODELIRANJE	25

3.1.	Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije	25
3.1.1.	Kinetički model	26
3.1.2.	Reaktorski model.....	28
3.1.3.	Kinetički parametri za provedbu simulacija.....	29
3.2.	Obrada podataka.....	32
4.	REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1.	Analiza osjetljivosti parametara primijenjena na model kinetičke rezolucije	33
4.2.	Analiza osjetljivosti parametara primijenjena na model dinamičke kinetičke rezolucije	40
4.3.	Usporedba analize osjetljivosti kinetičkih parametara primijenjenih na modele KR i DKR	50
5.	ZAKLJUČAK	56
6.	POPIS SIMBOLA	58
7.	LITERATURA.....	59
8.	DODATAK	62
9.	ŽIVOTOPIS	64

Najprije se želim zahvaliti svojoj mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na svakom savjetu i pomoći tijekom izrade ovoga rada. Hvala Vam što ste davali odgovore na sva moja pitanja, bili strpljivi, pomagali mi i uvijek bili na raspolaganju. Vaš topao pristup i angažiranost davali su mi vjetar u leđa i poticali me da dam sve od sebe i da ne klonem duhom! Veliko hvala!

Hvala mag. ing. oecoiing. Neveni Milčić na savjetima prilikom početka pisanja ovoga rada. Žao mi je što zbog epidemiološke situacije, kao i potresa nismo uspjele raditi u laobradoriju.

Zahvaljujem se svojoj obitelji na razumijevanju i podršci tijekom studiranja. Hvala Vam što ste vjerovali u mene čak i onda kada ja to nisam. Hvala Vam što ste se veselili svakom mojem položenom kolokviju ili ispitu, ali isto tako bili uz mene i onda kada mi je bilo teško i kada sam poželjela odustati. Bez vas bi bilo puno teže doći do cilja.

Luka, hvala ti na tvom optimizmu, podršci i vjeri u mene.

Hvala Ti Bože što si uvijek uz mene i što si uslišao moje molitve.

1. UVOD

Kataliza je, prema definiciji, teorija o djelovanju katalizatora. Cilj je povećati brzinu kojom reakcija postiže ravnotežu. Budući da brzina reakcije ovisi o slobodnoj energiji aktivacije, katalizator uzrokuje smanjenje energetske barijere i ubrzava katalitički stupanj. Enzimi su molekule koje mogu smanjiti energiju aktivacije reakcije i na taj način ubrzati biokemijske reakcije koje se odvijaju u stanicama. Zbog toga funkcionalnost stanice i njezina reprodukcija zahtijevaju da se sve reakcije odvijaju u koordiniranoj i kontroliranoj sinergiji. Enzimi su stoga ključni za održavanje života (Saibi et al., 2012). Analiza osjetljivosti parametara provedena je na reakciji čija su prva dva stupnja katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom.

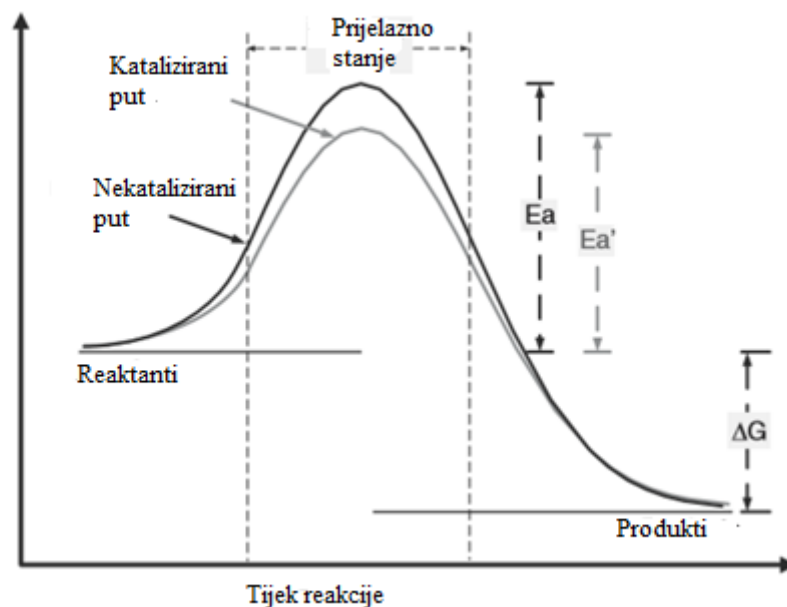
Enantioselektivnost koju halogenhidrin-dehalogenaze pokazuju prilikom kataliziranja reakcija zatvaranja prstena čini ih obećavajućim biokatalizatorima za proizvodnju optički aktivnih epoksida i β -supstituiranih alkohola kinetičkom rezolucijom (Janssen et al., 2006). Da bi prethodno navedena proizvodnja bila uspješna, najprije je potrebno razviti matematički model, kojim se onda proces može razumjeti, mijenjati, projektirati i voditi.

Modeliranje kao načelo reakcijskog inženjerstva ima značajnu ulogu u razvoju biokatalitičkih procesa i očekuje se da će rasti s primjenom biokatalize u industriji. Postoji puno radova koji opisuju modeliranje kinetike enzimski kataliziranih reakcija zasnovano na najjednostavnijem mehanizmu enzimске reakcije koji se sastoji od koraka vezanja i katalitičkog učinka. Najjednostavniji predloženi modeli su Michaelis-Menteničin za jedan ili dva supstrata. Svrha takvog istraživanja, posebno kada je enzim tek nedavno otkriven, je stjecanje znanja o mehanizmu reakcija i brzini reakcije te procjena kinetičkih parametara (Vasić-Rački et al., 2011).

2. OPĆI DIO

2.1. Kataliza i biokataliza

Mnoge kemijske reakcije odvijaju se spontano, no ipak ima i onih koje trebaju biti katalizirane kako bi se odvijale značajnom brzinom. Katalizatori su molekule koje smanjuju energijsku barijeru koju određena tvar mora dosegnuti da bi se kemijski pretvorila u drugu tvar (Illanes 2008).



Slika 2.1. Mehanizam katalize.

Kao što je prikazano na slici 2.1., katalizatori smanjuju energijsku barijeru zahvaljujući svojoj interakciji sa supstratom, čime se stvara aktivirani prijelazni kompleks koji daje produkt i oslobađa katalizator. E_a i E_a' su energije aktivacije katalizirane i nekatalizirane reakcije, a ΔG promjena slobodne energije reakcije. Katalizator se tijekom reakcije ne troši, niti ne mijenja, pa bi se u načelu mogao neograničeno koristiti u svrhu pretvorbe supstrata u produkt. U praksi je korištenje katalizatora ograničeno njegovom stabilnošću, odnosno njegovom sposobnošću da zadrži svoju aktivnu strukturu tijekom vremena, u uvjetima reakcije (Illanes 2008).

Biokemijske reakcije, odnosno kemijske reakcije koje se odvijaju u živim stanicama, moraju biti katalizirane kako bi se odvijale brzinom potrebnom za održavanje života.

Biokataliza se odnosi na upotrebu enzima kao procesnih katalizatora u uvjetima izvan stanice (*in vitro*) (Illanes 2008).

2.1.1. Biokataliza u industriji

Biokatalizatori se koriste u prehrambenoj industriji za proizvodnju aroma, mirisa i kontrolu teksture, boje, izgleda i hranjivih vrijednosti. Razvoj enzima za medicinsku primjenu je opsežan, a neki važni terapijski enzimi uključuju asparaginazu i glutaminazu za leukemiju, kolagenazu za čireve na koži, lizozim za antibiotike itd. Enzimi gušterače koriste se od 19. stoljeća za liječenje probavnih smetnji. Biokatalizatori igraju važnu ulogu u replikaciji i kloniranju DNA u molekularnoj biologiji, (npr. polimeraze koje se polimeriziraju, ograničavaju na rezanje lanca DNA te DNA ligaze za vezanje lanca DNA) (Kaushik et.al., 2014).

Kiralni spojevi imaju veliku važnost u organskoj sintezi, posebno u farmaceutskoj industriji, jer se uglavnom koriste kao gradivni blokovi složenijim i funkcionalnijim spojevima. Postoji nekoliko enantioselektivnih reakcija u kojima se biokatalizatori (enzimi) mogu upotrijebiti za proizvodnju kiralnih spojeva. Te enzimski katalizirane reakcije mogu se provesti ili uz pomoć čistih enzima, staničnih ekstrakata, cijelih permeabiliziranih stanica ili cijelih stanica koje sadrže unutarstanične enzime (Andrade 2015).

2.1.2. Biokataliza u nevodenom mediju

Enzimi su specifični katalizatori i djeluju u prirodnim vodenim otopinama, ali većina biotransformacija u industriji uključuje organske molekule netopive u vodi. Reakcijski uvjeti, koji su pogodni za kemijsku sintezu kao što su visoke temperature ili tlakovi, organska otapala itd., uglavnom su nepovoljni za enzime. Iako enzimi imaju aktivnost u organskom otapalu, njihova aktivnost je niža u usporedbi s onom u vodi. Proteinsko inženjerstvo i usmjerena evolucija pomogli su u razvoju enzima koji pokazuju poboljšanu aktivnost u organskim otapalima. Biokataliza u nevodenom mediju pronalazi primjenu u sintezi farmaceutskih prekursora i lijekova poput čistih enantiomera, pojedinačnih izomera, kiralnih molekula, biopolimera itd. Zbog velike topline isparavanja i visokog vrelišta, voda je najmanje poželjno otapalo za organske reakcije (Kaushik et.al., 2014).

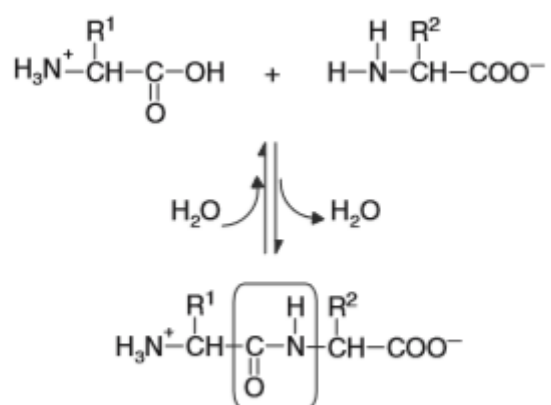
Neke novije tehnike uključuju fizičke i kemijske pristupe mutagenizi usmjerenoj na mjesto (*eng. site-directed mutagenesis*), liofilizaciju (zamrzavanje) i molekularne tehnike, a također primjenu ionskih kapljevinu kao otapala u biokatalitičkim reakcijama (Kaushik et. al., 2014).

2.2. Enzimi

Enzimi su molekule proteina koje su se razvile da bi učinkovito djelovale u blagim uvjetima potrebnim za očuvanje funkcionalnosti i integriteta bioloških sustava. Enzimi se stoga mogu smatrati katalizatorima optimiranim za obavljanje svojih fizioloških zadataka o kojima ovise svi oblici života. Prirodno su prilagođeni djelovanju u fiziološkim uvjetima (Illanes, 2008).

2.2.1. Struktura enzima

Enzimi su proteini sastavljeni od više aminokiselninskih ostataka čiji se broj kreće u rasponu od 100 do nekoliko stotina.

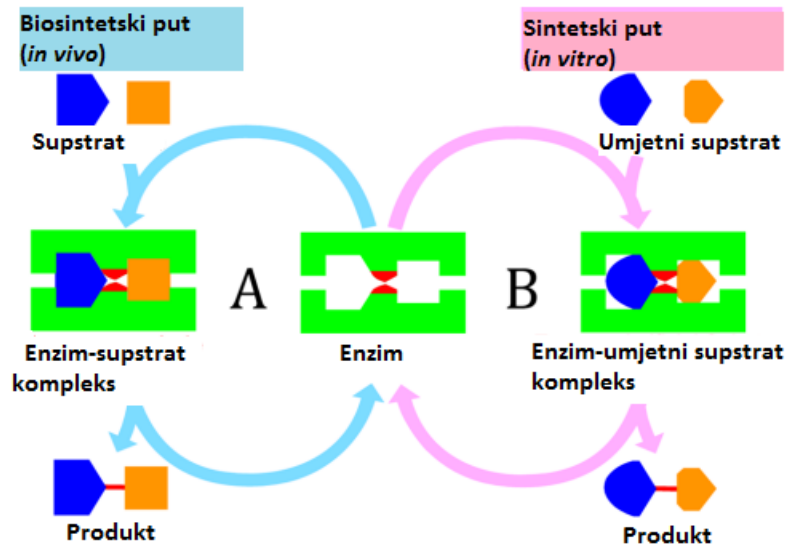


Slika 2.2. Nastajanje peptidne veze između dvije α -aminokiseline.

Aminokiseline se međusobno kovalentno vežu peptidnom vezom kao što je prikazano na slici 2.2. Peptidna veza formira se između ugljikova C-atoma karboksilne skupine i dušikova N-atoma α -amino skupine. Prema prirodni R-grupe, aminokiseline mogu biti nepolarne (hidrofobne) ili polarne (nabijene ili ne nabijene), a njihova raspodjela unutar proteinske molekule određuje njezino ponašanje. Većina karakteristika enzima kao katalizatora proizlazi upravo iz njihove molekularne strukture (Illanes, 2008).

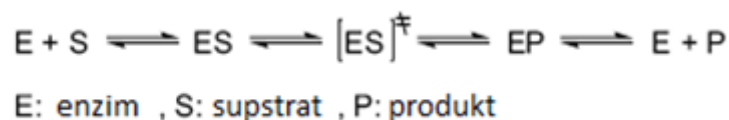
2.2.2. Princip ključ-brava

E. Fischer je 1894. predložio teoriju "ključ i brava", što predstavlja specifične odnose između enzima i supstrata.



Slika 2.3. Shematski izraz za teoriju "ključ i brava" za *in vivo* enzimske reakcije putem biosintetskog puta (ciklus A) i za *in vitro* enzimske reakcije putem nebiosintetskih putova (ciklus B) (Shoda et.al., 2016).

U reakciji *in vivo* (ciklus A, slika 2.3.), prirodni supstrat specifično prepoznaje enzim za stvaranje kompleksa enzim-supstrat. Nastajanje kompleksa uzrokovano je supramolekularnom interakcijom i aktivira supstrat koji dovodi do reakcijskog produkta sa savršenom kontrolom selektivnosti. U *in vitro* reakciji (ciklus B, slika 2.3.), enzim mora prepoznati umjetni supstrat kako bi se stvorio enzimski umjetni supstratni kompleks, a zatim se supstrat aktivira kako bi se reakcija nastavila. To dovodi do stvaranja proizvoda sa savršenim kontroliranjem selektivnosti reakcije (Shoda et.al., 2016).



Slika 2.4. Mehanizam enzimske reakcije *in vivo*.

Enzim (E) i supstrat (S) tvore kompleks (ES) kroz ključ – brava interakciju, koja aktivira supstrat čime se dolazi do prijelaznog stanja ($[ES]^\ddagger$) kako bi se reakcija nastavila. Aktivacijska energija uvelike se snižava djelovanjem enzima (Shoda et.al., 2016).

2.2.3. Denaturacija i inaktivacija enzima

Savršeno strukturirani prirodni enzim može izgubiti svoju biološku aktivnost tako da se njegova tercijarna struktura prevede u slučajni polipeptidni lanac u kojem aminokiseline smještene na aktivnom mjestu više neće biti dovoljno usklađene da bi mogle obavljati svoju katalitičku funkciju. Ovaj fenomen naziva se denaturacija i može biti reverzibilan ukoliko se utjecaj denaturacije ukloni prije nego dođe do kemijskih promjena u molekuli proteina. Molekula enzima također se može podvrgnuti kemijskim promjenama koje uzrokuju nepovratni gubitak aktivnosti. Ovaj fenomen naziva se inaktivacija i obično se javlja nakon razdvajanja. Ovi fenomeni određuju termodinamičku stabilnost (otpornost presavijenog proteina na denaturaciju) ili konformacijsku stabilnost (otpornost na nepovratnu inaktivaciju) (Illanes 2008).

2.2.4. Klasifikacija enzima

Prema Međunarodnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju (IUBMB), enzimi su klasificirani u šest glavnih klasa navedenih u tablici 2.1. (Kaushik et. al. 2014).

Tablica 2.1. Klase enzima, funkcije i primjeri.

Klasa enzima	Opis	Primjeri
Oksidoreduktaze	<p>Kataliziraju oksidacijske i redukcijske reakcije koje se događaju u stanici.</p> <p>Potrebni su im kofaktori poput nikotinamid adenin dinukleotida (NAD) i flavin adenina dinukleotida (FAD) u reakcijama.</p>	Dehidrogenaze, oksidaze, oksigenaze, peroksidaze
Transferaze	<p>Kataliziraju prijenos funkcionalnih skupina (npr. amino, metil, hidroksimetil, glikozil, acil, alkil, fosfat i sulfatne skupine) pomoću nukleofilne reakcije supstitucije.</p> <p>Koriste se u industriji za sintezu oligosaharida.</p>	Metiltransferaze, aminotransferaze, kinaze, fosforilaze
Hidrolaze	<p>Kataliziraju dodavanje vode supstratu (hidroliza).</p> <p>Koriste se u organskoj sintezi za proizvodnju intermedijera za lijekove i pesticide.</p>	Fosfataze, amidaze, proteaze, esteraze i lipaze
Liaze	<p>Cijepaju C-C, C-O, C-N, C-S i ostale veze uklanjanjem, ostavljajući dvostruke veze ili prstenove, ili obratno dodavanju skupina u dvostruke veze.</p> <p>Koriste se u staničnim procesima u organskoj sintezi, ciklusu limunske kiseline i proizvodnji cijanohidrina.</p>	Dekarboksilaze, aldolaze, sintaze
Ligaze	<p>Kataliziraju stvaranje veza između dvije molekule ili se one pridružuju dvjema molekulama.</p> <p>Važni su u određenim staničnim procesima, poput povezivanja nukleotida pri replikaciji DNA.</p>	Sintetaze, karboksilaze
Izomeraze	<p>Kataliziraju preuređivanje atoma unutar molekule kao što su racemizacija i epimerizacija.</p>	Racemaze i mutaze

2.2.5. Halogenhidrin-dehalogenaze

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su bakterijski enzimi koji kataliziraju pretvorbu vicinalnih halogenhidrina u njihove odgovarajuće epoksidge. Oni također mogu katalizirati kinetičku rezoluciju racemičnih epoksidge enantioselektivnim otvaranjem prstena, što pruža novu biokatalitičku strategiju za pripremu optički aktivnih spojeva. Enzim iz *Agrobacterium radiobacter AD1* (HheC) je najviše proučavana halogenhidrin-dehalogenaza. Određena je njegova kristalna struktura i katalitički mehanizam. (Janssen et.al., 2006).

2.2.5.1. Struktura HHDH

HHDH pripadaju u kratkolančane dehidrogenaze / reduktaze (SDR) s kojima dijele nekoliko strukturnih i mehaničkih karakteristika. HHDH su homotetrameri, formirani od para dimera, i posjeduju katalitičku trijadu sastavljenu od Ser-Tyr-Arg sličnu katalitičkoj trijadi Ser-Tyr-Lys mnogih SDR enzima. Umjesto mjesta vezanja nikotinamidnog kofaktora pronađenog u enzimima SDR, prostrani nukleofilni džep za vezanje nalazi se na odgovarajućem položaju u HHDH. Kristalne strukture HheA, HheA2, HheB i HheC imaju vrlo sličan strukturni nabor. Monomeri pokazuju tipičan Rossmannov nabor, nađen i kod drugih SDR enzima, koji se sastoji od šest ili sedam navoja paralelnog β -lista koji je okružen sa sedam ili osam α -heliksa (Slika 2.5.) (Schallmeyer 2016).

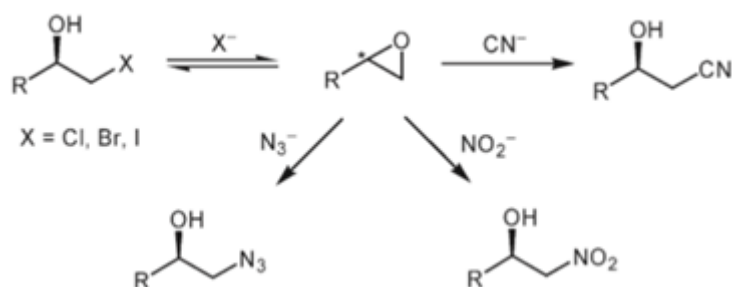


Slika 2.5. Struktura HHDH (Schallmeyer 2016).

2.2.5.2. Biokataliza s HHDH

Halohidriini se mogu smatrati izravnim prekursorima epoksida, budući da zatvaranje prstena katalizirano na bazi enantiomerno čistog halohidrina daje enantiomerno čisti epoksid. Halogenhidrin-dehalogenaze kataliziraju zatvaranje prstena vicinalnim halohidrinom i obrnutu reakciju, otvaranje epoksida u prstenu halogenidom (Lutje Spelberg et.al., 2002).

U reverznoj reakciji su osim halida za otvaranje prstena prihvaćeni i drugi negativno nabijeni nukleofili poput azida, cijanida ili nitrita (slika 2.6). Stoga, veze C-N C-C ili C-O mogu biti formirane uz pomoć halogenhidrin-dehalogenaza što ih čini atraktivnim biokatalizatorima za proizvodnju raznih β - supstituiranih alkohola (Schallmeyer et.al., 2016).



Slika 2.6. Reakcija otvaranja prstena katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom.

2.3. Optički čiste tvari

2.3.1. Kiralnost

Kiralnost je jednostavno geometrijsko svojstvo koje govori da je zrcalna transformacija objekta ne-identitetska operacija, tj. da se predmet i njegova zrcalna slika ne mogu preklopiti nikakvom translacijom ili rotacijom. Da bi se to moglo održati, objekt ne smije posjedovati bilo kakve obrnuto simetrijske elemente (tj. središta inverzijskih ili refleksnih ravnina). Kao rezultat toga, kiralni objekt može postojati u dva različita zrcala, ili enantiomerne forme. Svojstvo kiralnosti ima velik utjecaj u fizici, kemiji i biologiji, od narušavanja jednakosti za slabe sile, do korištenja isključivo jednog zrcalnog oblika aminokiselina u svim životnim oblicima na Zemlji. U organskim sustavima kiralnost općenito proizlazi od tetraedarskog ugljika, pod uvjetom da je prisutna dovoljna kompleksnost, npr. da su sve četiri grupe supstituentata različite. Apsolutna konfiguracija takvih kiralnih centara može biti označena *R* (lat. *rectus*) ili *S* (lat. *sinister*) kako je određeno pravilima Cahn – Ingold – Prelog (Raval, 2003).

Enantiomerni višak (*ee*), definiran jednadžbom 2.1, obično se koristi za kvantificiranje učinkovitosti asimetrične transformacije. Enantiomerni višak pokriva raspon od -100 % do +100 %; međutim, najčešće se prikazuje apsolutna vrijednost *ee*-a. Za kvantificiranje *ee*-a, enantiomeri se moraju odvojiti ili razlikovati. Upotreba kiralne okoline stvara dijastereomere koji su različiti u energiji, što omogućava diskriminaciju i kvantifikaciju enantiomera (Anslyn, 2012.)

$$ee = \left(\frac{[R]-[S]}{[R]+[S]} \right) \times 100 \quad (2.1)$$

2.3.1.1. Kiralnost lijekova

Kiralnost se pojavila kao ključno pitanje u dizajnu, otkriću i razvoju lijekova. Kiralne sklopke su lijekovi koji su već odobreni i za koje se tvrdi da su racemati, ali koji su preuređeni kao pojedinačni enantiomeri. Pitanje kiralnosti postalo je glavna tema u dizajniranju, otkrivanju i razvoju lijekova jer je razlikovanje stereoisomera značajna sastavnica u području farmaceutske industrije. Napredak kiralne tehnologije i sposobnost proizvodnje enantiomerno čistih spojeva imaju važan utjecaj na dizajn, istraživanje i razvoj lijekova te na strategije i politike farmaceutske industrije (Agranat, 1999).

2.3.1.2. Epoksidi

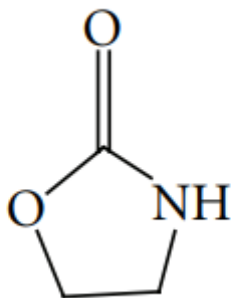
Epoksidi su atraktivni intermedijeri za proizvodnju kiralnih spojeva. Važne biokatalitičke reakcije koje uključuju epokside, uključuju kinetičku rezoluciju posredovanu epoksid hidrolazom, što dovodi do stvaranja diola i enantiočistih preostalih supstrata, te enantiokonvergentnu enzimsku hidrolizu, koja daje visoke prinose jednog enantiomera iz racemičnih smjesa. Epoksidi se također mogu pretvarati nehidrolitičkim enantioselektivnim otvaranjem prstena; korištenjem alternativnih anionskih nukleofila. Ove reakcije mogu biti katalizirane halogenhidrin-dehalogenazama. Sve nove mogućnosti za enantioselektivnu biokatalizu epoksida ukazuju na njihovu važnost u zelenoj kemiji (Janssen et.al., 2003).

2.3.1.3. Oksazolidinoni

Budući da se analiza osjetljivosti parametara u ovome radu provodi na reakciji u kojoj se dobivaju oksazolidinoni, oni će u nastavku biti pobliže opisani.

Oksazolidinoni su bakteriostatski antimikrobni lijekovi koji su inhibitori sinteze proteina. Kako djeluju u ranoj fazi sinteze proteina koja uključuje formiranje inicijalnog kompleksa 70S, ne čini se da postoji unakrsna rezistencija s drugim inhibitorima sinteze proteina. Postoje dva oksazolidinona odobrena od Američke agencije za hranu i lijekove (FDA - *Food and drug administration*), linezolid (izdan 2000.) i tedizolid (objavljen 2014.). Objavljeni su brojni opsežni pregledi oksazolidinona i posebno linezolida (Lowy 2017).

Oksazolidinoni su klasa azola, oksazolidina s ugljikom između dušika i kisika oksidiranih u keton (slika 2.7) (Pandit 2012).



Slika 2.7. Struktura oksazolidinona.

Oksazolidinoni se primarno koriste za liječenje bakterijskih infekcija uzrokovanih gram-pozitivnim bakterijama, uključujući stafilokoke, streptokoke i pneumokoke, iako se njihov spektar antibakterijske aktivnosti proteže izvan tih vrsta. Linezolid ima izvrsnu *in vitro* aktivnost protiv meticilina-osjetljivi i rezistentni stafilokoki s malo razlike u prosječnim minimalnim inhibicijskim koncentracijama. Linezolid je aktivan i protiv izolata *Staphylococcus aureus* koji su intermedijeri u osjetljivosti na glikopeptide (Lowy 2017).

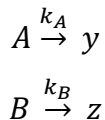
2.3.2. Dobivanje optički čistih tvari

Sve je veća potražnja za sintezom enantiočistih molekula kako bi se ograničili i / ili suzbili štetni učinci koji proizlaze iz upotrebe racemičnih smjesa. Ova tendencija je u skladu s ciljevima "zelene kemije", koja daje središnji naglasak na zaštitu zdravlja ljudi i okoliša dizajnom novih kemikalija i procesa. (Patti, 2011).

Enantiomerno čisti kiralni spojevi mogu se prirediti separacijskim ili sintetskim metodama. Sve metode razdvajanja enantiomera iz racemične smjese temelje se na činjenici da kiralne molekule u kiralnom okruženju iskazuju različita svojstva. Razdvajanje racemične smjese na komponente može se provesti kokristalizacijom s enantiomerno čistim reagensima (često prirodnog podrijetla) ili kromatografskim metodama s kiralnim nepokretnim fazama. Kiralne nepokretne faze sadržavaju enantiomerno čiste kiralne molekule koje na sebe vežu enantiomere iz smjese različitim afinitetima. Enantiomeri se razdvajaju na kromatografskoj koloni zbog različitog vremena zadržavanja na nepokretnoj fazi. Ograničenje navedenih metoda je njihovo iskorištenje, koje u idealnom slučaju iznosi maksimalnih 50 %, jer drugih 50 % čini drugi enantiomer (Šinko, 2005).

2.3.2.1. Kinetička rezolucija

Kinetička rezolucija predstavlja metodu separacije u kojoj se jedan od enantiomera (A) racemata (AB) lakše pretvara u proizvod od enantiomera (B):



$$E = \frac{k_A}{k_B} \quad (2.2)$$

Enantiomerni omjer (2.2), E , diktira učinkovitost kinetike enzimske rezolucije i opisuje ovisnost konverzije enantiomernog viška reaktanta, odnosno supstrata, (ee_R) i produkta (ee_P), u određenom stupnju pretvorbe (c), jednadžbama 2.3 i 2.4.

$$E = \ln[(1 - c)(1 - ee_R)] / \ln [(1 - c)(1 + ee_R)] \quad (2.3)$$

$$E = \ln[1 - c(1 + ee_P)] / \ln [1 - c(1 - ee_P)] \quad (2.4)$$

Posebnost kinetičke rezolucije (KR) je da se ee zaostalog supstrata povećava sa stupnjem pretvorbe, a uz samo skromnu selektivnost još je moguće oporabiti supstrat s visokim ee . Ukoliko se želi dobiti što čišći supstrat tada se produkt može izolirati, dok se supstrat podvrgava drugom koraku do konverzije 60 %, pri čemu je iskorištenje supstrata blizu konverziji od 50 %. Suprotno tome je da kada je E visok (cca. 50 % ili veći), produkt, ako je kiralan, istovremeno se dobiva s visokom ee , odnosno enantiomerni višak produkta se smanjuje. Visoko enantioselektivne reakcije iz kojih se mogu dobiti produkti enantiomerne čistoće > 99 % posjeduju vrijednosti $E > 200$. Za praktičnu uporabu enantiomerni omjeri manji od 15 nisu povoljni, dok su vrijednosti 15 – 30 srednje povoljne. Vrijednosti iznad 30 smatraju se vrlo pogodnima i poželjnima.

Kinetička rezolucija može se provesti kemijskim ili enzimskim metodama. U prvom slučaju reakcija može biti katalitička ili stehiometrijska; s ekonomskog stajališta preferira se kataliza. (Crosby, 1991.)

2.3.2.2. Dinamička kinetička rezolucija

Kinetička rezolucija racemičnih smjesa kiralnih spojeva je korisna metoda za dobivanje enantiomerno čistih spojeva, ali postoji nedostatak, a to je maksimalni prinos samo 50 % polaznog spoja te je potrebno naporno odvajanje optički aktivnog supstrata i proizvoda. Ovo se ograničenje može prevladati postupkom dinamičke kinetičke rezolucije (DKR), u kojem se jedan enantiomer racemizira tijekom pretvorbe. Ovaj postupak teoretski može rezultirati jednim enantiomerom produkta sa 100 % prinosa (Crosby, 1991).

Kvantitativna transformacija enantiomernih smjesa u enantiočiste proizvode je izazovan zadatak asimetrične sinteze. Metoda koja se može primijeniti za deracemizaciju je upravo DKR. DKR se temelji na kinetičkoj rezoluciji (KR) u kombinaciji s *in situ* racemizacijom sporije reagirajućeg enantiomera supstrata. Epibromohidrin je utvrđen kao najprikladniji supstrat za postizanje DKR-a u odnosu na druge epihalohidrine. Otvaranje prstena azidom, cijanidom i nitritom stvara β -supstituirane alkohole, a reakcija s cijanatnim ionom (OCN^-) odvija se preko izocijanat-cijanatnih vrsta koje prolaze brzu ciklizaciju čime se kao krajnji produkt dobiva 2-oksazolidinon. Ova reakcija je izrazito regioselektivna, bez vidljivih nusprodukata i stoga može poslužiti kao atraktivna metoda za proizvodnju kiralnih oksazolidinona. DKR epibromohidrina izveden u optimiranim reakcijskim uvjetima na analitičkoj skali pri čemu je dobiven (*S*)-1-azido-3-bromo-2-propanol s $> 99\%$ *ee* i 77 %-tnom konverzijom. U prethodnim studijama opažena je HheC - katalizirana enantioselektivna pretvorba epoksida u visoko enantio obogaćen (*S*)-2-oksazolidinon. Konverzija epoksida brzo se kretala do 50 %, ali nakon toga drastično je usporila. (*S*)-oksazolidinon je izoliran s prinosom od 47 % i 98 % *ee* kada je epoksid (0,5 g, 100 mM) reagirao s NaOCN (1 mol ekviv.) u prisutnosti pročišćenog HheC-a. Pod tim je uvjetima reakcija imala karakter KR, a ne DKR, a dodavanje bromidnih iona bilo je potrebno da bi se povećala brzina racemizacije u odnosu na brzinu otvaranja prstena. Već pri koncentraciji NaBr od 10 mM DKR racemata rezultirala je 100 %-tnom konverzijom uz izvrsnu *ee* (Mikleušević et.al., 2015.).

2.4. Kaskadne reakcije

Kaskadna ili domino reakcija je kemijska transformacija u kojoj se niz reakcija (najmanje dvije) odvija uzastopno u istom reakcijskom sustavu, a produkt jednog reakcijskog koraka supstrat je za sljedeći korak uzastopne reakcije. One su ekonomski bolji izbor za sintezu u više koraka, jer povećavaju efikasnost sintetske strategije i izbjegavaju brojna pročišćavanja i reakcijske preradbe koje u suprotnom mogu umanjiti iskorištenje reakcije. Stoga nije iznenađujuće da je njihov razvoj u posljednjih nekoliko godina doživio veliki napredak (Kumar et.al., 2019).

Kombinacijom različitih koraka enzimske reakcije u jednom reaktoru i analogno biokatalizi koja se odvija u prirodi, obrada intermedijera se izostavlja i ravnotežna reakcija se može pomaknuti prema željenom produktu što dovodi do poboljšane učinkovitosti procesa i smanjenih troškova. Na području HHDH-katalize, kaskadni princip se počeo primjenjivati vrlo rano kombinirajući HheC s epoksid hidrolazom za sintezu optički aktivnih halohidrina, epoksida i diola (Schallmeyer et.al., 2016).

Kaskadne reakcije oponašaju stanične metaboličke puteve, a prednost pristupa *in vitro* je mogućnost upotrebe supstrata i enzima koji u prirodi ne moraju nužno postojati. Kaskadne reakcije nude brojne prednosti nad tradicionalnim kemijskim postupcima, poput pojednostavljenja naknadnih procesa obrade bez izolacije međuprodukata, jednostavnijih i ekonomski isplativijih reaktorskih sustava koji se sastoje od samo jednog reaktora, blagih i kontroliranih reakcijskih uvjeta, manje potrošnje kemikalija i smanjenog ukupnog utjecaja na okoliš. Kako bi bile konkurentne kemijskoj sintezi, kaskadne reakcije trebaju biti učinkovite i robustne, te bi bilo idealno da se provode *in vitro* u jednom reaktoru. (Milčić et.al., 2019).

2.5. Modeliranje biotransformacija

Modeliranje i simulacija biotransformacija ima velik potencijal u potrazi za optimalnim uvjetima procesa, razvoju i dizajnu procesa, kontroli, širenju, određivanju strukture troškova procesa i usporedbi alternativa procesa. Oni dovode do boljeg razumijevanja i kvantifikacije ispitivanog procesa i mogu dovesti do značajnih ušteda materijala i troškova, posebno u ranim fazama razvoja procesa (Vrsalović Presečki et. al., 2006).

Biotransformacije su kemijski dobro definirane enzimski katalizirane reakcije u kojima se čiste tvari, odnosno reaktanti, pretvaraju u strukturno manje ili više slične produkte. Te su reakcije katalizirane ili čistim enzimima (enzimske biotransformacije) ili enzimima u cijelim stanicama mikroorganizama (mikrobne biotransformacije). Bitna razlika između mikrobne biotransformacije i enzimске biotransformacije je u broju reakcijskih koraka. Postoji nekoliko katalitičkih koraka između supstrata i proizvoda u mikrobnoj biotransformaciji, dok u enzimskoj biotransformaciji postoje samo jedan ili dva koraka. Razlika je i u tome što kod enzimске biotransformacije kemijska struktura supstrata i produkta nalikuju jedna drugoj, ali ne nužno i u mikrobnoj biotransformaciji. Nadalje, mikrobna biotransformacija trebala bi se odnositi na sva specifična svojstva i zahtjeve mikrobne biomase (Vrsalović Presečki et. al., 2006).

Pored toga, rane faze razvoja procesa ključne su za utvrđivanje nastalih troškova proizvodnje i opterećenja okoliša nastalih kada započne proizvodnja.

Informacije prikupljene pomoću simulacija modela namijenjene su odlučivanju, donošenju zaključaka za automatske kontrolne radnje bioloških stanja ili pokretanju određenih aktivnosti u eksperimentima, proizvodnji ili regulaciji (Vrsalović Presečki et. al., 2006).

Model potreban za određeni proces obično nije izravno dostupan, a njegov je razvoj naporna i skupa faza u čitavom postupku razvoja i optimizacije. Modeliranje procesa biotransformacije temelji se na poznavanju bilance tvari, prijenosa tvari i reakcijske kinetike dobivenih temeljitim biokemijskim studijama. Nakon odabira odgovarajuće strukture modela, potrebno je pronaći jedinstven skup odgovarajućih parametara modela (koji se moraju procijeniti iz eksperimentalnih podataka) (Vrsalović Presečki et. al., 2006).

Pri matematičkom modeliranju procesa biotransformacije formulirane su jednačbe koje uključuju Michaelis-Menteničinu kinetiku, a koje su često modificirane odražavajući inhibiciju produkta i / ili supstrata. Modeliranje kinetike enzimske reakcije kao alata za enzimsko reakcijsko inženjerstvo igra važnu ulogu u razvoju reakcije katalizirane enzimima za (*large scale*) proizvodnju na visokom nivou.

Modeliranje kinetike enzimske reakcije i reaktora može se upotrijebiti za pronalaženje optimalnih radnih točaka i za povećanje znanja o procesu i olakšavanje identifikacije najučinkovitijeg načina rada reaktora. Za dizajn enzimskog reaktora neophodno je detaljno poznavanje kinetičkih parametara katalizatora u radnim uvjetima (Vrsalović Presečki et. al., 2006).

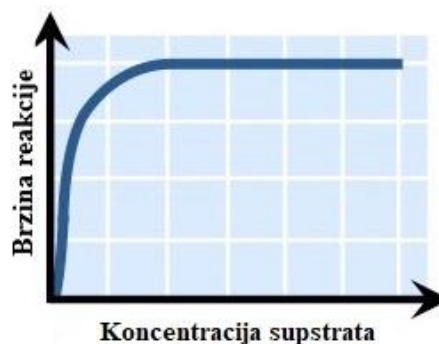
2.5.1. Faktori koji utječu na brzinu enzimski katalizirane reakcije

Enzimi mogu biti izolirani iz stanica i njihova svojstva se ispituju *in vitro*. Različiti enzimi daju različite odgovore na promjene koncentracije supstrata, temperature i pH. U nastavku će biti opisani faktori koji utječu na brzinu enzimskih reakcija (Champe, 2005).

2.5.1.1. Koncentracija supstrata

- **Maksimalna brzina reakcije**

Brzina reakcije (r) je broj molekula supstrata pretvorenih u produkt po jedinici vremena. Brzina je obično izražena kao $\mu\text{mol L}^{-1} \text{min}^{-1}$, te se povećava dok se ne postigne maksimalna brzina V_m (slika 2.8).



Slika 2.8. Utjecaj koncentracije supstrata na brzinu reakcije.

Većina enzima prati Michaelis-Menteničinu kinetiku gdje je ovisnost početne reakcijske brzine (r_o) o koncentraciji supstrata [S] hiperbolična. Suprotno tome alosterički enzimi daju krivulju sigmoidalnog oblika (Champe, 2005).

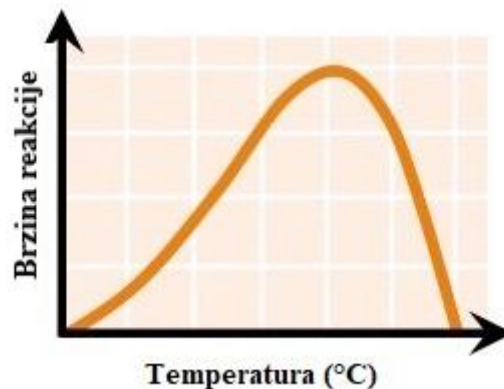
2.5.1.2. Temperatura

- **Povećanje brzine reakcije s temperaturom**

Brzina reakcije povećava se sve dok ne dosegne V_m . Ovo povećanje rezultat je povećanog broja molekula koje imaju dovoljno energije da savladaju energijsku barijeru i daju produkte u reakciji (Champe, 2005).

- **Smanjenje brzine reakcije s povećanjem temperature**

Daljnje povišenje temperature rezultira smanjenjem brzine reakcije koja je rezultat temperaturno inducirane denaturacije enzima (slika 2.9).



Slika 2.9. Utjecaj temperature na enzimski kataliziranu reakciju.

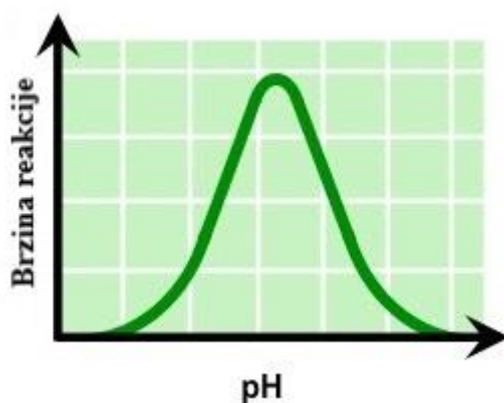
2.5.1.3. pH

- **Utjecaj pH na ionizaciju aktivnog mjesta**

Koncentracija H^+ iona utječe na brzinu reakcije. Katalitički proces zahtjeva da enzim i supstrat sadrže specifične kemijske grupe u ioniziranom ili neioniziranom obliku da bi mogli reagirati. Pri alkalnom pH ta grupa je deprotonirana, pa se brzina reakcije stoga smanjuje (Champe, 2005).

▪ **utjecaj pH na denaturaciju enzima**

Ekstremne pH-vrijednosti mogu također dovesti do denaturacije enzima jer struktura katalitički aktivne molekule proteina ovisi o ionskom karakteru bočnih lanaca aminokiselina. pH kod kojeg je postignuta maksimalna aktivnost enzima ovisi o vrsti enzima i često odražava $[H^+]$ na kojoj enzim funkcionira u tijelu (slika 2.10). Primjerice, pepsin, probavni enzim u želucu, postiže maksimalnu aktivnost pri pH 2, dok su drugi enzimi, koji djeluju pri neutralnom pH, denaturirani zbog kisele okoline (Champe, 2005).



Slika 2.10. Utjecaj pH na enzimski kataliziranu reakciju.

2.5.2. Michaelis-Menteničina kinetika

Michaelis i Menten predložili su model koji obuhvaća većinu značajki enzimski kataliziranih reakcija. U ovom modelu, enzim se reverzibilno kombinira sa supstratom, stvarajući ES kompleks koji se nakon toga raspada do produkta, pri čemu se slobodni enzim regenerira. Model koji uključuje jednu molekulu supstrata prikazan je jednačbom (2.5).



gdje je: S supstrat, E enzim, ES enzim-supstrat kompleks, P produkt, k_1 , k_{-1} i k_2 su konstante brzina.

2.5.2.1. Michaelis-Menteničina jednadžba

Michaelis-Menteničina jednadžba opisuje kako brzina reakcije varira u ovisnosti o koncentraciji supstrata što je dano formulom (2.6):

$$r_0 = \frac{V_m \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.6.)$$

gdje su: r_0 početna brzina reakcije, V_m maksimalna brzina, K_m Michaelisova konstanta = $(k_{-1} + k_2)/k_1$, $[S]$ koncentracija supstrata.

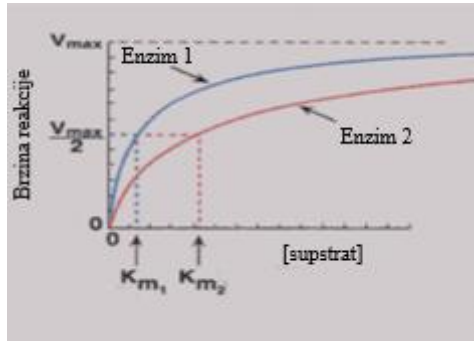
Michaelis-Menteničina kinetika je izvedena uz sljedeće pretpostavke (Champe, 2005):

1. Relativne koncentracije E i S : koncentracija supstrata $[S]$ je puno veća od koncentracije enzima, pa je postotak ukupno vezanog supstrata na enzimu u bilo kojem vremenu mali.
2. Stacionarno stanje: $[ES]$ se ne mijenja tijekom vremena (u stacionarnom stanju), što znači da je brzina stvaranja ES jednaka brzini raspada ES (u $E + S$ i $E + P$). Općenito, za intermedijer u nizu reakcija kaže se da je u stacionarnom stanju kada je brzina njegove sinteze jednaka brzini regeneracije.
3. Početna brzina: jedino početne brzine (r_0) se koriste u analizama enzimskih reakcija. To znači da se brzina reakcije mjeri čim se enzim i supstrat pomiješaju. U tom trenutku koncentracija produkta je vrlo mala, pa se brzina povratne reakcije, odnosno reakcije od P do S može zanemariti (Champe, 2005).

2.5.2.2. Važni zaključci kod Michaelis-Menteničine kinetike

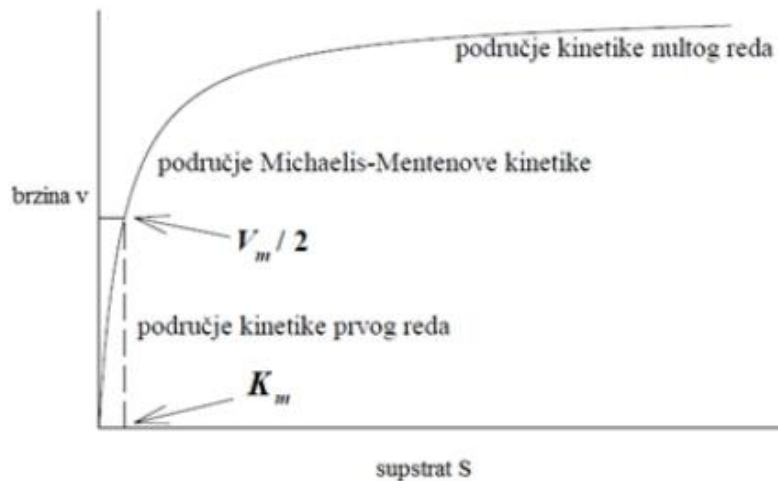
- K_m – Michaelisova konstanta je karakteristika enzima i njegovog specifičnog supstrata, te odražava afinitet enzima prema tom supstratu. K_m je numerički jednaka koncentraciji supstrata u kojoj je brzina reakcije jednaka $\frac{1}{2} V_m$. K_m ne varira s koncentracijom enzima (Champe, 2005).

- a) Mala vrijednost K_m : Numerički mala vrijednost K_m odražava veliki afinitet enzima prema supstratu jer je potrebna mala koncentracija supstrata da bi se enzim napola zasatio. Time se dostiže brzina $\frac{1}{2} V_m$. (slika 2.11).



Slika 2.11. Utjecaj koncentracije supstrata na brzinu reakcije za dva enzima; (enzim 1 s malom K_m vrijednosti i enzim 2 s velikom K_m vrijednosti) (Campe 2005).

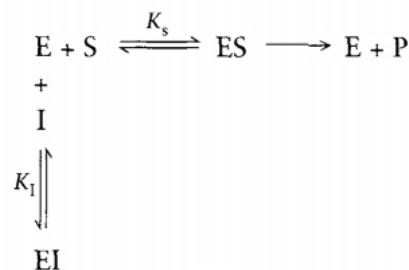
- b) Velika vrijednost K_m : Numerički visoka vrijednost K_m odražava niski afinitet enzima prema supstratu jer je potrebna visoka koncentracija supstrata da bi se enzim napola zasatio.
- **Veza između brzine reakcije i koncentracije enzima:** Brzina reakcije je izravno proporcionalna koncentraciji enzima pri svim koncentracijama supstrata. Primjerice, ukoliko je koncentracija enzima u pola smanjena, početna brzina reakcije (r_o) isto kao i V_m su smanjene na pola od početnih.
 - **Red reakcije:** kada je $[S]$ je puno manja od K_m , brzina reakcije je približno proporcionalna koncentraciji supstrata. Za brzinu reakcije se tada kaže da je prvog reda s obzirom na supstrat. Kada je $[S]$ puno veća od K_m brzina je konstantna i jednaka V_m . Brzina reakcije tada je neovisna o koncentraciji supstrata i kaže se da je to reakcija nultog reda s obzirom na supstrat (slika 2.12) (Champe, 2005).



Slika 2.12. Utjecaj koncentracije supstrata na brzinu enzimski katalizirane reakcije.

Aktivnost enzima može se reverzibilno ili nepovratno modulirati inhibitorima i inaktivatorima. Kinetika inhibicije i / ili inaktivacije daje vrijedan uvid u prirodu esencijalnih i / ili katalitičkih ostataka kao i mehanizam enzimске katalize. Reverzibilna inhibicija je pojava u kojoj se nekovalentno vezanje inhibitora izravno ili indirektno natječe sa supstratom i modulira aktivnost enzima. (Eun, 1996).

Kompetitivnu inhibiciju obično uzrokuju tvari koje su strukturno slične supstratu pa se žele vezati na istom mjestu kao i supstrat. Time nastaje ili enzim – supstrat kompleks (ES) ili kompleks enzim-inhibitora enzima (EI), ali ne i ternarni kompleks (EIS) (slika 2.13). Michaelis-Menteničin izraz za ovu vrstu inhibicije prikazan je jednadžbom 2.7. Ovu vrstu inhibicije može se u potpunosti prevladati visokim koncentracijama supstrata i na taj način ne utječe na brzinu reakcije (Eun, 1996).

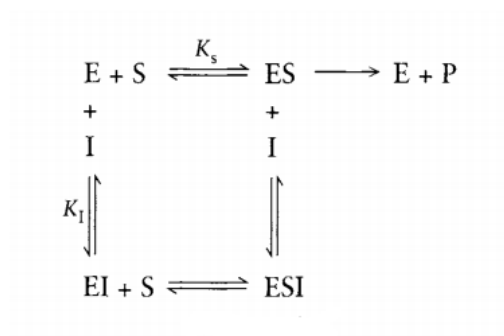


Slika 2.13. Shematski prikaz kompetitivne inhibicije.

$$r_s = \frac{v_m \cdot c_s}{K_m \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s} \quad (2.7)$$

pri čemu je c_i [mmol dm⁻³] koncentracija inhibitora, a K_i [mmol dm⁻³] konstanta inhibicije.

Kod **nekompetitivne inhibicije**, mjesto vezivanja inhibitora na enzimu odvojeno je od mjesta za supstrat. Stoga se nekompetitivni inhibitor može jednako dobro vezati s enzimom koji daje EI ili s njegovim enzim-supstrat kompleksom koji daju ESI (slika 2.14). Michaelis-Menteničin izraz za ovu vrstu inhibicije prikazan je jednadžbom 2.8.



Slika 2.14. Shematski prikaz nekompetitivne inhibicije.

$$r_s = \frac{v_m \cdot c_s}{K_m + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.8)$$

Ovu vrstu inhibicije, koja je vrlo slična s multi-supstratnim enzimima, ne može se u potpunosti prevladati s visokim koncentracijama supstrata. Stoga ne utječe na K_m , ali smanjuje brzinu reakcije (Eun, 1996).

Određene se tvari vežu samo s kompleksom enzima i supstrata, ali ne i sa slobodnim enzimom, što uzrokuje antikompetitivnu inhibiciju koju opisuje jednadžba 2.9 (Eun, 1996).

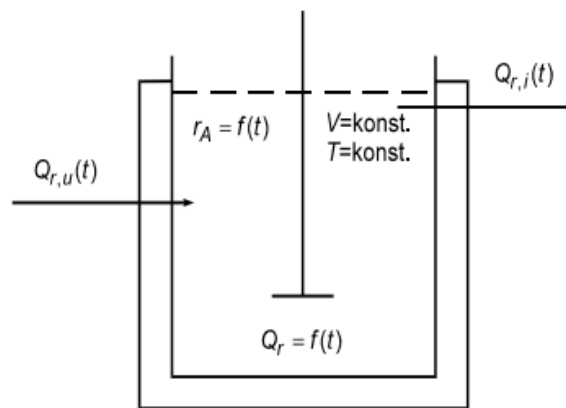
$$r_s = \frac{v_m \cdot c_s}{(K_m + c_s) \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.9)$$

2.5.3. Kotlasti reaktor

Sa stajališta kemijskog inženjerstva kao tehničke znanosti, kemijski reaktor je procesni uređaj u kome se svrhovito odigrava i vodi kemijska reakcija u cilju dobivanja određenog korisnog produkta. Kemijski reaktor je polazna osnova u dimenzioniranju i projektiranju određenog kemijskog procesa te predstavlja središte svakog tehnološkog procesa.

Svi procesi, bilo kemijski, bilo fizikalni, koji se odigravaju unutar reaktora ili kojima reaktor izmjenjuje masu i energiju s okolinom čine kemijsko reakcijsko inženjerstvo (Kosar, 2017).

Sa stajališta razumijevanja procesa i rada reaktora uopće, uobičajeno je započeti s najjednostavnijim reaktorskim sustavima koji, vrlo dobro ukazuju na bitne značajke rada reaktora i koji se kasnije mogu nadograditi složenijim pretpostavkama. Zbog toga definirana su tri osnovna tipa idealnih reaktora – kotlasti (slika 2.15), cijevni i protočno-kotlasti reaktor (Kosar 2017).



Slika 2.15. Prikaz idealnog kotlastog reaktora.

Promjena koncentracije s vremenom u kotlastom reaktoru opisana je jednadžbom:

$$r_A = -\frac{dc_A}{dt} \quad (2.10)$$

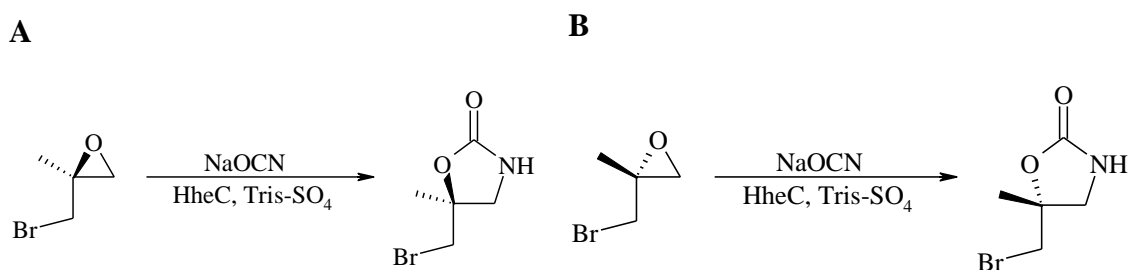
Kotlasti reaktor je zatvoreni sustav što znači da se za vrijeme reakcije s okolinom ne razmjenjuje reakcijska masa. U reaktoru se ostvaruje približno idealno miješanje, što znači da su vrijednosti svih parametara približno iste u bilo kojoj točki reaktorskog prostora. Po prirodi stvari, zbog kemijske reakcije koja je vremenski proces, kotlasti reaktor je uvijek u nestacionarnom radu. Kotlasti reaktor se često koristi u industriji, uglavnom za reakcije u kapljevitoj fazi, za proizvodnju manjih količina produkata na umjerenim tlakovima i temperaturama. Obično je konstruktivno izveden u obliku kotla s miješalom i plaštom za grijanje ili hlađenje. Osim naziva kotlasti reaktor koriste se i izrazi šaržni reaktor ili eng. *batch reactor* (Kosar, 2017).

3. MATEMATIČKO MODELIRANJE

3.1. Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije

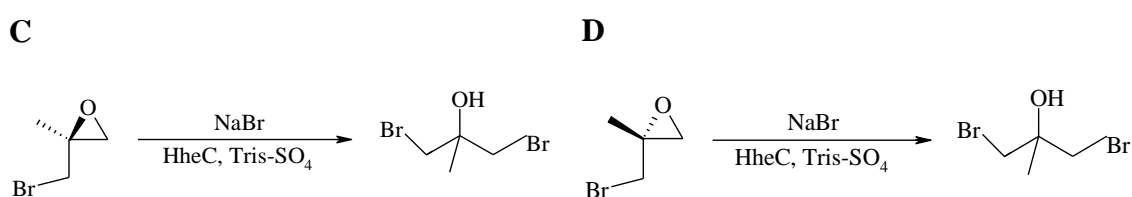
U svrhu razvoja matematičkog modela sustav dinamičke kinetičke rezolucije (DKR) podijeljen je na tri reakcijska koraka:

- i.* otvaranje (*S*)-epoksida i (*R*)-epoksida cijanatnim ionom (slika 3.1)
- ii.* otvaranje (*S*)-epoksida i (*R*)-epoksida bromidnim ionima (slika 3.2)
- iii.* zatvaranje prstena dibromoalkohola (slika 3.3).



Slika 3.1. Prvi reakcijski korak; otvaranje **A** (*S*)-epoksida i **B** (*R*)-epoksida cijanatnim ionom (OCN^-).

U prvom reakcijskom koraku (slika 3.1) reakcijom 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona, odnosno otvaranjem epoksidnog prstena cijanatnim ionom, nastaje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on.

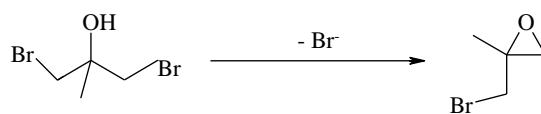


Slika 3.2. Drugi reakcijski korak; otvaranje **C** (*S*)-epoksida i **D** (*R*)-epoksida bromidnim ionima (Br^-).

U drugom reakcijskom koraku (slika 3.2) dolazi do otvaranja prstena 2-bromometil-2-metil-2-oksirana pomoću bromidnih iona pri čemu nastaje 1,3-dibromo-2-metil-2-propanol.

Enzim je različito selektivan prema ova četiri slučaja (A, B, C, D) i iz toga razloga je dobivena enantiomerna čistoća, što će biti bolje opisano kasnije.

E



Slika 3.3. Treći reakcijski korak; zatvaranje prstena dibromoalkohola.

U trećem reakcijskom koraku (slika 3.3) izdvajanjem protona i bromidnog iona iz 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola nastaje *rac*-2-bromometil-2-metil-oksiran.

3.1.1. Kinetički model

Reakcijom 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona uz prisustvo enzima HheC nastaje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on kao što je prikazano na slici 3.1.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_{(S)\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{NaOCN}} \cdot \gamma_{\text{HheC}}}{\left(\left(K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}} \cdot \left(1 + \frac{c_{(R)\text{-epoksid}}}{K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}} \right) + c_{(S)\text{-epoksid}} + \frac{c_{(S)\text{-epoksid}}^2}{K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}} \right) \cdot \left(c_{\text{NaOCN}} + K_{m1}^{\text{NaOCN}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NaBr}}}{K_{i1}^{\text{NaBr}}} \right) \right) \right)} \quad (3.1)$$

$$r_2 = \frac{k_2 \cdot c_{(R)\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{NaOCN}} \cdot \gamma_{\text{HheC}}}{\left(\left(K_{m2}^{\text{NaOCN}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NaBr}}}{K_{i2}^{\text{NaBr}}} \right) + c_{\text{NaOCN}} \right) \left(1 + \frac{c_{(S)\text{-epoksid}}}{K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}} \right) \right)} \quad (3.2)$$

Otvaranje prstena (*S*)-epoksida uz prisustvo cijanatnog iona i nastajanje (*S*)-oksazolidinona (slika 3.1 A) opisano je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom. Ovdje su uz inhibiciju supstratom (*S*)-epoksidom uočljive i dvije kompetitivne inhibicije; budući da su molekule (*R*)-epoksida strukturno slične molekulama (*S*)-epoksida, one djeluju kao kompetitivni inhibitori enzima ($K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$). Druga kompetitivna inhibicija je inhibicija bromidnim ionom (K_{i1}^{NaBr}) s obzirom na to da je on strukturno sličan cijanatnom ionu (3.1).

Nastajanje (*R*)-oksazolidinona (slika 3.1 B) također je opisano dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom, te je ovdje u slučaju (*R*)-epoksida vidljiva inhibicija sa suprotnim epoksidom ($K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$) i inhibicija bromidnim ionom kao supstratom (K_{i2}^{NaBr}). (3.2).

Prema kinetičkim jednadžbama 3.1 i 3.2 visoke koncentracije supstrata nisu povoljna opcija za kinetičku rezoluciju, jer bi u protivnom (*S*)-epoksid inhibirao reakciju (*S*)-epoksidom, a (*R*)-epoksid bi povećavao brzinu zapravo neželjene reakcije.

$$r_3 = \frac{k_3 \cdot c_{(S)\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{NaBr}} \cdot \gamma_{\text{HheC}}}{\left(\left(K_{m3}^{\text{NaBr}} + c_{\text{NaBr}} \right) \cdot \left(1 + \frac{c_{(R)\text{-epoksid}}}{K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}}} \right) \right)} \quad (3.3)$$

$$r_4 = \frac{k_4 \cdot c_{(R)\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{NaBr}} \cdot \gamma_{\text{HheC}}}{\left(\left(K_{m4}^{\text{NaBr}} + c_{\text{NaBr}} \right) \cdot \left(1 + \frac{c_{(S)\text{-epoksid}}}{K_{i4}^{(S)\text{-epoksid}}} \right) \right)} \quad (3.4)$$

U sljedećem stupnju odvija se reakcija nastajanja 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola iz 2-bromometil-2-metil-oksirana i bromidnog iona uz prisustvo enzima HheC (slika 3.2), odnosno reakcija kojom nastaje dibromoalkohol reakcijom bromidnih iona i epoksida. Kod reakcije otvaranja (*S*)-epoksida prisutna je inhibicija suprotnim enantiomerom (*R*)-epoksidom ($K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}}$) (3.3), a u slučaju reakcije otvaranja (*R*)-epoksida prisutna je inhibicija (*S*)-epoksidom ($K_{i4}^{(S)\text{-epoksid}}$) (3.4). Prema jednadžbama 3.3 i 3.4 je vidljivo da (*R*)- i (*S*)-epoksidi slijede dvosupstratnu Michaelis-Menteničinu kinetiku koja je u odnosu na jedan supstrat kinetika prvog reda. V_m ni K_m ne možemo mjeriti zbog nemogućnosti dobivanja eksperimentalnih podataka u laboratoriju.

$$r_5 = k_5 \cdot c_{\text{dibromoalkohol}} \quad (3.5)$$

Zadnji reakcijski stupanj prikazuje nastajanje racemata iz dibromoalkohola odvajanjem bromidnog iona i protona te slijedi kinetku prvog reda (3.5).

3.1.2. Reaktorski model

Reaktorski model procesa opisuje promjenu koncentracije reaktanata i produkata u vremenu preko bilancnih jednadžbi danih u nastavku:

$$\frac{dc_{(S)\text{-epoksid}}}{dt} = -r_1 - r_3 + 0.5 \cdot r_5 \quad (3.6)$$

$$\frac{dc_{(R)\text{-epoksid}}}{dt} = -r_2 - r_4 + 0.5 \cdot r_5 \quad (3.7)$$

$$\frac{dc_{\text{dibromoalkohol}}}{dt} = r_4 + r_3 - r_5 \quad (3.8)$$

$$\frac{dc_{\text{NaOCN}}}{dt} = -r_1 - r_2 \quad (3.9)$$

$$\frac{dc_{\text{NaBr}}}{dt} = -r_4 - r_3 + r_5 \quad (3.10)$$

$$\frac{dc_{(S)\text{-oksazolidinon}}}{dt} = r_1 \quad (3.11)$$

$$\frac{dc_{(R)\text{-oksazolidinon}}}{dt} = r_2 \quad (3.12)$$

Ove jednadžbe nam ukazuju na to koji sudionici reakcije gdje nastaju, a koji se troše, odnosno koncentracija kojih sudionika reakcije se smanjuje, a kojih se povećava.

Prema jednadžbi 3.6 vidljivo je da se (*S*)-epoksid troši u reakciji otvaranja (*S*)-epoksida cijanatnim ionom (slika 3.1 A) koja je opisana kinetičkom jednadžbom 3.1 te u reakciji otvaranja (*S*)-epoksida bromidnim ionom koja je opisana kinetičkom jednadžbom 3.3, a nastaje u reakciji zatvaranja prstena dibromoalkohola, odnosno u reakciji nastajanja racemata (slika 3.3) opisanoj kinetičkom jednadžbom 3.5.

Jednadžba 3.7 pokazuje da se koncentracija (*R*)-epoksida smanjuje u reakcijama otvaranja (*R*)-epoksida cijanatnim i bromidnim ionima (slika 3.1) koje su opisane kinetičkim jednadžbama 3.2 i 3.4. Koncentracija (*R*)-epoksida povećava se u reakciji zatvaranja prstena dibromoalkohola (slika 3.3) opisanoj kinetičkom jednadžbom 3.5. Budući da je moguće dobiti maksimalno 50 % od svakog enantiomera, ispred r_5 u jednadžbama 3.6 i 3.7 stoji 0,5.

Koncentracija dibromoalkohola se, prema jednadžbi 3.8, smanjuje u reakciji zatvaranja njegova prstena (slika 3.3) što je opisano kinetičkom jednadžbom 3.5, a povećava se u reakcijama (*R*)- i (*S*)-epoksida s bromidnim ionima (slika 3.2) koje su opisane kinetičkim jednadžbama 3.3 i 3.4.

Prema jednadžbi 3.9 koncentracija cijanatnih iona smanjuje se u reakcijama (*S*)- i (*R*)-epoksida sa cijanatnim ionima (slika 3.1) koje su opisane kinetičkim jednadžbama 3.1 i 3.2. Također je vidljivo (3.10) da se koncentracija bromidnih iona smanjuje u reakcijama (*S*)- i (*R*)-epoksida bromidnim ionima (slika 3.2.)

Koncentracija (*S*)-oksazolidinona povećava se u reakciji (*S*)-epoksida i cijanatnog iona (slika 3.1 A) opisanoj kinetičkom jednadžbom 3.1, dok se koncentracija (*R*)-oksazolidinona povećava u reakciji (*R*)-epoksida i cijanatnog iona (slika 3.1 B) opisanoj kinetičkom jednadžbom 3.2.

3.1.3. Kinetički parametri za provedbu simulacija

Kako bi se analizirala osjetljivost parametara u kaskadnoj reakciji, proveden je niz simulacija matematičkog modela. Vrijednosti parametara preuzete su iz diplomskog rada pod naslovom *Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije katalizirane halogenhidrin dehalogenazom* autorice Nevene Milčić izrađenog na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Tablica 3.1. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju NaOCN i (*S*)-epoksida.

PARAMETAR	VRIJEDNOST	MJERNA JEDINICA
V_{m1}	$15,580 \pm 1,698$	$U \text{ mg}^{-1}$
$K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$	$5,895 \pm 0,144$	mM
K_{m1}^{NaOCN}	$21,673 \pm 0,235$	mM
$K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$	$40,017 \pm 28,505$	mM
K_{i1}^{NaBr}	$0,408 \pm 0,033$	mM
$K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$	$1,514 \pm 1,040$	mM

Tablica 3.2. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju NaOCN i (*R*)-epoksida.

PARAMETAR	VRIJEDNOST	MJERNA JEDINICA
k_2	$0,026 \pm 0,001$	$\text{U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$
K_{m2}^{NaOCN}	$43,771 \pm 3,224$	mM
K_{i2}^{NaBr}	$0,037 \pm 0,022$	mM
$K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$	$100 \pm 2,317$	mM

Prema vrijednostima u tablicama 3.1. i 3.2. vidljivo je da je enzim različito selektivan prema (*S*)-epoksidu i (*R*)-epoksidu. Različiti afinitet enzima prema prethodno navedenim enantiomerima vidljiv je po tome što se K_m za (*R*)-epoksid nije mogao odrediti jer je utjecaj koncentracije (*R*)-epoksida na brzinu reakcije opisivala linearna funkcija. Dakle, enzim ima lošiji afinitet prema (*R*)-epoksidu. Kod niskih koncentracija (*S*)-epoksida postiže se visoka maksimalna brzina reakcije ($V_{m1} = 15,580 \text{ U mg}^{-1}$). Pri višim vrijednostima koncentracije (*S*)-epoksida smanjuje se brzina reakcije budući da dolazi do inhibicije enzima ($K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}} = 40,017 \text{ mM}$). Reakcija između (*R*)-epoksida i NaOCN slijedi dvosupstratnu Michaelis-Menteničinu kinetiku s konstantom brzine reakcije $k_2 = 0,026 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Zbog nemogućnosti mjerenja K_m za (*R*)-epoksid kinetika za ovaj supstrat aproksimirana je kinetikom prvoga reda. Iz toga se može zaključiti da se povećanjem koncentracije (*R*)-epoksida brzina reakcije nastajanja produkta ((*R*)-oksazolidinon) linearno povećava.

Bromidni ioni inhibiraju enzim u obje reakcije, pa je pogodna što niža koncentracija istih. Prema navedenim konstantama inhibicije ($K_{i1}^{\text{NaBr}} = 0,408 \text{ mM}$, $K_{i2}^{\text{NaBr}} = 0,037 \text{ mM}$) vidljivo je da je inhibicija u slučaju (*R*)-epoksida izraženija nego kod (*S*)-epoksida.

Tablica 3.3. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju NaBr i (*S*)-epoksida.

PARAMETAR	VRIJEDNOST	MJERNA JEDINICA
k_3	$0,082 \pm 0,001$	$\text{U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$
K_{m3}^{NaBr}	$0,067 \pm 0,009$	mM
$K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}}$	$11,855 \pm 2,066$	mM

Tablica 3.4. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju NaBr i (*R*)-epoksida.

PARAMETAR	VRIJEDNOST	MJERNA JEDINICA
k_4	$0,032 \pm 0,0004$	$\text{U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$
K_{m4}^{NaBr}	$0,145 \pm 0,183$	mM
$K_{i4}^{(S)\text{-epoksid}}$	$10 \pm 16,630$	mM

Uspoređujući vrijednosti parametara u tablicama 3.3. i 3.4. vidljivo je da obje reakcije prate kinetiku prvoga reda, odnosno brzina reakcije se povećava proporcionalno s povećanjem koncentracije supstrata. Michaelis-ove konstante, K_m , u oba slučaja su dosta niske ($K_{m3}^{\text{NaBr}} = 0,067 \text{ mM}$, $K_{m4}^{\text{NaBr}} = 0,145 \text{ mM}$) što znači da enzim ima visok afinitet prema bromidnim ionima, odnosno potrebna je mala količina bromidnih iona da bi se reakcija učinkovito provela. Cijanatni ioni u reakciji s (*R*)-epoksidom nemaju utjecaj. Prisutne su inhibicije suprotnim enantiomerom pri čemu inhibicija (*S*)-epoksidom ima značajno veći utjecaj ($K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}} = 11,855 \text{ mM}$, $K_{i4}^{(S)\text{-epoksid}} = 10 \text{ mM}$). Konstanta brzine reakcije za (*S*)-epoksid iznosi $k_3 = 0,082 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, dok za (*R*)-epoksid iznosi $k_4 = 0,032 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Da bi se reakcija odvijala većom brzinom potrebne su vrlo visoke koncentracije supstrata.

Tablica 3.5. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju zatvaranja prstena dibromoalkohola.

PARAMETAR	VRIJEDNOST	MJERNA JEDINICA
k_5	$0,055 \pm 0,0011$	min^{-1}
n	1	-

U tablici 3.5 prikazani su kinetički parametri za kemijsku reakciju zatvaranja prstena dibromoalkohola koja je spontana i kao produkt nastaje *rac*-epoksid. Ova reakcija slijedi kinetiku prvoga reda budući da je brzina nastajanja *rac*-epoksida proporcionalna koncentraciji dibromoalkohola. Reakcija je jako brza pa je teško uopće primjetiti koncentraciju dibromoalkohola u reaktoru. U ovom slučaju opet nastaju (*R*)- i (*S*)-epoksid u jednakim količinama.

3.2. Obrada podataka

Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije dobivanja (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona reakcijom *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnih iona uz katalitičko djelovanje HheC u prisutnosti bromidnih iona se sastoji od kinetičkog modela i bilancnih jednadžbi. Matematički model kinetičke rezolucije analogan je modelu DKR samo uz razliku što nisu prisutni bromidni ioni, pa se prema ovom modelu odvija reakcija 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona uz prisustvo enzima HheC pri čemu nastaje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on. Provedena je analiza osjetljivosti parametara kako bi se odredilo koji parametri imaju najznačajniji učinak na *ee* kod kinetičke rezolucije i dinamičke kinetičke rezolucije. Nakon završetka simulacije s variranjem jednoga parametra njegova vrijednost vraćena je na početnu i krenulo se s variranjem drugog parametra. Kod kinetičke rezolucije vrijednost variranog parametra očitavane su pri 48 %-tnoj konverziji supstrata, dok su kod dinamičke kinetičke rezolucije vrijednosti variranog parametra očitavane pri konverziji supstrata od 100 %. Kod kinetičke rezolucije brom nije prisutan, pa su testirani parametri u ovom slučaju isključivo oni u jednadžbama 3.1 i 3.2. Simulacije su provedene pomoću programskog paketa Scientist, a programski kod je dan u prilogu 1.

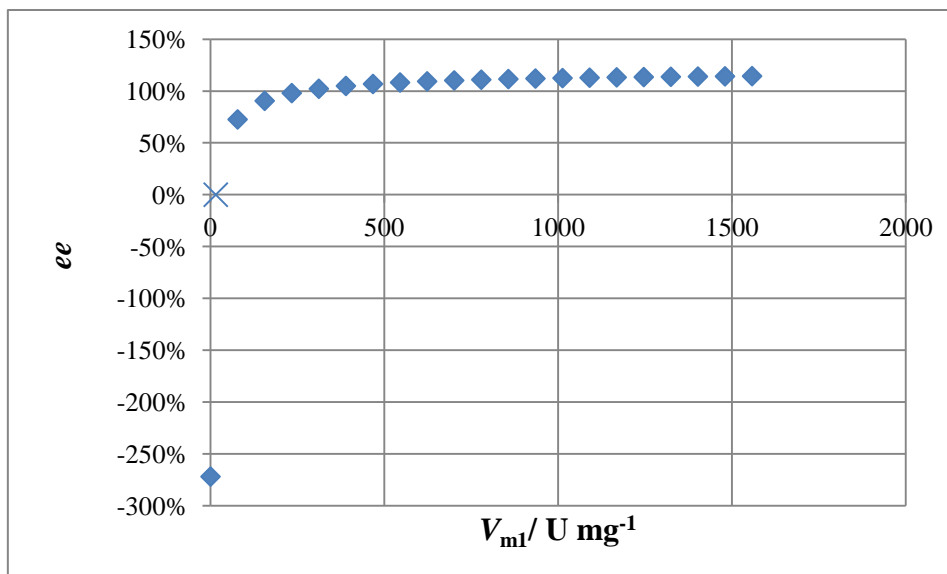
4. REZULTATI I RASPRAVA

Prema preuzetim kinetičkim parametrima vidljivo je da se reakcija mora provoditi pri niskim koncentracijama *rac*-epoksida zbog inhibicije supstratom (*S*)-epoksidom jer bi u protivnom došlo do inhibicije supstratom (*S*)-epoksidom u *i*. stupnju. Također su potrebne i niske koncentracije bromidnih iona koje ne inhibiraju enzim u *i*. stupnju, a dovoljne su za provođenje *ii*. stupnja reakcije. Kako bi se skratilo vrijeme trajanja procesa potrebno je odabrati optimalne koncentracije supstrata, a to se može odrediti kinetičkim ispitivanjima. Svaki od reakcijskih koraka promatran je zasebno za (*R*)- i (*S*)-epoksidge kao supstrate zbog kompleksnosti sustava. *i*. stupanj predstavlja otvaranje epoksidnog prstena oba enantiomera cijanatnim ionom pri čemu nastaje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on (slika 3.1). U *ii*. stupnju se (*S*) i (*R*)-epoksid otvaraju bromidnim ionom (slika 3.2), dok u *iii*. stupnju dolazi do zatvaranja prstena dibromoalkohola (slika 3.3).

U nastavku su dani rezultati analize osjetljivosti parametara na model KR i DKR, tako je grafički prikazan utjecaj vrijednosti pojedinog parametra na *ee* produkta pri KR i DKR.

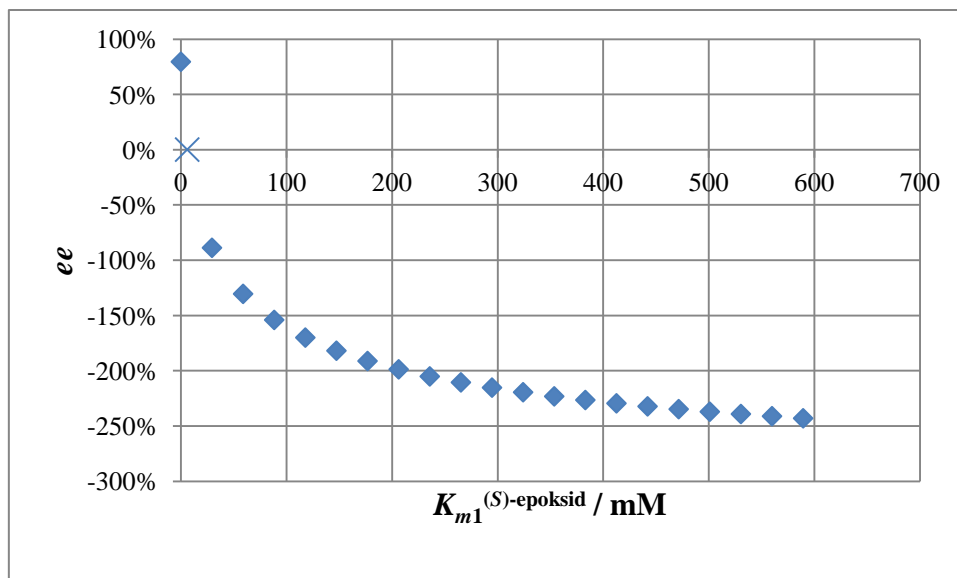
4.1. Analiza osjetljivosti parametara primijenjena na model kinetičke rezolucije

Prema modelu kinetičke rezolucije odvija se reakcija 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona uz prisustvo enzima HheC pri čemu nastaje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on. Ta reakcija otvaranja prstena (*S*) i (*R*)-epoksidge s cijanatnim ionima prikazana je na slici 3.1 i opisana jednadžbama 3.1 i 3.2. Utjecaj vrijednosti pojedinog parametra na *ee* pri kinetičkoj rezoluciji promatran je pri 48 %-tnoj konverziji supstrata jer je tu moguće dobiti čisti produkt, odnosno visoku enantiomernu čistoću (> 98 %). U teoriji se svaki enantiomer može dobiti s iskorištenjem od 50 %, dok u praksi to nije slučaj. Na slikama 4.1 – 4.7 nulta *ee* vrijednost za svaki pojedini parametar označena je sa \times . Odstupanja *ee* od nulte *ee* vrijednosti izračunata su tako da se od *ee* pojedine vrijednosti parametra oduzela *ee* pri stvarnoj vrijednosti parametra, te se zatim rezultat podijeli sa nultom *ee* vrijednošću.



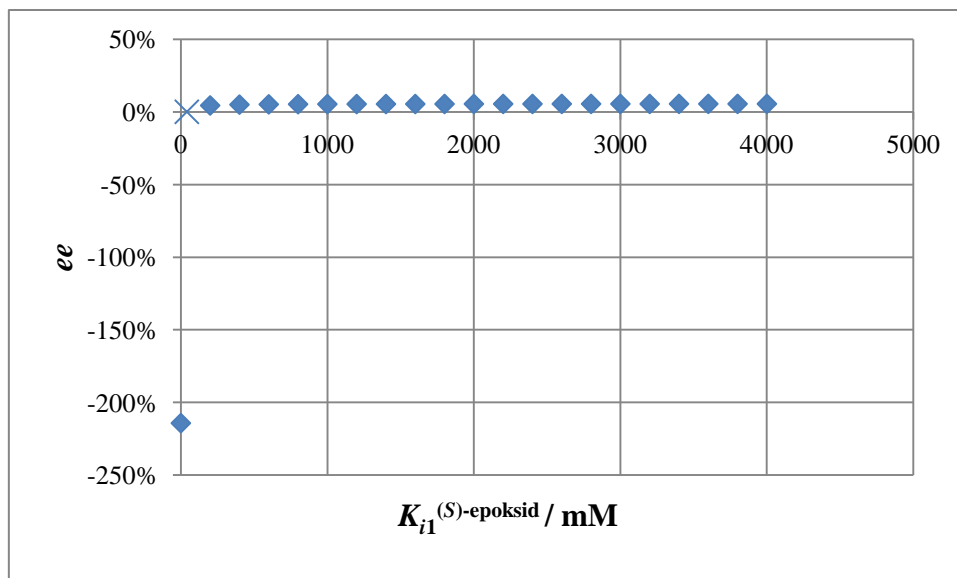
Slika 4.1. Utjecaj vrijednosti parametra V_{m1} na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata.

Slika 4.1 daje uvid u ovisnost odstupanja ee sa variranjem parametra V_{m1} . Vrijednosti V_{m1} kreću se od 0,1558 $U \text{ mg}^{-1}$ do 1558,03 $U \text{ mg}^{-1}$. Pri stvarnoj vrijednosti $V_{m1} = 15,5803 U \text{ mg}^{-1}$ izračun ee se smatra kao nulta vrijednost u odnosu na koju se računa odstupanje tako da kod tog parametra vrijednost ee iznosi 0 %. Pri najmanjoj vrijednosti parametra V_{m1} odstupanje ee od stvarne vrijednosti iznosi -272 %, te se zatim vidi nagli porast na pozitivno odstupanje i brzu stagnaciju pri čemu za najveću vrijednost $V_{m1} = 1558,03 U \text{ mg}^{-1}$ odstupanje ee iznosi 115 %. Iz toga se može zaključiti da je vrijednost ovog parametra ključna za rezultat, odnosno vrijednost ee kod KR.



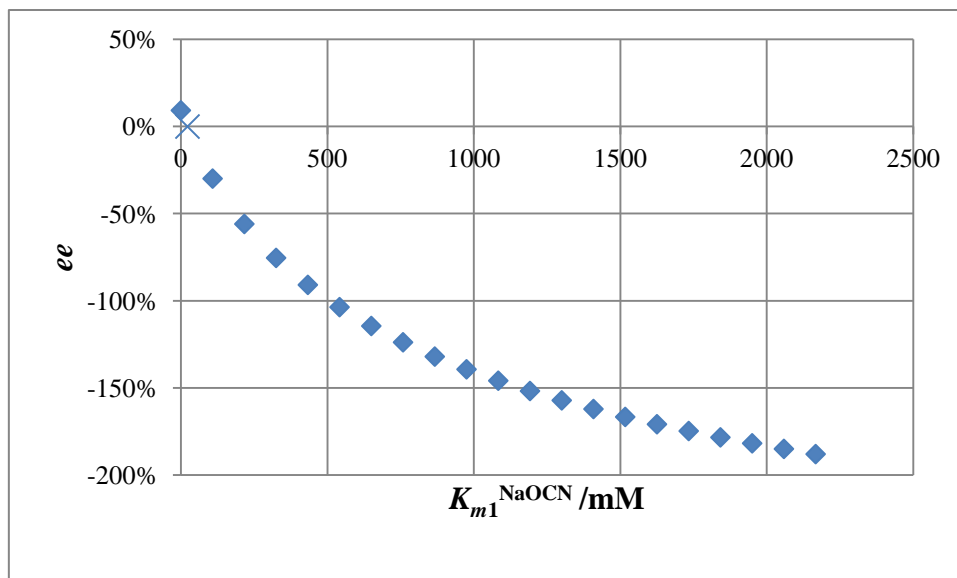
Slika 4.2. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata.

Na slici 4.2 vidljivo je kako se ee vrijednost mijenja u odnosu na nultu ee vrijednost s promjenom vrijednosti parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$. Vrijednosti $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ kreću se od 0,059 mM do 5,895 mM. Pri najmanjoj vrijednosti parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ odstupanje od ee iznosi 80 % , te se s povećanjem vrijednosti parametra ta odstupanja eksponencijalno smanjuju. Kod $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}} = 5,895$ mM odstupanje ee od stvarne vrijednost iznosi -243 %. Promjena vrijednosti ovog parametra značajno utječe na promjenu odstupanja ee . Iz toga se može zaključiti da je i ovaj parametar ključan za vrijednost ee .



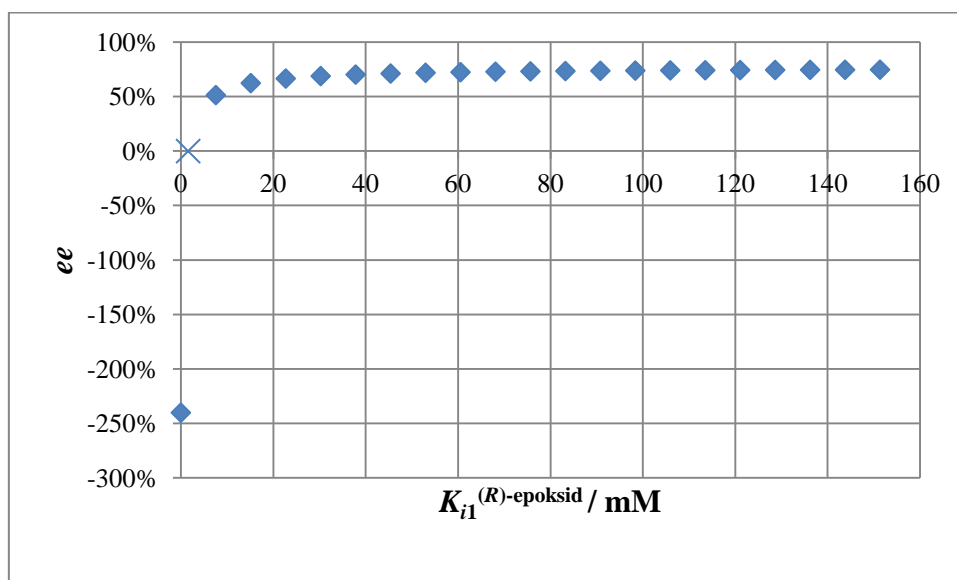
Slika 4.3. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata.

Promjena odstupanja ee od stvarne vrijednosti u ovisnosti o vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ prikazana je na slici 4.3. Vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ kreću se od 0,4002 mM do 4001,7 mM. Pri najmanjoj vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ odstupanje ee iznosi -214 %, dok kod najveće vrijednosti $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ ono iznosi 6 %. Vidljiv je nagli rast, odnosno smanjenje odstupanja, već kod druge simulacije, nakon čega slijedi stagnacija. Može se zaključiti da kod većih vrijednosti parametra ($K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}} = 200,465 \text{ mM}$) pa sve do najveće vrijednosti nema značajnog utjecaja na promjenu odstupanja (razlika je od 4 – 6 %), dok je kod manjih vrijednosti ovih parametara utjecaj $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee značajan.



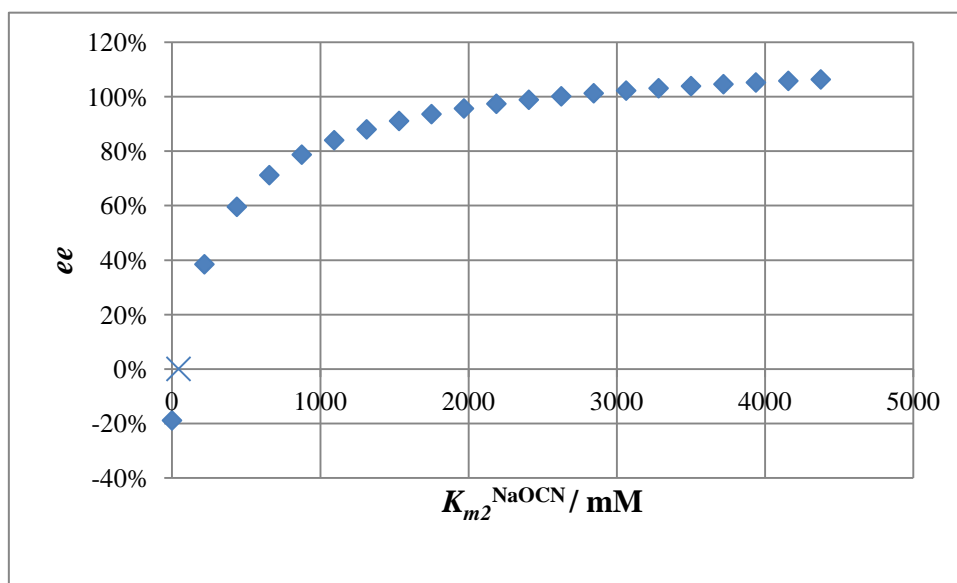
Slika 4.4. Utjecaj vrijednosti parametra K_{m1}^{NaOCN} na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata.

Vrijednosti parametra K_{m1}^{NaOCN} kreću se od 0,217 mM do 2167,25 mM s time da je kod najmanje vrijednosti parametra odstupanje od ee 9 %, dok se daljnjim povećanjem vrijednosti K_{m1}^{NaOCN} to odstupanje povećava do -188 %. Na slici 4.4 vidljiv je eksponencijalni pad, odnosno povećanje negativnog odstupanja od ee , s povećanjem vrijednosti parametra K_{m1}^{NaOCN} . U početku je taj pad nešto izraženiji, a kasnije se malo ublažava.



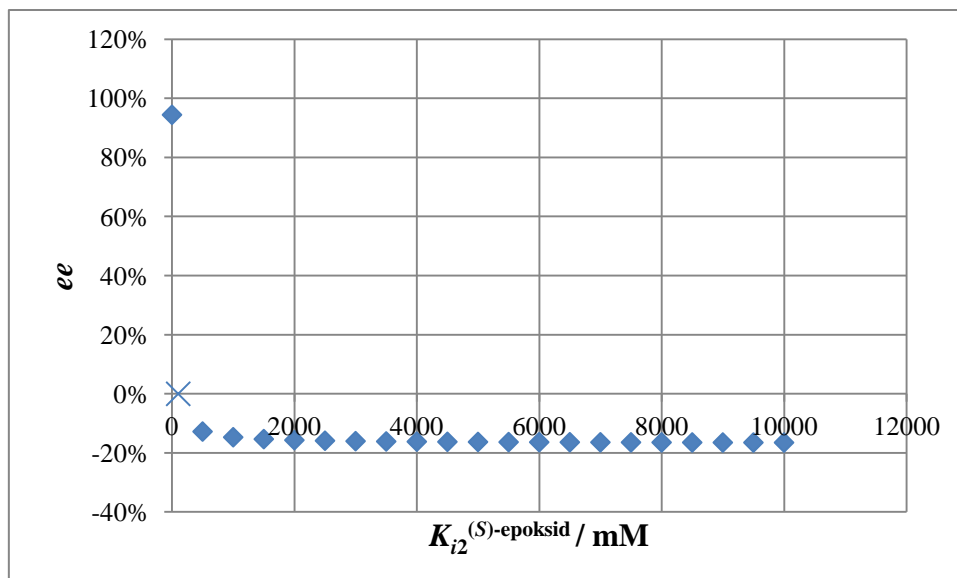
Slika 4.5. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata.

Na slici 4.5 vidljiv je utjecaj parametra $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$ na odstupanje ee od stvarne vrijednosti. Najmanja vrijednost parametra iznosi 0,015 mM, a najveća 151,39 mM. Kod najmanje vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$ odstupanje iznosi -240 %, dok kod najveće vrijednosti parametra ono iznosi 74 %. Između provedbe prve i druge simulacije vidljiva je velika razlika u odstupanjima ee , nakon čega su daljnjim povećanjem vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$ odstupanja slična i kreću se u rasponu 71 – 74 %.



Slika 4.6. Utjecaj vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata.

Utjecaj promjene vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} na odstupanje ee od stvarne vrijednosti prikazan je na slici 4.6. Vrijednosti K_{m2}^{NaOCN} kreću se od 0,438 mM do 4377,1 mM, pri čemu kod najmanje vrijednosti parametra odstupanje ee iznosi -19 %, dok kod najveće vrijednosti parametra ono iznosi 106 %. Prisutan je rast koji je u početku nešto izraženiji u odnosu na kasnije. Prema prikazu može se reći da vrijednost parametra K_{m2}^{NaOCN} ima značajan utjecaj na odstupanje ee od prave vrijednosti.



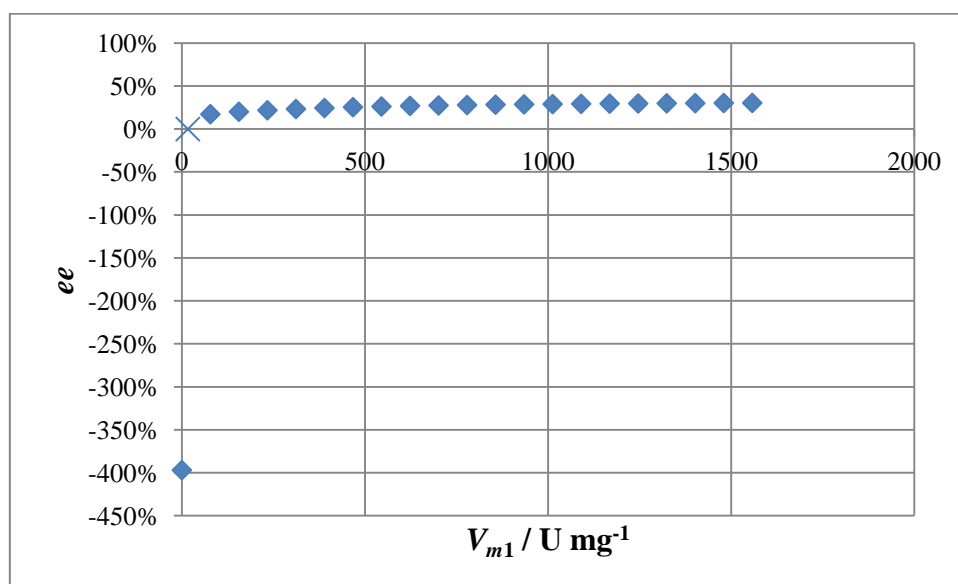
Slika 4.7. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata.

Slika 4.7 daje ovisnost odstupanja ee od stvarne vrijednosti u odnosu na vrijednost parametra $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$. Vrijednosti parametra kreću se od 1 – 10000 mM, pri čemu kod $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}} = 1$ mM odstupanje ee iznosi 94 % te se već kod druge simulacije ono naglo smanjuje i vrlo brzo stagnira na vrijednost od -16 %. Dakle, veće vrijednosti kinetičkog parametra $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$ (od 500,95 mM nadalje) nemaju značajan utjecaj na promjenu odstupanja ee od stvarne vrijednosti.

Iz svega ovdje navedenog može se zaključiti da svi kinetički parametri modela reakcije kinetičke rezolucije imaju značajan utjecaj. Neki od njih u cijelom istraživanom području, a neki pri većim ili manjim devijacijama.

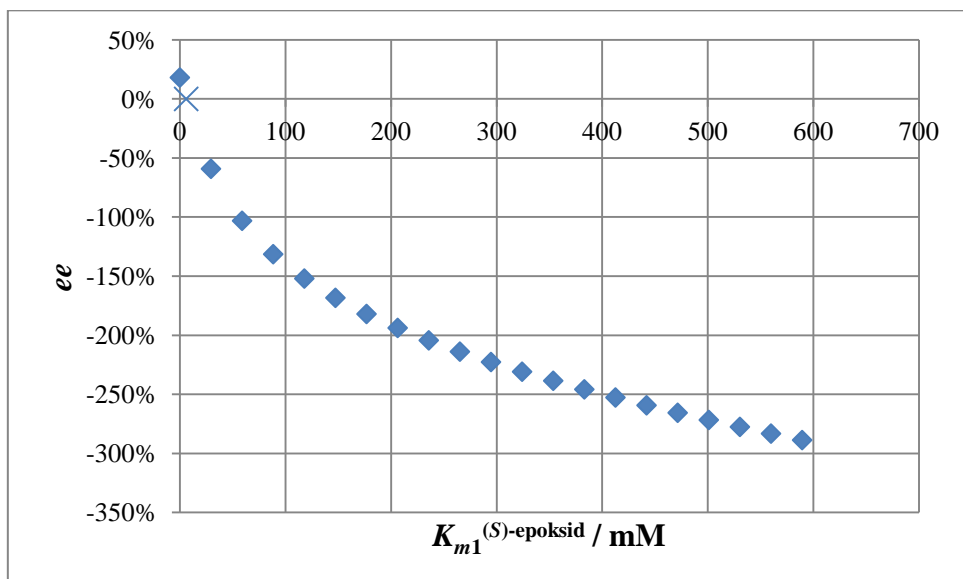
4.2. Analiza osjetljivosti parametara primijenjena na model dinamičke kinetičke rezolucije

Budući da je kod KR maksimalni prinos samo 50 % te da je dosta teško odvajanje optički aktivnog supstrata i produkta, simulacije su provedene i za model DKR, odnosno uz dodatak bromidnih iona. Ukupna reakcija sastoji se od otvaranja (*S*)- i (*R*)-epoksida cijanatnim ionom što predstavlja *i.* stupanj (slika 3.1) koji je opisan jednadžbama 3.1 i 3.2. Zatim slijedi otvaranje (*S*) i (*R*)-epoksida bromidnim ionom uz prisustvo enzima HheC što je prikazano na slici 3.2 te opisano jednadžbama 3.3 i 3.4. *iii.* stupanj prikazuje zatvaranje prstena dibromoalkohola odnosno dobivanja racemata (slika 3.3, jednadžba 3.5). U ovome radu analizirana je osjetljivost kinetičkih parametara kojom je dobiven utjecaj vrijednosti pojedinog parametra na *ee* produkta pri 100 %-tnoj konverziji supstrata. Odstupanje od nulte *ee* vrijednosti izračunato je kao i kod modela KR.



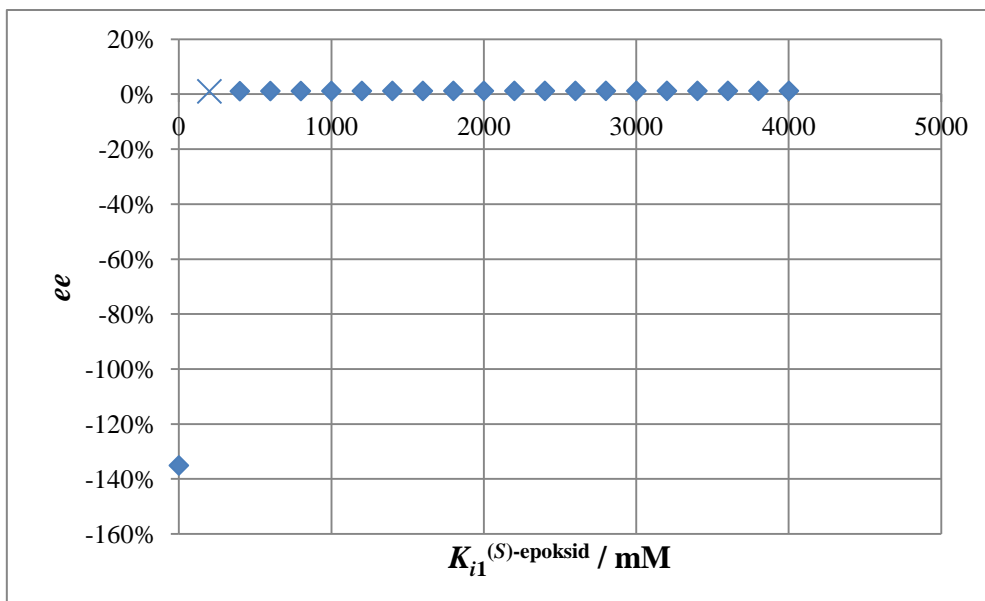
Slika 4.8. Utjecaj vrijednosti parametra V_{m1} na *ee* produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Slika 4.8 daje uvid u utjecaj vrijednosti parametra V_{m1} na odstupanje *ee* od nulte *ee* vrijednosti. Vrijednosti parametra V_{m1} kreću se od 0,156 mM pri kojoj odstupanje od *ee* iznosi -397 % do 1558,03 mM kod koje odstupanje od *ee* iznosi 30 %. Već pri drugoj najmanjoj vrijednosti parametra V_{m1} *ee* iznosi 17 %, a daljnjim povećanjem vrijednosti parametra to odstupanje raste, ali značajno sporije, pa se može zaključiti da se s povećanjem vrijednosti parametra V_{m1} odstupanja od *ee* značajno ne mijenjaju.



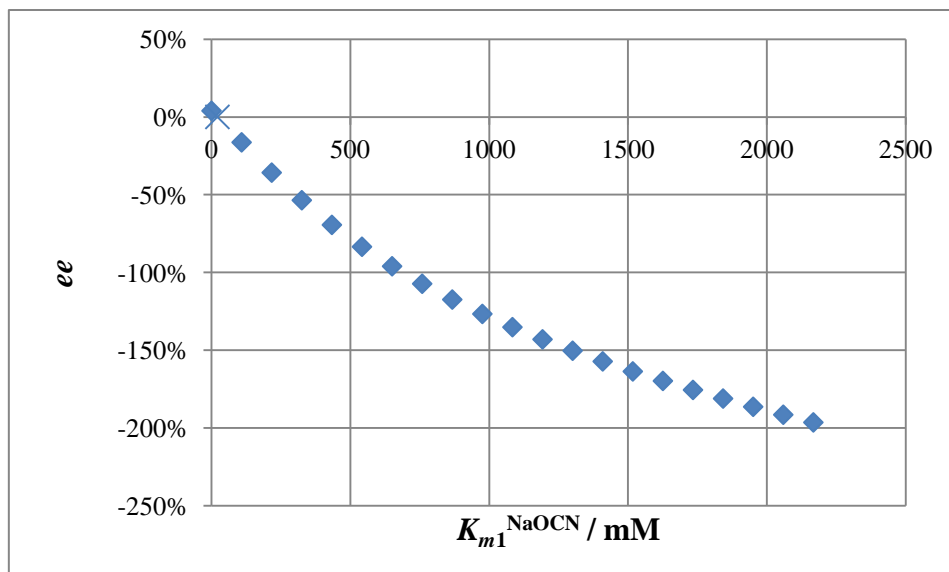
Slika 4.9. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Na slici 4.9 vidljiv je eksponencijalni pad, odnosno povećanje negativnog odstupanja ee u odnosu na stvarnu vrijednost s povećanjem vrijednosti parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$. Vrijednosti parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ kreću se od 0,059 mM pri čemu odstupanje ee iznosi 18 % do 589,5 mM kod koje odstupanje ee od stvarne vrijednosti iznosi -289 %. Dakle, povećanje vrijednosti parametra ima značajan utjecaj na iznos odstupanja ee od stvarne vrijednosti.



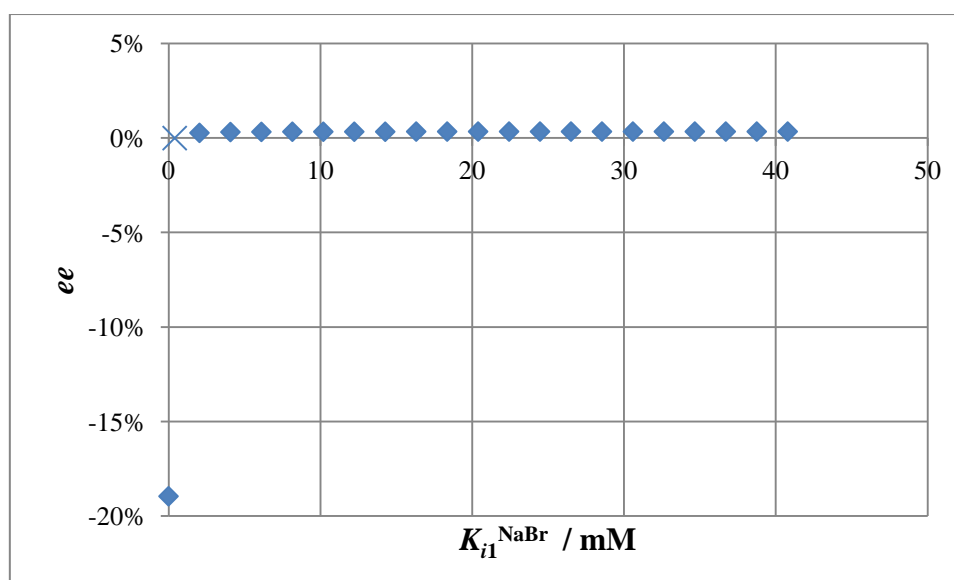
Slika 4.10. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Slika 4.10 prikazuje utjecaj vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ na odstupanje ee od stvarne vrijednosti. Vrijednosti $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ kreću se u rasponu od 0,4002 mM do 4001,7 mM. Pri najmanjoj vrijednosti parametra vidljivo je odstupanje ee koje iznosi -135 %, nakon čega odmah slijedi odstupanje od svega 1 % što se nastavlja za sve simulacije ovoga parametra. Dakle, odmah nakon druge najmanje vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ odstupanje se ustalilo na svega 1 %, pa se može reći da povećanje vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ gotovo ne utječe na vrijednost odstupanja ee od stvarne vrijednosti.



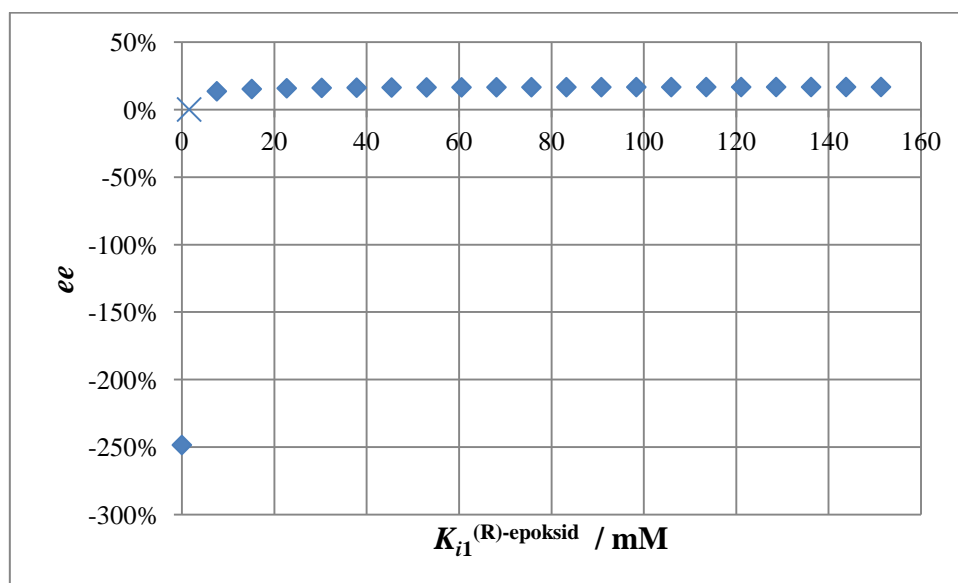
Slika 4.11. Utjecaj vrijednosti parametra K_{m1}^{NaOCN} na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Utjecaj parametra K_{m1}^{NaOCN} na odstupanje ee od stvarne vrijednosti prikazan je na slici 4.11. Vrijednosti K_{m1}^{NaOCN} kreću se od 0,217 mM do 2167,25 mM, pri čemu za najmanju vrijednost odstupanje ee iznosi 4 % nakon čega slijedi povećanje negativnog odstupanja sve do -196 % za najveću vrijednost parametra K_{m1}^{NaOCN} . Dakle, povećanjem vrijednosti parametra K_{m1}^{NaOCN} povećava se negativno odstupanje ee od stvarne vrijednosti.



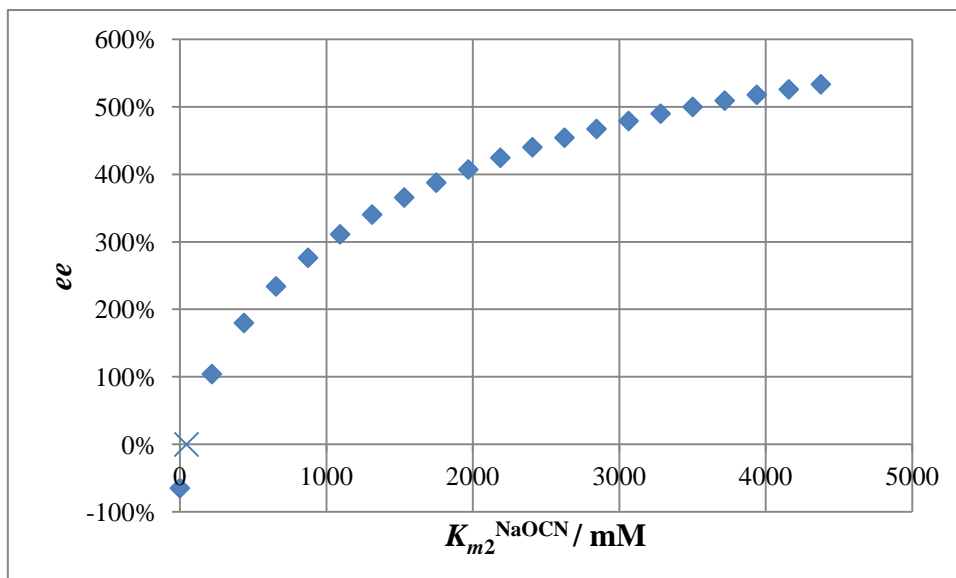
Slika 4.12. Utjecaj vrijednosti parametra K_{i1}^{NaBr} na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Na slici 4.12 vidljiv je utjecaj vrijednosti parametra K_{i1}^{NaBr} na odstupanje ee od stvarne vrijednosti. Najmanja vrijednost parametra iznosi 0,004 mM pri kojoj odstupanje iznosi -19 %, a najveća iznosi 40,794 mM za koju odstupanje iznosi 0 %. Dakle, odmah nakon provedbe druge simulacije odstupanje je iznosilo 0 % i više se nije mijenjalo sa povećanjem vrijednosti parametra. Prema tome, ovaj parametar ima manje odstupanje u odnosu na do sad prikazane.



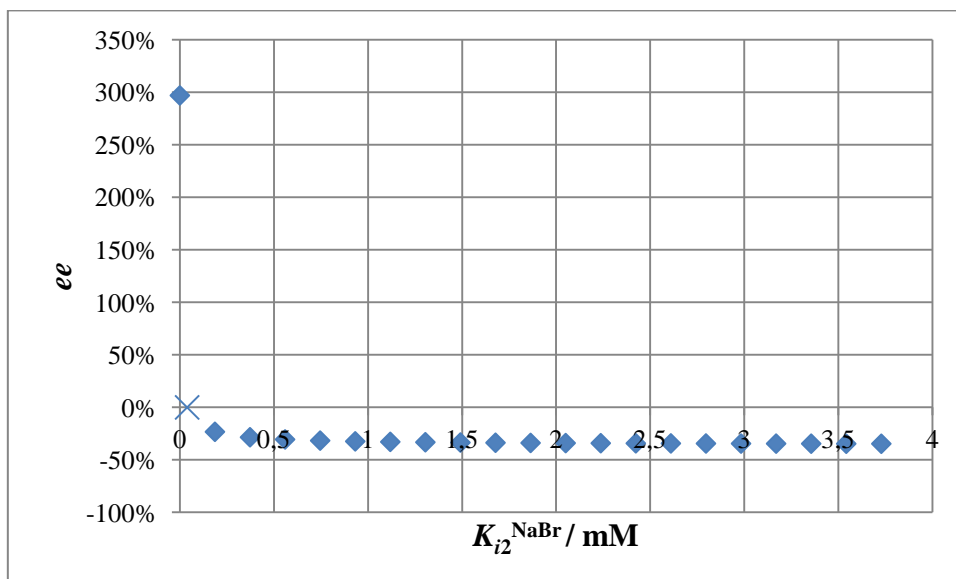
Slika 4.13. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Utjecaj vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$ na odstupanje ee od stvarne vrijednosti prikazan je na slici 4.13. Kod najmanje vrijednosti parametra ($K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}} = 0,015 \text{ mM}$) odstupanje ee od stvarne vrijednosti iznosi -248 %, dok kod najveće vrijednosti parametra ($K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}} = 151,39 \text{ mM}$) odstupanje ee od stvarne vrijednosti iznosi 17 %. Vidljivo je da se već nakon druge simulacije odstupanje ee od nulte vrijednosti ustalilo. Dakle, za vrijednosti parametra veće od stvarne vrijednosti odstupanje ee se značajno ne mijenja.



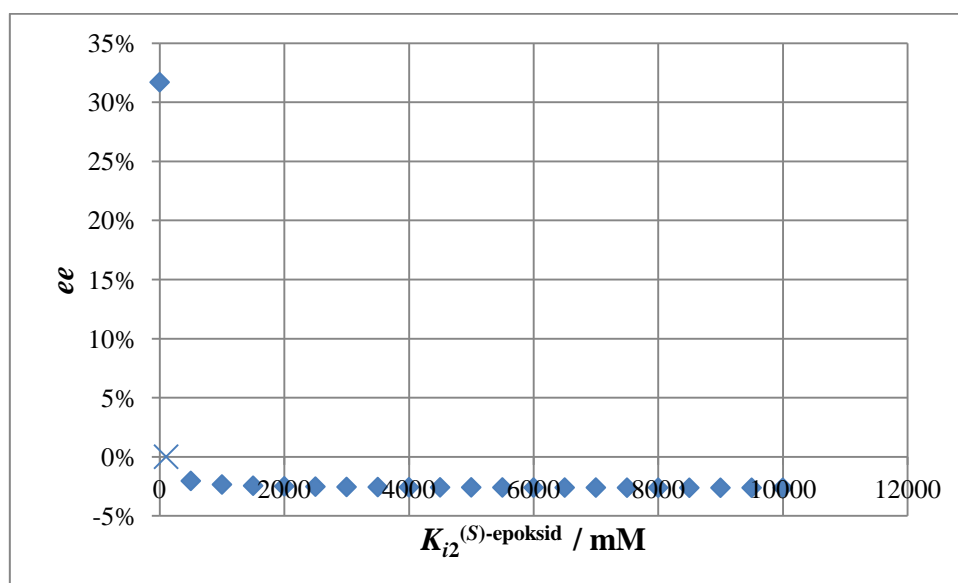
Slika 4.14. Utjecaj vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Slika 4.14 prikazuje ovisnost odstupanja ee od stvarne vrijednosti o vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} . Vrijednosti parametra kreću se u rasponu od 0,438 mM do 4377,1 mM, pri čemu odstupanje ee za najmanju vrijednost parametra iznosi -65 %, a za najveću vrijednost ono iznosi 533 %. Vidljiv je značajan porast odstupanja ee od stvarne vrijednosti s povećanjem vrijednosti parametara K_{m2}^{NaOCN} .



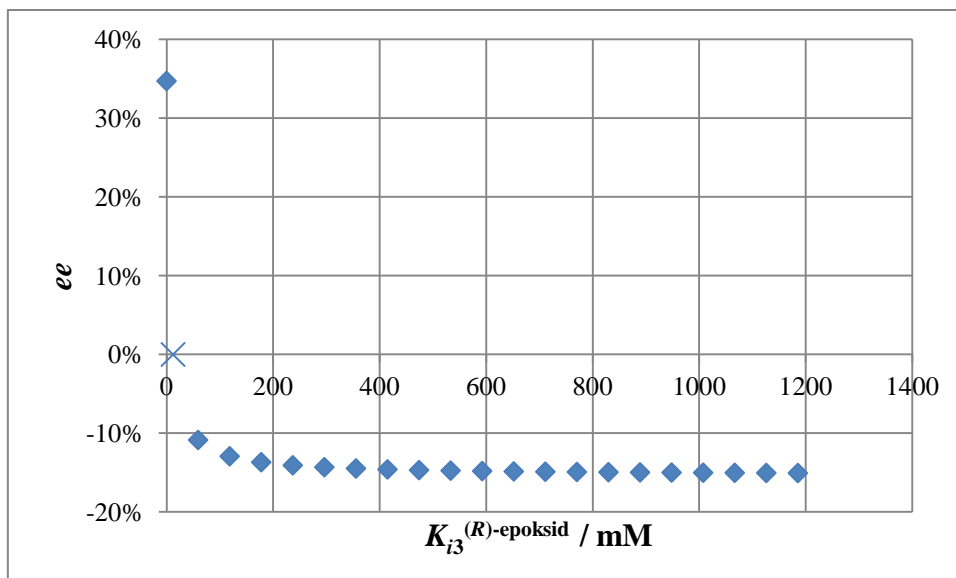
Slika 4.15. Utjecaj vrijednosti parametra K_{i2}^{NaBr} na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Slika 4.15 daje uvid u ovisnost odstupanja ee od stvarne vrijednosti u ovisnosti o vrijednosti parametra K_{i2}^{NaBr} čija najmanja vrijednost iznosi svega 0,00037 mM, a najveća 3,73 mM. Pri najmanjoj vrijednosti parametra odstupanje od ee iznosi čak 300 %, te se zatim odstupanje smanjuje i stagnira. Kod najveće vrijednosti parametra K_{i2}^{NaBr} odstupanje ee od stvarne vrijednosti iznosi -35 %.



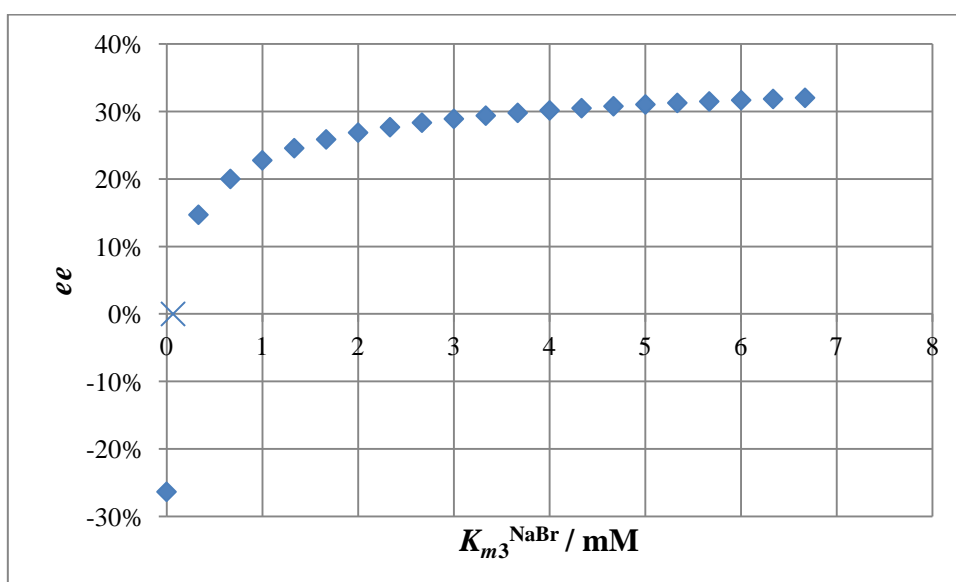
Slika 4.16. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Što se tiče parametra $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$ vidljivo je da vrlo brzo dolazi do stagnacije krivulje, odnosno da se s povećanjem vrijednosti parametra odstupanje ee od stvarne vrijednosti ne mijenja (slika 4.16). Najmanja vrijednost parametra $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$ je 1 mM s odstupanjem ee 32 %, a najveća vrijednost parametra je 10000 mM sa odstupanjem ee od -3 %. Ovako relativno malo odstupanje čini ovaj parametar jednim od manje značajnih u modelu DKR-e. Valja primijetiti da to nije bilo tako kada promatramo samo KR (Slika 4.7.)



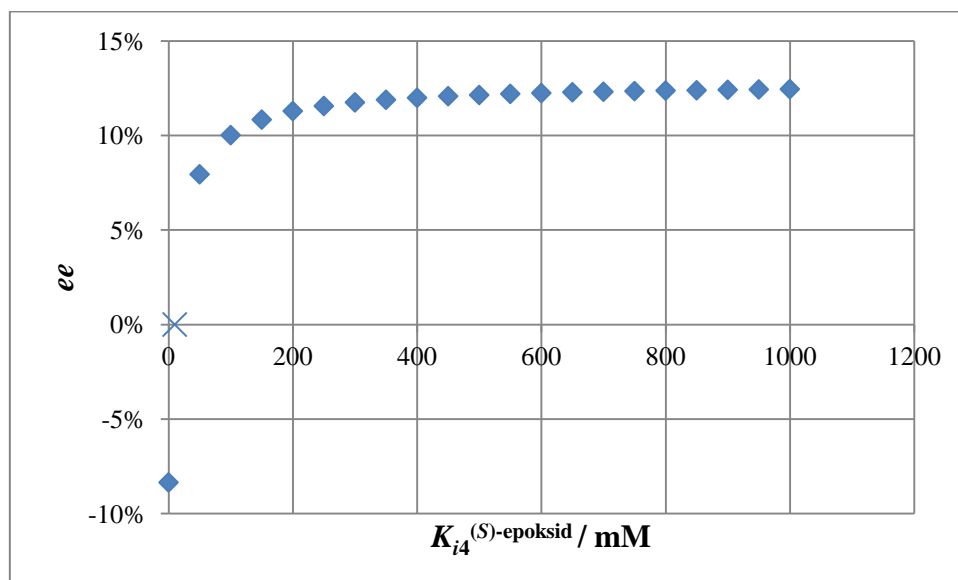
Slika 4.17. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Slika 4.17 prikazuje ovisnost odstupanja ee od stvarne vrijednosti o vrijednosti parametra $K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}}$. Najmanja vrijednost parametra iznosi 0,119 mM s odstupanjem ee od stvarne vrijednosti 35 %, dok najveća vrijednost parametra iznosi 1185,5 mM sa odstupanjem ee od -15 %. Dakle, s povećanjem vrijednosti parametra odstupanje ee se smanjuje i vrlo brzo ustaljuje na vrijednost od -15 %.



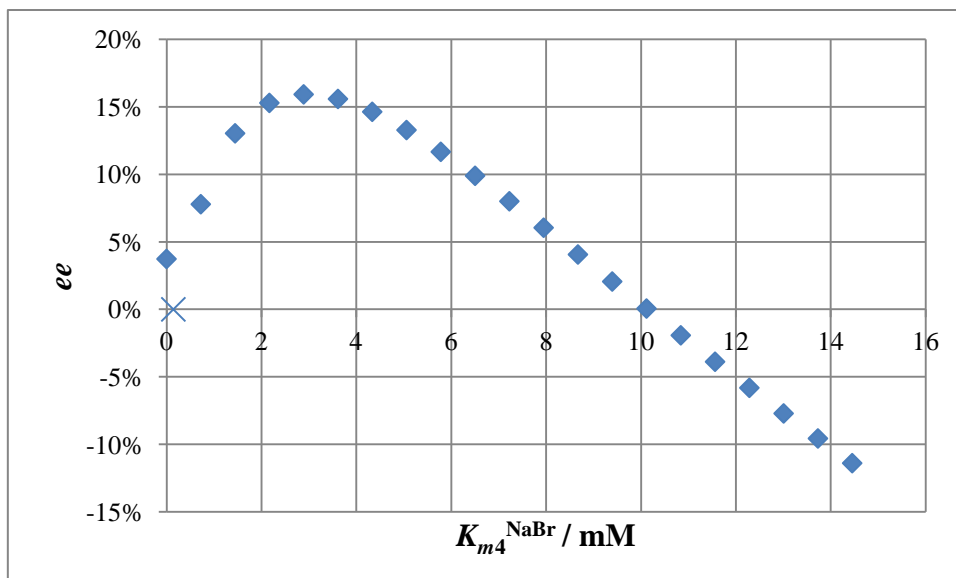
Slika 4.18. Utjecaj vrijednosti parametra K_{m3}^{NaBr} na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

S povećanjem vrijednosti parametra K_{m3}^{NaBr} vidljivo je da odstupanje ee od stvarne vrijednosti od negativno prelazi na pozitivno te se ustaljuje na 32 % što je vidljivo na slici 4.18. Vrijednosti parametra K_{m3}^{NaBr} kreću se od 0,0007 mM do 6,672 mM. S povećanje vrijednosti parametra povećava se i pozitivno odstupanje ee od stvarne vrijednosti.



Slika 4.19. Utjecaj vrijednosti parametra $K_{i4}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Na slici 4.19 prikazano je kako promjena vrijednosti parametra $K_{i4}^{(S)\text{-epoksid}}$ utječe na odstupanje ee od stvarne vrijednosti. Vrijednosti parametra kreću se od 0,1 mM sa odstupanjem ee od -8 % do 1000 mM s odstupanjem od 12 %. S povećanjem vrijednosti parametra povećava se pozitivno odstupanje ee od stvarne vrijednosti te se ono vrlo brzo ustaljuje na vrijednost od 12 %. Vidljivo je da ovaj parametar ima znatno manji utjecaj na odstupanje ee u odnosu na neke od ostalih parametara.



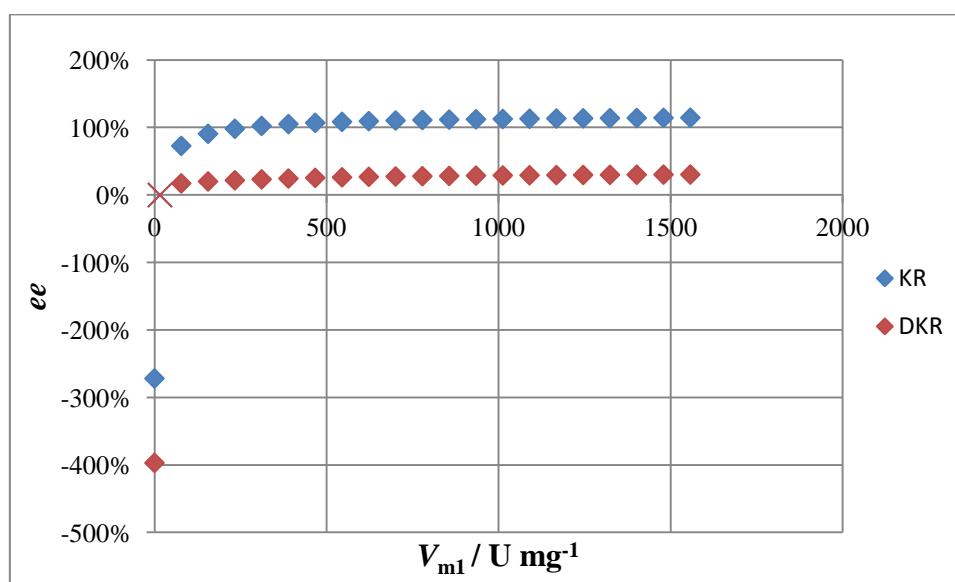
Slika 4.20. Utjecaj vrijednosti parametra K_{m4}^{NaBr} na ee produkta pri DKR 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Prema slici 4.20 vidi se da je parametar K_{m4}^{NaBr} , odnosno promjena njegovih vrijednosti nešto specifičnija. S povećanjem vrijednosti parametra doseže se maksimum odstupanja ee od 16 % kod šeste simulacije, odnosno kod vrijednosti parametra 3,615 mM, a zatim se daljnjim povećanjem vrijednosti parametra odstupanje smanjuje i prelazi u negativno do vrijednosti od -11 %.

Iz opisanih grafičkih prikaza na slikama 4.8 – 4.20 vidljivo je da svi kinetički parametri imaju utjecaj na odstupanje ee od nulte vrijednosti, neki u cijelom ispitivanom području, a neki u određenom dijelu ispitivanog područja.

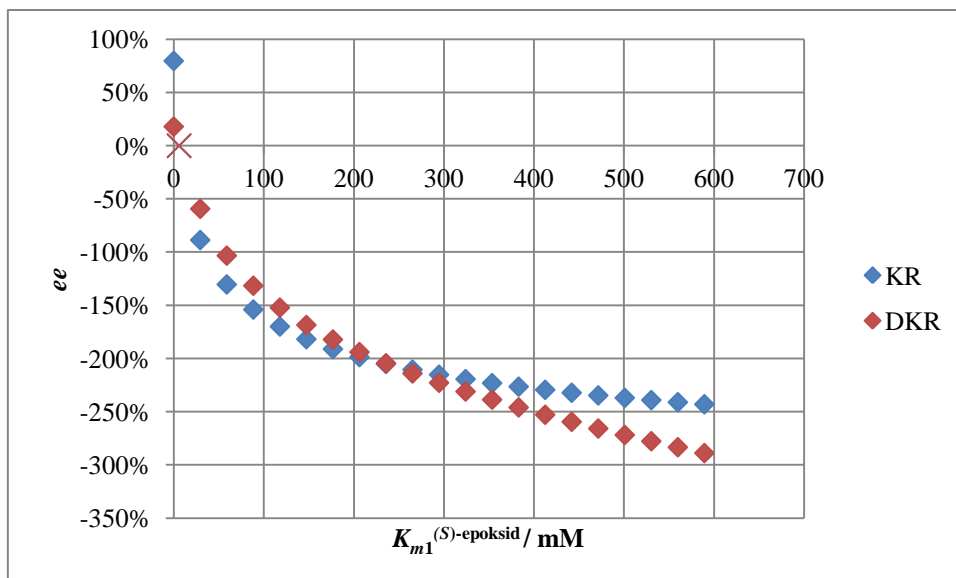
4.3. Usporedba analize osjetljivosti kinetičkih parametara primijenjenih na modele KR i DKR

Na slikama koje slijede prikazane su usporedbe utjecaja pojedinih vrijednosti parametara na odstupanje ee od stvarne vrijednosti pri KR i DKR kako bi se vidjela razlika u dobivenim rezultatima kod ovih dviju metoda. Kinetički parametri za obje metode su iste vrijednosti. Vrijednosti ee su kao i u prethodim slučajevima pri KR očitane pri 48 %-tnoj konverziji supstrata, dok su pri DKR one očitane pri 100 %-toj konverziji supstrata. Uspoređivani parametri su oni prisutni u kinetičkim jednadžbama 3.1 i 3.2 zbog prisutnosti bromidnih iona.



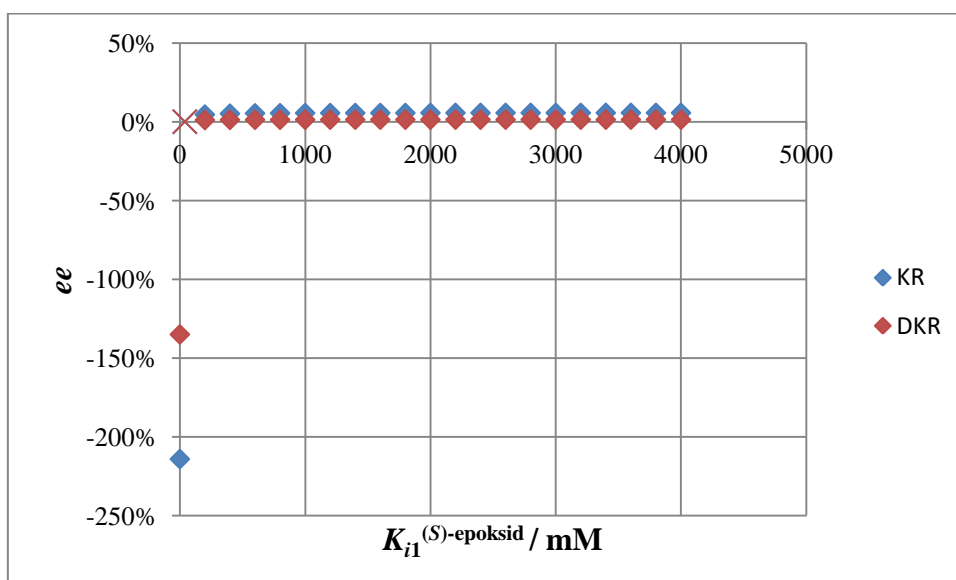
Slika 4.21. Usporedba utjecaja vrijednosti parametra V_{m1} na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata i pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Prema slici 4.21 vidljivo je da s povećanjem vrijednosti parametra V_{m1} i kod KR i kod DKR odstupanja od ee rastu prema pozitivnom, ali kod KR je to odstupanje veće u odnosu na DKR. Za najmanju vrijednost parametra V_{m1} odstupanje ee od stvarne vrijednosti za KR iznosi -272 %, dok za DKR ono iznosi -396,92 %. To nam govori da je za vrijednosti parametra V_{m1} koje su manje od stvarne vrijednosti KR povoljnija opcija. Za najveću vrijednost parametra V_{m1} odstupanje za KR iznosi 115 %, a za DKR ono iznosi 30 %. Dakle, za vrijednosti parametra V_{m1} veće od stvarne vrijednosti tog parametra odstupanje od ee povoljnije je kod DKR.



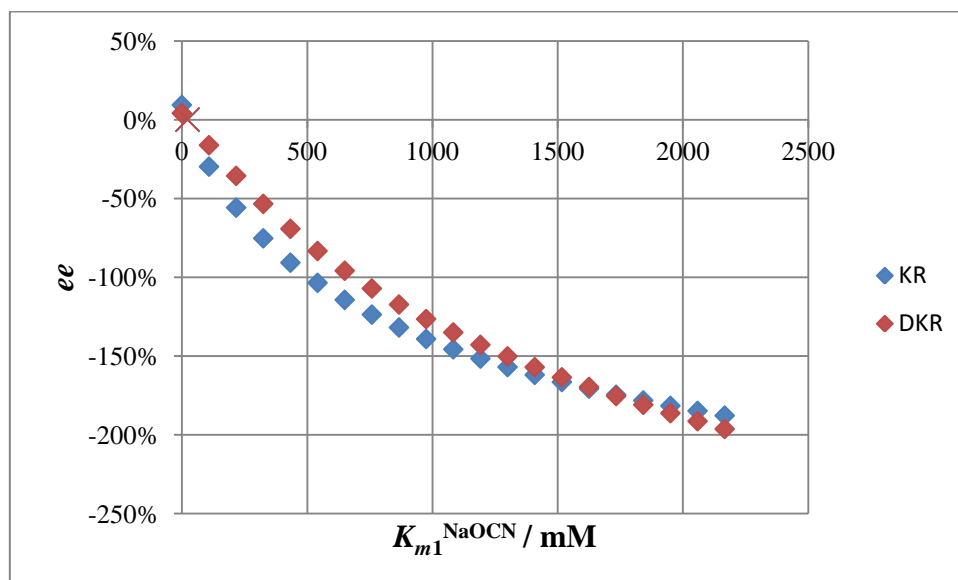
Slika 4.22. Usporedba utjecaja vrijednosti parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata i pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Što se tiče parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ za vrijednosti manje od stvarne vrijednosti parametra odstupanje ee od stvarne vrijednosti veće je pri KR (80 %) nego za DKR (18 %), pa je ovdje DKR povoljnija opcija. Za vrijednosti parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ veće od stvarne vrijednosti vidljivo je da krivulja za DKR ima nešto strmiji pad od one za KR. Za najveću vrijednost parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ odstupanje ee od stvarne vrijednosti za KR iznosi -243 %, a za DKR ono iznosi -289 % (slika 4.22).



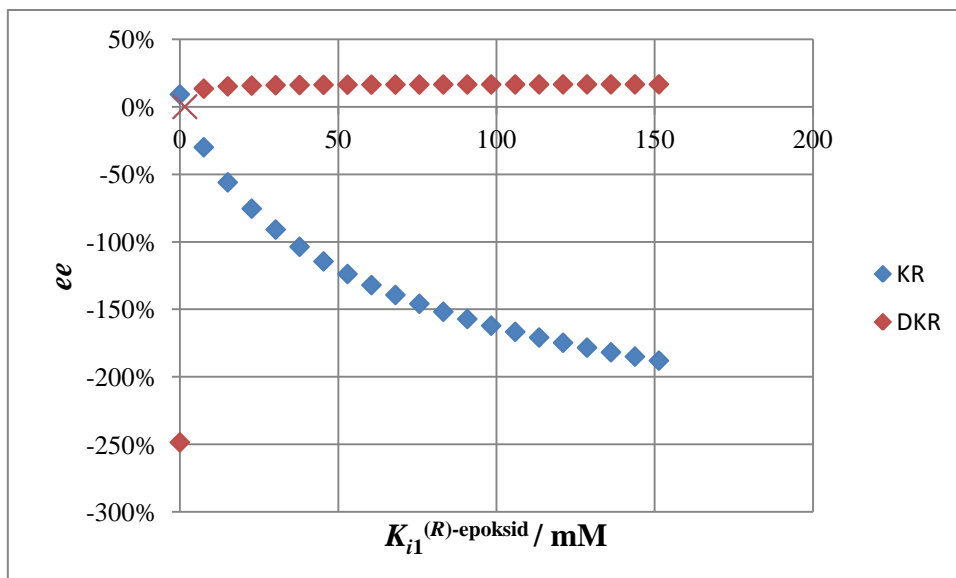
Slika 4.23. Usporedba utjecaja vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata i pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Na slici 4.23 vidljivo je da je za vrijednosti parametra manje od stvarne vrijednosti odstupanje ee kod KR iznosi -214 %, dok za DKR ono iznosi -135 %. Za vrijednosti parametra $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$ veće od stvarne vrijednosti vidljivo je malo odstupanje ee od stvarne vrijednosti i to kod KR od 6 %, a kod DKR svega 1 %.



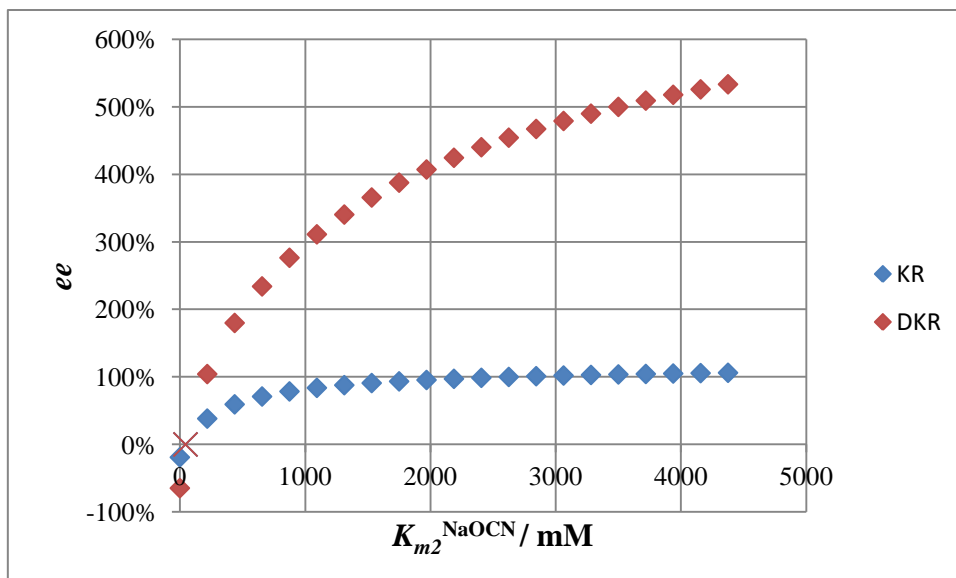
Slika 4.24. Usporedba utjecaja vrijednosti parametra K_{m1}^{NaOCN} na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata i pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Na slici 4.24 vidljivo je da se s povećanjem vrijednosti parametra K_{m1}^{NaOCN} odstupanja ee od stvarne vrijednosti pomiču prema sve većem negativnom odstupanju kako kod KR tako i kod DKR. U početku je odstupanje ee kod KR nešto veće u odnosu na odstupanje ee kod DKR, no na kraju dolazi do promjene. Dakle, za vrijednosti parametra K_{m1}^{NaOCN} 2167,25 mM odstupanje ee kod KR iznosi -188 %, dok kod DKR ono iznosi -196 %.



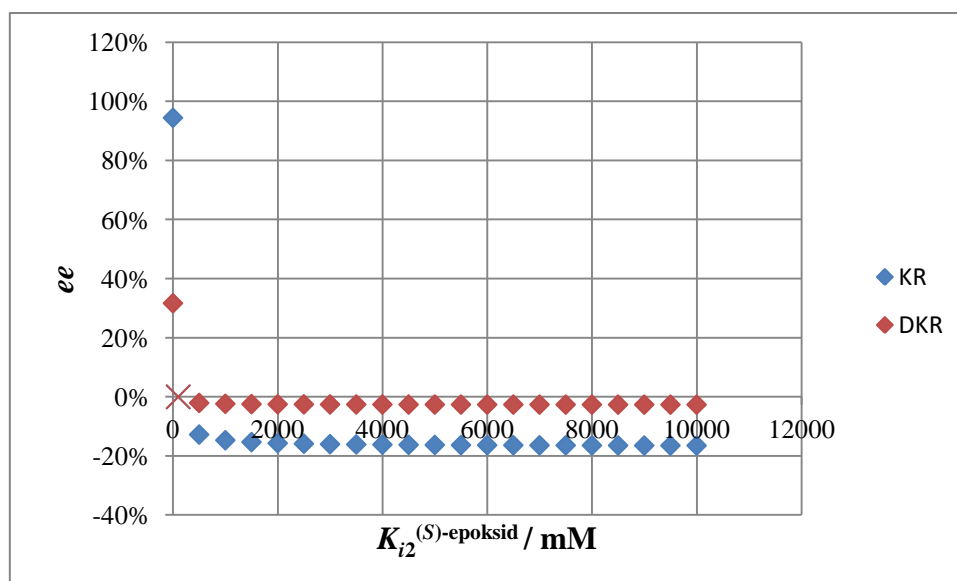
Slika 4.25. Usporedba utjecaja vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)-epoksid}$ na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata i pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Što se tiče parametra $K_{i1}^{(R)-epoksid}$ vidljivo je da se s njegovom promjenom odstupanje ee od stvarne vrijednosti pri KR i DKR dosta razlikuje (slika 4.25). Pri KR se s povećanjem vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)-epoksid}$ odstupanje ee povećava prema negativnoj vrijednosti. Pri DKR prisutno je sljedeće: Za vrijednost parametra $K_{i1}^{(R)-epoksid} = 0,015 \text{ mM}$ (manju od stvarne vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)-epoksid}$) odstupanje ee iznosi -248 %, dok se za sve sljedeće simulacije koje su veće od stvarne vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)-epoksid}$ to odstupanje ee vrlo brzo ustaljuje na vrijednost od 17 %. Stoga je u ovom slučaju DKR povoljnija opcija.



Slika 4.26. Usporedba utjecaja vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata i pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Slika 4.26 prikazuje utjecaj vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} na odstupanje ee od stvarne vrijednosti pri KR i DKR. Za vrijednost parametra K_{m2}^{NaOCN} manju od stvarne vrijednosti odstupanje ee je negativno i kod KR (-19 %) i kod DKR (-65 %). Za vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} veće od stvarne vrijednosti odstupanje ee pri KR u početku se povećava, te je zatim taj porast manje izražen (od 100 % do 106 %). Pri DKR uočljiv je znatno veći rast pozitivnog odstupanja ee od stvarne vrijednosti kako se povećava vrijednost parametra K_{m2}^{NaOCN} .



Slika 4.27. Usporedba utjecaja vrijednosti parametra $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$ na ee produkta pri KR pri 48 %-tnoj konverziji supstrata i pri DKR pri 100 %-tnoj konverziji supstrata.

Slika 4.27 prikazuje utjecaj vrijednosti parametra $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$ na odstupanje ee od stvarne vrijednosti pri KR i DKR. U oba slučaja su odstupanja ee pozitivna za vrijednost parametra manju od stvarne vrijednosti, i to pri DKR odstupanje iznosi 32 %, a pri KR 94 %. Dalje se s povećanjem vrijednosti parametra odstupanje ee od stvarne vrijednosti povećava prema negativnom u oba slučaja. Pri DKR odstupanje ee od stvarne vrijednosti se vrlo brzo ustaljuje na vrijednost od -3 %, dok se kod KR ono ustaljuje na vrijednost od -16 %.

Analiza osjetljivosti parametara može značajno pomoći razvoju novih enzima za određeni reakcijski sustav putem proteinskog inženjerstva. Ovakav rad pokazuje kako je za željeni ishod reakcije potreban usklađeni niz kinetičkih parametara enzima koji su direktno povezani sa strukturom aktivnog mjesta na molekuli enzima. S obzirom na to da se danas putem enzimskih procesa proizvode tvari koje ne možemo pronaći u prirodi, jasno je da je poznavanje strukture enzima, baš kao i poznavanje kinetičkih parametara enzima od ključne važnosti za uspjeh biokatalitičkog procesa.

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu je analizirana osjetljivosti kinetičkih parametara u kaskadnoj reakciji provedbom niza simulacija matematičkog modela. Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije, u kojem je reakcijom *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnih iona uz katalitičko djelovanje HheC u prisutnosti bromidnih iona dobiven (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on, sastoji se od kinetičkog modela i bilancnih jednadžbi. Prema matematičkom modelu kinetičke rezolucije odvija se reakcija 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona uz prisustvo enzima HheC pri čemu nastaje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on. Kako bi se odredilo koji parametri imaju najznačajniji utjecaj na *ee* kod kinetičke rezolucije i dinamičke kinetičke rezolucije provedena je upravo analiza osjetljivosti parametara.

Prilikom analize osjetljivosti parametara na model kinetičke rezolucije ispitani su sljedeći parametri: $V_{m1} = 15,580 \text{ U mg}^{-1}$, $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}} = 5,895 \text{ mM}$, $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}} = 40,017 \text{ mM}$, $K_{m1}^{\text{NaOCN}} = 21,673 \text{ mM}$, $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}} = 1,514 \text{ mM}$, $K_{m2}^{\text{NaOCN}} = 43,771 \text{ mM}$, $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}} = 100 \text{ mM}$. Iz grafičkih prikaza na slikama 4.2 – 4.7 može se zaključiti da svi navedeni kinetički parametri imaju značajan utjecaj na odstupanje *ee* od nulte *ee* vrijednosti. Pri tome u cijelome istraživanom području utjecaj imaju parametri $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ gdje se s povećanjem vrijednosti parametra negativno odstupanje *ee* od nulte vrijednosti povećava, zatim parametar K_{m1}^{NaOCN} gdje s povećanjem vrijednosti parametra odstupanje *ee* od nulte vrijednosti doseže i do -188 %. S povećanje vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} odstupanje *ee* od nulte *ee* vrijednosti doseže 106 % (slika 4.6). Ostali ispitani parametri imaju utjecaj samo u manjem dijelu ispitivanog područja nakon čega se s daljnjim povećanjem ili smanjenjem pojedinog parametra odstupanja više značajno ne mijenjaju. Tako, primjerice parametar $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}}$ za vrijednost manju od stvarne vrijednosti parametra odstupanje *ee* iznosi 94 %, dok za vrijednosti parametra veće od stvarne odstupanje *ee* vrlo brzo stagnira na -16 % i s daljnjim povećanjem vrijednosti parametara odstupanje se ne mijenja (slika 4.7).

S obzirom na to da je kod kinetičke rezolucije maksimalni prinos svega 50 %, a i odvajanje optički aktivnog supstrata i produkta je otežano, simulacije su provedene i za model DKR tj. uz dodatak bromidnih iona.

Analiza osjetljivosti parametara na model dinamičke kinetičke rezolucije uključuje analizu sljedećih parametara: $V_{m1} = 15,580 \text{ U mg}^{-1}$, $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}} = 5,895 \text{ mM}$, $K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}} = 40,017 \text{ mM}$, $K_{m1}^{\text{NaOCN}} = 21,673 \text{ mM}$, $K_{i1}^{\text{NaBr}} = 0,408 \text{ mM}$, $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}} = 1,514 \text{ mM}$, $K_{m2}^{\text{NaOCN}} = 43,771 \text{ mM}$, $K_{i2}^{\text{NaBr}} = 0,037 \text{ mM}$, $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}} = 100 \text{ mM}$, $K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}} = 11,855 \text{ mM}$, $K_{m3}^{\text{NaBr}} = 0,067 \text{ mM}$, $K_{i4}^{(S)\text{-epoksid}} = 10 \text{ mM}$, $K_{m4}^{\text{NaBr}} = 0,145 \text{ mM}$. Svi ispitani parametri imaju utjecaj na odstupanje ee od nulte ee vrijednosti. Veći utjecaj na odstupanje ee od nulte vrijednosti imaju parametri $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ gdje se s povećanjem vrijednosti parametra povećava negativno odstupanje ee , te pri najvećoj ispitivanoj vrijednosti parametra odstupanje ee iznosi -289 % (slika 4.9). Također s povećanjem vrijednosti parametra K_{m1}^{NaOCN} odstupanje ee se povećava prema negativnoj vrijednosti te za najveću vrijednost ovog parametra odstupanje ee iznosi -196 %. S povećanjem vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} odstupanje ee od nulte vrijednosti se povećava, te za najveću ispitivanu vrijednosti parametra odstupanje iznosi čak 533 %. Utjecaj vrijednosti parametra na odstupanje ee vrijednosti u cijelom ispitivanom području vidljiv je i kod parametra K_{m3}^{NaBr} s čijim se povećanjem povećava i odstupanje ee do 32 %. Parametar K_{m4}^{NaBr} ima malo drugačiji utjecaj od ostalih. S povećanjem vrijednosti parametra doseže se maksimum odstupanja ee od 16 % kod šeste simulacije, odnosno kod vrijednosti parametra 3,615 mM, a zatim se daljnjim povećanjem vrijednosti parametra odstupanje smanjuje i prelazi u negativno do vrijednosti od -11 %. Ostali ispitivani kinetički parametri imaju utjecaj u manjem ispitivanom području.

Slike 4.21 – 4.27 prikazuju usporedbu utjecaja pojedinog parametra na odstupanje ee pri KR i DKR. Primjerice povećanjem vrijednosti parametra V_{m1} i kod KR i kod DKR odstupanja od ee rastu prema pozitivnom, ali kod KR je to odstupanje veće u odnosu na DKR. Za vrijednosti parametra V_{m1} koje su manje od stvarne vrijednosti KR je povoljnija opcija, dok je za vrijednosti parametra V_{m1} veće od stvarne vrijednosti tog parametra odstupanje od ee povoljnije kod DKR. KR povoljnija je još za vrijednosti parametra $K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$ veće od stvarne vrijednosti, zatim za sve ispitivane vrijednosti parametra K_{m2}^{NaOCN} . Za vrijednosti parametra $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$ manje od stvarne vrijednosti KR je također povoljnija opcija. Za ostale kinetičke parametre povoljnija je DKR.

U analizi osjetljivosti parametara dane kaskadne reakcije vidljivo je da svi oni imaju određeni utjecaj na odstupanje ee od nulte vrijednosti. Analiza osjetljivosti parametara može značajno pomoći razvoju novih enzima za određeni reakcijski sustav putem proteinskog inženjerstva.

6. POPIS SIMBOLA

DKR – dinamička kinetička rezolucija

E – enantiomerni omjer, %

E – enzim

E_a – energija aktivacije, kJ

ee – enantiomerni višak (engl. *enantiomeric excess*), %

ee_R – enantiomerni višak supstrata, %

ee_P – enantiomerni višak produkta, %

ES – kompleks enzim-supstrat

G – slobodna Gibbsova energija, kJ

HHDH – halogenhidrin-dehalogenaza (engl. *halohydrin dehalogenase*)

HheC – tip halogenhidrin dehalogenaza (C tip)

KR – kinetička rezolucija

k_1, k_2, k_{-1} – konstante brzine reakcija formacije i disocijacije kompleksa enzim-supstrat te nastajanja produkta, min^{-1}

k_d – konstanta deaktivacije, min^{-1}

K_i – konstanta inhibicije, mmol dm^{-3}

K_m – Michaelisova konstanta, mmol dm^{-3}

KR – kinetička rezolucija

P – produkt

pH – negativan logaritam aktiviteta vodikovih iona

rac-epoksid – racemična smjesa epoksida

S – supstrat

t – vrijeme, s

V_m – maksimalna brzina enzimske reakcije, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$

X – konverzija, %

Δ – promjena

v – brzina reakcije, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$

v_0 – početna brzina reakcije, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$

7. LITERATURA

Agranat I., Caner H., *Intellectual property and chirality of drugs*. Drug Discovery Today, 4(7):313–314 (1999).

Andrade L. H., Kisukuri C. M.; *Production of chiral compounds using immobilized cells as a source of biocatalysts*; Organic & Biomolecular Chemistry, 13(40), 10086–10087 (2015).

Anslyn E. V, Leung D., Kang S. O.; *Rapid determination of enantiomeric excess: a focus on optical approaches*. Chemical Social Review, 41(1):448–479 (2012).

Champe P. C., Harvey R. A., Ferrier D.R.; *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*, Lippincott Williams & Wilkins 57-60 (2005).

Crosby J., *Synthesis of optically active compounds: A large scale perspective*. Tetrahedron, 47(27):4813–4814 (1991).

Eun H. M., *Enzymes and Nucleic Acids. Enzymology Primer for Recombinant DNA Technology*, 38-39 (1996).

Illanes A.; *Enzyme Biocatalysis - Principles and Applications*, Springer, 1-31 (2008).

Janssen D. B. & de Vries E. J.; *Biocatalytic conversion of epoxides*. Current Opinion in Biotechnology, 14(4), 414–420 (2003).

Janssen D. B., Majerić Elenkov M., Tang L., B. Hauer B.; *Sequential Kinetic Resolution Catalyzed by Halohydrin Dehalogenase*, Organic letters, 8(19):4227-4229 (2006).

Janssen D.B., Majerić-Elenkov M., Hasnaoui G., Hauer B., Lutje Spelberg J.H.; *Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases*, Biochemical Society Transactions 34(2):291- 295 (2006).

Kaushik N., Biswas S., Singh J.; *Biocatalysis & Biotransformation Processes – An Insight*, The Scitech Journal 1(8):15-22 (2014).

Kosar V., *Reaktori i bioreaktori (1. Reaktori) nastavni tekstovi*, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, Zagreb,1-6 (2017).

Kumar K., Ciulla M. G., Zimmermann S.; *Cascade synthesis strategies targeting biologically intriguing indole polycycles*. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 17:(3):414 (2019).

Lowy F. D.; *Oxazolidinones*, *Infectious Diseases*, 1230–1232 (2017).

Lutje Spelberg J. H., Tang L., van Gelder M., Kellogg R. M., Janssen D.B.; *Exploration of the biocatalytic potential of a halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates*, *Tetrahedron: Asymmetry* 13(10):1083–1089 (2002).

Majerić Elenkov M., Hauer B., Janssen D. B.; *Enantioselective Ring Opening of Epoxides with Cyanide Catalysed by Halohydrin Dehalogenases: A New Approach to Non-Racemic β -Hydroxy Nitriles*, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348(4-5):579-585 (2006).

Majerić Elenkov M., Hauer B., Janssen D. B.; *Enantioselective Ring Opening of Epoxides with Cyanide Catalysed by Halohydrin Dehalogenases: A New Approach to Non-Racemic β -Hydroxy Nitriles*. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348(4-5):579–585 (2006).

Miklešević A., Hameršak Z., Salopek-Sondi B., Tang L., Janssen D. B, & Majerić Elenkov M.; *Oxazolidinone Synthesis through Halohydrin Dehalogenase- Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution*; *Advanced Synthesis & Catalysis*, 357(8), 1709–1714 (2015).

Milčić N., Sudar M. i Findrik Blažević Z.: *Primjena matematičkog modeliranja u razvoju enzimskih kaskadnih reakcija*, *Kem. Ind.* 68(9-10):427–436 (2019).

Pandit N., Singla R. K., Shrivastava B.; *Current Updates on Oxazolidinone and Its Significance*, *International Journal of Medicinal Chemistry*, 1–3 (2012).

Patti A., *Methods for the Preparation of Optically Active Chiral Compounds*. *Green Approaches To Asymmetric Catalytic Synthesis*, 1–27 (2011).

Raval R., Barlow S. M.; *Complex organic molecules at metal surfaces: bonding, organisation and chirality*. *Surface Science Reports*, 50(6-8):206–207 (2003).

Saibi W., Abdeljalil S., Masmoundi K., Gargouri A.; *Biocatalysts: Beautiful creatures*, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 426(3):289-293 (2012).

Schallmey A., Schallmey M., *Recent Advances on Halohydrin Dehalogenases – From Enzyme Identification to Novel Biocatalytic Applications*, Applied Microbiology and Biotechnology, 100:7827 – 7839 (2016).

Shoda S., Uyama H., Kadokawa J., Kimura S., Kobayashi S.; *Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis*, Chemical reviews, 116(4):2307-2413 (2016).

Šinko G.; *Preparations and Biological Properties of Chiral Compounds*, Arhiv za higijenu rada i toksikologiju, 56 351 – 361 (2005).

Vasić-Rački Đ., Findrik Z., Vrsalović Presečki A.; *Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development*, Applied Microbiology and Biotechnology, 91(4):845–856 (2011).

Vrsalović Presečki A., Findrik Z., and Zelić B.; *Modeling of the Biotransformation Processes*, Chemical and Biochemical Engineering Quarterly 20(3):227-241 (2006).

8. DODATAK

Prilog 1. Matematički model korišten za provedbu simulacija za DKR

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t
DepVars: P,R,S,Pr,Ps,X,ee
Params:
//kineticki model
r1=Vm1*S*OCN*HHDH*exp(-
kd*t)/((Km1S*(1+R/Ki1R)+S+S*S/Ki1S)*(OCN+Km1OCN*(1+Br/Ki1Br)))
r2=k2*R*OCN*HHDH*exp(-kd*t)/((Kmocn2*(1+Br/Ki2Br)+ocn)*(1+S/Ki2S))
r3=k3*S*Br*HHDH*exp(-kd*t)/((Km3Br+Br)*(1+R/Ki3R))
r4=k4*R*Br*hhdh*exp(-kd*t)/((Kmbr4+Br)*(1+S/Ki4S))
r5=k5*Al
//bilance tvari
S'=-r1-r3+0.5*r5
R'=-r2-r4+0.5*r5
OCN'=-r1-r2
Al'=r4+r3-r5
Br'=-r4-r3+r5
PS'=r1
PR'=r2
P=Pr+Ps
E=R+S
ee=(Ps-Pr)/P
X=(E1-E)/E1
//pocetni uvjeti
t=0
S=50
R=50
Al=0
OCN=150
Br=50
PS=0
PR=0
E1=100
HHDH=1.1
//r1
Vm1=15.5803
Km1S=5.895
Ki1S=40.017
Km1OCN=21.6725
Ki1Br=0.40794
Ki1R=1.5139

//r2
k2=0.0261
KmOCN2=43.771
Ki2Br=0.0373
```

Ki2S=100
//r3
Ki3R=11.855
k3=0.0816
Km3Br=0.066721
//r4
Ki4S=10
k4=0.0319
Kmr4=0.14456
//r5
k5=0.055
kd=0

* za KR korišten je isti model kao i za DKR samo što je koncentracija bromidnih iona stavljena na 0 ($\text{Br}^- = 0$).

9. ŽIVOTOPIS

Barbara Cvetić [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje završila je u O.Š. Ljubo Babić Jastrebarsko, nakon čega je upisala Opću gimnaziju u Srednjoj školi Jastrebarsko. Maturirala je 2015. godine. Iste godine upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Primijenjena kemija. 2018. godine završila je preddiplomski studij obranom završnog rada na temu *Sinteza oksazolidinona u prisustvu halogenhidrin dehalogenaze*, te stekla titulu prvostupnice primijenjene kemije. Iste godine upisala je diplomski studij Primijenjene kemije, smjer Specifični materijali i napredne tehnologije.