

# Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije katalizirane halogenhidrin-dehalogenazom

---

**Marić, Ana-Katarina**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2020**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:251651>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ana-Katarina Marić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ  
PRIMIENJENA KEMIJA

Ana-Katarina Marić

MATEMATIČKI MODEL DINAMIČKE KINETIČKE  
REZOLUCIJE KATALIZIRANE  
HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZOM

ZAVRŠNI RAD

Mentorica: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević  
doc. dr. sc. Martina Sudar  
prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2020.

*Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na susretljivosti, stručnom savjetovanju i usmjeravanju tijekom izrade završnog rada.*

*Zahvaljujem mag. ing. oecoing. Neveni Milčić za stvaranje ugodne radne atmosfere i svu pomoć pri provođenju eksperimenata, a ponajviše strpljenju i spremnosti za odgovaranje na sva postavljena pitanja.*

*Hvala mojoj obitelji za svu podršku, strpljenje i razumijevanje, neizmjernu ljubav i konstantno ohrabrivanje.*

## SAŽETAK

Optički čiste tvari imaju veliku važnost u farmaceutskoj industriji, a mogu se dobiti enantioselektivnom biokatalizom čije su dvije metode kinetička rezolucija i asimetrična sinteza. Konverzija početnih spojeva u optički čiste produkte pri kinetičkoj rezoluciji iznosi do 50%. Ovaj nedostatak se rješava dinamičkom kinetičkom rezolucijom (DKR) koja se temelji na kinetičkoj rezoluciji kombiniranoj s *in situ* racemizacijom sporije reagirajućeg enantiomera. Pri odgovarajućim uvjetima dinamičkom kinetičkom rezolucijom se racemična smjesa može prevesti u jedan enantiomer. Efikasnost DKR ovisi o strukturnim parametrima supstrata i katalizatora te uvjetima *in situ* racemizacije.

Matematički modeli se sastoje od kinetičkog i reaktorskog modela. U ovom radu je provedena validacija matematičkog modela dinamičke kinetičke rezolucije dobivanja (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona iz *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana katalizirana enzimom halogenhidrin-dehalogenazom HheC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1. Reakcijska shema je podijeljena na tri reakcijska stupnja, pri čemu je prvi reakcija između (*S*)-epoksida i cijanatnih iona uz nastajanje (*S*)-oksazolidinona. Istovremeno dolazi do reakcije (*R*)-epoksida i cijanatnih iona uz nastajanje (*R*)-oksazolidinona. Nadalje, drugi stupanj je nastajanje dibromoalkohola iz (*R*)-epoksida i bromidnih iona te iz (*S*)-epoksida i bromidnih iona, dok je treći stupanj nastajanje *rac*-epoksida iz dibromoalkohola. Korišteni HheC enzim jedan je od nekolicine strukturno okarakteriziranih halogenhidrin-dehalogenaza. Kinetika ove reakcije određena je u ranijim radovima. Provođenjem eksperimenata validacije u kotlastom reaktoru uočeno je kako ovi enzimi imaju različit afinitet prema enantiomerima.

Eksperimentalni podaci pokazali su zadovoljavajuće slaganje s ranije postavljenim modelom te su utvrđeni optimalni uvjeti pri kojima se dinamičkom kinetičkom rezolucijom može sintetizirati čisti (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on.

**KLJUČNE RIJEČI:** halogenhidrin-dehalogenaza, epoksid, oksazolidinon, validacija, matematički model, dinamička kinetička rezolucija

## SUMMARY

Optically pure compounds are of great significance in the pharmaceutical industry and can be produced by enantioselective biocatalysis whose two methods are kinetic resolution and asymmetric synthesis. The conversion of the initial compounds to optically pure products by kinetic resolution does not exceed 50 %. This drawback is solved by dynamic kinetic resolution (DKR) which is based on kinetic resolution combined with *in situ* racemization of slower reacting enantiomer. Under adequate conditions, a racemic mixture can be transformed into one enantiomer by dynamic kinetic resolution. DKR efficiency depends on the structural parameters of substrates and catalysts as well as the conditions of *in situ* racemization.

The mathematical model consists of the kinetic and the reactor model. In this paper, validation of the mathematical model of dynamic kinetic resolution for obtaining (*S*)-5-bromomethyl-5-methyloxazolidin-2-one from *rac*-2-bromomethyl-2-methyl-oxirane catalyzed by HheC enzyme extracted from *Agrobacterium radiobacter* AD1 is conducted. The model is divided into three reaction steps, where the first one is the reaction of (*S*)-epoxide and cyanate ions with the formation of (*S*)-oxazolidinone. Simultaneously, the reaction with (*R*)-epoxide and cyanate ions forming (*R*)-oxazolidinone is happening. Furthermore, the second step is the formation of dibromoalcohol from (*R*)-epoxide and bromide ions as well as (*S*)-epoxide and bromide ions, while the third step is the formation of *rac*-epoxide from dibromoalcohol. HheC used in the experiment is one of the few structurally characterized halohydrin-dehalogenases. The kinetic of this reaction was determined in previous papers. While conducting validation experiments in the batch reactor it was recorded that these enzymes have a different enantiomeric affinity.

Experimental data have shown a satisfactory match with the earlier developed model. Moreover, optimal conditions for dynamic kinetic resolution for obtaining optically pure (*S*)-5-bromomethyl-5-methyloxazolidin-2-one were stipulated.

**KEY WORDS:** halohydrin-dehalogenase, epoxide, oxazolidinone, validation, mathematical model, dynamic kinetic resolution

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Opći dio .....</b>	<b>2</b>
2.1. Biokataliza .....	2
2.1.1. Biokatalizatori.....	2
2.1.2. Halogenhidrin-dehalogenaza .....	5
2.1.2.1. Povijesno otkriće.....	5
2.1.2.1. Strukturne karakteristike i klasifikacija .....	6
2.1.2.3. Reakcijski mehanizmi .....	7
2.1.2.4. Primjena u biokatalizi .....	9
2.2. Optički aktivne tvari .....	9
2.2.1. Dobivanje optički aktivnih tvari .....	10
2.2.1.1. Enantioselektivna biokataliza .....	10
2.2.1.2. Dinamička kinetička rezolucija.....	11
2.2.2. Epoksidi .....	11
2.2.3. Oksazolidinoni .....	12
2.3. Modeliranje biotransformacija.....	13
2.3.1. Matematički modeli .....	14
2.3.2. Kinetički modeli .....	14
2.3.3. Reaktorski modeli .....	18
<b>3. Eksperimentalni dio .....</b>	<b>19</b>
3.1. Aparatura .....	19
3.1.1. Reakcijski sustav.....	19
3.1.2. Plinski kromatograf.....	19
3.1.3. Ostala aparatura .....	20
3.2. Priprava kemikalija.....	21
3.2.1. Popis kemikalija.....	21
3.3. Analitičke metode.....	22
3.3.1. Analiza plinskom kromatografijom .....	22
3.4. Provođenje dinamičke kinetičke rezolucije u kotlastom reaktoru.....	23
<b>4. Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije.....</b>	<b>24</b>
4.1. Kinetički model .....	25
4.2. Reaktorski model .....	27

<b>5. Rezultati i rasprava .....</b>	<b>28</b>
5.1. Kinetika dinamičke kinetičke rezolucije .....	28
5.2. Validacija modela .....	30
<b>6. Zaključak .....</b>	<b>33</b>
<b>7. Popis simbola i pokrata.....</b>	<b>34</b>
<b>8. Literatura .....</b>	<b>36</b>
<b>9. Prilozi.....</b>	<b>40</b>



# 1. UVOD

Zbog kompleksnosti biokatalitičkih procesa, u usporedbi s klasičnim organskim reakcijama, mnogi su ispitani samo teorijski. (Faber, 2018.) No ovi procesi zauzimaju važan položaj u znanstvenim istraživanjima i razvitku bioekonomije, zbog svoje ekološke prihvatljivosti, održivosti te sve veće zainteresiranosti za trend zelene kemije. Prvenstveno su korišteni u reakcijama esterifikacije i hidrolize, a danas imaju široki spektar primjene, posebno u farmaceutskoj industriji zbog potrebe za optički čistim spojevima. Biokataliza često omogućuje efikasnije sintetske puteve te smanjuje količinu otpadnih nusproizvoda tijekom proizvodnje farmaceutika. (Whittall et al., 2012.) Proučavanjem biokatalitičkih procesa bavi se bioreakcijsko inženjerstvo, čiji je cilj industrijska proizvodnja bioprodukata. (Findrik Blažević, 2017.) Biokatalitički procesi odvijaju se pri blagim uvjetima s neopasnim i obnovljivim katalizatorima te tako daju nove mogućnosti razvoju kemijskih industrijskih procesa. Doprinosu ekonomičnosti te zadovoljavaju zakonske regulative zaštite okoliša, a koriste se u slučajevima kada bi kemijska kataliza bila puno kompliciranija. U svijetu se 85-90% procesa provodi katalitički, a biokatalitički procesi se javljaju u više od 300 raznih industrijskih postrojenja. (Faber 2018.) Korišteni biokatalizatori se svojom definicijom i funkcijom ne razlikuju od običnih katalizatora, no prednost njihovog korištenja očituje se u njihovoj sposobnosti razgradnje toksičnih i za okoliš opasnih tvari te visokoj enantioselektivnosti, regioselektivnosti i kemoselektivnosti. Implementiranje biokatalizatora u industrijske procese se odvija sporo, a većinom se koriste komercijalno dostupni enzimi kao što su lipaze, esteraze i proteaze. (Whittall et al., 2012.) Idealni su biokatalizatori katalitički efikasni, imaju dobru stabilnost i jednostavan postupak pripreme. (You et al., 2013.) Danas je poznato 3000 enzima koji kataliziraju gotovo sve tipove reakcija, no industrijski se koristi samo njih 150-170 i to u prehrambenoj industriji, genetičkom inženjerstvu, industrijskoj biokatalizi i kozmetičkoj industriji. (Patel et al., 2016.)

Konkretan primjer biokatalizatora su halogenhidrin-dehalogenaze, koje su kao i povratne reakcije dehalogeniranja poznate još od 1968. godine. Mogućnost djelovanja ovih enzima na reakcije otvaranja epoksidnih prstenova demonstrirana je tek 1990.-ih, a od tada se provode intenzivnija istraživanja. (Majerić Elenkov et al., 2014.) Vrlo su rijetki enzimi te sudjeluju u mineralizaciji halogeniranih ksenobiotika. Usprkos velikom potencijalu korištenja kao biokatalizatora, do sada je za upotrebu izolirano i strukturno okarakterizirano samo nekoliko halogenhidrin-dehalogenaza. (Schallmeyer et al., 2014.)

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Biokataliza

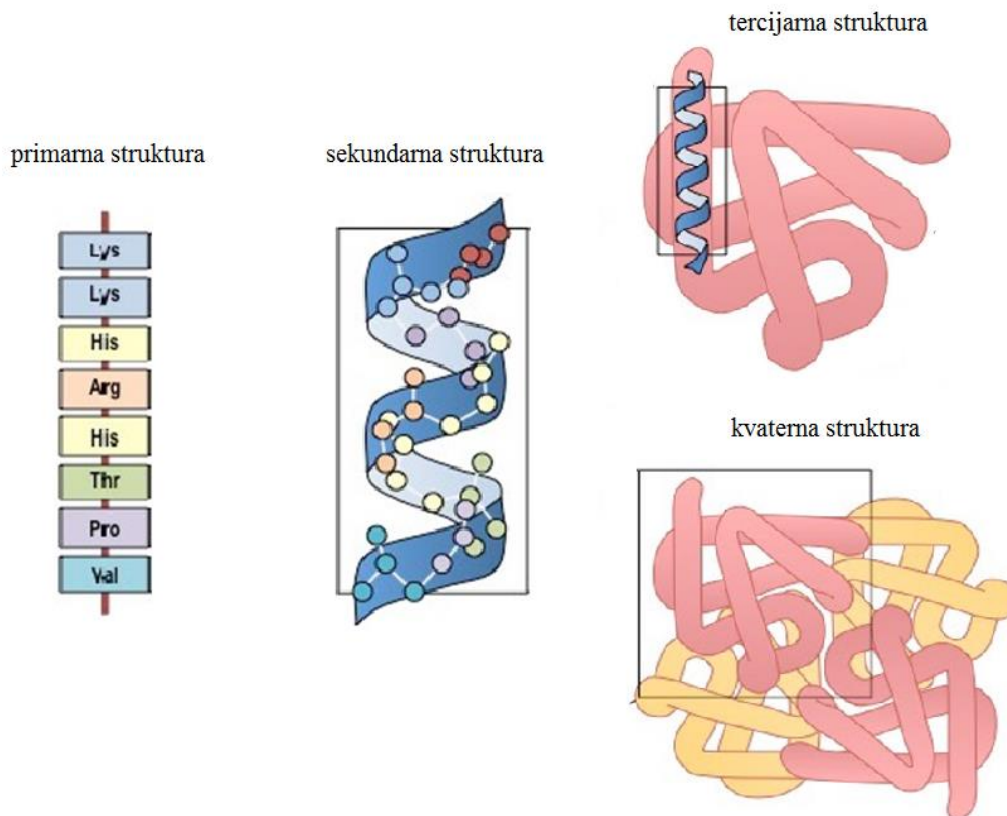
Biokataliza je definirana kao kemijski proces kroz koji izolirani i pročišćeni enzimi ili drugi biološki katalizatori provode katalizu reakcija između organskih spojeva. Pri korištenju izoliranih enzima, biokatalitički proces zahtjeva jednostavnije aparature, iskorištenje reakcije je veće te se produkti mogu lakše izolirati. Biokataliza je kontinuirano proučavana grana znanosti i tehnologije, a pod utjecajem biotehnologije i biotransformacija, biokatalizatorima se pronalaze nove primjene. (Patel et al., 2016.) Također, moderna biotehnologija napravila je iskorak te omogućila proizvodnju modificiranih i sintetskih enzima, stoga biokataliza nije više strogo vezana za prirodne enzime. Nadalje, za provođenje biokatalitičkih reakcija kao supstrati se često koriste organske molekule netopive u vodi, a gotovo svaka organska reakcija ima kompatibilnu biokatalitičku reakciju. U usporedbi s kemijskom katalizom, biokataliza ima veću učinkovitost te su potrebne manje koncentracije enzima za provedbu reakcije, no ima ograničene uvjete rada jer se pri pH vrijednostima izvan optimalnog područja i visokim temperaturama enzimi denaturiraju i gube svoju aktivnost. (Faber, 2018.)

#### 2.1.1. Biokatalizatori

Biokatalizatori su aktivni proteini koji se nalaze u živim organizmima i već u malim količinama mogu katalizirati biokemijske reakcije. U usporedbi s klasičnim katalizatorima, njihovi izvori su obnovljivi te ne zagađuju okoliš s obzirom da su i oni sami dio ekosustava. Brojni se mogu izolirati iz mikroorganizama i bakterija te biljaka. Enzimsko djelovanje najviše se očituje pri pH 5-8 i temperaturama od 20 °C do 40 °C. Zbog reakcijskih uvjeta u kojima djeluju, smanjuju pojavu nepoželjnih reakcija kao što su raspad produkta, izomerizacija i racemizacija. (Faber, 2018.)

Enzimi su po kemijskoj prirodi proteini građeni od jednog ili više polipeptidnih lanaca. Aminokiseline se vežu peptidnom vezom koja nastaje povezivanjem  $\alpha$ -COO<sup>-</sup> skupine jedne, sa  $\alpha$ -NH<sup>3+</sup> skupinom druge aminokiseline uz izdvajanje vode. Molekulske mase enzima kreću se od 15 000 g mol<sup>-1</sup> do nekoliko milijuna g mol<sup>-1</sup>. Osim enzimske katalize, imaju glavne uloge u svim biološkim procesima. Enzimi, ovisno o svojstvima aminokiselina koje ih grade, dolaze u obliku primarne, sekundarne, tercijarne te kvaterne strukture. Razine

strukturne organizacije proteina prikazane su na slici 2.1. Primarna struktura definirana je jedinstvenim aminokiselinskim slijedom u polipeptidnom lancu. Izvijanjem i međusobnim nekovalentnim interakcijama aminokiselina, nastaje sekundarna struktura, čiji su elementi  $\alpha$ -uzvojnica,  $\beta$ -lanci povezani u  $\beta$ -list te  $\beta$ -okret i  $\Omega$ -omče. Tercijarna struktura dobiva se daljnjim svijanjem, uvijanjem i zbijanjem lanca, a predstavlja trodimenzijski raspored svih atoma polipeptidnog lanca. Četvrta razina strukturne organizacije je kvaterna struktura koja definira prostorni odnos domena povezanih nekovalentnim interakcijama ili disulfidnim vezama. (Stryer, 1981.) Mnogi enzimi u svojoj strukturi moraju sadržavati kofaktore kako bi bili katalitički aktivni. Kofaktor čini vrlo mali udio mase cijelog enzima. Može biti metalni ion, a u slučaju da je organska molekula, tada se naziva koenzim. (Faber, 2018.)



**SLIKA 2.1.** Strukturna organizacija proteina

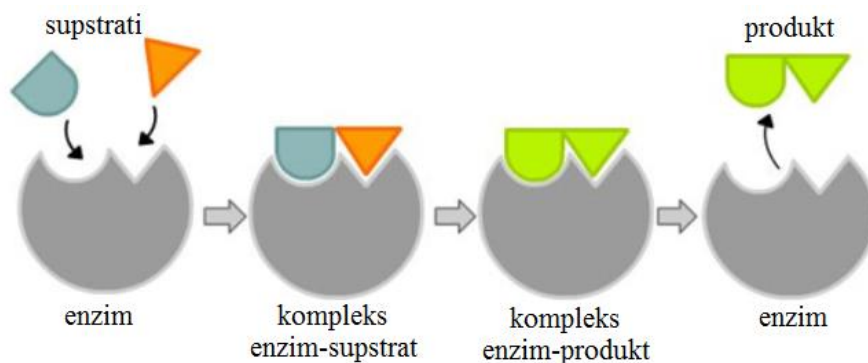
Enzimi se klasificiraju prema prirodi reakcija koje kataliziraju. Imenovanje enzima sastoji se od naziva reakcije koju katalizira i nastavka -aza, a svaki enzim ima odgovarajući komisijski broj (engl. Enzyme Commission Number) pomoću kojeg se mogu razlikovati klase enzima. Internacionalna unija za biokemiju i molekularnu biologiju (engl. International Union of Biochemistry and Molecular Biology) sve poznate enzime, grupira u šest glavnih skupina koje su navedene u tablici 2.1. (Liu et al., 2016).

**TABLICA 2.1.** Skupine enzima i karakteristične reakcije

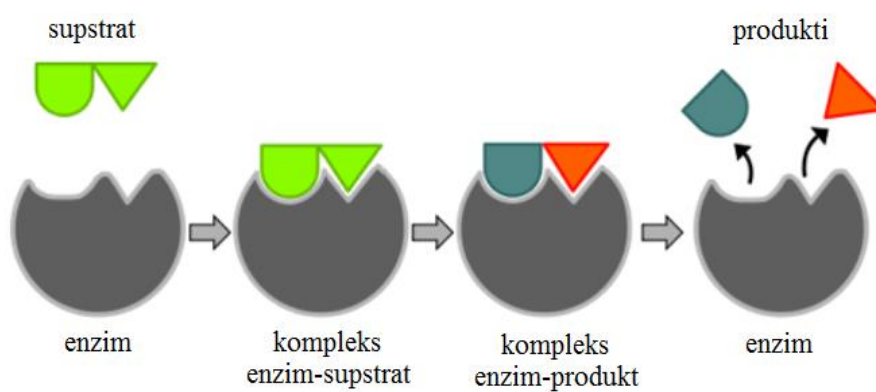
<b>NAZIV SKUPINE ENZIMA</b>	<b>VRSTA REAKCIJE KOJU KATALIZIRA</b>
<b>oksidoreduktaze</b>	oksidacija-redukcija
<b>transferaze</b>	prijenos skupina ili atoma
<b>hidrolaze</b>	prijenos funkcionalne skupine na vodu (hidroliza)
<b>liaze</b>	eliminacija i adicija skupina radi stvaranja dvostruke veze
<b>izomeraze</b>	izomerizacija
<b>ligaze</b>	vezanje supstrata i hidroliza pirofosfatne veze u adenozin-trifosfatu

Enzimi imaju veliku katalitičku moć, stereoselektivni su i visokospecifični. Smanjenjem energije aktivacije ( $E_a$ ) olakšavaju nastajanje prijelaznog stanja i potiču brže formiranje produkata te se zato brže uspostavlja reakcijska ravnoteža. Brzine kataliziranih reakcija mogu biti i do milijun puta veće od brzina nekataliziranih reakcija. (Patel et al., 2016.) Enzimi ne mijenjaju ravnotežno stanje reakcije, što znači da ubrzavaju reakciju jednako u oba smjera. Također ne mijenjaju konstantu ravnoteže, niti utječu na slobodnu energiju reakcije tj. promjenu Gibbsove energije ( $\Delta G$ ). (Stryer, 1981.) Točnu masu enzima u uzorku se rijetko poznaje s obzirom da sadrži veliku količinu katalitički neaktivnog proteina. Stoga se koncentracija enzima često izražava kao specifična aktivnost definirana kao količina enzima koja daje određenu katalitičku aktivnost pri danim uvjetima reakcije. (Liu, 2016.)

Prvi korak pri katalizi je stvaranje kompleksa enzim-supstrat uvjetovano precizno određenim rasporedom atoma na aktivnom mjestu enzima. Interakciju enzima i supstrata opisuju dvije teorije. Najjednostavnija teorija je model ključ-brava (slika 2.2.). Supstrat se veže na specifičnu regiju na enzimu tj. aktivno mjesto, koje ima strukturu komplementarnu strukturi enzima. (Liu, 2016.) Druga teorija je model izazvanog pristajanja (slika 2.3.), u kojem se odgovarajući oblik aktivnog mjesta enzima stvara tek nakon vezanja supstrata. Postojanje kompleksa dokazano je promjenom fizikalnih i spektroskopskih osobina enzima nakon stvaranja kompleksa. Također, enzim-supstrat kompleksi ponekad se mogu izdvojiti u čistom obliku te su vidljivi elektronskim mikroskopom i rendgenskom strukturnom analizom. (Stryer, 1981.)



SLIKA 2.2. Shematski prikaz djelovanja enzima: model ključ-brava



SLIKA 2.3. Shematski prikaz djelovanja enzima: model izazvanog pristajanja

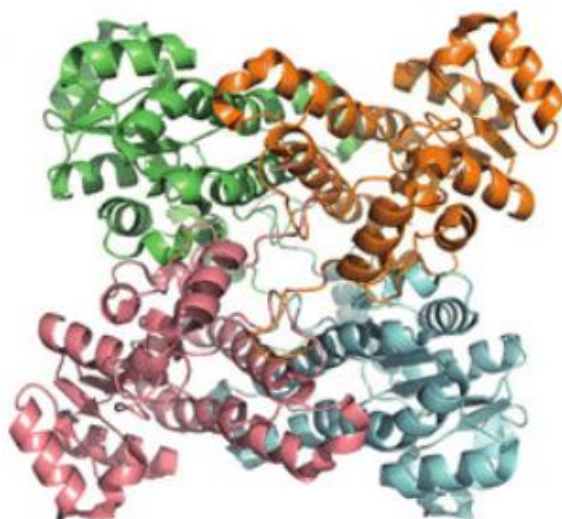
## 2.1.2. Halogenhidrin-dehalogenaza

### 2.1.2.1. Povijesno otkriće

Castro i Bartnicki su 1968. g. prvi opisali pojavu enzimskih reakcija dehalogenacije, na reakciji degradacije 2,3-dibromo-1-propanola pomoću enzima izoliranog iz *Flavobacterium* sp. Otkriveno je kako djelomično pročišćen enzim može ukloniti kloridne i bromidne ione iz vicinalnih halogenhidrina uz formiranje odgovarajućih epoksida. Zatvaranje prstena odvija stereospecifičnom *trans*-eliminacijom protona i halogenog iona. Također, enzim može katalizirati otvaranje epoksida napadom kloridnih i bromidnih nukleofila na terminalnom ugljikovom atomu. Kasnije je otkriveno da jod također može biti nukleofil pri otvaranju prstena. S vremenom je izolirano nekoliko novih enzima iz različitih bakterijskih sojeva, što je proširilo enzimsku obitelj halogenhidrin-dehalogenaza. (Schallmey et al., 2012.)

### 2.1.2.2. Strukturne karakteristike i klasifikacija

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH), također poznate kao halogenalkohol-dehalogenaze ili halogenhidrin-epoksidaze, pripadaju kratkolančanim dehidrogenazama/reduktazama (engl. short-chain dehydrogenase/reductase, SDR) s kojima dijele strukturne, sekvencijske i mehanističke značajke. Posjeduju homotetramerni oblik i sastavljene su od para dimera. (slika 2.4.) Za razliku od kratkolančanih dehidrogenaza/reduktaza, koje posjeduju Ser/Tyr/Lys trijadu odgovornu za deprotonaciju hidroksilnih grupa supstrata, dehalogenaze sadrže Ser/Tyr/Arg trijadu. (Schallmey et al., 2012.) Također, na mjestu za vezanje nikotinamidnog kofaktora kod kratkolančanih dehidrogenaza/reduktaza, HHDH posjeduju prostrani džep za vezanje nukleofila.



SLIKA 2.4. Struktura HheC

Usprkos mnogim istraživanjima posvećenim mikroorganizama koji pokazuju HHDH aktivnost te izolaciji i pročišćavanju istih, klonirano je samo nekoliko kodirajućih gena HHDH, podijeljenih u tri filogenska podtipa A, B i C:

HheA iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074

HheA2 iz *Arthrobacter* sp. soj AD2

HheB iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074

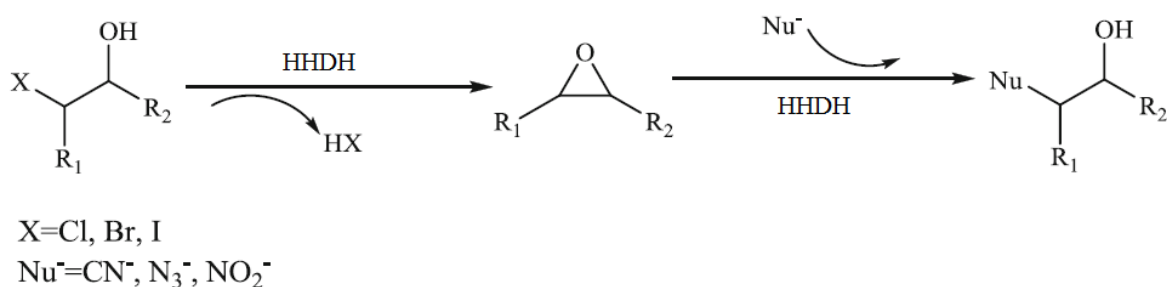
HheB2 iz *Mycobacterium* sp. soj GP1

dva identična HheC iz *Agrobacterium radiobacter* soj AD1 i *Rhizobium* sp. soj NHG3

Do sada određene kristalne strukture HheA, HheA2, HheB te HheC pokazuju velike sličnosti. Od navedenih, najviše je proučavana HheC iz *Agrobacterium radiobacter* soj AD1. Monomeri sadrže Rossmannov nabor, koji se može pronaći i u drugim kratkolančanim dehidrogenazama/reduktazama, a sastoji se od šest ili sedam paralelnih  $\beta$ -listova okruženih sa sedam ili osam  $\alpha$ -uzvojnica. Aktivno mjesto monomera nalazi se duboko u unutrašnjosti enzima te je s okolinom povezano tunelom za ulazak supstrata. Jedino HheC sadrži C-terminalni produžetak koji se proteže u aktivno mjesto suprotstavljenog monomera u strukturi. Produžetak sadrži Trp kiselinški ostatak koji značajno utječe na stereoselektivnost HheC. (Schallmey et al., 2016)

### 2.1.2.3. Reakcijski mehanizmi

HHDH može, bez prisutnosti kofaktora, rastaviti halogenhidrine na odgovarajuće epokside, ali mogu katalizirati i suprotnu reakciju otvaranja epoksidnog prstena u prisutnosti nukleofila kao što su cijanid, azid ili nitrit. Neke HHDH pokazuju savršenu enantioselektivnost u katalitičkom procesu te zbog toga imaju veliki katalitički potencijal u sintezi kiralnih epoksida i alkohola. Djelotvornost HHDH je uglavnom veća kada su u pitanju brom-supstituirani derivati u odnosu na klor-supstituirane. Djeluje na C2 i C3 vicinalne halogenhidrine te pokazuje veću aktivnost prema  $\alpha$ -supstituiranim halogenhidrinima nego prema  $\beta$ -supstituiranim derivatima. Reakcijski mehanizam prikazan je na slici 2.5. Na aktivnost HHDH utječe pH vrijednost i temperatura te inhibitorско djelovanje iona teških metala, kao što su  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^+$  te  $\text{Cu}^+$ . (You et al., 2013.)

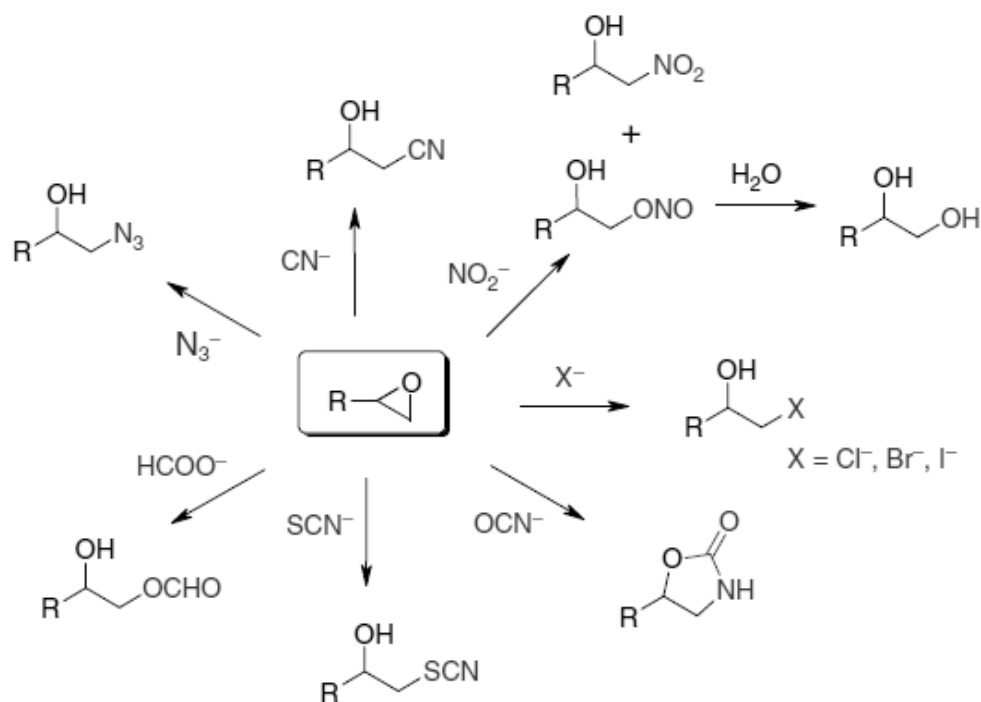


**SLIKA 2.5.** Dehalogenacija vicinalnog halogenhidrina i otvaranje epoksidnog prstena

Prilikom dehalogenacije Ser kiselinški ostatak, formiranjem vodikove veze sa hidroksilnom skupinom supstrata omogućuje ulazak supstrata na aktivno mjesto enzima. Tyr izdvaja proton te hidroksilne skupine. Arg ne reagira sa supstratom, već pomoću vodikovih

veza spušta  $pK_a$  vrijednost tirozin-OH, kako bi ga aktivirao za izdvajanje protona. U reakciji otvaranja epoksida Tyr donira proton formirajući kisikov anion nakon nukleofilnog napada na jedan od epoksidnih ugljika. (Schallmey et al., 2016)

U reakciji otvaranja epoksida, HHDH može koristiti niz anionskih nukleofila, uključujući cijanid, cijanat, tiocijanat, nitrit, azid i formijat. U ovim reakcijama dolazi do formiranja  $\beta$ -supstituiranog alkohola (slika 2.6.). (Majerić Elenkov et al., 2014.) Većina nukleofila također inhibira reakcije zatvaranja prstena. (Lutje Spelberg et al., 2012.)



**SLIKA 2.6.** Reakcije otvaranja epoksida djelovanjem HHDH

Ukoliko se reakcije odvijaju s azidom ili nitritom stvaraju se C-N veze, sa cijanidom C-C veze, C-O veze u slučaju nitrita i formijata te C-S veze u reakciji s tiocijanatom. Ako se kao nukleofil koristi cijanat produkt reakcije je oksazolidinon. (Schallmey et al., 2012.) U prisutnosti nenabijenih nukleofila, kao što su voda i amonijak, HHDH ne pokazuje aktivnost, zbog čega se ovi enzimi vrlo lako mogu razlikovati od epoksidnih hidrolaza. Nadalje, odabir supstrata limitiran je na terminalne epoksidge. Reakcije HHDH s 2,2-disupstituiranim epoksidnim prstenom teže se provode, iako nisu nemoguće. U reakcijskim procesima koji isključuju kemijsku hidrolizu upotreba HHDH je vrlo korisna, pogotovo ako se žele koristiti visoke koncentracije supstrata. Velika enantioselektivnost može se ponekad smatrati i nedostatkom djelovanja ovog enzima iz razloga što reakcijom nastaje samo jedan stereoizomer produkta. (Majerić Elenkov et al., 2014.)



#### 2.1.2.4. Primjena u biokatalizi

Dehalogenaze imaju veliku ulogu u razgradnji halogeniranih organskih spojeva, koji su zbog svoje toksičnosti štetni za ljudsko zdravlje i okoliš, a spontano se ne mogu razgraditi. (You et al., 2013) Koriste se pri uklanjanju halogeniranih alkohola u prehrambenoj i papirnoj industriji te proizvodnji polimera. Procesi s HDDH privlače mnogo pažnje u novije vrijeme zbog njihove upotrebe pri sintezi optički aktivnih C3 i C4 kiralnih prekursora u farmaceutskoj industriji. Kao jedan od prvih primjera je sinteza optički aktivnog (*R*)-3-klorpropan-1,2-diola. Kod otvaranja epoksida uz prisutnost cijanida, dodatni supstituent na epoksidnom prstenu uzrokuje veliku stereoselektivnost, koja se može koristiti pri proizvodnji optički čistih tercijarnih alkohola. Ove pretvorbe 2,2-disupstituiranih epoksida omogućuju dobivanje optički čistih tercijarnih  $\beta$ -azidoalkohola,  $\beta$ -hidroksinitrila i diola, koje je teško dobiti nekatalitičkim metodama. Ako se otvaranje epoksidnog prstena odvija uz azid, također se dobivaju  $\beta$ -azidoalkoholi te  $\beta$ -aminoalkoholi, koji se koriste za dobivanje  $\beta$ -blokatora u medicini. Stereoselektivna priprema oksazolidinona uz HDDH vrlo je zanimljiva zbog antibiotskog djelovanja oksazolidinona protiv gram-pozitivnih bakterija. Koncept enzimskih kaskadnih reakcija s HDDH primjenjivan je u proizvodnji optički čistih kemijskih prekursora s enantiomernim suviškom većim od 99%. Inženjerska ispitivanja s HDDH provode se u svrhe povećanja njihove stabilnosti, modificiranja stereoselektivnosti te povećanja brzine katalize. (Schallmeyer et al., 2012.)

## 2.2. Optički aktivne tvari

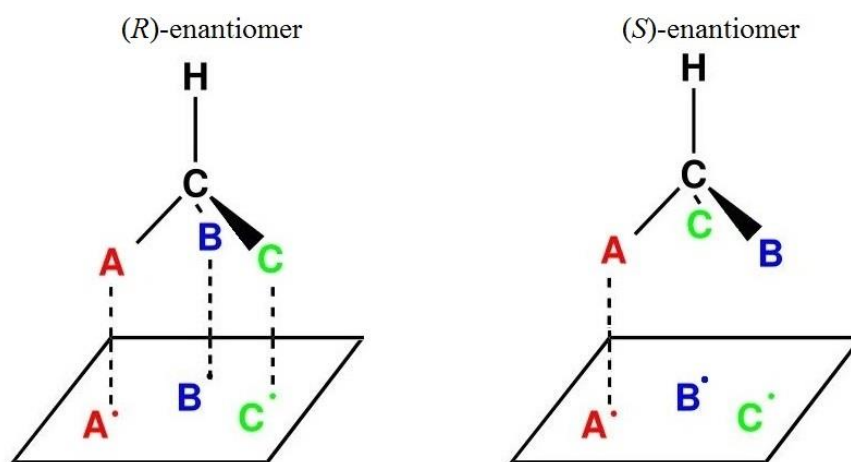
Najvažnije obilježje kiralnih spojeva je postojanje asimetričnog ugljikovog atoma. U slučaju kada kiralni spoj nema asimetrični ugljik, centar kiralnosti postaje drugi asimetrični atom, kao što je dušik ili fosfor. Kiralni spojevi imaju nepreklopljivu zrcalnu sliku odnosno enantiomerni oblik. Enantiomeri imaju gotovo ista fizikalna svojstva, no međusobne se razlike javljaju pri interakcijama s drugim kiralnim molekulama. Za razlikovanje enantiomera koristi se polarimetrija, metoda kojom se prolaskom polariziranog svjetla kroz kiralni spoj javlja zakretanje ravnine. Zakretanje ravnine naziva se optička aktivnost, a tvari koje je uzrokuju optički aktivne tvari. Smjer zakretanja ravnine je karakteristično fizikalno svojstvo svakog kiralnog spoja i ne može se predvidjeti. (*R*)-enantiomer zakreće ravninu polariziranog svjetla u desno, dok (*S*)-enantiomer zakreće za isti iznos kuta, ali u lijevo.

Smjese spojeva mogu biti optički čiste, odnosno sadržavati samo jedan enantiomer ili racemične, sadrže jednake količine oba enantiomera. Kada se smjesa ne može svrstati u jednu od navedenih tipova, navodi se optička čistoća smjese (*o.p.*, engl. optical purity) koja je definirana omjerom zakretanja smjese i zakretanja čistog enantiomera. Osim optičke čistoće, relativnu količinu enantiomera može se iskazati pomoću enantiomernog viška (*e.e.*, engl. enantiomeric excess), koji se računa kao omjer viška jednog u odnosu na drugi enantiomer i cijele smjese. Optička čistoća i enantiomerni višak izražavaju se postotcima. (Wade, 2017.)

## 2.2.1. Dobivanje optički aktivnih tvari

### 2.2.1.1. Enantioselektivna biokataliza

Razvitak enantioselektivne biokatalize od izrazite je važnosti kod sinteze kiralnih organskih molekula, čiji samo jedan enantiomer pokazuje aktivnost. Ova vrsta biokatalize uključuje selektivnu, katalitičku i ponovljivu sintezu željenog enantiomera. (Bolm et al., 2003.) Dvije metode enantioselektivne biokatalize su asimetrična sinteza te kinetička rezolucija. Asimetrična sinteza započinje s prokiralnom molekulom, dok metoda kinetičke rezolucije započinje racemičnom smjesom dva enantiomera. Upotrebom enantioselektivnog biokatalizatora dobiva se točno određen enantiomer. (Straathof et al., 2000.) Važnost enantioselektivnosti očitovana je u biološkoj aktivnosti biokatalizatora. Do danas, najbolje okarakterizirani su (*R*)-selektivni biokatalizatori, dok je dostupnost (*S*)-selektivnih vrlo mala (slika 2.7.). (Majerić Elenkov et al., 2014.)



SLIKA 2.7. Djelovanje *R*-selektivnog biokatalizatora

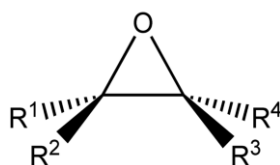
### 2.2.1.2. Dinamička kinetička rezolucija

Kinetička rezolucija racemičnih smjesa korisna je metoda dobivanja optički čistih spojeva. Enantiomeri racemične smjese reagiraju različitim brzinama dajući produkte. Obično se sporo reagirajući enantiomer dobiva u velikom enantiomernom višku pretvorbom brzo reagirajućeg enantiomera u drugi produkt. (Nakano et al., 2014.) Glavni nedostaci ove metode su maksimalna konverzija početne sirovine koja iznosi 50% te potreba za zahtjevnom separacijom optički aktivnog supstrata i produkta. Rješenje ovih nedostataka nalazi se u dinamičkoj kinetičkoj rezoluciji (DKR), koja usporava racemizaciju i teorijski može dati stopostotno iskorištenje. (Lutje Spelberg et al., 2004.)

Dinamička kinetička rezolucija definirana je kao enantioselektivna reakcija temeljena na kinetičkoj rezoluciji u kombinaciji s *in situ* racemizacijom sporo reagirajućeg enantiomera. (Mikleušević et al., 2015.) U posljednjih dvadeset godina korištenjem kemijskih i biokemijskih katalizatora razvijeni su brojni DKR procesi, kao i druge povezane metode. Ovi procesi klasificirani su kao: DKR, dinamička termodinamička rezolucija, dinamička kinetička asimetrična transformacija, stereoinverzija, ciklička deracemizacija te enantiokonverzijske transformacije. Efikasnost DKR ovisi o strukturnim parametrima katalizatora i supstrata te uvjetima u kojima se provodi *in situ* racemizacija kiralnog supstrata. (Nakano et al., 2014.)

### 2.2.2. Epoksidi

Epoksidi (slika 2.8) su ciklički spojevi koji u svojoj strukturi imaju barem jedan kiralni centar. Zbog svoje reaktivnosti epoksidi često nisu produkti reakcije već intermedijeri u stvaranju stabilnijih konačnih produkata što uvelike pogoduje farmaceutskoj industriji. (Lutje Spelberg et al., 2012.)



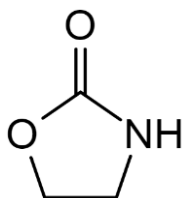
SLIKA 2.8. Opća formula epoksida

Za sintezu optički čistih epoksida razvijene su metode asimetrične epoksidacije olefina i kinetička rezolucija epoksida. Metode su bazirane na korištenju kiralnih katalizatora koji sadrže prijelazne metale. Dostupne su i razne biokatalitičke metode sinteze. (Majerić Elenkov

et. al., 2008.) Osim oksidacijom alkena, epoksidi se sintetiziraju enantioselektivnom reakcijom zatvaranja prstena kataliziranom halogenhidrin-dehalogenazom. Reakcija otvaranja prstena može se odvijati na bilo kojem ugljiku prstena, a regioselektivnost je određena elektronskim i steričkim obilježjima vezanih supstituenata. (Lutje Spelberg et al., 2012.)

### 2.2.3. Oksazolidinoni

Oksazolidinoni (slika 2.9.) su spojevi koji u svojoj strukturi sadrže peteročlani heterociklički prsten, 2-oksazolidon. Prekursori su za stvaranje aminokiselina i amino alkohola te se koriste kao kiralna pomoćna tvar u svrhu stereokemijske kontrole reakcije aldolne kondenzacije. Privlače pozornost zbog svoje antibakterijske aktivnosti, posebice prema Gram-pozitivnim bakterijama koje su otporne na mnoge antibiotike. (Hasnaoui-Dijoux et al., 2008.)



SLIKA 2.9. Opća formula oksazolidinona

Prvi primjer biokatalitičke konverzije epoksida u oksazolidinon je reakcija enantioselektivnog otvaranja prstena terminalnog epoksida s cijanatnim nukleofilom katalizirana HHDH iz *Agrobacterium radiobacter*. Reakcijom je dobiven 5-supstituirani oksazolidinon visoke čistoće (69-98% e.e.) uz iskorištenje od 47%. Glavna prepreka za izravnu pretvorbu epoksida je slaba nukleofilnost cijanatnog iona. (Majerić Elenkov et al., 2008.)

Prvi i do sada jedini dostupni oksazolidinon je linezolid korišten u liječenju bolesti uzrokovanih meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin rezistentnog *Enterococcus faecium* te penicilin rezistentnog *Streptococcus pneumoniae*. Oksazolidinoni inhibiraju sintezu bakterijskih proteina vežući se na 50S ribosomsku podjedinicu. Mehanizam inhibicije oksazolidinonima drukčiji je od svih ostalih inhibicija sinteze bakterijskih proteina. Novootkriveni oksazolidinoni pokazuju poboljšanu aktivnost protiv anaeroba i mikobakterija. Oksazolidinoni pokazuju potencijal za razvitak novih spojeva s manjom toksičnošću i širim spektrom reaktivnosti. Jedan od primjera je oksazolidinon-kinolon hibrid koji pokriva Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. (Bozdogan et al., 2004.)

## 2.3. Modeliranje biotransformacija

Kako bi se postigla željena biotransformacija potrebno je, osim pravilnog izbora enzima, prilagoditi reakcijske uvjete. Strukturna stabilnost enzima ne smije biti narušena reakcijskom okolinom. Izbor temperature, pH, otapala za supstrate i produkte, kao i konstruiranje odgovarajućeg bioreaktora, određuje hidrodinamiku te prijenos mase i topline tokom procesa. (de Carvalho et al., 2019.)

Modeliranje biotransformacija igra ključnu ulogu u traženju optimalnih reakcijskih uvjeta, razvitku, uspoređivanju i dizajnu procesa te u identificiranju troškova prevođenja procesa u industrijske pogone. Vodi do boljeg razumijevanja i kvantifikacije procesa, a temelji se na poznavanju bilanci tvari, prijenosa tvari te reakcijskoj kinetici. (Vrsalović Presečki et al., 2006.) Optimizacija uvjeta pri projektiranju procesa visoke efikasnosti u svrhe poboljšavanja selektivnosti uključuje teorijski i praktični pristup. (Nakano et al., 2014.)

Modeliranje se može provoditi pomoću relevantnih biokemijskih i fizikalnih mehanizama. Tako dobiveni modeli su generalno primjenjivi, ali zahtijevaju opsežna istraživanja za potpuni opis. Ukoliko se modeliranje temelji na mjerenju parametara sustava, nije potrebno detaljno poznavanje sustava, a rezultati su vrlo precizni matematički modeli. Kombinacijom znanja, u kratkom se vremenskom roku mogu razviti modeli s dobrim interpolacijskim i ekstrapolacijskim svojstvima, što je od velike važnosti za postavljanje procesnih uvjeta. (Vrsalović Presečki et al., 2006.)

Postupak modeliranja može se podijeliti na nekoliko koraka. Najprije je potrebno definirati svrhu postavljanja novog modela. Zatim slijedi prikupljanje eksperimentalnih podataka, nakon čega slijedi strukturiranje modela pomoću reakcijske kinetike i reaktorskog modela. Slijedi ispitivanje podudarnosti parametara i mjerne nesigurnosti. Na posljetku se provodi validacija modela uz pomoć odvojenog seta podataka u različitim reakcijskim uvjetima. (Sin et al., 2009.)

### 2.3.1. Matematički modeli

Teorijska analiza kinetike daje vrijedne informacije o načinu odvijanja procesa, a kako bi se procesi mogli u potpunosti opisati, potrebno je konstruirati matematičke modele koji obuhvaćaju teorijske spoznaje kinetike. Hipoteze se matematičkim modelima potvrđuju ili odbacuju. (Marangoni, 2002.) U biokatalizi, matematički se modeli dijele na četiri područja navedena u tablici 2.2. (Sin et al., 2009.)

**TABLICA 2.2.** Podjela matematičkih modela

MODEL	ULOGA
<b>biokatalitički</b>	model opisuje katalizu na molekularnoj razini
<b>reakcijski</b>	kinetički model opisuje mehanizam u ovisnosti o parametrima kao što su pH, temperatura i koncentracija
<b>reaktorski</b>	kinetički model opisuje promatranu reakciju u reaktoru pomoću bilance mase i hidrodinamičkih uvjeta
<b>procesni</b>	model analizira cjelokupno ponašanje i interakcije između stupnjeva procesa.

### 2.3.2. Kinetički modeli

Kinetički model je matematički izraz kojim se opisuje veza između veličina stanja reakcijskog sustava (tlaka, temperature i koncentracije) i brzine enzimske reakcije. Za postavljanje kinetičkog modela potrebno je provesti kinetička ispitivanja. (Findrik Blažević, 2017.) Određivanje kinetike reakcije započinje proučavanjem odnosa supstrata prema enzimu te njegovom konverzijom u produkt. Zatim se ispituju utjecaji kofaktora, aktivatora ili inhibitora na brzinu reakcije. (Bisswanger, 2008.)

U enzimskoj reakcijskoj kinetici govori se o jednostavnim, jednosupstratnim reakcijama pretvorbe reaktanta u produkt. Ove reakcije se sastoje od ravnotežnog vezanja supstrata (S) i enzima (E) uz formiranje enzim-supstrat kompleksa (ES), nakon kojeg slijedi ireverzibilni raspad ES kompleksa do produkta (P) i slobodnog enzima (2.1). Na temelju navedenog mehanizma biokemijskih reakcija postavljena je Michaelis-Menteničina jednadžba (2.2), fundamentalna jednadžba enzimske kinetike. (Marangoni, 2002.)



$$r = \frac{V_m c_S}{K_m + c_S} \quad (2.2)$$

Brzina enzimske reakcije  $r$  [mmol dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>], okarakterizirana je koncentracijom supstrata  $c_S$  [mmol dm<sup>-3</sup>], maksimalnom brzinom enzimske reakcije  $V_m$  [mmol dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>] te Michaelisovom konstantom  $K_m$  [mmol dm<sup>-3</sup>]. Michaelisova konstanta može se odrediti kinetičkim mjerenjima, a predstavlja konstantu disocijacije te govori o afinitetu supstrata u kompleksu enzim-supstrat (ES). Niske vrijednosti  $K_m$  ukazuju na visoki afinitet. (Bisswanger, 2008.) Vrijednost Michaelisove konstante kreće se uglavnom od 10<sup>-1</sup> M do 10<sup>-7</sup> M, a ovisi o vrsti supstrata i reakcijskim uvjetima, kao što su pH, temperatura, polarnost i ionska jakost. (Marangoni, 2002.)

Matematički zapisi Michaelisove konstante i maksimalne brzine enzimske reakcije prikazani su izrazima (2.3) i (2.4)

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.3)$$

$$V_m = k_2 * c(E_T) \quad (2.4)$$

gdje su  $k_1$ ,  $k_{-1}$ ,  $k_2$  konstante brzine reakcija formiranja i disocijacije kompleksa enzim-supstrat te nastajanja produkta, a  $c(E_T)$  ukupna koncentracija enzima. (Stryer, 1981.)

Pretpostavke Michaelis-Menteničine kinetike su slijedeće:

1. Koraci vezanja supstrata i formiranja enzim-supstrat kompleksa su brzi u usporedbi s brzinom raspada kompleksa.
2. Koncentracija supstrata ostaje konstantna tokom cijele reakcije.
3. Pretvorba produkta u supstrat je neznatna, s obzirom da se vrlo malo produkta stigne formirati za vrijeme reakcije.

Ove su pretpostavke temeljene na stabilnosti enzima tokom provedenih mjerenja, korištenju inicijalnih brzina kao brzina reakcije te proporcionalnosti brzine reakcije s ukupnom koncentracijom enzima. (Marangoni, 2002.)

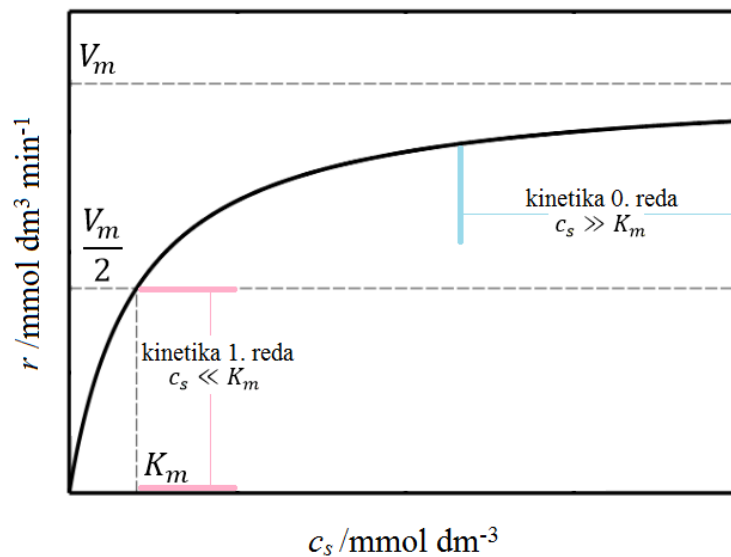
Prema Michaelis-Menteničinoj kinetici, ovisnost brzine reakcije  $r$  o koncentraciji supstrata  $c_s$  opisana je hiperboličkom krivuljom zasićenosti prikazanoj na slici 2.10. Pri niskim koncentracijama supstrata brzina reakcije je proporcionalna koncentraciji supstrata te za ovo područje vrijedi kinetika 1. reda. U ovom slučaju jednadžba (2.2) prelazi u oblik prikazan izrazom (2.5).

$$r = \frac{V_m}{K_m} * c_s \quad (2.5)$$

Nasuprot tomu, pri visokim koncentracijama, brzina reakcije ostaje približno konstantna te nije osjetljiva na promjenu koncentracije supstrata. Ovo je područje kinetike 0. reda, u kojem je brzina enzimske reakcije definirana izrazom (2.6).

$$r = V_m \quad (2.6)$$

Između dva krajnja slučaja je područje Michaelis-Menteničine kinetike. (Marangoni, 2002.)



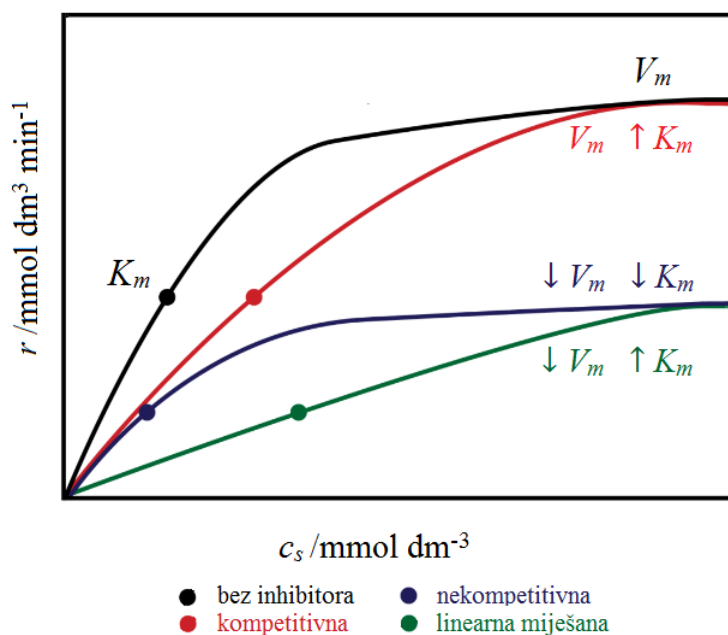
**SLIKA 2.10.** Grafički prikaz Michaelis-Menteničine kinetike

Većina enzimskih reakcija odvija se u prisutnosti dva ili više supstrata. Kinetika dvosupstratnih reakcija ispituje pri uvjetima u kojima je vrijednost jednog supstrata promjenjiva, a ostale komponente konstantne. Jednadžba za brzinu dvosupstratne enzimske reakcije prikazana je izrazom (2.7). (Bisswanger, 2008.)

$$r = \frac{V_m * c_{S1} * c_{S2}}{(K_{m,S1} + c_{S1}) * (K_{m,S2} + c_{S2})} \quad (2.7)$$



Molekule koje se vežu na enzim te smanjuju ili zaustavljaju njegovu aktivnost zovu se inhibitori. Inhibitori kao što su teški metali stvaraju stabilan kompleks s enzimom te nepovratno inhibiraju enzimsku aktivnost, dok povratni inhibitori lakše disociraju od enzima nakon vezanja. (Liu et al., 2016). Povratna inhibicija može biti kompetitivna i nekompetitivna te linearna miješana. Svaka na specifičan način utječe na vrijednosti konstante disocijacije ES kompleksa  $K_m$  te  $V_m$ . Kod kompetitivne inhibicije, inhibitor se natječe sa supstratom za prednost pri vezanju na aktivno mjesto enzima, što rezultira povećanjem vrijednosti konstante disocijacije ES kompleksa te nepromijenjenom  $V_m$ . Kada se inhibitor veže na ES kompleks na mjesto izuzev aktivnog mjesta enzima, tada je inhibicija nekompetitivna te se obje vrijednosti smanjuju. Nadalje, kada se inhibitor veže za slobodni enzim ili ES kompleks na mjestima izuzev aktivnog mjesta enzima javlja se linearna miješana inhibicija. Za ovaj tip inhibicije karakterističan je porast vrijednosti konstante disocijacije kompleksa i pad maksimalne brzine reakcije. Poseban slučaj linearne miješane inhibicije je antikompetitivna inhibicija prilikom koje se  $K_m$  vrijednost ne mijenja, a  $V_m$  se smanjuje (slika 2.11.). Jednadžbe za kompetitivnu, nekompetitivnu i antikompetitivnu inhibiciju prikazane su izrazima (2.8) - (2.10). Pri tome  $c_i$  [mmol dm<sup>-3</sup>] predstavlja koncentraciju inhibitora, a  $K_i$  [mmol dm<sup>-3</sup>] konstantu inhibicije. (Marangoni, 2002.) Pri visokim koncentracijama supstrata često se javlja inhibicija supstratom. Ova vrsta inhibicije je uzrokovana prisutnošću druge molekule supstrata koja se veže na aktivno mjesto ES kompleksa te tako inhibira reakciju. (Bisswanger, 2008.) Inhibicija supstratom prikazana je izrazom (2.11). (Findrik Blažević, 2017.)



SLIKA 2.11. Grafički prikaz povratne inhibicije

$$r = \frac{V_m * c_S}{K_m * \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_S} \quad (2.8)$$

$$r = \frac{V_m * c_S}{K_m + c_S * \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.9)$$

$$r = \frac{V_m * c_S}{(K_m + c_S) * \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.10)$$

$$r = \frac{V_m * c_S}{K_m + c_S + \frac{c_S^2}{K_i}} \quad (2.11)$$

### 2.3.3. Reaktorski modeli

Tri osnovna tipa idealnih reaktora su kotlasti (KR), protočno-kotlasti (PKR) te cijevni reaktor (CR). Kotlasti reaktori djeluju u nestacionarnom stanju, reaktanti se dovode u reaktor te se reakcija odvija u vremenu. Nasuprot tomu protočno-kotlaste i cijevne reaktore karakterizira rad u stacionarnom stanju, što znači da se reaktanti kontinuirano dovode i produkti odvođe kroz reaktor.

Najučestaliji tip reaktora je kotlasti reaktor, a pretpostavke rada ovog reaktora su:

1. Izotermnost: radna temperatura sustava je poznata, jednaka kroz cijeli sustav i ne mijenja se s vremenom
2. Homogenost: miješanje i prijenos topline osiguravaju homogeni sastav reakcijske smjese tokom provođenja procesa (Nauman, 2008.)

Uz pretpostavku da su reakcije u reaktoru ireverzibilne te da se provode pri konstantnoj temperaturi i volumenu, promjena koncentracije može se izraziti diferencijalnom jednadžbom (2.12). (Harriott, 2002.)

$$r = -\frac{dc_s}{dt} \quad (2.12)$$

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Aparatura

#### 3.1.1. Reakcijski sustav

Reakcijski sustav (slika 3.1.) u kojem su provođene reakcije sastoji se od kotlastog reaktora, magnetske miješalice Rotamix 550 MMH (Tehnica, Slovenija) te magneta koji služi za postizanje homogenih uvjeta. Za uzorkovanje reakcijske smjese postavljene su igla i šprica, kako bi se gubitci uzoraka uslijed hlapljenja sveli na minimum.



SLIKA 3.1. Reakcijski sustav

#### 3.1.2. Plinski kromatograf

Plinska kromatografija (engl. gas chromatography, GC) je analitička metoda za separaciju i analizu lako hlapljivih uzoraka. Ovom je metodom moguće analizirati organske i anorganske spojeve čije se mase kreću od 2 do preko 1000 Da. Prednosti plinske kromatografije su brzina, efikasnost i nedestruktivnost analize. Nadalje, metoda koristi male količine uzorka, ima mogućnost detekcije u ppm i ppb te veliku točnost kvantitativne analize.

No ova je metoda limitirana na hlapljive uzorke te zahtjeva spektroskopske metode za potvrdu rezultata. Također, plinsku kromatografiju je teško provoditi za termalno labilne uzorke.

Uzorak, obično u  $\mu\text{L}$ , se injektira u kolonu te se prenosi mobilnom fazom kroz stacionarnu fazu. Mobilna faza je inertni plin, najčešće helij, dušik ili vodik. Komponenta uzorka s većom distribucijom u mobilnoj fazi brže prolazi kroz kolonu, dok se druga komponenta duže zadržava na stacionarnoj fazi te se javlja separacija. Detekcijom temeljenom na različitom vremenu zadržavanja dobiva se kromatogram. Vrijeme zadržavanja (engl. retention time,  $t_R$ ) uzorka izražava se kao suma vremena provedenog u stacionarnoj i mobilnoj fazi. Usporedba vremena zadržavanja najlakša je i najbrža metoda identifikacije. Više spojeva može imati jednako vrijeme zadržavanja te je stoga za potvrdu potrebno provesti spektroskopsku analizu. (McNair et al., 2019.)

Plinski kromatograf korišten u ovom radu je GC-2014 (Shimadzu, Japan) (slika 3.2.). Kromatografski se sustav sastoji od generatora vodika (1), sustava za automatsko injektiranje (2), plinskog kromatografa (3) te računala (4).



SLIKA 3.2. Kromatografski sustav

### 3.1.3. Ostala aparatura

Za vaganje uzoraka korištena je analitička vaga AUW120 (Shimadzu, Japan).

Za miješanje i ekstrakciju uzoraka korištena je miješalica Vortex-Genie (Scientific industries, Inc., SAD).

## 3.2. Priprava kemikalija

### 3.2.1. Popis kemikalija

U tablicama 3.1. i 3.2. navedene su kemikalije korištene pri provođenju eksperimenata. Uz komercijalno dostupne, korišteno je i nekoliko komercijalno nedostupnih koje su preuzete s Instituta Ruđer Bošković, gdje su i sintetizirane.

**TABLICA 3.1.** Komercijalno dostupne kemikalije

PUNI NAZIV KEMIKALIJE	KEMIJSKI SIMBOL ILI POKRATA	PROIZVOĐAČ
2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer	TriS-SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Dimetil-sulfoksid	DMSO	Kemika d.d., Hrvatska
Metil- <i>terc</i> -butil-eter	MTBE	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Natrijev bromid	NaBr	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Natrijev cijanat	NaOCN	Sigma-Aldrich Corporation, SAD

**TABLICA 3.2.** Komercijalno nedostupne kemikalije

PUNI NAZIV KEMIKALIJE	POKRATA	PROIZVOĐAČ
2-bromometil-2-metil-oksiran	epoksid	Institut Ruđer Bošković
5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on	oksazolidinon	Institut Ruđer Bošković
C tip halogenhidrin-dehalogenaze	HheC	Institut Ruđer Bošković

Temeljna otopina, TO, natrijeva bromida i natrijeva cijanata, obje koncentracija 500 mM, pripravljene otapanjem odvaga čvrstih uzoraka u TriS-SO<sub>4</sub> puferu. Temeljne otopine pripravljene na ovaj način skladištene su u hladnjaku na temperaturi +4 °C i vadene neposredno prije korištenja.

TO epoksida koncentracije 2500 mM pripravljena je otapanjem odvage kapljevitog uzorka u DMSO. Ovako pripravljena TO skladištena je u hladnjaku na temperaturi +4 °C i vadena neposredno prije korištenja.

Sirovi enzimski ekstrakt HheC ( $\gamma = 11,128 \text{ mg mL}^{-1}$ ) skladišten je u zamrzivaču pri temperaturi – 20 °C i odmrzavan neposredno prije korištenja.

### 3.3. Analitičke metode

#### 3.3.1. Analiza plinskom kromatografijom

Uzorci su analizirani na uređaju GC-2014 (Shimadzu, Japan). Uzorak se unosio uz pomoć sustava za automatsko injektiranje AOC-20i (Shimadzu, Japan) pri uvjetima  $T_{\text{injektor}} = 250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $p = 39,4 \text{ kPa}$  te protok  $14,8 \text{ mL min}^{-1}$ . Mobilna faza je bio dušik iz spremnika (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska), dok su stacionarne faze bile kiralna kolona za oksazolidinon CP-Chirasil-DEX CB (Agilent Technologies, SAD) i kiralna kolona za epoksidi Alpha DEX<sup>TM</sup> 120 (Supelco Inc, SAD), čije su osnovne karakteristike prikazane u tablici 3.3. Plinski kromatograf sadrži plameno ionizacijski detektor (engl. flame ionization detector, FID) gdje su tokom detekcije ( $T_{\text{detektor}} = 300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) uzorci spaljivani u smjesi sintetskog zraka iz spremnika (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska) i vodika generiranog u uređaju Gas Generator 9150 (Parker Hannifin, SAD). Podaci su obrađivani uz programsku podršku GC Solutions (Shimadzu, Japan).

Uzorke za analizu plinskom kromatografijom priprema se na sljedeći način. Prebaci se alikvot od  $10 \text{ }\mu\text{L}$  prethodno pripremljenog uzorka u epruvetu s  $500 \text{ }\mu\text{L}$  metil-*terc*-butil-etera (MTBE). Zatim se uzorak miješa 20 s kako bi se postigla ekstrakcija uzorka. Nastaju međusobno nemješljivi organski i vodeni sloj. Provodi se ekstrakcija preko kapalice, punjene vatom i slojem natrijevog sulfata, u vijalice za kromatografsku analizu. Uzorci se čuvaju na ledu do provođenja analize. Za CP-Chirasil-DEX CB kolonu korištena je izotermna metoda analize ( $185 \text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 10 min). Vrijeme zadržavanja oksazolidinona bilo je 8,325 min. Za Alpha DEX<sup>TM</sup> 120 kolonu korištena je gradijentna metoda (održavanje  $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$  tijekom 10 min, a potom rast do  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  s gradijentom od  $15 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Vremena zadržavanja (R)-epoksida i (S)-epoksida bila su 7,179 te 7,411 min.

**TABLICA 3.3.** Karakteristike stacionarnih faza

	<b>CP-Chirasil-DEX CB</b>	<b>Alpha DEX<sup>TM</sup> 120</b>
<b>literaturni izvor</b>	<a href="https://www.agilent.com">https://www.agilent.com</a>	<a href="https://www.sigmaaldrich.com">https://www.sigmaaldrich.com</a>
<b>tip kolone</b>	kiralna	kiralna
<b>materijal</b>	ciklodekstrin povezan s polidimetilsiloksanom	kvareno staklo
<b>duljina, m</b>	25	30
<b>promjer, mm</b>	0,25	0,25
<b>debljina filma, <math>\mu\text{m}</math></b>	0,25	0,25
<b>temperaturni raspon, <math>^{\circ}\text{C}</math></b>	do 200	30 - 230

### 3.4. Provođenje dinamičke kinetičke rezolucije u kotlastom reaktoru

Sastavi reakcijskih smjesa navedeni su u tablicama 3.4., 3.5. i 3.6. Eksperimenti su provedeni pri sobnoj temperaturi u TriS-SO<sub>4</sub> puferu koncentracije 500 mM. Reakcijske smjese miješane su na magnetskoj miješalici pri 1000 okr min<sup>-1</sup>.

Uzorkovanje reakcijske smjese provedeno je iglom i špricom kroz čep sa septumom deset puta, u pravilnim vremenskim intervalima tokom 24 sata. Analiza se provodila za uzorke bez razrjeđenja te pri 10x razrjeđenju. Razrjeđenje se provodilo stavljanjem alikvota od 10 µL reakcijske smjese u 90 µL TriS-SO<sub>4</sub> pufera i tada je zapisano vrijeme. Uzorak se miješao par sekundi, a zatim se 10 µL uzorka prenijelo u epruvetu s 500 µL MTBE. Nakon 20 s miješanja, uzorak je sušen na sloju natrijevog sulfata. Za uzorke bez razrjeđenja, 10 µL reakcijske smjese se prenijelo u epruvetu s 500 µL MTBE te je zapisano vrijeme. Uzorak je zatim miješan 20 s te ekstrahiran preko kapalice punjene slojem natrijevog sulfata u vijalicu. Ovako pripremljeni, dobro zatvoreni uzorci, čuvani su na hladnom do analize plinskom kromatografijom.

**TABLICA 3.4.** Sastav reakcijske smjese za prvi eksperiment

	reaktor	pufer	epoksid	NaBr	NaOCN	DMSO	HheC
<b>c, mM</b>	-	-	100	0	150	-	-
<b>V, µL</b>	2000,0	1100,0	80,0	0,0	600,0	20,0	200,0

**TABLICA 3.5.** Sastav reakcijske smjese za drugi eksperiment

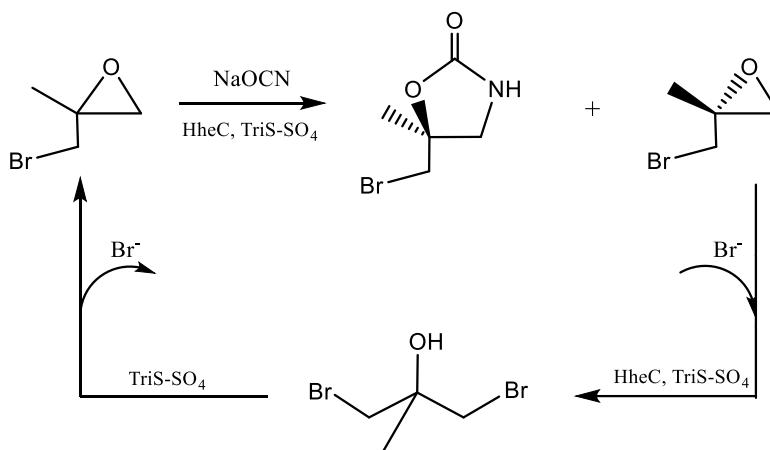
	reaktor	pufer	epoksid	NaBr	NaOCN	DMSO	HheC
<b>c, mM</b>	-	-	100	100	150	-	-
<b>V, µL</b>	2000,0	700,0	80,0	400,0	600,0	20,0	200,0

**TABLICA 3.6.** Sastav reakcijske smjese za treći eksperiment

	reaktor	pufer	epoksid	NaBr	NaOCN	DMSO	HheC
<b>c, mM</b>	-	-	100	50	150	-	-
<b>V, µL</b>	2000,0	900,0	80,0	200,0	600,0	20,0	200,0

## 4. MATEMATIČKI MODEL DINAMIČKE KINETIČKE REZOLUCIJE

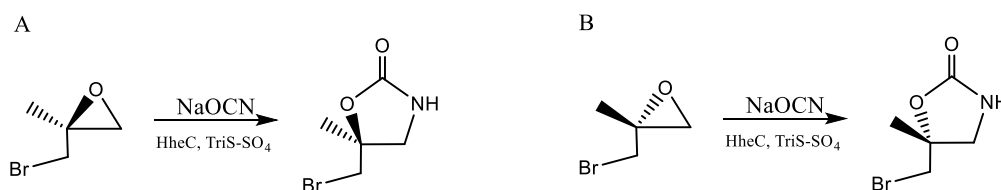
Na slici 4.1. prikazana je shema dinamičke kinetičke rezolucije dobivanja (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona reakcijom *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnih iona kataliziranom HheC u prisutnosti bromidnih iona.



SLIKA 4.1. DKR dobivanja (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona

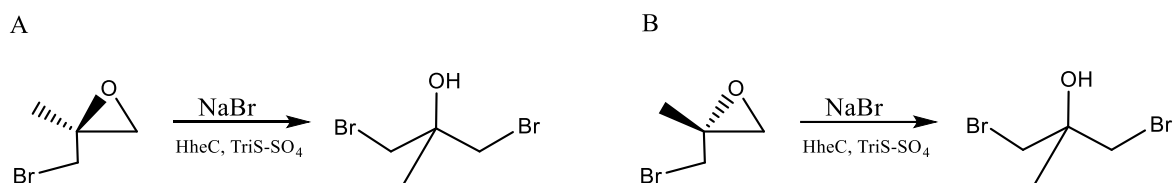
Matematički model procesa se sastoji od kinetičkog i reaktorskog modela. Nadalje, reaktorski model se sastoji od bilancnih jednadžbi supstrata i produkata svakog reakcijskog stupnja. (Findrik Blažević, 2017.) Model je temeljen na raspoloživim literaturnim i eksperimentalnim podacima, a DKR sustav je podijeljen u tri reakcijska stupnja:

1. reakcija 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona uz nastajanje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona (slika 4.2.)
2. reakcija 2-bromometil-2-metil-oksirana i bromidnog iona uz nastajanje 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola (slika 4.3.)
3. reakcija izlaska bromidnog iona te zatvaranje 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola uz nastajanje *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana (slika 4.4.).

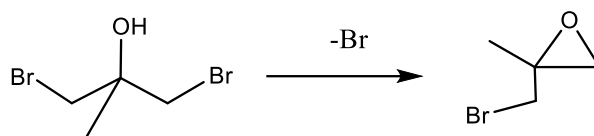


SLIKA 4.2. Shematski prikaz 1. reakcijskog stupnja s **A**: (*S*)-epoksidom i **B**: (*R*)-epoksidom





**SLIKA 4.3.** Shematski prikaz 2. reakcijskog stupnja s **A:** (*S*)-epoksidom i **B:** (*R*)-epoksidom



**SLIKA 4.4.** Shematski prikaz 3. reakcijskog stupnja

Reakcija otvaranja 2-bromometil-2-metil-oksirana s cijanatom uz prisutnost HheC odvija se preko intermedijera 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola i daje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on kao konačni produkt. (Miklušević et al., 2015.) Otvaranje epoksidnog prstena, zbog ambidentne prirode cijanatnog aniona, odvija se preko dušikovog ili kisikovog napada što dovodi do nastajanja dva izomerna produkta,  $\beta$ -hidroksiizocijanata te  $\beta$ -hidroksicijanata. Organski cijanati su nestabilni spojevi koji se već pri sobnoj temperaturi izomeriziraju.  $\beta$ -hidroksiizocijanat se ne može izolirati jer spontano ciklizira u oksazolidinon. Formiranje oksazolidinona je vrlo regioselektivna reakcija bez nastajanja nusprodukata. (Majerić Elenkov et al., 2008.) Otvaranje (*R*)-2-bromometil-2-metil-oksirana s bromidnim ionom je najsporiji stupanj reakcije te predstavlja usko grlo procesa. Reakcija zatvaranja 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola je vrlo brza i regioselektivna. (Miklušević et al., 2015.)

## 4.1. Kinetički model

Prvi reakcijski stupanj dinamičke kinetičke rezolucije je nastajanje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona reakcijom 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona katalizirano HheC enzimom.

Nastajanje (*S*)-oksazolidinona opisano je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom prikazano izrazom (4.1). Osim inhibicije supstratom (*S*)-epoksidom, javljaju se kompetitivne inhibicije jer su molekule (*S*)-epoksida odnosno cijanatnih iona strukturno analogne molekulama (*R*)-epoksida odnosno bromidnim ionima.

$$r_1 = \frac{V_{m1} * c_{(S)\text{-epoksid}} * c_{\text{NaOCN}} * \gamma_{\text{HheC}}}{\left[ K_{m1, \text{NaOCN}} * \left( 1 + \frac{c_{\text{NaBr}}}{K_{i1, \text{NaBr}}} \right) + c_{\text{NaOCN}} \right] * \left[ K_{m1, (S)\text{-epoksid}} * \left( 1 + \frac{c_{(R)\text{-epoksid}}}{K_{i1, (R)\text{-epoksid}}} \right) + c_{(S)\text{-epoksid}} + \frac{c_{(S)\text{-epoksid}}^2}{K_{i1, (S)\text{-epoksid}}} \right]} \quad (4.1)$$

Nastajanje (R)-oksazolidinona također je opisano dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom, uz pojavu kompetitivnih inhibicija molekula epoksida i iona. (4.2). (R)-epoksid slijedi kinetiku 1. reda, NaOCN Michaelis-Menteničinu kinetiku.

$$r_2 = \frac{k_2 * c_{(R)\text{-epoksid}} * c_{\text{NaOCN}} * \gamma_{\text{HheC}}}{\left[ K_{m2, \text{NaOCN}} * \left( 1 + \frac{c_{\text{NaBr}}}{K_{i2, \text{NaBr}}} \right) + c_{\text{NaOCN}} \right] * \left( 1 + \frac{c_{(S)\text{-epoksid}}}{K_{i2, (S)\text{-epoksid}}} \right)} \quad (4.2)$$

Drugi reakcijski stupanj je nastajanje 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola reakcijom 2-bromometil-2-metil-oksirana i bromidnog iona katalizirano HheC enzimom.

Brzina reakcije opisana je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom. Enantiomeri epoksida slijede kinetiku 1. reda, a NaBr Michaelis-Menteničinu kinetiku (4.3), (4.4). U reakcijama se javlja inhibicija suprotnim enantiomerima epoksida, a OCN<sup>-</sup> ioni nemaju inhibicijski učinak.

$$r_3 = \frac{k_3 * c_{(S)\text{-epoksid}} * c_{\text{NaBr}} * \gamma_{\text{HheC}}}{(K_{m3, \text{NaBr}} + c_{\text{NaBr}}) * \left( 1 + \frac{c_{(R)\text{-epoksid}}}{K_{i3, (R)\text{-epoksid}}} \right)} \quad (4.3)$$

$$r_4 = \frac{k_4 * c_{(R)\text{-epoksid}} * c_{\text{NaBr}} * \gamma_{\text{HheC}}}{(K_{m4, \text{NaBr}} + c_{\text{NaBr}}) * \left( 1 + \frac{c_{(S)\text{-epoksid}}}{K_{i4, (S)\text{-epoksid}}} \right)} \quad (4.4)$$

Treći reakcijski stupanj je nastajanje *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana reakcijom izlaska bromidnog iona i zatvaranjem 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola, opisano kinetikom 1. reda (4.5).

$$r_5 = k_5 * c_{\text{dibromalkohol}} \quad (4.5)$$

## 4.2. Reaktorski model

Reaktorski model za kotlasti reaktor sastoji se od bilancnih jednažbi prikazanih izrazima od (4.6) do (4.12). Jednažbe opisuju promjenu supstrata i produkata reakcijskih stupnjeva dinamičke kinetičke rezolucije u vremenu.

$$\frac{dc_{(S)\text{-epoksid}}}{dt} = -r_1 - r_3 + 0,5 * r_5 \quad (4.6)$$

$$\frac{dc_{(R)\text{-epoksid}}}{dt} = -r_2 - r_4 + 0,5 * r_5 \quad (4.7)$$

$$\frac{dc_{\text{NaOCN}}}{dt} = -r_2 - r_1 \quad (4.8)$$

$$\frac{dc_{\text{NaBr}}}{dt} = -r_4 - r_3 + r_5 \quad (4.9)$$

$$\frac{dc_{\text{dibromoalkohol}}}{dt} = r_4 + r_3 - r_5 \quad (4.10)$$

$$\frac{dc_{(S)\text{-oksazolidinon}}}{dt} = r_1 \quad (4.11)$$

$$\frac{dc_{(R)\text{-oksazolidinon}}}{dt} = r_2 \quad (4.12)$$

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. Kinetika dinamičke kinetičke rezolucije

U poglavlju 4.1. su navedeni učinci pojedinih supstrata na reakcijske stupnjeve DKR. Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu prethodno je proveo kinetička ispitivanja, a dobiveni kinetički parametri prikazani su u tablici 5.1. Uz poznavanje vrijednosti kinetičkih parametara moguće je detaljnije opisati reakcijske stupnjeve i utjecaje supstrata na odvijanje reakcija.

TABLICA 5.1. Kinetički parametri u reakcijskom sustavu

PARAMETAR	MJERNA JEDINICA	VRIJEDNOST
<b>Prvi reakcijski stupanj s (S)-epoksidom</b>		
$V_{m1}$	U mg <sup>-1</sup>	15,580
$K_{m1,(S)-epoksid}$	mM	5,895
$K_{m1,NaOCN}$	mM	21,673
$K_{i1,(S)-epoksid}$	mM	40,017
$K_{i1,NaBr}$	mM	0,408
$K_{i1,(R)-epoksid}$	mM	1,514
<b>Prvi reakcijski stupanj s (R)-epoksidom</b>		
$k_2$	U mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	0,026
$K_{m2,NaOCN}$	mM	43,771
$K_{i2,NaBr}$	mM	0,037
$K_{i2,(S)-epoksid}$	mM	100
<b>Drugi reakcijski stupanj s (S)-epoksidom</b>		
$k_3$	U mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	0,082
$K_{m3,NaBr}$	mM	0,067
$K_{i3,(R)-epoksid}$	mM	11,855
<b>Drugi reakcijski stupanj s (R)-epoksidom</b>		
$k_4$	U mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	0,032
$K_{m4,NaBr}$	mM	0,145
$K_{i4,(S)-epoksid}$	mM	10
<b>Treći reakcijski stupanj</b>		
$k_5$	min <sup>-1</sup>	0,055
$n$	-	1

U prvom reakcijskom stupnju otvaranja (*S*)-epoksida uz cijanat brzina reakcije ovisna je o koncentraciji (*S*)-epoksida prema Michaelis-Menten kinetici uz inhibiciju supstratom. Za (*R*)-epoksid nije bilo moguće odrediti maksimalnu reakcijsku brzinu, kao niti Michaelisovu konstantu s obzirom da supstrat u ispitivanom koncentracijskom području prati kinetiku 1. reda. Vrijednost Michaelis-ove konstante za cijanatne ione dvostruko je veća u slučaju reakcije otvaranja (*R*)-epoksida s cijanatom gdje iznosi 43,771 mM, dok je u istoj reakciji s (*S*)-epoksidom  $K_{m1,NaOCN} = 21,673$  mM. Iz toga slijedi da enzim ima nizak afinitet prema cijanatnim ionima te da je u ovom slučaju reakciju potrebno provoditi s puno većom količinom NaOCN nego u slučaju s (*S*)-epoksidom kako bi se postigla maksimalna reakcijska brzina. Uočena je inhibicija bromidnim ionima u oba slučaja, s razlikom da je inhibicija izraženija u slučaju (*R*)-epoksida gdje vrijednost konstante inhibicije iznosi 0,037 mM. U slučaju (*S*)-epoksida ta konstanta iznosi 0,408 mM. Kako bi se smanjio utjecaj inhibicije bromidnim ionima, ovaj stupanj reakcije potrebno je provoditi pri nižim koncentracijama NaBr.

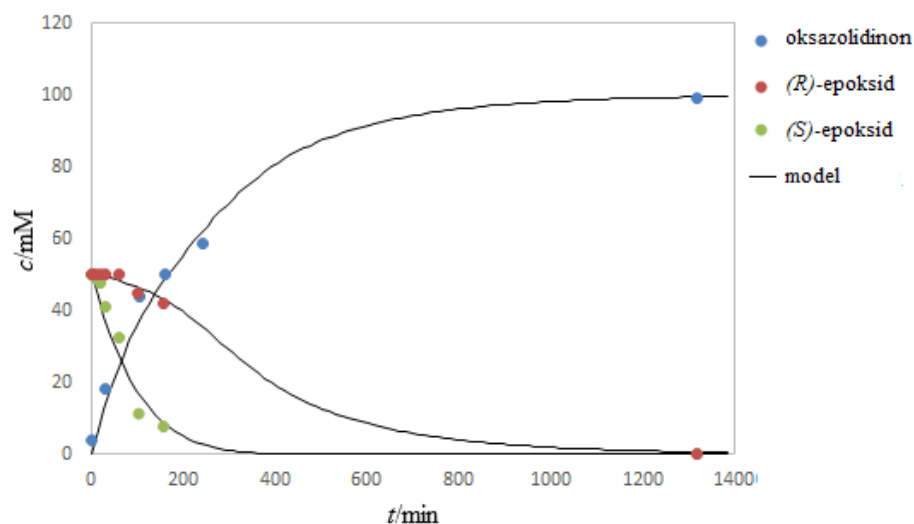
Oba enantiomera epoksida u drugom reakcijskom stupnju prate kinetiku 1. reda, s tim da je u slučaju s (*S*)-epoksidom konstanta brzine reakcije znatno veća ( $k_3 = 0,082$  U mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>,  $k_4 = 0,032$  U mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>). Ove konstante su niske te je za brže odvijanje reakcije potrebno osigurati visoku koncentraciju supstrata u reaktoru. Bromidni ioni prate Michaelis-Menteničinu kinetiku uz niske konstante ( $K_{m3,NaBr} = 0,067$  mM i  $K_{m4,NaBr} = 0,145$  mM) koje ukazuju na visok afinitet enzima prema bromidnim ionima. Zbog toga je za ovaj stupanj DKR potrebna mala količina NaBr.

Treći stupanj DKR opisan je kinetikom 1. reda uz konstantu brzine reakcije od 0,055 min<sup>-1</sup>. Brzina reakcije proporcionalna je koncentraciji dibromoalkohola.

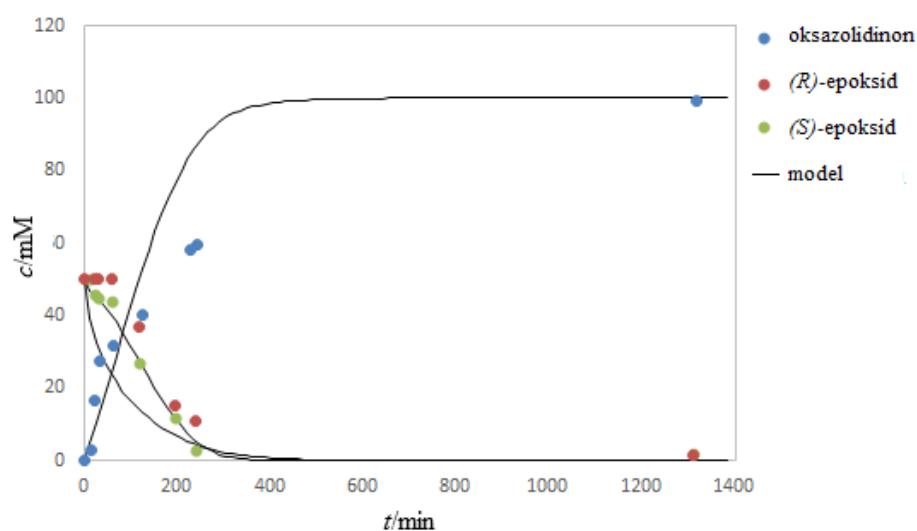
Prethodnim ispitivanjima tijekom izrade diplomskog rada N. Milčić također je dokazana velika stabilnost HheC enzima te potencijalna mogućnost višestrukog korištenja. (Milčić, 2018.)

## 5.2. Validacija modela

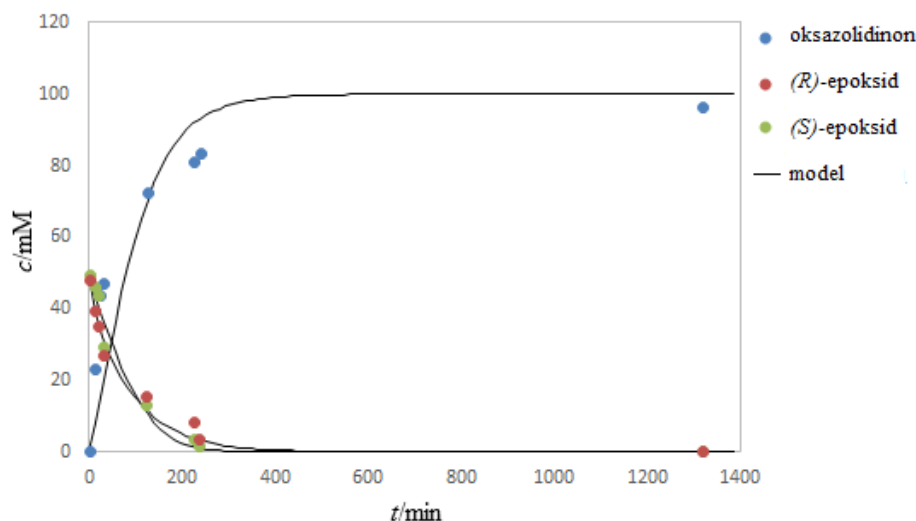
Uz usvojena saznanja prethodnih ispitivanja DKR te cjelovito razvijen matematički model, u ovom radu provedena je njegova validacija. Provođenjem dinamičke kinetičke rezolucije u kotlastom reaktoru kako je opisano u poglavlju 3.4. dobiveni su rezultati prikazani na slikama 5.1., 5.2. te 5.3. Rezultati su praćeni plinskom kromatografijom.



SLIKA 5.1. Prvi eksperiment ( $V_{\text{reaktor}} = 2000 \mu\text{L}$ ,  $c_{\text{epoksid}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaOCN}} = 150 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheC}} = 11,128 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{TriS-SO}_4} = 500 \text{ mM}$ )



SLIKA 5.2. Drugi eksperiment ( $V_{\text{reaktor}} = 2000 \mu\text{L}$ ,  $c_{\text{epoksid}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaBr}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaOCN}} = 150 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheC}} = 11,128 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{TriS-SO}_4} = 500 \text{ mM}$ )



**SLIKA 5.3.** Treći eksperiment ( $V_{\text{reaktor}} = 2000 \mu\text{L}$ ,  $c_{\text{epoksid}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaBr}} = 50 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaOCN}} = 150 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheC}} = 11,128 \text{ mg mL}^{-1}$ ,  $c_{\text{Tris-SO}_4} = 500 \text{ mM}$ )

Analizom plinskom kromatografijom, uočeno je kako je jedini mjerljivi produkt oksazolidinon. Time je potvrđen prethodno iznesen zaključak koji govori kako je ciklizacija dibromoalkohola vrlo brza i regioselektivna reakcija. Nadalje, poznato je kako brzina enzimske reakcije ovisi o koncentraciji supstrata te je potrebno odabrati optimalnu koncentraciju za najbolje iskorištenje u najkraćem vremenskom periodu. U provedenim eksperimentima koncentracije *rac*-epoksida i NaOCN su držane konstante te je praćen utjecaj bromidnih iona na reakcijsku brzinu.

Prvi se eksperiment provodio u odsustvu bromidnih iona i odnosi se samo na prvi reakcijski stupanj DKR, za razliku od ostalih eksperimenata koji zbog prisutnosti bromidnih iona u obzir uzimaju cijeli sustav DKR. (*S*)-epoksid se troši brzo jer kinetika predviđa izraženiji afinitet enzima prema cijanatnim ionima u slučaju (*S*)-epoksida ( $K_{m1, \text{NaOCN}} = 21,673 \text{ mM}$ ,  $K_{m2, \text{NaOCN}} = 43,771 \text{ mM}$ ). Različit afinitet enzima prema enantiomerima jasno je vidljiv iz grafičkih prikaza, gdje je konverzija (*S*)-2-bromometil-2-metil-oksirana puno brža od konverzije (*R*)-enantiomera. Stoga se može zaključiti kako pri postavljenim reakcijskim uvjetima, HheC iz *Agrobacterium radiobacter* soj AD1 posjeduje veliku enantioselektivnost prema (*S*)-enantiomerima odabranog epoksida.

Nadalje, primjetno je kako se konverzija epoksidnih enantiomera u sustavu bez bromidnih iona (slika 5.1.) odvija najsporije. Slično je zapažanje u reakcijskom sustavu s 100 mM NaBr (slika 5.2.). Tada je potrošnja enantiomera ipak veća, no ne kao u reakcijskom sustavu s 50 mM NaBr (slika 5.3.). Konverzija epoksida je u svim eksperimentima ubrzano

rasla do četvrtog sata, a nakon toga je brzina porasta znatno usporila. Razlog tomu je vrlo niska koncentracija neizreagiranih supstrata u sustavu u tom vremenskom periodu. Za 4 h koncentracija dobivenog oksazolidinona u sustavu bez bromidnih iona iznosila je 58,7 mM, u sustavu s 100 mM NaBr 59,5 mM te u sustavu s 50 mM NaBr 83,2 mM. Stečena saznanja ukazuju na postojanje inhibitorskog svojstva bromidnih iona pri većim koncentracijama NaBr što je uočeno i u prijašnjim ispitivanjima.

Sve su reakcije praćene kroz 24 h, nakon čega je u prva dva eksperimenta potvrđena konverzija epoksida od 99%, dok je u trećem iznosila nešto manje, odnosno 96%. Za treći eksperiment model predlaže malo veću konverziju, odnosno 99%. Odstupanja od modela odgovaraju analitičkoj eksperimentalnoj pogrešci.

Dobiveni eksperimentalni podaci pokazuju zadovoljavajuće slaganje s prethodno razvijenim modelom DKR dobivanja (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona, uz slučaj drugog eksperimenta gdje pri danim reakcijskim uvjetima model predviđa bržu potrošnju epoksidnih enantiomera (slika 5.2.). Odstupanja nisu velika te su posljedica eksperimentalne pogreške.



## 6. ZAKLJUČAK

Pomoću dostupnih literaturnih izvora, prethodno su provedeni eksperimenti kojima je postavljen matematički model dinamičke kinetičke rezolucije katalizirane halogenhidrin-dehalogenazom. Model opisuje sintezu (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona reakcijom *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnih iona u prisustvu bromidnih iona kataliziranu s halogenihigrin-dehalogenazom. U ovom radu provedeni su eksperimenti validacije kojima je potvrđeno zadovoljavajuće slaganje modela s eksperimentalnim podacima.

Model nalaže primjenu niskih koncentracija bromidnih iona kako ne bi do izražaja došao njihov inhibicijski učinak te je pomoću provedenih eksperimenata to i potvrđeno. Eksperimenti su provedeni bez prisutnosti bromidnih iona, s 100 mM NaBr i 50 mM NaBr te su dobiveni rezultati ukazali na točnost pretpostavke modela. Od provedenih eksperimenata najbrža konverzija epoksida postignuta je u sustavu s 50 mM NaBr.

## 7. POPIS SIMBOLA I POKRATA

$c$  – množinska koncentracija,  $\text{mmol dm}^{-3}$

CR – cijevni reaktor

DKR- dinamička kinetička rezolucija

DMSO – dimetil-sulfoksid

E - enzim

$E_a$  – energija aktivacije, kJ

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

ES – enzim-supstrat kompleks

FID – plameno ionizacijski detektor (engl. flame ionization detector)

$G$  – Gibbsova energija, kJ

GC – plinska kromatografija (engl. gas chromatography)

HHDH – halogenhidrin-dehalogenaza

HheC – C tip halogenhidrin-dehalogenaze

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

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

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

KR – kotlasti reaktor

MTBE – metil-*terc*-butil-eter

*o.p.* – optička čistoća (engl. optical purity), %

$p$  – tlak, kPa

P – produkt

pH – negativan logaritam aktiviteta vodikovih iona

PKR – protočno kotlasti reaktor

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

S - supstrat

SDR – kratkolančane dehidrogenaze/reduktaze (engl. short-chain dehydrogenase/reductase)

$T$  – temperatura, °C

TO – temeljna otopina

$t_R$  – vrijeme zadržavanja (engl. retention time), min

TriS-SO<sub>4</sub> - 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer

$V$  – volumen,  $\text{dm}^3$

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

$\Delta$  – promjena

$\gamma$  – masena koncentracija,  $\text{mg mL}^{-1}$

## 8. LITERATURA

### B

Bisswanger H.; Enzyme Kinetics, Principles and Methods, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008 str. 59-66., 120-131.

Bolm C., Gladysz J. A.; Introduction: Enantioselective Catalysis, Chemical Reviews, **Vol. 103, No. 8** (2003) 2761-2762.

Bozdogan B., Appelbaum P. C.; Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance, International Journal of Antimicrobial Agents, **Vol. 23, No. 2** (2004) 113-119.

### D

de Carvalho C.C.C.R., da Fonseca M.M.R.; Biotransformations, u: M. Moo-Young (ur.), Comprehensive biotechnology, Elsevier, New York, 2019, str. 574-584.

### F

Faber K.; Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook, Springer, Berlin, 2018, str. 1-26.

Findrik Blažević Z.; Bioreaktori, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2017, str. 4., 21-24., 41-43.

### H

Harriott P.; Chemical Reactor Design, Marcel Dekker, Inc., New York, 2002, str. 82.

Hasnaoui-Dijoux G., Majerić Elenkov M., Lutje Spelberg J.H., Hauer B., Janssen D.B.; Catalytic Promiscuity of Halohydrin Dehalogenase and its Application in Enantioselective Epoxide Ring Opening; ChemBioChem, **Vol. 9, No. 7** (2008) 1-5.

<https://www.agilent.com> (pristup 17. kolovoz 2020.)

<https://www.sigmaaldrich.com> (pristup 17. srpanj 2020.)

## L

Liu S.; *Bioprocess Engineering: Kinetics, Sustainability and Reactor Design*, Elsevier, New York, 2016, str. 297 – 303., 313-314., 320.

Lutje Spelberg J. H., Tang L., Kellogg R. M., Janssen D. B.; Enzymatic dynamic kinetic resolution of epihalohydrins, *Tetrahedron: Asymmetry*, **Vol. 15, No. 7** (2004) 1095-1102.

Lutje Spelberg J. H., de Vries E. J.; Hydrolysis and Formation of Epoxides, u: K. Drauz, H. Gröger i O. May (ur.), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2012, str. 363-411.

## M

Majerić Elenkov M., Tang L., Meetsma A., Hauer B., Janssen D. B.; Formation of Enantiopure 5-Substituted Oxazolidinones through Enzyme-Catalysed Kinetic Resolution of Epoxides, *Organic Letters*, **Vol. 10, No. 12**, (2008) 2417-2420.

Majerić Elenkov M., Szymanski W., Janssen D. B.; Reactions Catalyzed by Halohydrin Dehalogenases, u: K. Faber, W.-D. Fessner i N. J. Turner (ur.), *Science of Synthesis: Biocatalysis in Organic Synthesis Vol. 2*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2014, str. 507-527.

Marangoni A. G.; *Enzyme Kinetics, A Modern Approach*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2002, str. 1-65.

McNair H. M., Miller J. M., Snow N. H.; *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2019, str. 1-14., 37-40.

Mikleušević A., Hameršak Z., Salopek-Sondi B., Tang L., Janssen D. B., Majerić Elenkov M.; Oxazolidinone Synthesis through Halohydrin Dehalogenase-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution, *Advanced Synthesis & Catalysis*, **Vol. 357, No. 8**, (2015) 1709-1714.

Milčić N.; Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije katalizirane halogenhidrin dehalogenazom, *Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu*, 2018, str. 54.

## N

Nakano K., Kitamura M.; Dynamic Kinetic Resolution, u: M. Todd (ur.), Separation of Enantiomers, Synthetic Methods, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, 2014, str. 161-215.

Nauman E. B.; Chemical Reactor Design, Optimatization and Scaleup, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2008, str. 12-17.

## P

Patel A. K., Singhania R. R., Pandey A.; Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes, u: G. Brahmachari (ur.), Biotechnology of Microbial Enzymes, Elsevier, New York, 2016, str. 13-20., 451.

## S

Schallmey M., Floor R.J., Szymanski W., Janssen D.B.; Hydrolysis and Reverse Hydrolysis: Halohydrin Dehalogenases, u: E. M. Carreira i H. Yamamoto (ur.), Comprehensive Chirality, Volume 7: Synthetic Methods VI-Enzymatic and Semi-Enzymatic, Elsevier, New York, 2012 str. 143-155.

Schallmey M., Koopmeiners J., Wells E., Wardenga R., Schallmey A.; Expanding the Halohydrin Dehalogenase Enzyme Family: Identification of Novel Enzymes by Database Mining, Applied and Enviromental Microbiology, **Vol. 80, No. 23** (2014) 7303-7315.

Schallmey A., Schallmey M.; Recent advances on halohydrin dehalogenases-from enzyme identification to novel biocatalytic applications, Applied Microbiology and Biotechnology, **Vol. 100, No. 18** (2016) 7828-7839.

Sin G., Woodley J.M., Gernaey K.V.; Application of Modeling and Simulation Tools for the Evaluation of Biocatalytic Processes: A Future Perspective, Biotechnology Progress, **Vol. 25, No. 6** (2009) 1529–1538.

Straathof A. J. J., Adlercreutz P.; Applied Biocatalysis, Second Edition, Taylor & Francis Inc., Bosa Roca, 2000 str. 374.

Stryer L.; Biochemistry 2nd Edition, San Francisco, W.H.Freeman and Comp., San Francisco, 1981, str. 11-16., 26-29., 89-112.

## V

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

## W

Wade L.G. ml.; Organska kemija, Školska knjiga, Zagreb, 2017, str. 169-211.

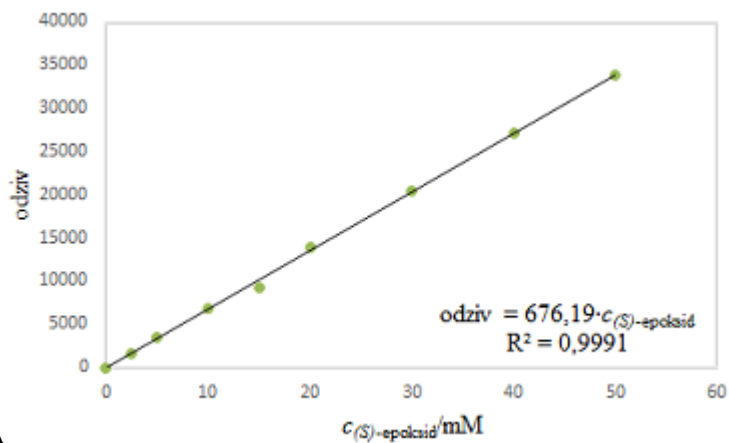
Whittall J., Sutton P.W.; Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2012, str. 1-12.

## Y

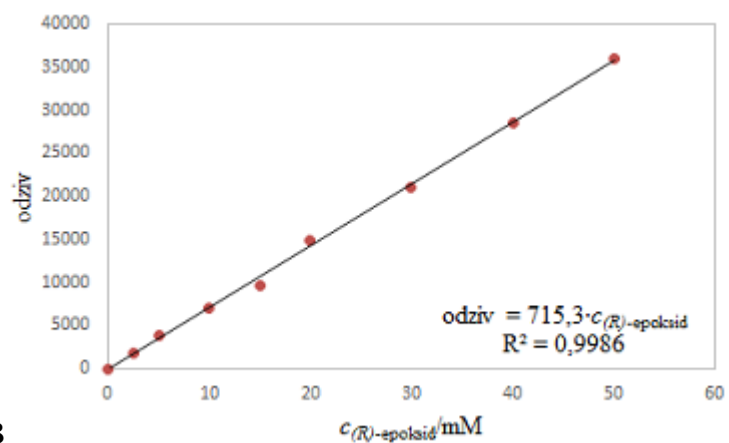
You Z.-Y., Liu Z.-Q., Zheng Y.-G.; Properties and biotechnological applications of halohydrin dehalogenases: current state and future perspectives, Applied Microbiology and Biotechnology, **Vol. 97, No. 1** (2013) 9-21.

## 9. PRILOZI

**PRILOG 1.** Baždarni pravci za GC analizu za **A:** (*S*)-epoksid i **B:** (*R*)-epoksid na Alpha DEX™ 120 koloni



**A**



**B**

**PRILOG 2.** Baždarni pravac za GC analizu za (*S*)-oksazolidinon na CP-Chirasil-DEX CB koloni

