

Optimiranje kaskadne reakcije sinteze (3S,4R)-5-[N-(benziloksikarbonil)amino]-5-deokspent-2-uloze

Slivar, Anamarija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:149:142290>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Anamarija Slivar

**OPTIMIRANJE KASKADNE REAKCIJE SINTEZE
(3S, 4R)-5-[N-(BENZILOKSIKARBONIL)AMINO]-5-
DEOKSIPENT-2-ULOZE**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Đurđa Vasić-Rački

Članovi ispitnog povjerenstva: Prof. dr. sc. Đurđa Vasić-Rački

Izv. prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Izv. prof. dr. sc. Irena Škorić

Zagreb, rujan 2015.

Iskreno i srdačno se zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Đurđi Vasić Rački na pruženoj prilici da učim pod njenim mentorstvom, a koja mi je ujedno svojim stručnim savjetima, sugestijama i podrškom pomogla pri izradi ovog rada.

Veliko hvala asistentici dr. sc. Martini Sudar na beskrajnom strpljenju i razumijevanju koje je imala, te pomoći koju mi je ukazala prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se izv. prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na pomoći pri izradi ovog rada.

Također, hvala djelatnicima Zavoda za reakcijsko inženjerstvo i katalizu na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Veliko hvala mojim roditeljima, sestri i prijateljima koji su mi bili velika podrška i pomoć tijekom studija.

I na kraju hvala mojim kolegama na druženju i bodrenju. Bez vas mi studentski dani ne bi bili tako lijepi!

SAŽETAK

U ovom radu je proučavana sinteza (3S, 4R)-5-[N-(benziloksikarbonil)amino]deokspent-2-uloze u kaskadnoj reakciji oksidacije etanolamina kataliziranoj alkohol dehidrogenazom koja je izolirana iz konjske jetre uz regeneraciju koenzima kataliziranom NADH oksidazom i aldolne adicije dihidroksiacetona (DHA) na N-Cbz-glicinal kataliziranoj D-fruktoza-6-fosfat aldolazom (FSA A129N) porijeklom iz *Escherichia coli*.

Kinetika reakcije aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal i oksidacije etanolamina ispitana je metodom početnih brzina reakcije. Ispitan je utjecaj koncentracija supstrata (DHA, N-Cbz-glicinala) i produkta (aldola) na početnu brzinu reakcije aldolne adicije. Kako se radi o povratnoj reakciji ispitana je i utjecaj koncentracija supstrata (aldola) i produkta (DHA, N-Cbz-glicinala) na početnu brzinu retro-aldolne reakcije. Kod reakcije oksidacije etanolamina ispitana je utjecaj supstrata (etanolamina i NAD^+) na početnu brzinu reakcije oksidacije. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri metodom nelinearne regresije, te su razvijeni matematički modeli reakcija u kotlastom reaktoru. Razvijen matematički model u kotlastom reaktoru za reakciju aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal validiran je eksperimentalno i dobro opisuje eksperimentalne podatke.

Razvijen je i matematički model kaskadne reakcije oksidacije etanolamina katalizirane s ADH uz regeneraciju koenzima kataliziranu NADH oksidazom i aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal katalizirane s FSA A129N, uz pomoć kojeg je provedena optimizacija kaskadne reakcije. Varirane su koncentracije enzima FSA, ADH, NOX-a i koenzima NAD^+ kako bi se dobilo najveće iskorištenje na konačnom produktu.

Optimizacijom kaskadne reakcije uz pomoć razvijenog matematičkog modela dobiveno je najveće iskorištenje od 77,96 % pri koncentraciji FSA od $0,5 \text{ mg/cm}^3$, HLADH od 15 mg/cm^3 , NOX od $0,1 \text{ mg/cm}^3$ i NAD^+ od $1,0 \text{ mmol/dm}^3$.

Ključne riječi: kaskadna reakcija, aldolna adicija, oksidacija, matematički model, optimizacija

ABSTRACT

The synthesis of (3S, 4R)-5-[N-(benzyloxycarbonyl)amino]deoxypent-2-ulose in a cascade reaction of ethanolamine oxidation catalyzed by alcohol dehydrogenase isolated from horse liver with coenzyme regeneration catalyzed with NADH oxidase and aldol addition of dihydroxyacetone (DHA) to N-Cbz-glycinal catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase (FSA A129N) from *Escherichia coli* was studied in this paper.

Reaction kinetics of aldol addition of DHA to N-Cbz-glycinal and ethanolamine oxidation were investigated using initial reaction rate method. The influence of substrate (DHA, N-Cbz-glycinal) and product concentration (aldol) on the initial reaction rate of aldol addition was investigated. Since this is an equilibrium reaction, the influence of substrate (aldol) and product concentration (DHA, N-Cbz-glycinal) on the initial reaction rate of the retro-aldol reaction was also investigated. The influence of substrate concentration (ethanolamine, NAD^+) on the initial reaction rate in the reaction of ethanolamine oxidation was investigated. Kinetic parameters were estimated from the experimental data by the non-linear regression method and mathematical models of reactions in batch reactor were developed.

Developed mathematical model in the batch reactor for the aldol addition of DHA to N-Cbz-glycinal was validated experimentally and it described experimental data well.

Mathematical model for the cascade reaction of ethanolamine oxidation catalyzed with ADH with coenzyme regeneration catalyzed with NADH oxidase and aldol addition of DHA to N-Cbz-glycinal catalyzed with FSA A129N was developed. Furthermore, optimization of this cascade reaction was conducted. Concentrations of enzymes FSA, ADH, NOX and coenzyme NAD^+ are varied to give the maximum yield of the product.

Optimization of the cascade reaction with the help of the developed mathematical model gave the highest yield of 77.96 % at concentrations of FSA at 0.5 mg/cm^3 , HLADH 15 mg/cm^3 , NOX 0.1 mg/cm^3 and NAD^+ 1.0 mmol/dm^3 .

Key words: cascade reaction, aldol addition, oxidation, mathematical model, optimization

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. ENZIMI.....	2
2.2. ALDOLAZE.....	4
2.2.1. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza	5
2.3. ALKOHOL DEHIDROGENAZA	6
2.4. REGENERACIJA KOENZIMA	7
2.4.1. Koenzim nikotinamid adenin dinukleotid	8
2.5. KASKADNE REAKCIJE	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	11
3.1. KEMIKALIJE	11
3.2. APARATURA	11
3.2.1. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC).....	11
3.2.2. Inkubator	12
3.2.3. Tresilica.....	12
3.2.4. Analitička vaga.....	13
3.2.5. Centrifuga.....	14
3.2.6. Spektrofotometar	14
3.3. METODE	15
3.3.1. Mjerenje koncentracija reaktanta i produkta kapljevinskom kromatografijom visokog učinka.....	15
3.3.2. Postupak odštićivanja N-Cbz-glicinala	15
3.3.3. Određivanje kinetike aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal	16
3.3.3.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije	17
3.3.3.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije	17
3.3.3.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu reakcije aldolne adicije	18
3.3.4. Određivanje kinetike retro-aldolne reakcije DHA na N-Cbz-glicinal.....	18
3.3.4.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije	18
3.3.4.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu retro-aldolne reakcije.....	18

3.3.4.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije DHA na početnu brzinu retro-aldolne reakcije	19
3.3.5. Provedba eksperimenata u kotlastom reaktoru.....	19
3.3.6. Određivanje kinetike reakcije oksidacije etanolamina	19
3.3.6.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije.....	20
3.3.6.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije	21
3.4. OBRADA PODATAKA	21
4. MATEMATIČKO MODELIRANJE	22
4.1. MATEMATIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-Cbz-GLICINAL U KOTLASTOM REAKTORU	22
4.2. MATEMATIČKI MODEL OKSIDACIJE ETANOLAMINA.....	22
4.3. MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE	23
5. REZULTATI I RASPRAVA	25
5.1. UKLANJANJE ZAŠTITNE SKUPINE N-Cbz-GLICINALA.....	25
5.2. ALDOLNA ADICIJA DHA NA N-Cbz-GLICINAL U KOTLASTOM REAKTORU	26
5.3. ODREĐIVANJE KINETIKE REAKCIJE ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-Cbz-GLICINAL	27
5.3.1. Utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije	27
5.3.2. Utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije	28
5.3.3. Utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu reakcije aldolne adicije	29
5.4. ODREĐIVANJE KINETIKE RETRO-ALDOLNE REAKCIJE	30
5.4.1. Utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije	30
5.4.2. Utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu retro-aldolne reakcije	31
5.4.3. Utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu retro-aldolne reakcije ..	32
5.5. VALIDACIJA MATEMATIČKOG MODELA	33
5.6. ODREĐIVANJE KINETIKE REAKCIJE OKSIDACIJE ETANOLAMINA	36
5.6.1. Utjecaj koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane enzimom HLADH	36
5.6.2. Utjecaj koncentracije NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane enzimom HLADH	37
5.6.3. Utjecaj koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane komercijalnim enzimom ADH	38
5.6.4. Utjecaj koncentracije NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane komercijalnim enzimom ADH	39
5.6.5. Regeneracija koenzima.....	40
5.7. OPTIMIZACIJA KASKADNE REAKCIJE.....	41
6. ZAKLJUČAK	48

7. SIMBOLI	49
8. LITERATURA.....	50
9. PRILOZI.....	53
PRILOG 1.	53
PRILOG 2.	53
PRILOG 3. – Program u SCIENTIST-u	54
Prilog 3.1. Jednosupstratni kinetički model za određivanje kinetike	54
Prilog 3.2. Dvosupstratni kinetički model za određivanje kinetike	54
Prilog 3.3. Matematički model kaskadne reakcije	55
ŽIVOTOPIS	56

1. UVOD

Ubrzani razvoj današnjeg društva uz napredak nosi i negativnu stranu. Posljedica takvog ubrzanog razvoja je onečišćenje okoliša. Smatra se da su kemijska i farmaceutska industrija jedne od najvećih svjetskih onečišćivača okoliša [1]. Budući da je zaštita okoliša jedno od najvažnijih pitanja u 21. stoljeću, kemijska i farmaceutska industrija se moraju prilagoditi novim propisima i zakonima. To je važno za razvoj novih procesa koji će generirati manje otpada, trošiti manje energije, resursa i vode [2]. Zato se u današnje vrijeme sve više pažnje poklanja zaštiti okoliša, te se prilikom proizvodnje kemikalija i farmaceutskih pripravaka prelazi na „čistije“ tehnologije kako bi se očuvao okoliš. Jedna od takvih tehnologija je i upotreba biokatalize u kemijskoj industriji. Povećan interes za upotrebom biokatalize u kemijskoj industriji proizlazi iz smanjenja otpadnih tvari u postupku proizvodnje [3].

Napredak kemijske sinteze se odvija vrlo brzo. Novi spojevi se sintetiziraju svaki dan i više nije pitanje što se može sintetizirati, već kako to učiniti [1]. Klasičan pristup sintezi obično uključuje više reakcijskih koraka koji se izvode u odvojenim fazama. Takva sinteza rezultira niskim prinosima i skupim produktima te je jasno da postoji potreba za novim vrstama procesa koje će riješiti taj problem. Rješenje mogu biti kaskadne reakcije čije se prednosti očituju u manjoj količini otpada nakon procesa, u manjem volumenu otapala i reaktora, te u višim prinosima i kraćem trajanju procesa [2]. Za postizanje manje količine otpada i veće konverzije produkta potrebno je provesti optimizaciju kaskadnih reakcija. Optimizacija je vrlo važna za postizanje učinkovitosti [4], te iz ekonomskih razloga [5].

2. OPĆI DIO

2.1. ENZIMI

Velik dio povijesti biokatalize odnosi se na istraživanje enzima. Biološka kataliza prvi puta je prepoznata i opisana u kasnim godinama osamnaestog stoljeća, u studijama o razgradnji mesa pomoću želučanih izlučevina. Istraživanja su se nastavila i u devetnaestom stoljeću s ispitivanjima pretvorbe škroba u šećer u slini i različitim biljnim ekstraktima. 1850. godine Louis Pasteur je proučavanjem fermentacije šećera u alkohol pomoću kvasca došao do zaključka da je fermentacija moguća uslijed postojanja fermenta u kvascu. 1897. godine Edward Buchner je otkrio da ekstrakt kvasca može fermentirati šećer u alkohol, iako u cijeloj smjesi nije bilo prisutnih živih stanica kvasaca. Frederick W. Kühne naziva te molekule enzimima [6].

Postupci izolacije i kristalizacije ureaze koje je razvio James Sumner 1926. godine osigurale su veliki napredak u ranim studijama o enzimima. Sumner je utvrdio da se kristali ureaze sastoje isključivo od proteina, pa je pretpostavio da su svi enzimi proteini. U nedostatku drugih dokaza, ova ideja je ostala kontroverzna neko vrijeme. Tek 1930. godine Sumnerov zaključak je prihvaćen, nakon što su John Northrop i Moses Kunitz kristalizirali pepsin, tripsin, i druge probavne enzime za koje su otkrili da su također proteini. Iako molekularna priroda enzima nije bila još u potpunosti priznata, Haldane je razvio hipotezu da se slabe interakcije vezanja između enzima i njegovog supstrata mogu koristiti za kataliziranje reakcija. U drugom dijelu dvadesetog stoljeća, istraživanje enzima postaje intenzivno. To je dovelo do pročišćavanja tisuća enzima, izučavanja strukture i kemijskog mehanizma mnogih od njih, te općeg razumijevanja o tome kako enzimi funkcioniraju [6].

U biološkom sustavu neprekidno se odvija vrlo velik broj promjena koje zahtijevaju brze kemijske reakcije za dobavljanje energije i oblikovanje stanica. Stoga biološki sustav zahtijeva katalizatore koji mogu funkcionirati u skladu s uvjetima u organizmu. Odabranom kontrolom ubrzavanja specifičnih reakcija u određeno vrijeme, ti biološki katalizatori (enzimi) djelotvorno funkcioniraju neovisno o promjenama koje mogu razoriti ili ubiti stanice [7].

Enzimi ubrzavaju kemijske reakcije, provodeći reakciju drugim reakcijskim putem s manjom energijom aktivacije i pravilno orijentirajući molekule koje se sudaraju. Tako se, bez povećanja temperature ili tlaka, u živoj stanici odvija golem broj kemijskih reakcija.

Enzimi kataliziraju reakcije koje su od 10^8 do 10^{20} puta brže od reakcija koje se odvijaju bez enzima. Sudjeluju u reakcijama metabolizma, disanju (respiraciji), pretvorbi i prenošenju energije, i u sintezi različitih makromolekula i staničnih sastojaka. Poznato je i opisano više od dvije tisuće različitih enzima, a svaki od njih može katalizirati specifičnu reakciju [7].

Enzimi, poput drugih proteina, imaju molekulsku masu u rasponu od oko 12000 do više od 1 milijuna Da [6]. Mnogi enzimi su samo proteini i nazivaju se jednostavni enzimi. Za razliku od njih, enzimi koji sadržavaju i neproteinske skupine, nazivaju se konjugirani enzimi. Proteinski se dio naziva apoenzim, a neproteinski dio koenzim (kofaktor). Apoenzim i koenzim zajedno tvore potpun enzim – holoenzim. Kada je kofaktor metalni ion (npr. magnezij, cink, željezo, bakar ili mangan), govori se o aktivatoru [7].

Koenzimi djeluju kao nosioci pojedinih prijelaznih funkcionalnih skupina. Najčešće potječu iz vitamina, organskih hranjivih tvari potrebnih u malim količinama u prehrani [6].

Svaki enzim ima funkcionalnu ili optimalnu pH vrijednost i temperaturu jer brzina enzimskih reakcija najvećim dijelom ovisi o tim čimbenicima. Temperatura i pH utječu ne samo na privlačne sile između pojedinih aminokiselinskih ostataka u molekuli enzima nego i na reakcije između enzima i supstrata na koji enzim djeluje i koji se, djelovanjem enzima, kemijski mijenja. Enzimi ostaju nepromijenjeni nakon procesa koje kataliziraju. Neki od njih su posve specifični, pa kataliziraju samo određenu reakciju [7].

Enzimi su klasificirani prema reakcijama koje kataliziraju. Mnogi enzimi su nazvani dodavanjem sufiksa "-aze" na ime svog supstrata, riječ ili izraz koji opisuje njihovu djelatnost. Ponekad isti enzimi imaju dva ili više imena, odnosno dva različita enzima imaju isti naziv. Zbog takvih nejasnoća, i stalno rastućeg broj novootkrivenih enzima, biokemičari su međunarodnim ugovorom usvojili sustav za imenovanje i klasificiranje enzima [6].

Prema *Međunarodnom savezu za biokemiju* enzimi se mogu podijeliti u šest osnovnih skupina prema tipu reakcije koje kataliziraju [8]:

- Oksidoreduktaze su enzimi koji kataliziraju reakcije oksidacije i redukcije.
- Transferaze su enzimi koji kataliziraju reakcije u kojima dolazi do premještanja različitih grupa s jedne molekule na drugu (npr. aldehidne, ketonske grupe).
- Hidrolaze kataliziraju reakcije u kojima dolazi do hidrolize.
- Liaze kataliziraju reakcije u kojima se supstrat raspada na dvije komponente i reakcije eliminacije uz stvaranje dvostruke veze ili adicije na dvostruku vezu.

- Izomeraze su enzimi koji kataliziraju pregradnju unutar molekula pri čemu se uspostavlja ravnoteža između izomera. Izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije kao što je migracija C=C veze.
- Ligaze kataliziraju reakcije u kojima dolazi do nastajanja novih spojeva uz pomoć energije neke treće komponente koja se oslobađa raspadom te komponente (najčešće adenzintrifosfat koji se raspada na adenzindifosfat i fosfat ili adenzinmonofosfat i difosfat). Ovi enzimi kataliziraju stvaranje C-O, C-N i C-C veze.

2.2. ALDOLAZE

Reakcija aldolne adicije jedna je od najčešćih metoda formiranja ugljik - ugljik (C-C) veze [9]. Biokatalitičke metode provođenja ovih reakcija imaju prednost pred neenzimatskom metodologijom [10]. Iako postoje različiti načini katalize aldolne reakcije, „zeleni“ način bio bi uz pomoću biokatalize, odnosno korištenjem enzima – aldolaza [11, 12].

Aldolaze pripadaju skupini ligaza koje kataliziraju reverzibilnu selektivnu adiciju nukleofilnog donora na elektrofilni aldehidni akceptor [13]. Istovremeno uz formiranje C – C veze između nukleofila i elektrofila stvaraju se jedan ili dva nova stereocentra [14]. Prednost aldolaze je što vrlo često može kontrolirati stereokemiju novoformiranog stereo centra [11, 15] bez obzira na strukturu i stehiometriju supstrata [16]. Aldolaze se koriste za sintezu kompleksnih spojeva, kao što su ugljikohidrati, aminokiseline i njihovi analogi polazeći od akiralnih i jednostavnih materijala [15].

Aldolaze se dijele prema kataličkom mehanizmu na dvije osnovne skupine, na aldolaze prve i druge klase [14]:

- Aldolaze I klase formiraju intermedijer u obliku Schiffove baze sa supstratom na aktivnom mjestu.
- Aldolaze II klase ovise o dvovalentnom metalnom kofaktoru (Zn^{2+}) koji na aktivnom mjestu djeluje kao Lewisova kiselina.

Aldolaze II klase su stabilnije od aldolaze I klase što je važno za njihovu primjenu. Aldolaze II klase nalaze se u prokariotima i eukariotima niže vrste [15].

Aldolaze je moguće klasificirati i prema vrsti nukleofila koju koriste kao supstrat. Prema supstratima koje koriste, aldolaze se klasificiraju kao [11]:

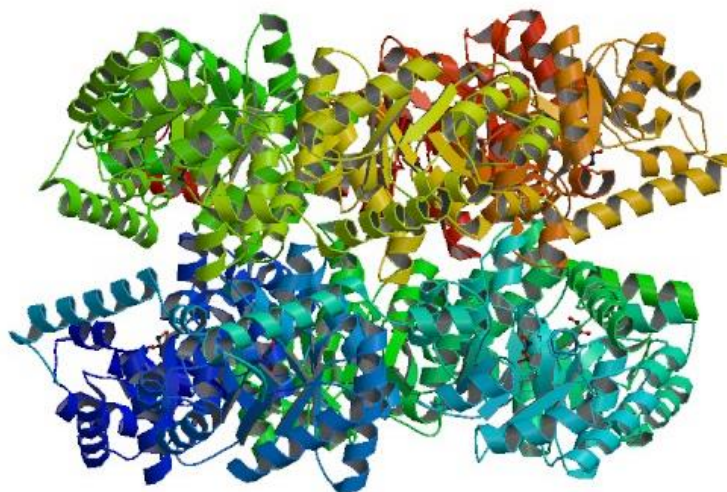
- Dihidroksiaceton fosfat (DHAP) ovisne aldolaze
- Dihidroksiaceton (DHA) ovisne aldolaze
- Piruvat/ 2-oksobutirat ovisne aldolaze
- Acetaldehid ovisne aldolaze
- Glicin / alanin ovisne aldolaze.

2.2.1. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza

Aldolaza korištena u ovom radu je D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA) izolirana iz *Escherichia coli* [17]. FSA pripada skupini aldolaza klase I koja se odnosi na novu skupinu bakterijskih transaldolaza za koje je utvrđeno da kataliziraju adiciju DHA na D-gliceraldehid-3-fosfat. Ovaj enzim koristi nefosforilirani dihidroksiaceton (DHA) kao donor umjesto skupog i nestabilnog dihidroksiaceton fosfata (DHAP) [13].

FSA je prvi put izolirana 2001. godine [13]. Ovaj enzim pokazao se kao robustan i koristan katalizator za aldolne adicije velikog broja različitih donora i akceptora [18, 19].

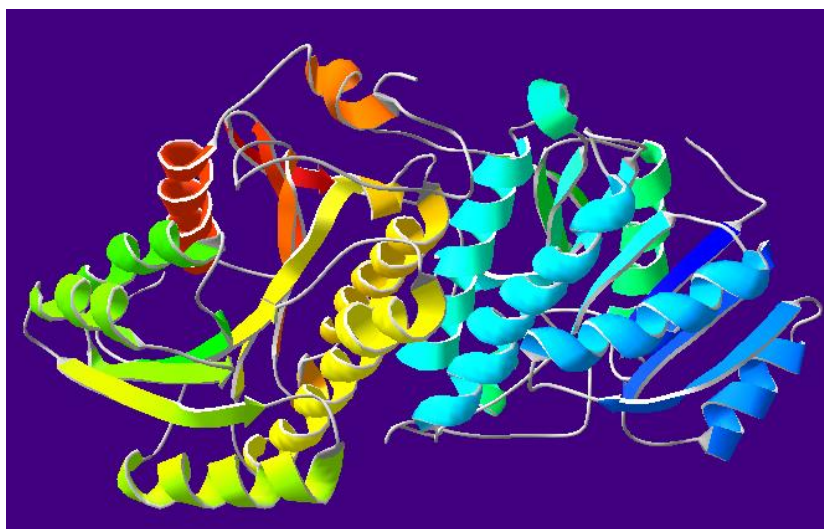
Trodimenzionalna struktura ovog enzima određena je pri rezoluciji 1,93 Å pojedinačnom izomorfnom izmjenom i deseterostrukom nekristalografičnom simetrijom. Struktura FSA se sastoji od pet podjedinica složenih kao peterokut i dva koluta oko njih što je moguće vidjeti na slici 2.1. [20].



Slika 2.1. Struktura enzima D-fruktoza-6-fosfat aldolaze [21]

2.3. ALKOHOL DEHIDROGENAZA

Enzim alkohol dehidrogenaza (ADH) spada u skupinu oksidoreduktaza (Slika 2.2.). Prvi puta je izoliran 1937. godine iz pekarskog kvasca (*Saccharomyces cerevisiae*), koji se koristi kao najčešći izvor ovog enzima. Osim u pekarskom kvascu, alkohol dehidrogenaza je široko rasprostranjen enzim u prirodi i može se pronaći i u drugim živim bićima, pa tako i u ljudskom organizmu. Ljudski organizam ga koristi kao osnovnu obranu od toksičnog djelovanja alkohola. Visoka koncentracija tog enzima u jetri i želucu pretvara alkohol u acetaldehid koji dalje prelazi u acetat i druge molekule koje stanice mogu koristiti i nisu toksične za organizam. Tako se potencijalno štetne molekule uz pomoć alkohol dehidrogenaze pretvaraju u hranu. Osim alkohola supstrati mogu biti steroidi i masne kiseline [22].



Slika 2.2. Alkohol dehidrogenaza [23]

ADH se često koristi u biokemijskim i forenzičkim znanostima za procjenu koncentracije primarnih alkohola, NAD^+ (nikotinamid adenin dinukleotid), etilen glikola [24] i brojnih aldehida u enzimskoj katalizi i također u biosenzorima [25]. Koristi se u analitičke svrhe za određivanje koncentracije alkohola u krvi, te za dobivanje heksanala iz heksanola koji se koristi kao dodatak hrani [26].

Zahvaljujući rasprostranjenosti u prirodi i široke upotrebe zbog specifičnosti za različite supstrate i stereoselektivnosti, ADH je privukao veliki interes znanstvenika [27].

Alkohol dehidrogenaze dijele se u tri skupine [28]:

1. Srednje-lančane ADH koje sadrže 350 aminokiselinskih ostataka po lancu i stabilizirane su cinkom. U ovu skupinu ubraja se ADH izoliran iz konjske jetre [29], te izoenzimi ADH (izoenzimi I-III) iz *Saccharomyces cerevisiae* [30].
2. Kratkolančane ADH koje sadrže oko 250 aminokiselinskih ostataka po lancu, te rijetko sadrže metale. U ovu skupinu ubraja se ADH izoliran iz *Lactobacillus brevis* [31].
3. Dugolančane ADH koje sadrže oko 385 aminokiselinskih ostataka po lancu, te su stabilizirane željezom. U ovu skupinu ubraja se ADH izoliran iz *Saccharomyces cerevisiae* [32].

ADH je jedan od prvih izoliranih i pročišćenih enzima. Izolirani enzim ima molekularnu masu od 150 000 Da [33]. Ima kvartarnu strukturu, stabiliziranu ionima cinka te stoga pripada metalo-enzimskoj skupini, to ovisi o koenzimu nikotinamidu adenin dinukleotidu koji je uključen u dvo-elektronsku oksidaciju ili redukciju [34].

2.4. REGENERACIJA KOENZIMA

U stalnom je porastu broj biotransformacija kataliziranih dehidrogenazama koje koriste koenzim nikotinamid adenin dinukleotid (NAD^+) [35]. Zbog toga se javlja potreba za jednostavnim i učinkovitim sustavom regeneriranja koenzima jer je njihova upotreba u stehiometrijskoj količini skupa [36, 37]. Iako je primjena dehidrogenaza za redukciju favorizirana u praksi, oksidativni put jednako je zanimljiv za dobivanje asimetričnih spojeva iz prokiralnih supstrata, poput D-aminokiselina uz dehidrogenaze L-aminokiselina, S-alkohola uz R-specifične alkohol dehidrogenaze ili pretvorba hidroksi-kiselina, aminokiselina i alkohola u odgovarajuće keto spojeve [38].

Regeneracija koenzima NAD^+ je od velike važnosti za te reakcije jer je potpuna oksidacija potrebna za preparativne primjene [38]. Osim smanjenja troškova, regeneracija koenzima pojednostavljuje izolaciju produkta, sprječava probleme inhibicije produkta koenzimom i može utjecati na nepovoljnu ravnotežu reakcije [39].

Do sada su proučavane i razvijene mnoge *in situ* metode za regeneraciju koenzima. Te metode se mogu podijeliti u nekoliko skupina: kemijske, biološke, elektrokemijske, fotokemijske i enzimске [40].

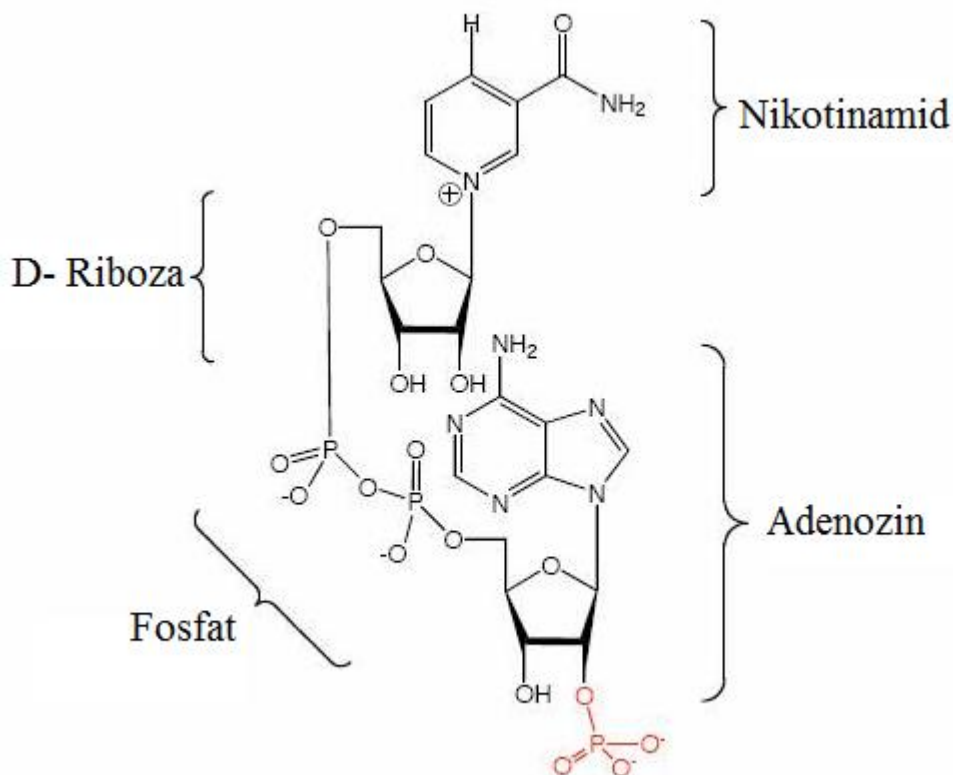
Primjer jedne od metoda, za regeneraciju NAD^+ je upotreba NADH oksidaze (NOX), enzima koji je od nedavno postao dostupan na tržištu, ali uz vrlo visoku cijenu [41]. NADH oksidaza je flavoprotein koji oksidira NADH u NAD^+ uz nastajanje vode ili vodikovog peroksida kao produkta [42]. Naravno, nastajanje vode kao produkta je prikladnije zbog negativnog utjecaja koji vodikov peroksid može imati na enzime i glavnu reakciju. Jedna od glavnih prednosti korištenja NADH oksidaze za regeneraciju koenzima je to što ovaj enzim katalizira nepovratnu reakciju koja pomiče ravnotežu primarne reakcije na stranu nastajanja produkta [43]. Alternativne metode za regeneraciju NAD^+ obuhvaćaju dodatak drugih enzima, poput laktat dehidrogenaze [44] ili glutamat dehidrogenaze [36], koji zahtijevaju i dodatan kosupstrat. Kosupstrati mogu uzrokovati sporedne reakcije ili inhibiciju enzima. Dakle, NADH oksidaza predstavlja idealno rješenje za regeneraciju NAD^+ . Međutim, njegova operacijska stabilnost može biti velik problem u nekim slučajevima [40].

NADH oksidaze se mogu pronaći u raznim mikroorganizmima kao što su *Lactobacillus brevis* [40], *Streptococcus mutans* [42], *Thermus thermophilus* [35], *Bacillus cereus* [45], *Archaeoglobus fulgidus* [46], *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Borrelia burgdorferi* [47], *Streptococcus faecalis* [48], itd.

2.4.1. Koenzim nikotinamid adenin dinukleotid

Nikotinamid adenin dinukleotid, skraćeno NAD^+ jedan je od najvažnijih koenzima u biološkim procesima [49]. Moguće ga je pronaći i u eukariotskim i prokariotskim organizmima [50].

Strukturna karakterizacija NAD^+ predstavlja poseban izazov jer je to fleksibilna molekula s više od desetak rotirajućih veza (Slika 2.3.) [51]. NAD^+ je sastavljen od dva nukleotida povezanih preko dvije fosfatne skupine: jedan nukleotid sadrži nikotinamid (neutralni naboj), a drugi prsten adenzin (pozitivni naboj) [52]. Tu su i negativni (pirofosfat) naboji i skupina vodikovih veza (riboza hidroksi skupine, karboksiamidi) u molekuli [51]. Pozitivni naboj kompenzira negativan naboj, te je molekula NAD^+ neutralna [52].



Slika 2.3. Struktura NAD⁺ [53]

NAD⁺ služi kao posrednik elektrona, te sudjeluje u mnogim staničnim metaboličkim procesima [50]. Osim toga, uključen je u neke važne biološke funkcije [50], uključujući popravak DNA [54], regulaciju transkripcije [55], homeostaze kalcija [56], itd. U biološkom sustavu služi za prenošenje dva elektrona (e⁻) i jednog vodikovog iona (H⁺). U toj oksidaciji NAD⁺ prima vodikov ion (H⁺) i dva elektrona (e⁻) za tvorbu NADH, a preostali se proton otpušta kao slobodan H⁺ prema reakciji jednadžbe 2.1. [7].



Poznato je preko sto NAD⁺ ovisnih dehidrogenaza, koje kataliziraju reakcije oksidacije laktata, malata, alkohola, gliceraldehid-3-fosfata, itd [51].

2.5. KASKADNE REAKCIJE

U posljednjem desetljeću pojmovi zelene kemije i održivog razvoja postali su strateški fokus u kemijskoj industriji i akademskoj zajednici. Ključ za uspješnu provedbu katalitičke metodologije u proizvodnji finih kemikalija je integracija katalitičkih koraka u višestupnjevitu organsku sintezu. Krajnji cilj integracije je kombinacija nekoliko katalitičkih koraka provedenih u jednom reaktoru, čime se ostvaruje višestupnjeviti katalitički kaskadni proces. Višestupnjevita sinteza u jednom reaktoru ima nekoliko prednosti: manje operacijskih jedinica, manji volumen otapala i reaktora, kraći radni ciklusi, veću produktivnost i manje otpada što dovodi do znatnih ekonomskih i ekoloških koristi [57].

Povezivanje reakcija može se koristiti za pomicanje reakcijske ravnoteže prema produktu, čime se izbjegava potreba za većim količinama reaktanata. Također postoji i nekoliko problema povezanih s kaskadama: katalizatori su često međusobno nekompatibilni, reakcijske brzine su vrlo različite i vrlo je teško naći optimalne uvjete pH vrijednosti, temperature, otapala, itd. Oporaba i recikliranje katalizatora je komplicirana, a procesi izolacije produkta su kompleksni. U prirodi je ovaj problem riješen odjeljivanjem pojedinih enzima u odjeljke. To se u kaskadnim reakcijama može postići putem imobilizacije. Također treba napomenuti da se enzimski procesi općenito odvijaju u otprilike sličnim uvjetima – u vodenom mediju na sobnoj temperaturi i tlaku što olakšava kaskadni proces [57].

Katalitički kaskadni proces je onaj u kojem se svi katalizatori (enzimi ili kemijski katalizatori) nalaze od početka u reakcijskoj smjesi. Za razliku od kaskadnog, proces u jednom reaktoru je onaj u kojem se nekoliko reakcija odvija jedna za drugom u istoj reakcijskoj posudi, bez izolacije intermedijera, ali nije nužno da se svi reaktanti ili katalizatori nalaze u reakcijskoj smjesi od početka. Dakle, kaskadni proces je po definiciji proces u jednom reaktoru [57].

Kaskadni procesi uključuju više enzima, od kojih mnogi podrazumijevaju sustav regeneracije koenzima, koji se mogu provesti kao biotransformacije s cijelim stanicama gdje su svi potrebni enzimi prisutni u stanici. Ovakav je postupak jeftiniji jer zaobilazi izolaciju i pročišćavanje pojedinih enzima, ali često gubi na selektivnosti zbog prisutnosti sličnih enzima u stanici, što se izbjegava korištenjem izoliranih enzima [57].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. KEMIKALIJE

U ovom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- aceton (Kemika, Hrvatska)
- acetonitril (Fisher Chemical, Švicarska)
- etanolamin (Acros Organics, SAD)
- dihidroxiaceton (DHA) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- metanol (J. T. Baker, SAD)
- NAD⁺ (Acros Organics, SAD)
- NADH (Acros Organics, SAD)
- trietanolamin (TEA) (Sigma Aldrich, Njemačka),
- etanol (Kemika, Hrvatska)
- klorovodična kiselina (HCl) (Sigma Aldrich, Njemačka),
- N-Cbz-glicinal (aminoaldehid) sintetiziran na Institutu za Naprednu kemiju Katalonija IQAC-CSIC (Barcelona, Španjolska)
- D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA) iz *E. coli*, varijante A129S, A129N i A129S/A165G, su pročišćene na Institutu za naprednu kemiju Katalonija IQAC-CSIC (Barcelona, Španjolska)
- Alkohol dehidrogenaza iz konjske jetre (ADH) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Alkohol dehidrogenaza iz konjske jetre (HLADH) (Institut za bio- i geoznanosti IBG-1: Biotehnologija Istraživački centar Jülich)

3.2. APARATURA

3.2.1. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracije supstrata i produkta aldolne adicije određivane su na HPLC-u s UV detektorom. Uređaj proizvođača SHIMADZU prikazan je na slici 3.1.



Slika 3.1. Kapljevinska kromatografija visokog učinka

3.2.2. Inkubator

Postupak odštićivanja N-Cbz-glicinala proveden je u inkubatoru pri temperaturi 35 °C i 200 okr/min. Inkubator ORBITAL SHAKER INCUBATOR proizvođača Crux prikazan je na slici 3.2.



Slika 3.2. Inkubator

3.2.3. Tresilica

Eksperimenti u kotlastom reaktoru provedeni su na tresilici Multi-Vortex V-32 proizvođača BIOSAN. Tresilica je prikazana na slici 3.3.



Slika 3.3. Tresilica Multi-Vortex V-32

3.2.4. Analitička vaga

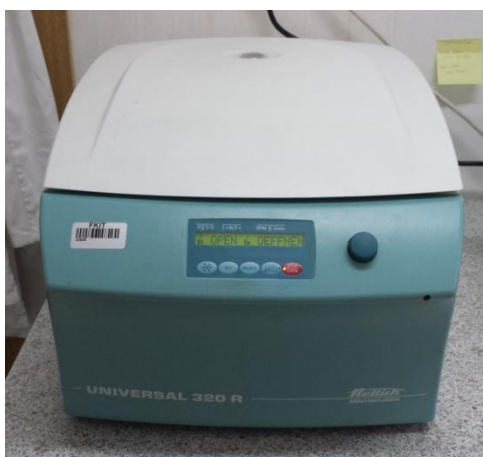
Za vaganje potrebnih kemikalija korištena je analitička vaga SHIMADZU na četiri decimale prikazana na slici 3.4.



Slika 3.4. Analitička vaga

3.2.5. Centrifuga

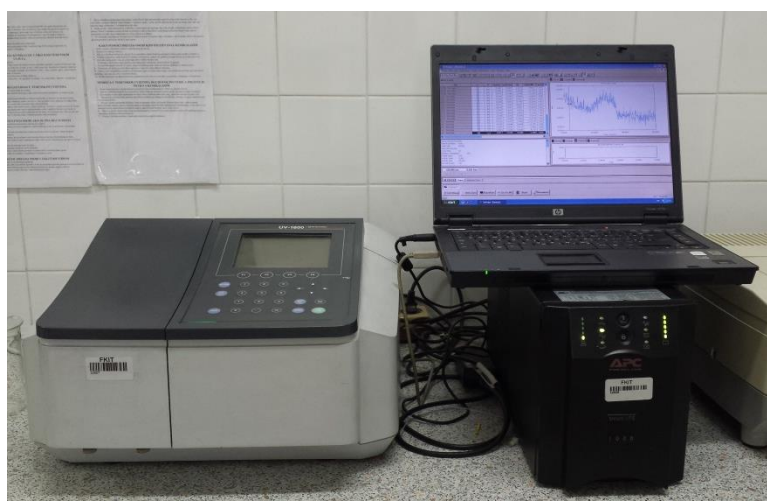
Uzorci su centrifugirani na centrifugi Universal 320 R, proizvođača Hettich prikazanoj na slici 3.5.



Slika 3.5. Centrifuga

3.2.6. Spektrofotometar

Mjerenje volumne aktivnosti NADH oksidaze te određivanje reakcijske kinetike oksidacije etanolamina provedeno je spektrofotometrijski na dvozračnom spektrofotometru SHIMADZU UV – 1800 (Japan), prikazanom na slici 3.6.



Slika 3.6. Spektrofotometar

3.3. METODE

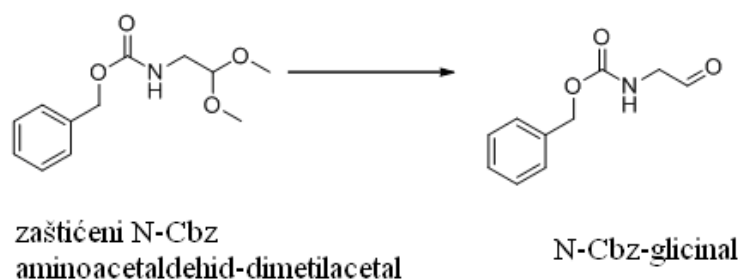
3.3.1. Mjerenje koncentracija reaktanta i produkta kapljevinskom kromatografijom visokog učinka

Koncentracije N-Cbz-glicinala i aldola praćene su kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (Slika 3.1.). Mjerenja su provedena na koloni Lichrospher, RP-18 (5 μ m) 250 x 4. Mobilna faza A sastojala se od redestilirane vode s dodatkom TFA (0.1 % v/v), a mobilna faza B od 80 % acetonitrila, 20 % vode i 0,095 % TFA. Korištena je izokratna metoda sa sastavom eluenta 66 % faze A i 34 % faze B pri ukupnom protoku od 1,2 cm³/min.

Retencijska vremena za N-Cbz-glicinal i aldol bila su 7,3 i 3,9 min. Baždarni pravci za N-Cbz-glicinal i aldol nalaze se u prilogu (Prilog 1. i Prilog 2.).

Uzorci za analizu na HPLC-u pripremljeni su tako da je 10 mm³ uzorka otopljeno u metanolu (razrjeđenje prema potrebi 10, 20, 50, 100 i 1000 puta), pri čemu metanol denaturira enzim i time zaustavlja daljnji napredak reakcije. Uzorci su zatim centrifugirani (Slika 3.5.) dvije minute pri temperaturi od 4 °C i 14000 okr/min pri čemu je enzim istaložen na dnu kivete, a gornji dio otopine je korišten za analizu na HPLC-u.

3.3.2. Postupak odštićivanja N-Cbz-glicinala



Slika 3.7. Reakcija odštićivanja N-Cbz-glicinala

Supstrat aldolne adicije, N-Cbz-glicinal, je spoj s dvostrukom zaštitom kako bi se mogao čuvati kroz dulji vremenski period. Stoga ga je prije upotrebe bilo potrebno pretvoriti

iz nereaktivnog zaštićenog oblika N-Cbz-aminoacetaldehida-dimetilacetala u N-Cbz-glicinal (Slika 3.7.).

Postupak odštićivanja N-Cbz-glicinala provoden je miješanjem odgovarajuće količine N-Cbz-glicinala s $3,5 \text{ cm}^3$ acetonitrila, 1 cm^3 vode i 1 cm^3 1 mol/dm^3 klorovodične kiseline. Odštićivanje je provedeno u inkubatoru pri temperaturi $35 \text{ }^\circ\text{C}$ i 200 okr/min. Uzorci su uzimani u određenim vremenskim razmacima te su razrijeđeni u metanolu i odmah analizirani na HPLC-u gdje je praćena nastala koncentracija N-Cbz-glicinala.

3.3.3. Određivanje kinetike aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal

Na slici 3.8. je prikazana shema aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-glicinal katalizirana aldolazom FSA A129N porijeklom iz *Escherichia coli*. Obzirom da se radi o povratnoj reakciji, ispitana je kinetika u oba smjera ispitivanjem utjecaja svake komponente smjese na početnu brzinu reakcije.

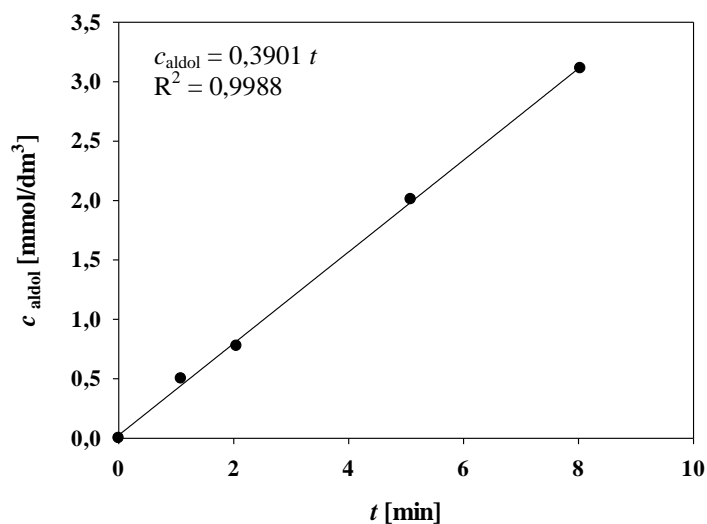


Slika 3.8. Reakcija aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-glicinal

Utjecaj supstrata i produkta reakcijskog sustava na početnu brzinu reakcije aldolne adicije ispitivan je metodom početnih brzina reakcije (manje od 10% konverzije supstrata) kada nastali produkt nema utjecaja na brzinu reakcije. U tu svrhu proveden je niz eksperimenata u kojima je koncentracija aldola praćena pomoću HPLC-a.

Eksperimenti su provedeni u reaktoru volumena $0,5 \text{ cm}^3$ na tresilici (Slika 3.3.). U reaktoru je pomiješana reakcijska smjesa te je prije dodavanja enzima uzet nulti uzorak. Dodavanjem enzima je započeta reakcija nakon čega su uzorci uzimani u prvoj, drugoj, petoj, osmoj i desetoj minuti prema prethodno opisanom postupku (poglavlje 3.3.1.). Promjena koncentracije aldola u vremenu (dc/dt) na početku reakcije je korištena za računanje nagiba

pravca iz kojeg se računa volumna aktivnost aldolaze prema jednadžbi 3.1., te specifična aktivnost prema jednadžbi 3.2. Primjer određivanja početne brzine reakcije dan je na slici 3.9.



Slika 3.9. Primjer određivanja aktivnosti aldolaze

$$V.A. = \frac{dc_{\text{aldol}}}{dt} \cdot \frac{V_r}{V_{\text{enz}}} \quad \left[\frac{\text{U}}{\text{cm}^3} \right] \quad 3.1.$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{c_{\text{enz}}} \quad \left[\frac{\text{U}}{\text{mg}} \right] \quad 3.2.$$

3.3.3.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije

Ispitan je utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije. Koncentracija DHA održavana je konstantnom na 100 mmol/dm³, dok je koncentracija N-Cbz-glicinala varirana od 0 do 45 mmol/dm³.

3.3.3.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije

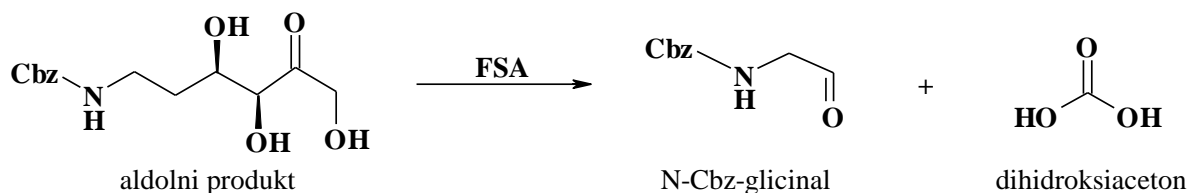
Ispitan je utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije. U ovom slučaju koncentracija N-Cbz-glicinala držana je konstantnom na 45 mmol/dm³, dok je koncentracija DHA varirana od 0 do 200 mmol/dm³.

3.3.3.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu reakcije aldolne adicije

Ispitan je utjecaj koncentracije aldola kao produkta na početnu brzinu reakcije aldolne adicije jer je poznato da može doći do inhibicije produktom. U ovom slučaju koncentracija supstrata N-Cbz-glicinala je držana konstantnom i iznosila je 45 mmol/dm^3 , a koncentracija DHA 100 mmol/dm^3 , dok je koncentracija aldola varirana od 0 do 150 mmol/dm^3 .

3.3.4. Određivanje kinetike retro-aldolne reakcije DHA na N-Cbz-glicinal

Aldolna adicija dihidroksiacetona na N-Cbz-glicinal je ravnotežna reakcija (Slika 3.10.), te je stoga potrebno odrediti kinetiku reakcije u oba smjera.



Slika 3.10. Retro-aldolna reakcija dihidroksiacetona na N-Cbz-glicinal

3.3.4.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

Ispitan je utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije. Koncentracija aldola varirana je od 0 do 225 mmol/dm^3 .

3.3.4.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

Ispitan je utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala kao produkta na početnu brzinu retro-aldolne reakcije kako bi se provjerilo dolazi li do inhibicije produktom. U ovom slučaju koncentracija aldola održavana je konstantnom i iznosila je 100 mmol/dm^3 , dok je koncentracija N-Cbz-glicinala varirana od 0 do 28 mmol/dm^3 .

3.3.4.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije DHA na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

Ispitan je utjecaj koncentracije DHA kao produkta na početnu brzinu retro-aldolne reakcije kako bi se provjerilo dolazi li do inhibicije produktom. U ovom slučaju koncentracija aldola držana je konstantnom i iznosila je 125 mmol/dm^3 , dok je koncentracija DHA varirana od 0 do 100 mmol/dm^3 .

3.3.5. Provedba eksperimenata u kotlastom reaktoru

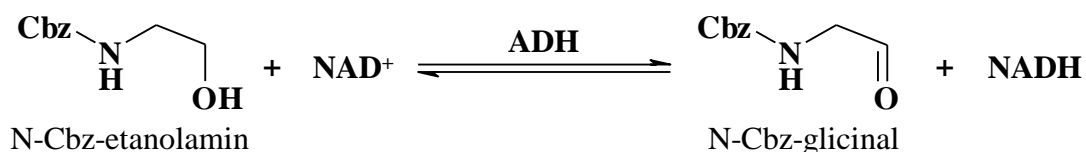
U kotlastom reaktoru provedeno je nekoliko eksperimenata aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal. Eksperimenti su provedeni u 50 mmol/dm^3 TEA HCl puferu, pH 8,0 s 10 % acetonitrila u reaktoru volumena 1 cm^3 , pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$ i na tresilici (Slika 3.3.) pri 1000 okr/min.

Provedena su tri šaržna eksperimenata s tri različite aldolaze FSA A129S, FSA A129S/A165G i FSA A129N, kako bi se utvrdilo koji je enzim najbolji za provedbu ove aldolne adicije. Pripremljena je reakcijska smjesa od 43 mmol/dm^3 N-Cbz-glicinala, 45 mmol/dm^3 dihidroksiacetona uz $0,5 \text{ mg/cm}^3$ enzima FSA.

Osim toga, za validaciju razvijenog matematičkog modela, aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal katalizirana s enzimom FSA A129N provedena je pri različitim ekvimolarnim koncentracijama N-Cbz-glicinala i dihidroksiacetona; 5 mmol/dm^3 , 10 mmol/dm^3 i 20 mmol/dm^3 . Koncentracija FSA u sve tri reakcije bila je jednaka i iznosila je $0,99 \text{ mg/cm}^3$. Uzorci su uzimani prema prethodno opisanom postupku u poglavlju 3.3.1.

Svaki je eksperiment ponovljen dva puta.

3.3.6. Određivanje kinetike reakcije oksidacije etanolamina



Slika 3.11. Reakcija oksidacije etanolamina

Kinetika ADH u reakciji oksidacije etanolamina određena je spektrofotometrijski pri 340 nm. Provedene su dvije serije mjerenja. U prvoj seriji mjerenja korišten je komercijalni enzim alkohol dehidrogenaza izoliran iz konjske jetre (Sigma Aldrich) (ADH), a u drugoj seriji korišten je enzim izoliran iz konjske jetre u Institutu za bio- i geoznanosti IBG-1: Biotehnologija Istraživački centar Jülich (HLADH). Praćena je promjena apsorbancije u vremenu, a volumna aktivnost izračunata je prema jednadžbi 3.3. Mjerenja su provedena u kvarcnoj kiveti od 1 cm³ i u 50 mmol/dm³ TEA HCl puferu pH 8,0. Kivete su termostatirane pri 25 °C prije nego što je dodano 10 mm³ enzima ADH.

U kiveti je praćena promjena koncentracije NADH pri valnoj duljini od 340 nm. Reducirani nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) apsorbira maksimalnu količinu svjetla valne duljine pri 340 nm, dok njegova oksidirana forma (NAD⁺) u valnom području od 300 do 400 nm ne apsorbira svjetlo. Tijekom testa dolazi do promjene koncentracije NADH što se na spektrofotometru registrira kao promjena apsorbancije u vremenu koja je proporcionalna aktivnosti enzima ADH. Volumna aktivnost (V.A.) enzima izračunata je prema Jednadžbi 3.3.:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon_{340} \cdot d \cdot V_u} \cdot \frac{\Delta ABS}{\Delta t} \quad 3.3.$$

gdje je:

V_r - ukupni volumen [cm³];

V_u – volumen uzorka [cm³];

ε_{340} - ekstinkcijski koeficijent [cm²/μm], ($\lambda = 340$ nm, $\varepsilon_{340} = 6,22$ cm²/μm);

d - promjer kivete [cm];

$\Delta ABS/\Delta t$ - promjena apsorbancije u vremenu [1/min], (nagib pravca).

Specifična aktivnost enzima izračunata je prema jednadžbi 3.2.

3.3.6.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije

Ispitan je utjecaj koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije. U ovom slučaju koncentracija NAD⁺ održavana je konstantnom i iznosila je 8,25 mmol/dm³, dok je koncentracija etanolamina varirana od 0 do 100 mmol/dm³.

3.3.6.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije

Ispitan je utjecaj koncentracije NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije. U ovom slučaju koncentracija etanolamina držana je konstantnom i iznosila je 100 mmol/dm^3 , dok je koncentracija NAD^+ varirana od 0 do $5,5 \text{ mmol/dm}^3$.

3.4. OBRADA PODATAKA

Za procjenu kinetičkih parametara matematičkog modela, simulaciju eksperimenata u reaktoru i optimizaciju kaskadne reakcije je korišten programski paket SCIENTIST [58], koji u sebi sadrži metodu najmanjih kvadrata i simpleks metodu za procjenu parametara. Kinetički parametri procijenjeni su metodom nelinearne regresije iz rezultata nezavisnih mjerenja, tj. iz ovisnosti početne brzine reakcije o koncentraciji pojedine komponente. Procijenjeni kinetički parametri uz matematički model dan u sljedećem poglavlju (Poglavlje 4.) korišteni su za simulaciju eksperimenata u reaktoru i optimizaciju kaskadne reakcije.

Odstupanje matematičkog modela od eksperimentalnih podataka dano je kao suma kvadrata razlike između eksperimentalnih podataka i podataka dobivenih pomoću modela.

Program u SCIENTIST-u nalazi se u Prilogu 5.

4. MATEMATIČKO MODELIRANJE

4.1. MATEMATIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-Cbz-GLICINAL U KOTLASTOM REAKTORU

Kinetika napredne reakcije aldolne adicije je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom (Jednadžba 4.1.). Kinetika retro-aldolne reakcije opisana je jednosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju supstratom – aldolom, te kompetitivnom inhibicijom s produktom – N-Cbz-glicinalom (Jednadžba 4.2.).

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_{\text{glicinal}} \cdot c_{\text{DHA}} \cdot \gamma_{\text{FSA}}}{(K_m^{\text{glicinal}} + c_{\text{glicinal}}) \cdot (K_m^{\text{DHA}} + c_{\text{DHA}})} \quad 4.1.$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot c_{\text{aldol}} \cdot \gamma_{\text{FSA}}}{\left(K_m^{\text{aldol}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{glicinal}}}{K_i^{\text{glicinal}}} \right) + c_{\text{aldol}} + \left(\frac{c_{\text{aldol}}^2}{K_i^{\text{aldol}}} \right) \right)} \quad 4.2.$$

Bilancne jednadžbe u kotlastom reaktoru su dane jednadžbama 4.3.-4.5.

$$\frac{dc_{\text{DHA}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad 4.3.$$

$$\frac{dc_{\text{N-Cbz-glicinal}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad 4.4.$$

$$\frac{dc_{\text{aldol}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad 4.5.$$

4.2. MATEMATIČKI MODEL OKSIDACIJE ETANOLAMINA

Kinetika oksidacije etanolamina je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom (Jednadžba 4.6.).

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_{\text{etanolamin}} \cdot c_{\text{NAD}^+} \cdot \gamma_{\text{ADH}}}{(K_m^{\text{etanolamin}} + c_{\text{etanolamin}}) \cdot (K_m^{\text{NAD}^+} + c_{\text{NAD}^+})} \quad 4.6.$$

Bilancne jednadžbe u kotlastom reaktoru dane su jednadžbama 4.7. i 4.8.

$$\frac{dc_{\text{etanolamin}}}{dt} = -r_1 \quad 4.7.$$

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = -r_1 \quad 4.8.$$

4.3. MATEMATIČKI MODEL KASKADNE REAKCIJE

Razvijen je matematički model kaskadne oksidacije etanolamina katalizirane s HLADH uz regeneraciju koenzima kataliziranu s NADH oksidazom i aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal katalizirane s aldolazom (FSA A129N). Kinetičke jednadžbe aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal dane su jednadžbama 4.9. i 4.10. Kinetička jednadžba oksidacije etanolamina dana je jednadžbom 4.11. Kinetička jednadžba regeneracije koenzima dana je jednadžbom 4.12.

$$r_1 = \frac{V_{m1} \cdot c_{\text{N-Cbz-glicinal}} \cdot c_{\text{DHA}} \cdot \gamma_{\text{FSA}}}{(K_m^{\text{N-Cbz-glicinal}} + c_{\text{N-Cbz-glicinal}}) \cdot (K_m^{\text{DHA}} + c_{\text{DHA}})} \quad 4.9.$$

$$r_2 = \frac{V_{m2} \cdot c_{\text{aldol}} \cdot \gamma_{\text{FSA}}}{\left(K_m^{\text{aldol}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{N-Cbz-glicinal}}}{K_i^{\text{N-Cbz-glicinal}}} \right) + c_{\text{aldol}} + \left(\frac{c_{\text{aldol}}^2}{K_i^{\text{aldol}}} \right) \right)} \quad 4.10.$$

$$r_3 = \frac{V_{m3} \cdot c_{\text{etanolamin}} \cdot c_{\text{NAD}^+} \cdot \gamma_{\text{ADH}}}{(K_m^{\text{etanolamin}} + c_{\text{etanolamin}}) \cdot (K_m^{\text{NAD}^+} + c_{\text{NAD}^+})} \quad 4.11.$$

$$r_4 = \frac{V_{m4} \cdot c_{\text{NADH}} \cdot \gamma_{\text{NOX}}}{(K_m^{\text{NADH}} + c_{\text{NADH}}) \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{NAD}^+}}{K_i^{\text{NAD}^+}} \right)} \quad 4.12.$$

Bilancne jednadžbe u kotlastom reaktoru dane su jednadžbama 4.13.-4-18.

$$\frac{dc_{\text{DHA}}}{dt} = -r_1 + r_2 \quad 4.13.$$

$$\frac{dc_{\text{N-Cbz-glicinal}}}{dt} = -r_1 + r_2 + r_3 \quad 4.14.$$

$$\frac{dc_{\text{aldol}}}{dt} = r_1 - r_2 \quad 4.15.$$

$$\frac{dc_{\text{etanolamin}}}{dt} = -r_3 \quad 4.16.$$

$$\frac{dc_{\text{NADH}}}{dt} = r_3 - r_4 \quad 4.17.$$

$$\frac{dc_{\text{NAD}^+}}{dt} = -r_3 + r_4 \quad 4.18.$$

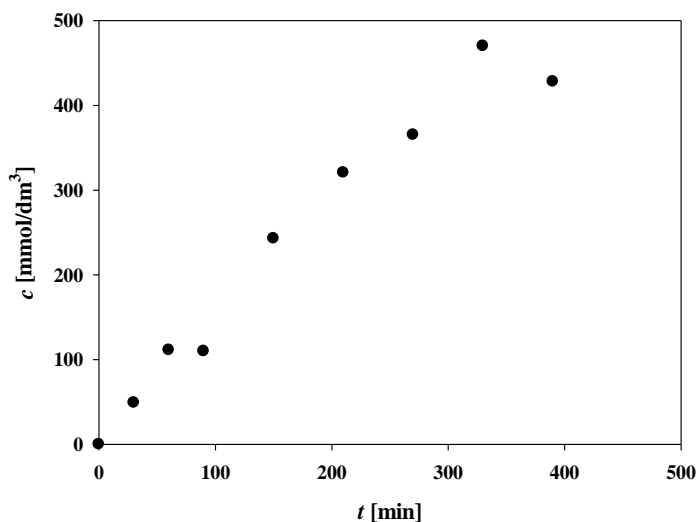
5. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu je proučavana sinteza (3S, 4R)-5-[N-(benziloksikarbonil)amino]deoksipent-2-uloze u kaskadnoj reakciji oksidacije etanolamina katalizirana s ADH uz regeneraciju koenzima kataliziranu NADH oksidazom i aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal katalizirane s aldolazom.

Proveden je postupak odštićivanja N-Cbz-glicinala (Slika 5.1.), supstrata aldolne adicije. Ispitana je kinetika reakcije aldolne adicije (Slike 5.3.-5.8.) i oksidacije etanolamina (Slike 5.12. - 5.15.). Razvijeni su matematički modeli procesa (Poglavlje 4.) za svaku pojedinu reakciju u kotlastom reaktoru. Razvijeni matematički model za reakciju aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru validiran je eksperimentalno (Slika 5.9.). Razvijen je i matematički model za kaskadnu reakciju (Poglavlje 4.3.) uz pomoć kojeg je provedena optimizacija kaskadne reakcije. Varirane su koncentracije enzima FSA, ADH, NOX-a i koenzima NAD⁺ kako bi se dobilo najveće iskorištenje na produktu (Slike 5.19. - 5.22.).

5.1. UKLANJANJE ZAŠTITNE SKUPINE N-Cbz-GLICINALA

Postupak odštićivanja N-Cbz-glicinala opisan je u poglavlju 3.3.2. Praćena je koncentracija N-Cbz-glicinala tijekom vremena dok nije postignuta maksimalna koncentracija. Na slici 5.1. moguće je vidjeti da je potrebno vrijeme za postizanje maksimalne koncentracije N-Cbz-glicinala iznosilo 330 min.

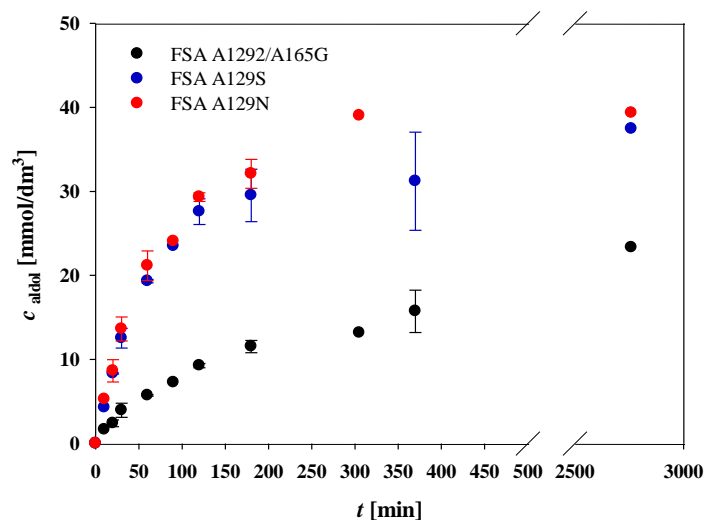


Slika 5.1. Odštićivanje N-Cbz-glicinala ($V_r = 5 \text{ cm}^3$, $35 \text{ }^\circ\text{C}$, 200 okr/min)

5.2. ALDOLNA ADICIJA DHA NA N-Cbz-GLICINAL U KOTLASTOM REAKTORU

N-Cbz-glicinal je netopljiv u vodi pa je u reakcijskoj smjesi potrebno organsko otapalo. U literaturi [59] su testirana tri različita organska otapala te je za ovaj rad odabran acetonitril koji se miješa s vodom. Korištena je koncentracija od 10%, zato što veće koncentracije bilo kojeg organskog otapala negativno utječu na aktivnost enzima.

Provedena je aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru katalizirana s tri različite varijante aldolaze, FSA A129S, FSA A129N, FSA A129S/A165G, kako bi se utvrdilo koji je enzim najbolji za provedbu ove aldolne adicije. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 5.2. Za daljnje eksperimente izabran je enzim FSA A129N jer je u reakciji kataliziranoj s ovim enzimom postignuto najveće iskorištenje na aldolu od 90,86 % u najkraćem vremenu (300 min).



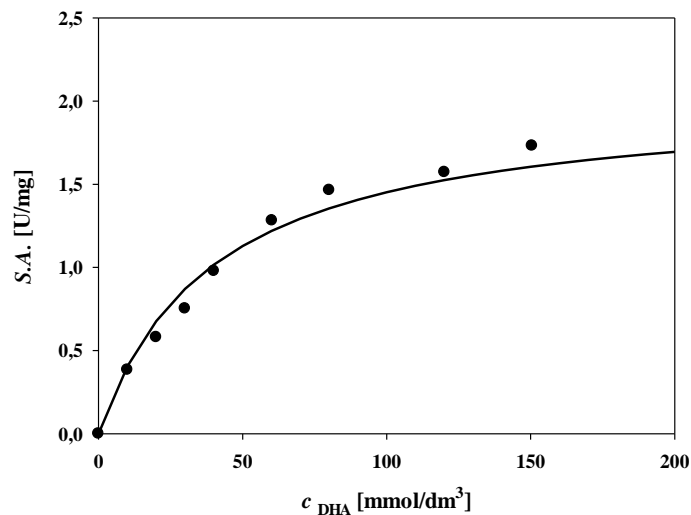
Slika 5.2. Aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal s tri različite aldolaze u kotlastom reaktoru ($V_r = 1 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 okr/min, 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10% acetonitrila, $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 43 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 45 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$).

5.3. ODREĐIVANJE KINETIKE REAKCIJE ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-Cbz-GLICINAL

Ispitana je kinetika aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal katalizirane aldolazom FSA A129N porijeklom iz *Escherichia coli*. Ispitan je utjecaj koncentracija supstrata DHA (Slika 5.3.), N-Cbz-glicinala (Slika 5.4.) i produkta aldola (Slika 5.5.) na početnu brzinu reakcije aldolne adicije.

5.3.1. Utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije

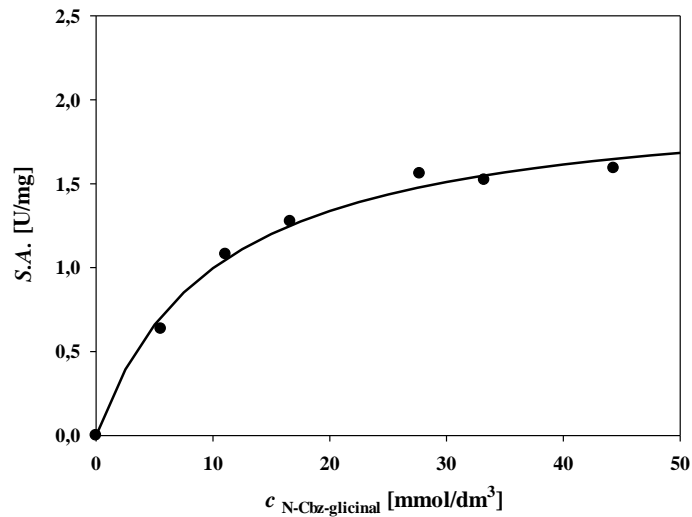
Ispitan je utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije. Rezultati su prikazani na slici 5.3. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri (K_m^{DHA} , V_{ml}) koji su prikazani u tablici 5.1. Vidljivo je da rezultati prate trend Michaelis-Menteničine kinetike.



Slika 5.3. Utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije ($V_r = 0,5 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 okr/min , 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10 % acetonitril, $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 44,32 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,25 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

5.3.2. Utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije

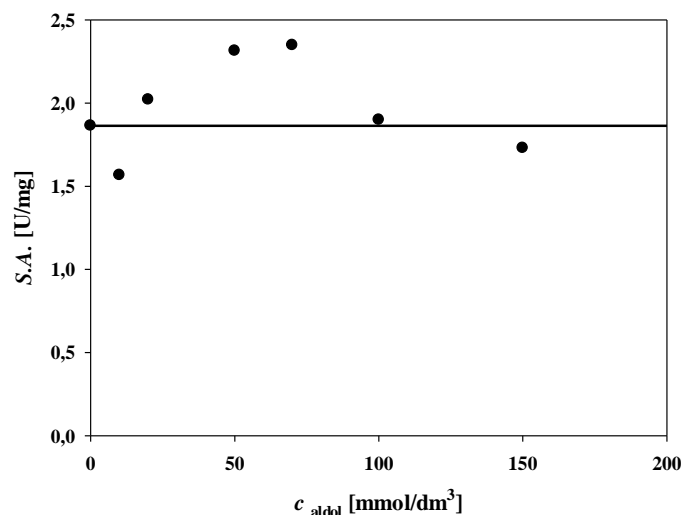
Ispitan je utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije. Rezultati su prikazani na slici 5.4. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri ($K_m^{\text{N-Cbz-glicinal}}$, V_{m1}) koji su prikazani u tablici 5.1. Rezultati prate trend Michaelis-Menteničine kinetike.



Slika 5.4. Utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije ($V_r = 0,5 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 okr/min , 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10 \% acetonitril, $c_{\text{DHA}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,25 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

5.3.3. Utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu reakcije aldolne adicije

Ispitan je utjecaj koncentracije aldola kao produkta na početnu brzinu reakcije aldolne adicije kako bi se provjerilo dolazi li do inhibicije produktom. Rezultati su prikazani na slici 5.5. Iz rezultata je vidljivo da aldol nema utjecaja na početnu brzinu reakcije aldolne adicije jer povećanjem njegove koncentracije ne dolazi do smanjenja brzine reakcije, što znači da nije došlo do inhibicije produktom.



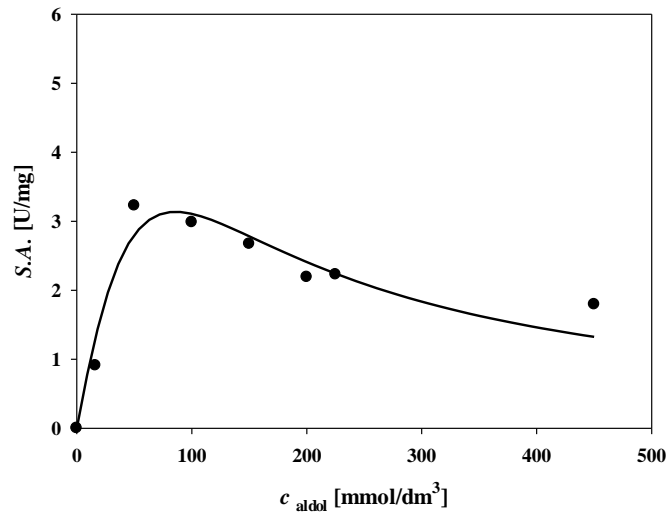
Slika 5.5. Utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu reakcije aldolne adicije ($V_r = 0,5 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 okr/min , 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10 % acetonitrila, $c_{\text{DHA}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 44,32 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,25 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

5.4. ODREĐIVANJE KINETIKE RETRO-ALDOLNE REAKCIJE

Ispitana je kinetika retro-aldolne reakcije DHA na N-Cbz-glicinal katalizirane aldolazom FSA A129N porijeklom iz *Escherichia coli*. Ispitan je utjecaj koncentracija supstrata aldola (Slika 5.6.), produkta N-Cbz-glicinala (Slika 5.7.) i DHA (Slika 5.8.) na početnu brzinu retro-aldolne reakcije.

5.4.1. Utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

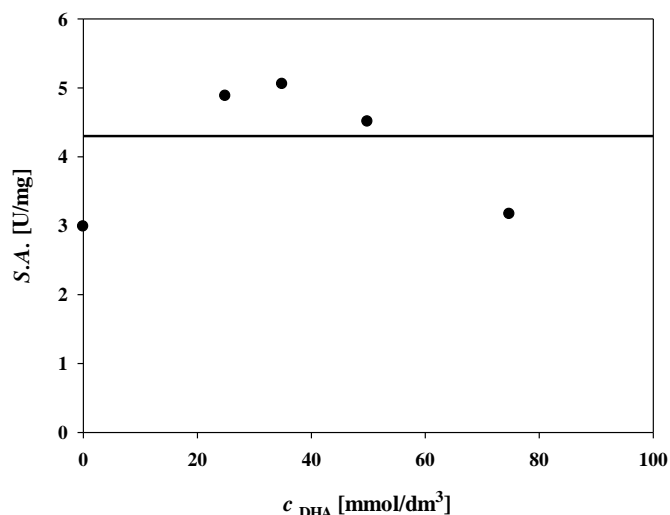
Ispitan je utjecaj koncentracije aldola kao supstrata na početnu brzinu retro-aldolne reakcije. Rezultati su prikazani na slici 5.6. Iz rezultata je vidljivo da nakon određene koncentracije aldola daljnjim povećanjem dolazi do smanjenja početne brzine reakcije što upućuje na pojavu inhibicije supstratom. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri (K_m^{aldol} , V_{m2} , K_i^{aldol}) koji su prikazani u tablici 5.1.



Slika 5.6. Utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije ($V_r = 0,5 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 okr/min , 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10 % acetonitrila, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,25 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

5.4.2. Utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

Ispitan je utjecaj koncentracije DHA kao produkta na početnu brzinu retro-aldolne reakcije kako bi se provjerilo dolazi li do inhibicije produktom. Rezultati su prikazani na slici 5.7. Iz rezultata je vidljivo kako DHA nema utjecaja na početnu brzinu retro-aldolne reakcije, što znači da nije došlo do inhibicije produktom.

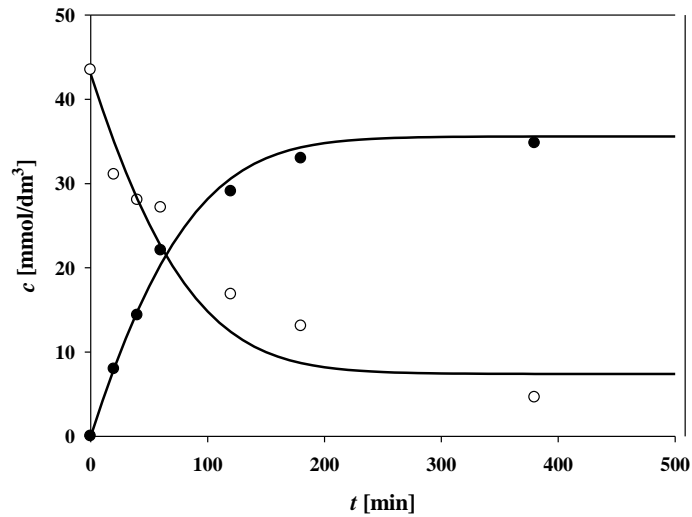


Slika 5.7. Utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu retro-aldolne reakcije ($V_r = 0,5 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 okr/min , 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10 % acetonitrila, $c_{\text{aldol}} = 124,64 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,25 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

5.4.3. Utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

Ispitan je utjecaj N-Cbz-glicinala kao produkta na početnu brzinu retro-aldolne reakcije kako bi se provjerilo dolazi li do inhibicije produktom. Dobivene rezultate nije bilo moguće kvantificirati te iz njih procijeniti konstatnu inhibicije. Zbog toga je ova konstanta procijenjena iz eksperimenta aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal proveden u kotlastom reaktoru (slika 5.8).

Literatura je pokazala [60] da je uobičajno za ove aldolaze da je retro-aldolna reakcija inhibirana aldehidom. Konstanta inhibicije povratne reakcije produktom N-Cbz-glicinalom procijenjena je iz eksperimentalnih podataka aldolne adicije katalizirane FSA A129N prikazanim na slici 5.8. Procijenjena konstanta inhibicije ($K_i^{\text{N-Cbz-glicinal}}$) prikazana je u tablici 5.1.



Slika 5.8. Aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal ($V_r = 1 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 okr/min, 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10% acetonitrila, $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 43 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 45 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci za aldol, ○ eksperimentalni podaci za N-Cbz-glicinal, — matematički model).

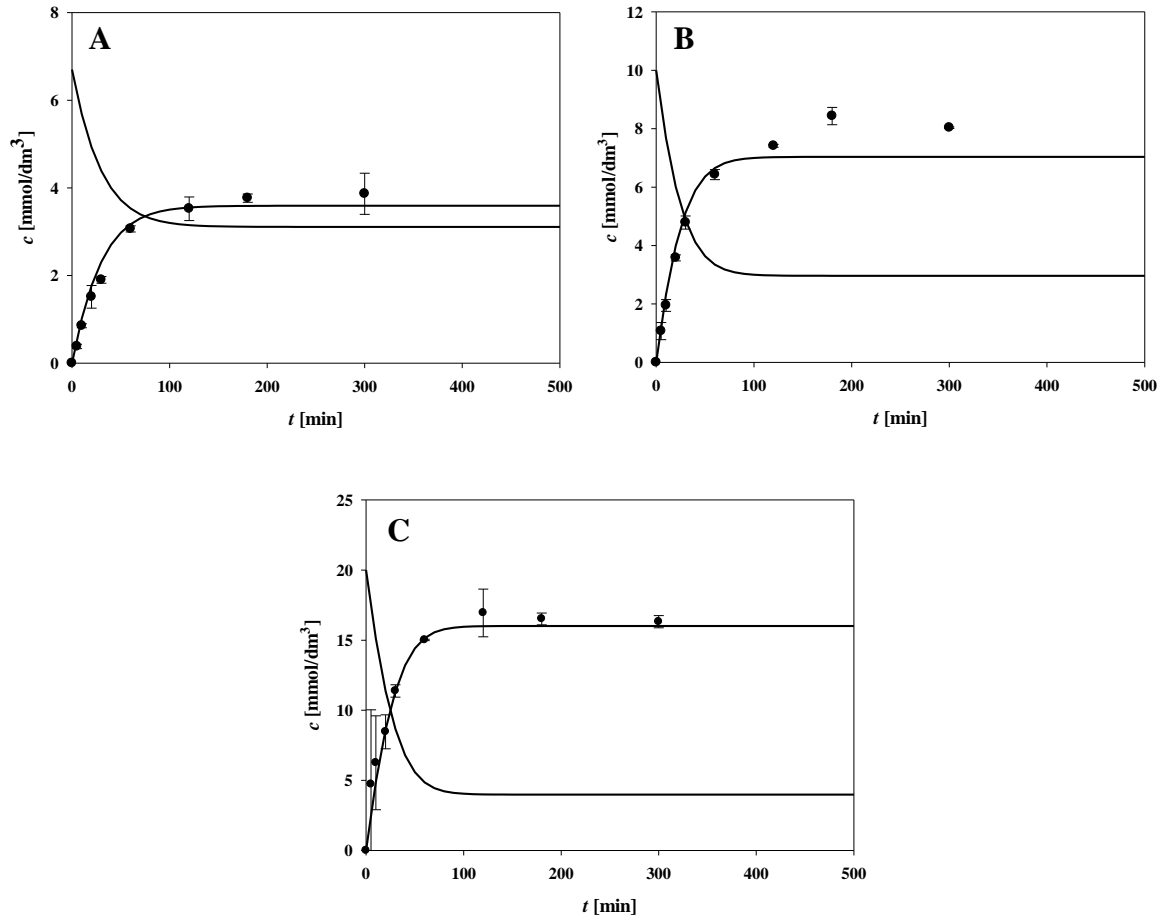
Tablica 5.1. Kinetički parametri aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_{m1}	U/mg	$2,035 \pm 0,098$
$K_m^{\text{N-Cbz-glicinal}}$	mmol/dm^3	$10,412 \pm 1,554$
K_m^{DHA}	mmol/dm^3	$40,097 \pm 2,589$
V_{m2}	U/mg	$15,415 \pm 22,979$
K_m^{aldol}	mmol/dm^3	$167,810 \pm 306,342$
K_i^{aldol}	mmol/dm^3	$43,854 \pm 78,177$
$K_i^{\text{N-Cbz-glicinal}}$	mmol/dm^3	$0,389 \pm 0,168$

5.5. VALIDACIJA MATEMATIČKOG MODELA

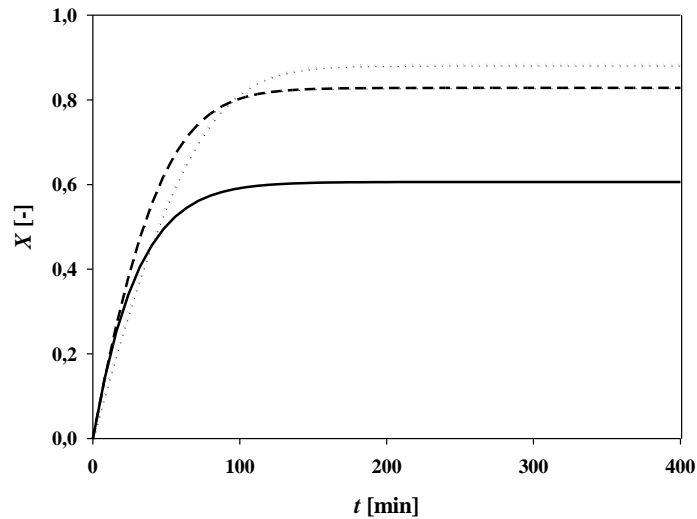
Razvijeni matematički model (Poglavlje 4.1.) validiran je u nekoliko eksperimenata aldolne adicije katalizirane s aldolazom FSA A129N pri različitim ekvimolarnim koncentracijama N-Cbz-glicinala i DHA. Rezultati su prikazani na slici 5.9. Na grafovima su prikazane samo koncentracije aldola jer koncentraciju N-Cbz-glicinala zbog problema s analitičkom metodom nije bilo moguće precizno odrediti na HPLC-u. Reakcije su provedene

pri različitim početnim koncentracijama supstrata i iz prikazanih rezultata je vidljivo da razvijeni matematički model (Poglavlje 4.1.) dobro opisuje eksperimentalne podatke.



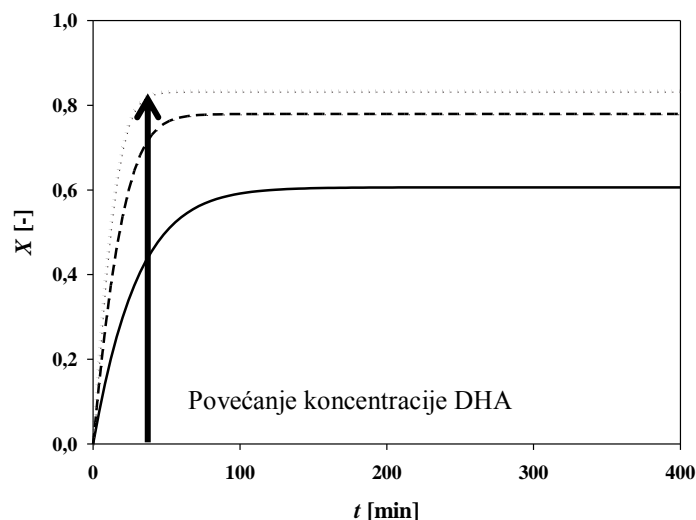
Slika 5.9. Aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru ($V_r = 1 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 okr/min, 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10 % acetonitrila. **A.** $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 5 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 5 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,99 \text{ mg/cm}^3$. **B.** $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,99 \text{ mg/cm}^3$. **C.** $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 20 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 20 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,99 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

Uz pomoć matematičkog modela provedena je simulacija reakcije aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal pri različitim ekvimolarnim koncentracijama N-Cbz-glicinala i DHA. Rezultati su prikazani na slici 5.10. te je vidljivo da se povećanjem koncentracije N-Cbz-glicinala i DHA povećava konverzija supstrata.



Slika 5.10. Simulacija reakcije aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal pri različitim ekvimolarnim koncentracijama supstrata ($\gamma_{\text{FSA}} = 1 \text{ mg/cm}^3$, — $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, - - - $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 50 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 50 \text{ mmol/dm}^3$, ····· $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$).

Također je provedena simulacija reakcije aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal uz povećanje koncentracije DHA. Rezultati su prikazani na slici 5.11. te je vidljivo da se povećanjem koncentracije DHA povećava konverzija supstrata.



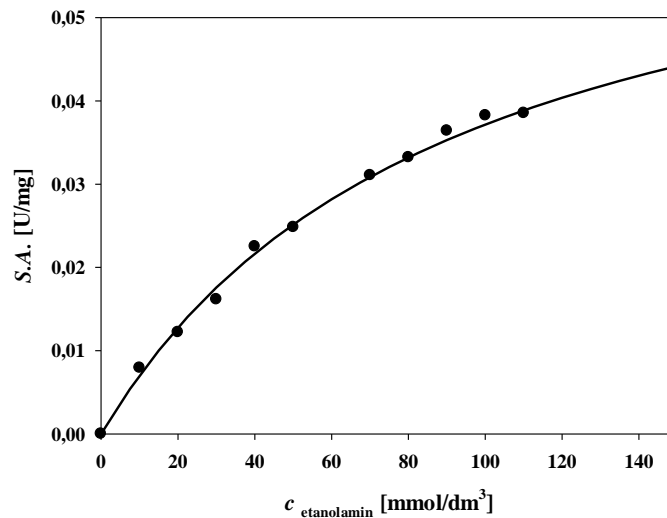
Slika 5.11. Simulacija reakcije aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal uz povećanje koncentracije DHA ($\gamma_{\text{FSA}} = 1 \text{ mg/cm}^3$, $c_{\text{N-Cbz-glicinal}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, — $c_{\text{DHA}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, - - - $c_{\text{DHA}} = 25 \text{ mmol/dm}^3$, ····· $c_{\text{DHA}} = 50 \text{ mmol/dm}^3$).

5.6. ODREĐIVANJE KINETIKE REAKCIJE OKSIDACIJE ETANOLAMINA

Kinetika oksidacije etanolamina katalizirane ADH određena je spektrofotometrijskom metodom pri 340 nm. Provedene su dvije serije mjerenja. U prvoj seriji mjerenja korišten je komercijalni enzim alkohol dehidrogenaza izoliran iz konjske jetre (Sigma Aldrich) (ADH), a u drugoj seriji korišten je enzim izoliran iz konjske jetre u Institutu za bio- i geoznanosti IBG-1: Biotehnologija Istraživački centar Jülich (HLADH).

5.6.1. Utjecaj koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane enzimom HLADH

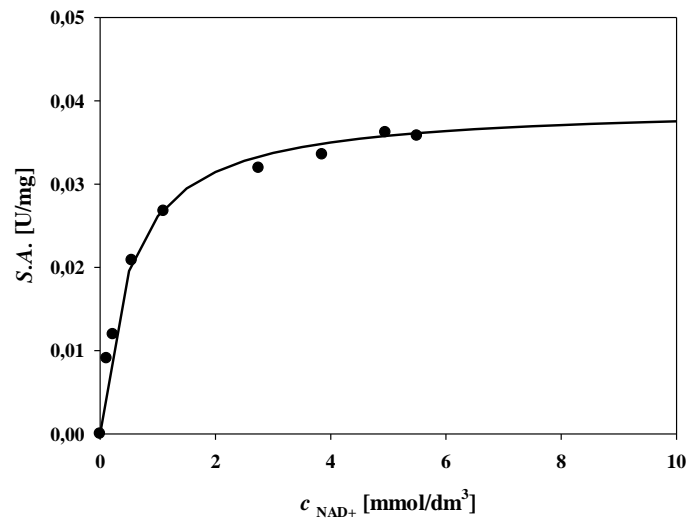
Ispitan je utjecaj koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane enzimom HLADH iz Istraživačkog centra Jülich. Rezultati su prikazani na slici 5.12. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri ($K_m^{\text{etanolamin}}$, V_m) koji su prikazani u tablici 5.2.



Slika 5.12. Utjecaj koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina ($V_T = 1 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 340 nm , 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10% acetonitrila, $c_{\text{NAD}^+} = 8,25 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 10 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

5.6.2. Utjecaj koncentracije NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane enzimom HLADH

Ispitan je utjecaj NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina. Rezultati su prikazani na slici 5.13. te je vidljivo da prate trend Michaelis-Menteničine kinetike. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri ($K_m^{\text{NAD}^+}$) koji su prikazani u tablici 5.2.



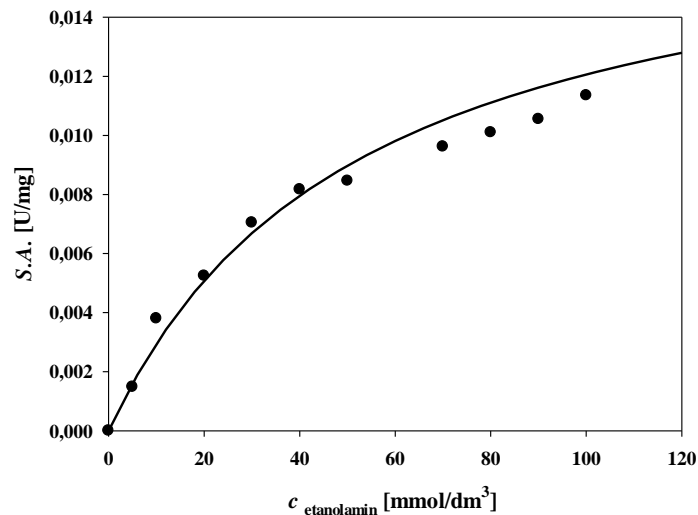
Slika 5.13. Utjecaj koncentracije NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina ($V_r = 1 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $\lambda = 340 \text{ nm}$, 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, $c_{\text{etanolamin}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 10 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

Tablica 5.2. Kinetički parametri oksidacije etanolamina katalizirane HLADH

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_m	U/mg	$0,075 \pm 0,007$
$K_m^{\text{etanolamin}}$	mmol/dm ³	$91,291 \pm 15,461$
$K_m^{\text{NAD}^+}$	mmol/dm ³	$0,507 \pm 0,058$

5.6.3. Utjecaj koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane komercijalnim enzimom ADH

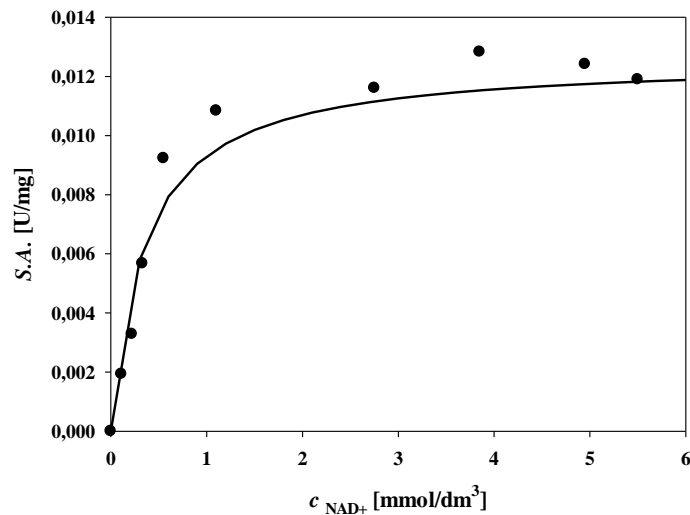
Ispitan je utjecaj etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane komercijalnim enzimom ADH. Rezultati su prikazani na slici 5.14. te je vidljivo da prate trend Michaelis-Menteničine kinetike. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri ($K_m^{\text{etanolamin}}$, V_m) koji su prikazani u tablici 5.3.



Slika 5.14. Utjecaj koncentracije etanolamina na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina ($V_r = 1 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 340 nm , 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, 10% acetonitrila, $c_{\text{NAD}^+} = 8,25 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{ADH}} = 10 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

5.6.4. Utjecaj koncentracije NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina katalizirane komercijalnim enzimom ADH

Ispitan je utjecaj NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina. Rezultati su prikazani na slici 5.15. Iz eksperimentalnih podataka procijenjeni su kinetički parametri ($K_m^{\text{NAD}^+}$) koji su prikazani u tablici 5.3.



Slika 5.15. Utjecaj koncentracije NAD^+ na početnu brzinu reakcije oksidacije etanolamina ($V_r = 1 \text{ cm}^3$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, 340 nm , 50 mmol/dm^3 TEA HCl pufer pH 8,0, $c_{\text{etanolamin}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{ADH}} = 10 \text{ mg/cm}^3$, • eksperimentalni podaci, — matematički model).

Tablica 5.3. Kinetički parametri oksidacije etanolamina katalizirane komercijalnom ADH

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_m	U/mg	$0,019 \pm 0,002$
$K_m^{\text{etanolamin}}$	mmol/dm^3	$52,350 \pm 13,529$
$K_m^{\text{NAD}^+}$	mmol/dm^3	$0,351 \pm 0,064$

Usporedbom procijenjenih kinetičkih parametara iz tablica 5.2. i 5.3. može se vidjeti da je maksimalna brzina reakcije (V_m) veća za enzim HLADH izoliran iz konjske jetre u Istraživačkom centru Jülich nego za komercijalni ADH zbog čega je on izabran za daljnje eksperimente. Nadalje, Michaelisove konstante za oba supstrata (etanolamin i NAD^+) pokazuju da komercijalni ADH ima veći afinitet prema supstratima nego HLADH iz Istraživačkog centra Jülich, ali ova razlika nije toliko značajna.

5.6.5. Regeneracija koenzima

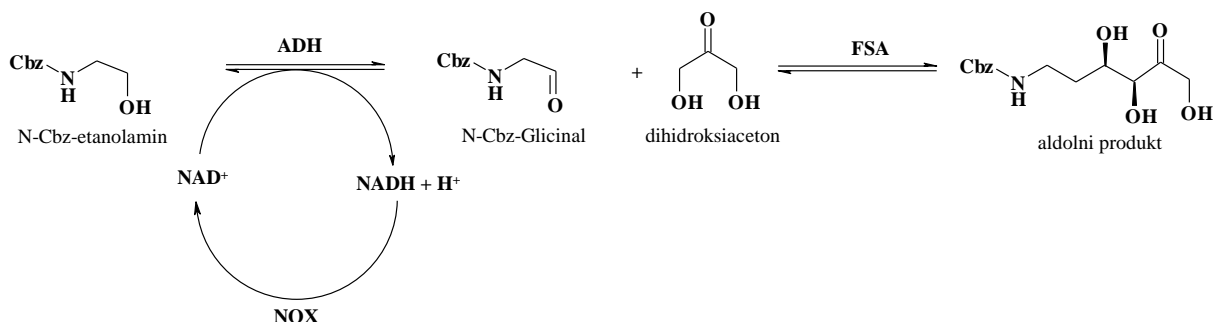
Kinetički parametri za regeneraciju koenzima NAD^+ preuzeti su iz literature [61] i prikazani su u tablici 5.4.

Tablica 5.4. Kinetički parametri regeneracije koenzima [61]

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_m	U/mg	$16,409 \pm 0,717$
K_m^{NADH}	mmol/dm ³	$0,005 \pm 0,001$
K_i^{NAD}	mmol/dm ³	$0,142 \pm 0,045$

5.7. OPTIMIZACIJA KASKADNE REAKCIJE

Razvijen je matematički model (Poglavlje 4.3.) kaskadne reakcije oksidacije etanolamina katalizirane s HLADH uz regeneraciju koenzima kataliziranu s NADH oksidazom i aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal kataliziranu s aldolazom (FSA A129N) (Slika 5.16.). Za optimizaciju kaskadne reakcije korišteni su procijenjeni kinetički parametri za reakciju aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal iz tablice 5.1. i reakciju oksidacije etanolamina iz tablice 5.2., te literaturni kinetički parametri za regeneraciju koenzima iz tablice 5.4.

**Slika 5.16.** Kaskadna reakcija

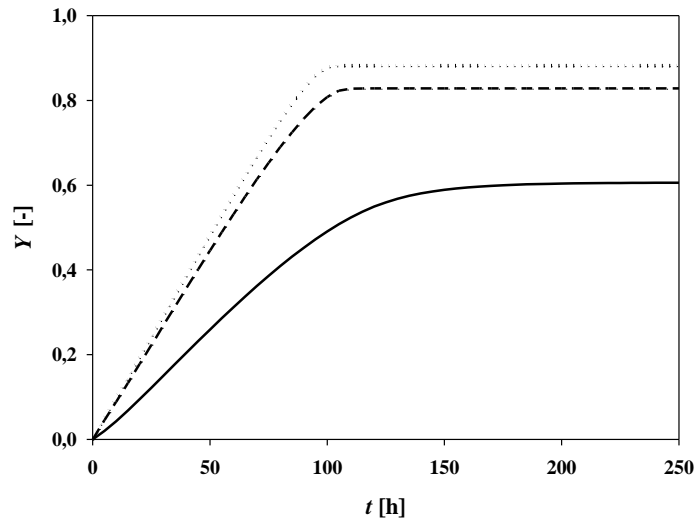
Optimizacija je provedena tako da su povećane koncentracije etanolamina, DHA, enzima FSA, ADH, NOX i koenzima NAD^+ u reakciji 5 puta, zatim 10 puta. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 5.17. te je moguće vidjeti kako se povećanjem koncentracija svih komponenata povećava iskorištenje na aldolnom produktu sa 60,59 % na 88,19 %. Iskorištenje na aldolnom produktu izračunato je prema jednadžbi 5.1.

$$Y = \frac{c_p}{c_{A0}} \quad 5.1.$$

gdje je:

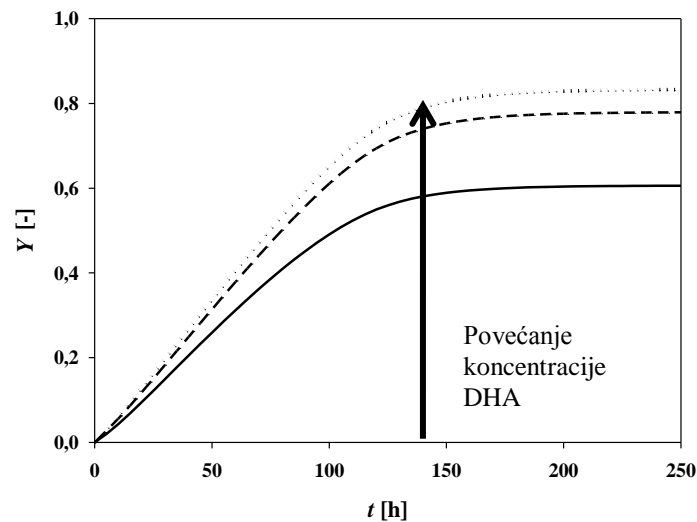
c_p – koncentracija produkta

c_{A0} – početna koncentracija supstrata



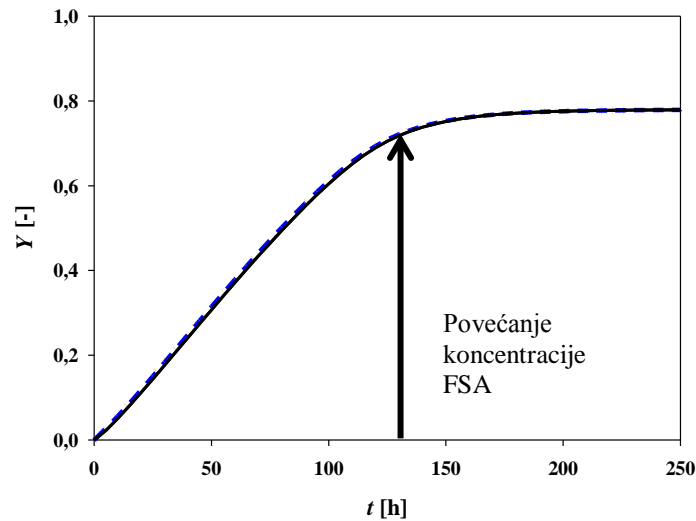
Slika 5.17. Simulacija kaskadne reakcije pri različitim koncentracijama supstrata i enzima (——— $c_{\text{DHA}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{etanolamin}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 5 \text{ mg/cm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$, $c_{\text{NAD}} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{NOX}} = 0,01 \text{ mg/cm}^3$, - - - - $c_{\text{DHA}} = 50 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{etanolamin}} = 50 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 25 \text{ mg/cm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 2,5 \text{ mg/cm}^3$, $c_{\text{NAD}} = 0,5 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{NOX}} = 0,05 \text{ mg/cm}^3$, ······ $c_{\text{DHA}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{etanolamin}} = 100 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 50 \text{ mg/cm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 5 \text{ mg/cm}^3$, $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{NOX}} = 0,1 \text{ mg/cm}^3$).

Provedeno je nekoliko simulacija kaskadne reakcije uz povećanje koncentracije DHA. Moguće je vidjeti iz dobivenih rezultata na slici 5.18. da je povećavanjem koncentracije DHA s ekvimolarne koncentracije (10 mM) na 5 puta veću koncentraciju (50 mM) dobiveno povećanje iskorištenja na aldolnom produktu sa 60,59% na 83,26%. Koncentracije svih ostalih komponenata držane su konstantnim.



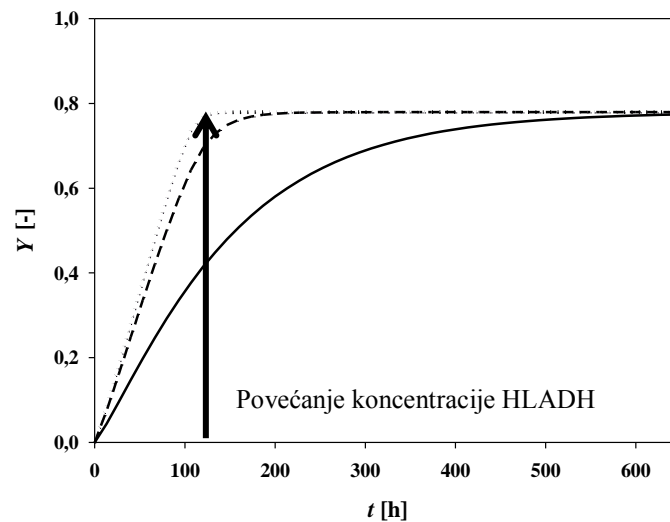
Slika 5.18. Simulacija kaskadne reakcije pri različitim koncentracijama DHA ($c_{\text{etanolamin}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 5 \text{ mg/cm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$, $c_{\text{NAD}^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{NOX}} = 0,01 \text{ mg/cm}^3$, — $c_{\text{DHA}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, ---- $c_{\text{DHA}} = 25 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 50 \text{ mmol/dm}^3$).

Također, varirana je koncentracija FSA od 0,1 do 1,0 mg/cm^3 , dok su koncentracije ostalih komponenti držane konstantnim. Rezultat je prikazan na slici 5.19. te je moguće vidjeti da se pri sve tri koncentracije FSA u istom vremenu postiže jednako iskorištenje na aldolnom produktu koje iznosi 77,92 %, što znači da povećanje koncentracije FSA iznad 0,5 mg/cm^3 nema utjecaja na reakciju.



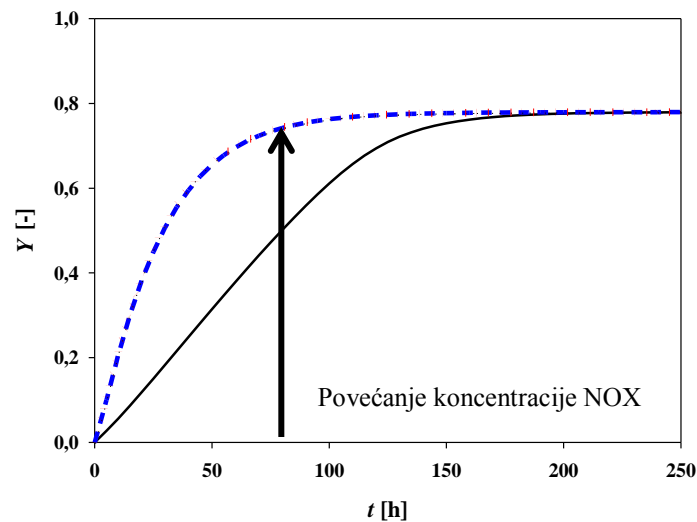
Slika 5.19. Simulacija kaskadne reakcije pri različitim koncentracijama FSA ($c_{\text{etanolamin}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 5 \text{ mg/cm}^3$, $c_{\text{NAD}^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{NOX}} = 0,01 \text{ mg/cm}^3$, — $\gamma_{\text{FSA}} = 0,1 \text{ mg/cm}^3$, - - - $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 1,0 \text{ mg/cm}^3$).

Varirana je koncentracija HLADH od 1 do 15 mg/cm^3 , dok su koncentracije ostalih komponenti držane konstantnim. Rezultat je prikazan na slici 5.20. Iz rezultata se može vidjeti da se pri koncentraciji HLADH od 15 mg/cm^3 brže postiže maksimalno iskorištenje na aldolnom produktu koje je na kraju za sve tri koncentracije HLADH jednako i iznosi 77,96 %. Iz navedenog slijedi da daljnje povećanje koncentracije HLADH nema utjecaja na iskorištenje reakcije.



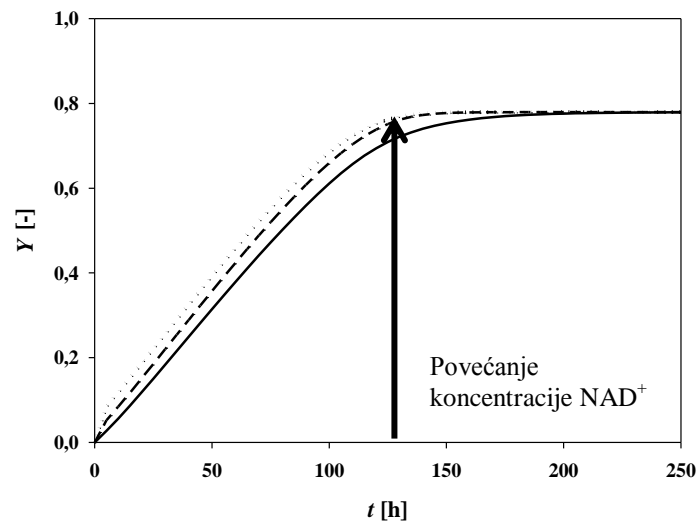
Slika 5.20. Simulacija kaskadne reakcije pri različitim koncentracijama HLADH ($c_{\text{etanolamin}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{DHA}} = 25 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$, $c_{\text{NAD}^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{NOX}} = 0,01 \text{ mg/cm}^3$, — $\gamma_{\text{HLADH}} = 1 \text{ mg/cm}^3$, --- $\gamma_{\text{HLADH}} = 5 \text{ mg/cm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 15 \text{ mg/cm}^3$).

Varirana je koncentracija NOX-a od $0,01$ od $1,0 \text{ mg/cm}^3$, dok su koncentracije ostalih komponenti držene konstantnima. Rezultat je prikazan na slici 5.21. Moguće je vidjeti da se pri koncentraciji od $0,1 \text{ mg/cm}^3$ brže postiže maksimalno iskorištenje na aldolnom produktu koje je na kraju za sve tri koncentracije jednako i iznosi $77,96 \%$. Povećanje koncentracije NOX iznad $0,1 \text{ mg/cm}^3$ nema utjecaja na reakciju.



Slika 5.21. Simulacija kaskadne reakcije pri različitim koncentracijama NOX ($c_{\text{DHA}} = 25 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{etanolamin}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$, $c_{\text{NAD}} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 5 \text{ mg/cm}^3$, — $\gamma_{\text{NOX}} = 0,01 \text{ mg/cm}^3$, - - - $\gamma_{\text{NOX}} = 0,1 \text{ mg/cm}^3$, $\gamma_{\text{NOX}} = 1 \text{ mg/cm}^3$).

Na kraju je varirana i koncentracija koenzima NAD^+ od $0,1$ do $1,0 \text{ mmol/dm}^3$, dok su koncentracije ostalih komponenti držane konstantnima. Rezultat je prikazan na slici 5.22. Može se vidjeti kako se pri koncentraciji NAD^+ od $1,0 \text{ mmol/dm}^3$ u kraćem vremenu postiže najveće iskorištenje na aldolnom produktu koje je na kraju za sve tri koncentracije jednako i iznosi $77,96 \%$. Daljnje povećanje koncentracije NAD^+ nema utjecaja na iskorištenje reakcije.



Slika 5.22. Kaskadna reakcija pri različitoj koncentraciji NAD^+ ($c_{\text{DHA}} = 25 \text{ mmol/dm}^3$, $c_{\text{etanolamin}} = 10 \text{ mmol/dm}^3$, $\gamma_{\text{FSA}} = 0,5 \text{ mg/cm}^3$, $\gamma_{\text{HLADH}} = 5 \text{ mg/cm}^3$, $\gamma_{\text{NOX}} = 0,01 \text{ mg/cm}^3$, — $c_{\text{NAD}^+} = 0,1 \text{ mmol/dm}^3$, - - - $c_{\text{NAD}^+} = 0,5 \text{ mmol/dm}^3$, ····· $c_{\text{NAD}^+} = 1 \text{ mmol/dm}^3$).

Prema rezultatima dobivenim optimiranjem kaskadne reakcije uz pomoć razvijenog matematičkog modela, pokazano je da se pri koncentracijama FSA od $0,5 \text{ mg/cm}^3$, HLADH od 15 mg/cm^3 , NOX od $0,1 \text{ mg/cm}^3$ i NAD^+ od $1,0 \text{ mmol/dm}^3$ postiže najveće iskorištenje na aldolnom produktu od 77,96 %.

6. ZAKLJUČAK

Provedbom aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru katalizirane s tri različite varijante aldolaze, FSA A129S, FSA A129N, FSA A129S/A165G, utvrđeno je da je najbolji enzim za provedbu ove aldolne adicije, uz najveće iskorištenje na aldolu od 90,86 % u najkraćem vremenu (300 min), aldolaza FSA A129N,

Kinetika aldolne adicije katalizirane aldolazom FSA A129N je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom. Kinetika retro-aldolne reakcije opisana je jednosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju supstratom – aldolom, te kompetitivnu inhibiciju produktom – N-Cbz-glicinalom. Razvijeni matematički model aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal dobro je opisao eksperimentalne podatke. Povećanjem koncentracije DHA povećava se konverzija supstrata, što je potvrđeno simulacijom aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal.

Kinetika oksidacije etanolamina katalizirane s dvije različite alkohol dehidrogenaze je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom. Iz procijenjenih kinetičkih parametara za daljnje eksperimente odabran je enzim HLADH izoliran iz konjske jetre na Institutu za bio- i geoznanosti IBG-1: Biotehnologija Istraživački centar Jülich, zbog svoje veće aktivnosti u odnosu na komercijalni enzim ADH izoliran iz konjske jetre (Sigma Aldrich).

Razvijen je matematički model za kaskadnu reakciju oksidacije etanolamina katalizirane s HLADH uz regeneraciju koenzima kataliziranu NADH oksidazom i aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal katalizirane s aldolazom (FSA A129N).

Optimizacijom kaskadne reakcije uz pomoć razvijenog matematičkog modela dobiveno je najveće iskorištenje od 77,96 % pri koncentraciji FSA od $0,5 \text{ mg/cm}^3$, HLADH od 15 mg/cm^3 , NOX od $0,1 \text{ mg/cm}^3$ i NAD^+ od $1,0 \text{ mmol/dm}^3$. To nam omogućuje isplativiju provedbu procesa uz manje otpada, kraće trajanje procesa, manju cijenu, veću učinkovitost, itd.

7. SIMBOLI

ADH	komercijalna alkohol dehidrogenaza	
FSA	D-fruktoza-6-fosfat aldolaza	
DHA	dihidroksiaceton	
DHAP	dihidroksiaceton fosfat	
NAD ⁺	nikotinamid adenin dinukleotid	
NADH	nikotinamid adenin dinukleotid – reducirani oblik	
V.A.	volumna aktivnost enzima	[U/cm ³]
S.A.	specifična aktivnost enzima	[U/mg]
V	volumen	[cm ³]
c	molarna koncentracija	[mmol/dm ³]
K _i	konstanta inhibicije	[mmol/dm ³]
K _m	Michaelisova konstanta	[mmol/dm ³]
V _m	maksimalna brzina reakcije	[U/cm ³ , ili U/mg]
t	vrijeme	[min, ili h]
γ	masena koncentracija	[mg/cm ³]
ε ₃₄₀	ekstinkcijski koeficijent pri 340 nm	[cm ² /μm]
Y	iskorištenje	[-]
λ	valna duljina	[nm]
d	promjer kivete	[cm]
ABS	apsorbancija	[-]
X	konverzija	[-]

8. LITERATURA

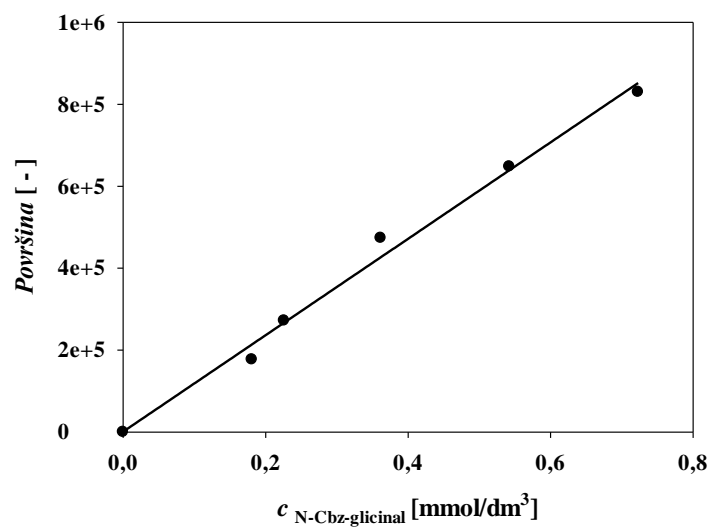
- [1] Tietze, L.F., Domino reactions in organic synthesis, *Chemical Reviews*, 96 (1996) 115.
- [2] Findrik, Z., Vasić-Rački, Đ., Overview on reactions with multi-enzyme systems, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 23 (2009) 545-553.
- [3] Alcalde, M., Ferrer, M., Plou, F.J, Ballesteros, A., Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes, *Trends in Biotechnology*, 24 (2006) 6-7.
- [4] Angelov, P., Guthke, R., A genetic-algorithm-based approach to optimization of bioprocesses described by fuzzy rules, *Bioprocess Engineering*, 16 (1997) 299-303.
- [5] Findrik, Z., Poljanac, M., Vasić-Rački, Đ., Modelling and optimization of the (R)-(+)-3,4-dihydroxyphenyllactic acid production catalyzed with D-lactate dehydrogenase from *Lactobacillus leishmannii* using genetic algorithm, *Chemical Biochemical Engineering Quarterly*, 19 (2005) 351–358.
- [6] Nelson, D.L., Cox, M.L., *Lehninger Principles of Biochemistry*, University of Wisconsin–Madison, Four Edition, 2008., str. 190 -193.
- [7] Duraković, S., *Opća mikrobiologija*, Prehrambeno tehnološki inženjering, Zagreb, 1996., str. 301-304.
- [8] Loughlin, W.A., Biotransformations in organic synthesis, *Bioresource Technology*, 74 (2000) 49.
- [9] Trost, B.M., Brindle, C.S., The direct catalytic asymmetric aldol reaction, *Chemical Society Reviews*, 39 (2010) 1600–32.
- [10] Mahrwald, R., *Modern aldol reactions. Enolates, organocatalysis, biocatalysis and natural product synthesis*, vol. 1. Weinheim: Wiley-VCH; 201 (2004) 208-232.
- [11] Clapés, P., Fessner, W.-D., Sprenger, G.A., Samland, A.K., Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases, *Current Opinion in Chemical Biology*, 14 (2010) 154–167.
- [12] Clapés, P., Garrabou, X., Current trends in asymmetric synthesis with aldolases, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 353 (2011) 2263–83.
- [13] Schürmann, M., Sprenger, G.A., Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases, *Journal of Biological Chemistry*, 276 (2001) 11055–61.
- [14] Widmann, M., Pleiss, J., Samland, A.K., Computational tools for rational protein engineering of aldolases, *Computational and structural biotechnology journal*, 2 (2012) 1-11.
- [15] Samland, A.K., Sprenger, G.A., Microbial aldolases as C–C bonding enzymes—unknown treasures and new developments, *Applied Microbiology Biotechnology*, 71 (2006) 253–264.
- [16] Machajewski, T.D., Wong, C.-H., The catalytic asymmetric aldol reaction, *Angewandte Chemie International Edition*, 39 (2000) 1352–1375.
- [17] Fessner, W.-D., Heyl, D., Rale, M., Multi-enzymatic cascade synthesis of dfructose 6-phosphate and deoxy analogs as substrates for high-throughput aldolase screening, *Catalysis Science and Technology*, 2 (2012) 1596–1601.
- [18] Castillo, J.A., Calveras, J., Casas, J., Mitjans, M., Vinardell, M.P., Parella, T., Inoue, T., Sprenger, G.A., Joglar, J., Clapes, P., Fructose-6-phosphate aldolase in organic synthesis: preparation of D-fagomine, N-alkylated derivatives, and preliminary biological assays, *Organic Letters*, 8 (2006) 6067–6070.
- [19] Castillo, J.A., Guerard-Helaine, C., Gutierrez, M., Garrabou, X., Sancelme, M., Schurmann, M., Inoue, T., Helaine, V., Charmantray, F., Gefflaut, T., Hecquet, L., Joglar, J., Clapes, P., Sprenger, G.A., Lemaire, M., A mutant D-fructose-6-phosphate aldolase (Ala129Ser) with improved affinity towards dihydroxyacetone for the synthesis of polyhydroxylated compounds, *Advanced Synthesis and Catalysis*, 352 (2010) 1039–1046.
- [20] Thorell, S., Schürmann, M., Sprenger, G. A., Schneider, G., Crystal structure of decameric fructose-6-phosphate aldolase from *Escherichia coli* reveals inter-subunit helix swapping as a structural basis for assembly differences in the transaldolase family, *Journal of Molecular Biology*, 319 (2002) 161-171.

- [21] <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1l6w> (pristup 17. travnja 2015.)
- [22] Madhusudhan, M.C., Raghavarao, K.S.M.S., Nene, S., Integrated process for extraction and purification of alcohol dehydrogenase from Baker's yeast involving precipitation and aqueous two phase extraction, *Biochemical Engineering Journal*, 38 (2008) 414–420.
- [23] http://en.wikipedia.org/wiki/Alcohol_dehydrogenase (pristup 17. travnja 2015.)
- [24] John, H., Eckfeldt, R., Light, T., Kinetic ethylene glycol assay with the help of yeast alcohol dehydrogenase, *Clinical Chemistry*, 26 (1980) 1278–1280.
- [25] Gonchar, M., Maiden, M., Korpan, Y., Sibirny, V., Kotylak, Z., Sibirny, A., Metabolically engineered methylotrophic yeast cells and enzymes as sensor recognition elements, *FEMS Yeast Research*, 2 (2002) 307–314.
- [26] Maugard, T., Lamare, S., Legoy, M.D., Gas phase biotransformation reaction catalyzed by baker's yeast, *Biotechnology Bioengineering*, 73 (2001) 164–8.
- [27] Zanon, J.P., Peres, M.F.S., Gattas, E.A.L., Colorimetric assay of ethanol using alcohol dehydrogenase from dry baker's yeast, *Enzyme and Microbial Technology*, 40 (2007) 466–470.
- [28] Jörnvall, H., Persson, B., Jeffery, J., Characteristics of alcohol/polyol dehydrogenases. The zinc-containing long-chain alcohol dehydrogenases, *European Journal of Biochemistry*, 167 (1987) 195–201.
- [29] Adolph, H.-W., Zwart, P., Meijers, R., Hubatsch, I., Kiefer, M., Lamzin, V., Cedergren-Zeppezauer, E., Structural basis for substrate specificity difference of horse liver alcohol dehydrogenase isozymes, *Biochemistry* 39 (2000) 12885–97.
- [30] Saliola, M., Shuster, J.R., Falcone, C., The alcohol dehydrogenase system in the yeast *Kluyveromyces lactis*, *Yeast*. 6 (1990) 193–204.
- [31] Niefind, K., Müller, J., Riebel, B., Hummel, W., Schomburg, D., The crystal structure of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* suggests the structural basis of its metal dependency, *Journal of Molecular Biology*, 327 (2003) 317–28.
- [32] Williamson, VM., Paquin, CE., Homology of *Saccharomyces cerevisiae* ADH4 to an iron-activated alcohol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*, *Molecular Genetics*, 209 (1987) 371–81.
- [33] Leskovic, V., Trivić, S., Peričin, D., The three zinc-containing alcohol dehydrogenase from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Yeast Research* 2 (2002) 481–94.
- [34] Vrsalović Presečki, A., Vasić-Rački, Đ., Modelling of the alcohol dehydrogenase production in baker's yeast, *Process Biochemistry*, 40 (2005) 2781–2791.
- [35] Rocha-Martín, J., Vega, D., Bolivar, J.M., Godoy, C.A., Hidalgo, A., Berenguer, J., Guisán, J.M., López-Gallego, F., New biotechnological perspectives of a NADH oxidase variant from *Thermus thermophilus* HB27 as NAD⁺-recycling enzyme, *BMC Biotechnology*, 11 (2011) 101–112.
- [36] Weckbecker, A., Gröger, H., Hummel, W., Regeneration of nicotinamide coen-zymes: principles and applications for the synthesis of chiral compounds, *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 120 (2010) 195–242.
- [37] Wichmann, R., Vasić-Rački, Đ., Cofactor regeneration at the lab scale, *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 92 (2005) 225–260.
- [38] Geueke, B., Riebel, B., Hummel, W., NADH oxidase from *Lactobacillus brevis*: a new catalyst for the regeneration of NAD, *Enzyme Microbiology Technology*, 32 (2003) 205–211.
- [39] Donk van der, W., Zhao, H., Recent developments in pyridine nucleotide regeneration, *Current Opinion Biotechnology*, 14 (2003) 421–426.
- [40] Findrik, Z., Vrsalović Presečki, A., Vasić-Rački, Đ., Mathematical modelling of NADH oxidation catalyzed by new NADH oxidase from *Lactobacillus brevis* in continuously operated enzyme membrane reactor, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104 (2007) 275 - 280.
- [41] <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n1288?lang=en®ion=HR> (pristup 12. srpnja 2015.)
- [42] Higuchi, M., Yamamoto, Y., Poole, L.B., Shimada, M., Sato, Y., Takahashi, N., Kamio, Y., Functions of two types of NADH oxidases in energy metabolism and oxidativestress of *Streptococcus mutans*, *Journal of Bacteriology*, 181 (1999) 5940–5947.
- [43] Hummel, W., Kuzu, M., Geueke, B., An efficient and selective enzymatic oxidationsystem for the synthesis of enantiomerically pure d-tert-leucine, *Organic Letters*, 5 (2003) 3649–3650.

- [44] Chenault, H.K., Whitesides, G.M., Lactate dehydrogenase-catalyzed regeneration of NAD from NADH for use in enzyme-catalyzed synthesis, *Bioorganic Chemistry*, 17 (1989) 400–409.
- [45] Kim, M.S., Kim, Y.J., Enzymatic properties of the membrane-bound NADH oxidase system in the aerobic respiratory chain of *Bacillus cereus*, *Journal of biochemistry and molecular biology*, 37 (2004) 753–756.
- [46] Kengen, S.W.M., Oost, J., Vos, W.M., Molecular characterization of H₂O₂-forming NADH oxidases from *Archaeoglobus fulgidus*, *European Journal of Biochemistry*, 270 (2003) 2885–2894.
- [47] Riebel, B.R., Gibbs, P.R., Wellborn, W.B., Bommarius, A.S., Cofactor regeneration of NAD⁺ from NADH: novel water-forming NADH oxidases, *Advanced Synthesis & Catalysis* 344 (2002) 1156–1168.
- [48] Ross, R.P., Claiborne, A., Molecular cloning and analysis of the gene encoding the NADH oxidase from *Streptococcus faecalis* 10C1: comparison with NADH peroxidase and the flavoprotein disulfide reductases, *Journal of Molecular Biology*, 227 (1992) 658–671.
- [49] Hou, S., Ji, D., Liu, W., Wang, L., Zhao, Z.K., Identification of malic enzyme mutants depending on 1,2,3-triazole moiety-containing nicotinamide adenine dinucleotide analogs, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24 (2014) 1307–1309.
- [50] Jiang, C., Kan, Y.-Y., Jiang, J.-H., Yu, R.-Q., A simple and highly sensitive DNAzyme-based assay for nicotinamide adenine dinucleotide by ligase-mediated inhibition of strand displacement amplification, *Analytica Chimica Acta*, 844 (2014) 70–74.
- [51] Lau, S. K., Chass, G. A., Lovas, S., Penke, B., Csizmadia, I. G., An exploratory ab initio conformational analysis of selected fragments of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺). Part I: 5-deoxyribose nicotinamide N-glycoside, *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, 666–667 (2003) 415–429.
- [52] Hoffmann, S. K., Goslar, J., Lijewski, St., Basiński, K., Gąsowska, A., Łomozik, L., EPR and potentiometric studies of copper(II) binding to nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) in water solution, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 111 (2012) 18–24.
- [53] <http://imgarcade.com/1/nad-structure/> (pristup 17. travnja 2015.)
- [54] Wilkinson, A., Day, J., Bowater, R., Bacterial DNA ligases, *Molecular Microbiology*, 40 (2001) 1241–1248.
- [55] Zhang, Q., Piston, D.W., Goodman, R.H., Regulation of corepressor function by nuclear NADH, *Science*, 295 (2002) 1895–1897.
- [56] Guse, A.H., Gu, X., Zhang, L., Weber, K., Krämer, E., Yang, Z., Jin, H., Li, Q., Carrier, L., Zhang, L., A minimal structural analogue of cyclic ADP-ribose: synthesis and calcium release activity in mammalian cells, *Journal Biological Chemistry*, 280 (2005) 15952–15959.
- [57] Garcia-Junceda, E., *Multi-Step Enzyme Catalysis: biotransformations and chemoenzymatic synthesis*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA, Weinheim, 2008., str. 109-110.
- [58] *SCIENTIST handbook*, 1986.
- [59] Sudar, M., Findrik, Z., Vasić-Rački, Đ., Clapés, P., Lozano, C., Aldol addition of dihydroxyacetone to N-Cbz-3-aminopropanal catalyzed by two aldolases variants in microreactors, *Enzyme and Microbial Technology*, 53 (2013a) 38-45.
- [60] Sudar, M., Findrik, Z., Vasić-Rački, Đ., Clapés, P., Lozano, C., Mathematical model for aldol addition catalyzed by two D-fructose-6-phosphate aldolases variants overexpressed in *E. coli*, *Journal of Biotechnology*, 167 (2013b) 191-200.
- [61] Sudar, M., Findrik, Z., Vuković Domanovac, M., Vasić-Rački, Đ., Coenzyme regeneration catalyzed by NADH oxidase from *Lactococcus lactis*, *Biochemical Engineering Journal*, 88 (2014) 12–18.

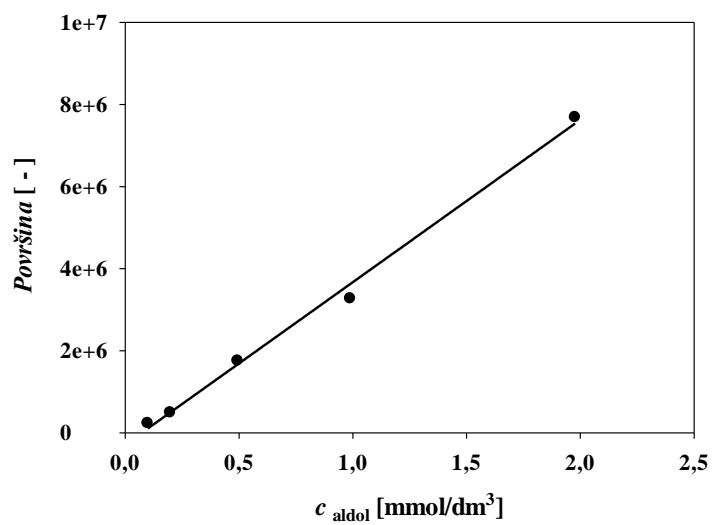
9. PRILOZI

PRILOG 1.



Slika 9.1. Baždarni dijagram za N-Cbz-glicinal

PRILOG 2.



Slika 9.2. Baždarni dijagram za aldol

PRILOG 3. – Program u SCIENTIST-u**Prilog 3.1. Jednosupstratni kinetički model za određivanje kinetike**

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: c
DepVars: r
Params: Km, Vm
// Kineticki model
 $r = Vm * c / (Km + c)$ 
// Kineticki parametri
Vm=1.6
Km =7
***
```

Prilog 3.2. Dvosupstratni kinetički model za određivanje kinetike

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: c1, c2
DepVars: r
Params: Km_1, Km_2, Vm1
// Kineticki model
 $r1 = (Vm1 * c1 * c2) / ((Km_1 + c1) * (Km_2 + c2))$ 
// Kineticki parametri
Vm1=1.8
Km_1=7
Km_2=50
***
```

Prilog 3.3. Matematički model kaskadne reakcije

```

IndVars: t
DepVars: ALKOHOL, ALDEHID, ALDOL
Params: Vm1, Vm2, Vm3, Vm4, Km_ALDEHID, Km_DHA, Km_ALDOL, Ki_ALDOL,
Km_ALKOHOL, Ki_ALDEHID, Km_NAD, Km_NADH, Ki_NAD
//Kineticki model
r1=(Vm1*ALDEHID*DHA*FSA)/((Km_ALDEHID+ALDEHID)*(Km_DHA+DHA))
r2=(Vm2*ALDOL*FSA)/(Km_ALDOL*(1+(ALDEHID/Ki_ALDEHID))+ALDOL+((ALD
OL^2)/Ki_ALDOL))
r3=(Vm3*ALKOHOL*NAD*ADH)/((Km_ALKOHOL+ALKOHOL)*(Km_NAD+NAD))
r4=(Vm4*NADH*NOX)/((Km_NADH+NADH)*(1+(NAD/Ki_NAD)))
//Bilancne jednadžbe
ALDEHID'=-r1+r2+r3
DHA'=-r1+r2
ALDOL'=-r2+r1
ALKOHOL'=-r3
NADH'=r3-r4
NAD'=-r3+r4
//Kineticki parametri
Vm1=2.03466036
Vm2=15.415
Vm3=0.075
Vm4=0.18
Ki_ALDOL=43.854
Ki_ALDEHID=0.389572
Ki_NAD=0.142
Km_ALDEHID=10.4123233
Km_DHA=40.09705
Km_ALDOL=167.81
Km_ALKOHOL=91.291
Km_NAD=0.507
Km_NADH=0.005
//Pocetni uvjeti
t=0
FSA=0.5
ADH=5
ALDEHID=0
ALDOL=0
DHA=10
ALKOHOL=10
NAD=1
NADH=0
NOX=0.1
***

```

ŽIVOTOPIS

Anamarija Slivar rođena je 27. srpnja 1991. godine u Zagrebu. Osnovnu školu pohađala je u Sesevskom Kraljevcu. 2006. godine upisala je Srednju školu Sesvete, smjer Opća gimnazija, gdje je 2010. godine maturirala. Iste godine upisala je sveučilišni prediplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Završni rad pod nazivom „Napredni oksidacijski procesi obrade voda“ obranila je u rujnu 2013. godine i time stekla akademski naziv sveučilišna prvostupnica inženjerka ekoinženjerstva. Nakon završenog preddiplomskog studija s prosjekom 4,213 nastavila je obrazovanje na istoimenom diplomskom studiju. U veljači 2015. godine položila je zadnji ispit diplomskog studija i ostvarila prosjek 5,000.

Tijekom studija bila je demonstrator iz kolegija „Prijenos tvari i energije“, „Jedinične operacije u ekoinženjerstvu“, „Mehaničko procesno inženjerstvo“, „Toplinsko procesno inženjerstvo“, „Procesi prijenosa i separacija“ i „Sustavi jediničnih operacija“. Sudjelovala je na Sajmu ideja u listopadu 2013. godine s temom svoga završnoga rada, X. Susretu mladih kemijskih inženjera u veljači 2014. godine s temom „Regeneracija ionskih kapljevina“, XV. Ružičkinim danima u rujnu 2014. godine s temom „Primjenjivost *n*-heksadekana pri regeneraciji ionskih kapljevina“, Sajmu ideja u listopadu 2014. godine s temom „Primjenjivost *n*-heksadekana i *n*-dodekana pri regeneraciji ionskih kapljevina“, Natural resources green technology and sustainable development u studenom 2014. godine s temom „Liquid – liquid extraction as a successful tool for regeneration of ionic liquids“ i 24. Hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera u travnju 2015. s temom „Ekološki prihvatljiva otapala u procesu separacije organskih spojeva“.

Tijekom studija za uspješnost na kraju prediplomskog studija dobila je pohvalu Cum laude. Na diplomskom studiju dobitnica je stipendije za darovite studente Sveučilišta u Zagrebu (2013./2014.) i stipendije Grada Zagreba (2014./2015.).