

Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije katalizirane halogenhidrin dehalogenazom

Milčić, Nevena

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:149:206240>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-08**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Nevena Milčić

MATEMATIČKI MODEL DINAMIČKE KINETIČKE
REZOLUCIJE KATALIZIRANE HALOGENHIDRIN
DEHALOGENAZOM

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac
dr. sc. Maja Majerić Elenkov, v. zn. sur.

Zagreb, rujan 2018.

Prvenstveno, zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na izvrsnom mentorstvu u punom smislu – metodično pojašnjavanje, konstruktivni savjeti te poticanje logičkog razmišljanja i samostalnog rada kroz strpljiv i topao pristup nisu me samo vodili već i motivirali kroz sve faze izrade rada.

Dr. sc. Maji Majerić Elenkov zahvaljujem na velikoj znanstvenoj pomoći i moralnoj podršci. Iznimno sam zahvalna što ste me poticali, entuzijastično pristupali ovoj suradnji i pritom me toliko toga naučili.

Dr. sc. Martini Sudar, zahvaljujem na uvijek velikodušnoj pomoći, strpljenju i potpori. Svojim prijateljskim pristupom i spremnosti da odgovorite na sva pitanja uvelike ste mi olakšali ovu životnu stepenicu.

Zahvaljujem i ostatku Zavoda za reakcijsko inženjerstvo i katalizu na ugodnoj radnoj atmosferi.

Zahvaljujem se na ljubavi i podršci svojoj obitelji. Hvala vam za svaki ispit koji ste sa mnom proživljavali i svaki uspjeh kojem ste se veselili. Mama i tata, hvala što ste mi omogućili sve što mi je bilo potrebno, i mnogo više od toga, te se pri tom trudili imati razumijevanja čak i kada me niste potpuno razumjeli. Ela i Iva, hvala vam na svim sretnim trenucima i pametnim savjetima, bez vas ne bih bila tu gdje jesam.

Iva i Kristina, hvala vam na lepezi najljepših uspomena, ljubavi i pomoći. Moji ste oslonci i uvijek izvor sreće.

SAŽETAK

Optički čiste tvari su vrijedni prekursori u farmaceutskoj industriji i industriji finih kemikalija, stoga pretvorba racemičnih smjesa u enantiomerno čiste produkte predstavlja izazov. Jedna od metoda deracemizacije je dinamička kinetička rezolucija (DKR) koja se zasniva na kinetičkoj rezoluciji u kombinaciji s *in situ* racemizacijom sporije reagirajućeg enantiomera supstrata. Halogenhidrin dehalogenaze (HHDH) u metaboličkim putovima kataliziraju reverzibilnu dehalogenaciju vicinalnih halogenhidrina do epoksida.

U radu je razvijen matematički model DKR *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana i dobivanja (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona uz enzim HheC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1. Ispitivana DKR se sastoji od tri reakcijska stupnja: *i.* favorizirano nastajanje (*S*)-oksazolidinona reakcijom (*S*)-epoksida i cijanatnih iona, *ii.* nastajanje 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola iz (*R*)-epoksida i bromidnih iona, te *iii.* nastajanje *rac*-epoksida iz dibromoalkohola.

Matematički model sastoji se od kinetičkog modela i bilanci tvari u reaktoru. Određivanjem kinetike reakcije DKR utvrđen je različit afinitet enzima prema enantiomerima. U *i.* stupnju reakcije za (*S*)-epoksid utvrđeno je da supstrati prate Michaelis-Menteničinu kinetiku uz inhibicijski učinak (*S*)-epoksida na enzim pri višim koncentracijama. Za (*R*)-epoksid utvrđeno je da prati kinetiku 1. reda, a cijanatni ioni Michaelis-Menteničinu kinetiku. Bromidni ioni te suprotni enantiomeri epoksida u oba slučaja imaju inhibicijski učinak na enzim. U *ii.* stupnju DKR oba epoksida prate kinetiku 1. reda, a bromidni ioni Michaelis-Menteničinu kinetiku uz inhibiciju u slučaju (*S*)-epoksida. U slučaju (*S*)-epoksida također postoji inhibicijski učinak suprotnim enantiomerom i cijanatnim ionima. Otkriveno je da je reakcija zatvaranja dibromoalkohola odnosno *iii.* stupanj DKR spontan kemijski proces pri kojem *rac*-epoksid nastaje prema kinetici 1. reda.

Optički čisti (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on može se dobiti uz pažljivo odabrane reakcijske uvjete. DKR je potrebno provoditi pri niskim koncentracijama *rac*-epoksida, radi inhibicije supstratom (*S*)-epoksidom u *i.* stupnju, te niskim koncentracijama bromidnih iona, koje su dovoljne za provođenje *ii.* stupnja i ne inhibiraju enzim u *i.* stupnju.

Ključne riječi: dinamička kinetička rezolucija, halogenhidrin dehalogenaza, epoksid, oksazolidinon, kinetika enzimske reakcije, matematičko modeliranje

SUMMARY

Optically pure compounds are valuable precursors in pharmaceutical and fine chemicals industry, so the conversion of racemic mixtures to enantiomerically pure products represents a challenge. One of the deracemization methods is the dynamic kinetic resolution (DKR) which couples a kinetic resolution with *in situ* racemization of the slower reacting substrate enantiomer. Halohydrin dehalogenases (HHDH) in metabolic pathways catalyze the reversible dehalogenation of vicinal halohydrin to epoxide.

In this paper, a mathematical model of *rac*-2-bromomethyl-2-methyl-oxirane DKR has been developed to obtain (*S*)-5-bromomethyl-5-methyloxazolidin-2-one with the HheC enzyme from *Agrobacterium radiobacter* AD1. The examined DKR consists of three reaction steps: *i.* favored formation of (*S*)-oxazolidinone in (*S*)-epoxide and cyanate ions reaction; *ii.* the formation of 1,3-dibromo-2-methyl-2-propanol in (*R*)-epoxide and bromide ions reaction; and *iii.* the formation of *rac*-epoxide from dibromo-alcohol.

The mathematical model consists of the kinetic model and the mole balance in the reactor. By determining the DKR reaction kinetics, different affinity of the enzyme towards the enantiomers has been observed. In the *i.* reaction step for (*S*)-epoxide, it has been determined that both substrates follow Michaelis-Menten kinetics with the inhibitory effect on the enzyme at higher concentrations of the (*S*)-epoxide. The (*R*)-epoxide follows the first-order kinetics and the cyanate ion Michaelis-Menten kinetics. Bromide ions and the opposite epoxide enantiomers in both cases have an inhibitory effect on the enzyme. In the *ii.* reaction step both epoxides follow first-order kinetics and the bromide ions follow Michaelis-Menten kinetics with the inhibitory effect in the case of (*S*)-epoxide. In the case of (*S*)-epoxide enzyme inhibition with another enantiomer and cyanate ion is present as well. It has been found that the reaction of dibromo-alcohol closure, i.e. *iii.* reaction step, is a spontaneous chemical process in which *rac*-epoxide is formed by first-order kinetics.

Optically pure (*S*)-oxazolidinone can be obtained with carefully selected reaction conditions. DKR should be carried out at low concentrations of the *rac*-epoxide, because of the (*S*)-epoxide substrate inhibition in the *i.* reaction step, and low concentrations of bromide ions, which should be sufficient enough to perform the *ii.* reaction step and which do not inhibit the enzyme in the *i.* step.

Keywords: dynamic kinetic resolution, halohydrin dehalogenase, epoxide, oxazolidinone, enzymatic reaction kinetics, mathematical modeling

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Opći dio	2
2.1. Biokatalizatori.....	2
2.1.1. Općenito o biokatalizatorima	2
2.1.2. Biokataliza.....	5
2.1.3. Halogenhidrin dehalogenaza	6
2.1.3.1. Klasifikacija, struktura i reakcijski mehanizmi	6
2.1.3.2. Podjela i pregled korištenja HHDH u biokatalizi.....	8
2.2. Optički čiste tvari.....	9
2.2.1. Svojstvo kiralnosti.....	9
2.2.2. Optički čiste tvari u farmaceutskoj industriji	10
2.2.2.1. Epoksidi	11
2.2.2.2. Oksazolidinoni.....	12
2.2.3. Dobivanje optički čistih tvari	13
2.2.3.1. Dinamička kinetička rezolucija	13
2.3. Modeliranje biotransformacija.....	13
2.3.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija.....	14
2.3.2. Model kotlastog reaktora.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Aparatura	18
3.1.1. Reakcijski sustav	18
3.1.2. Plinski kromatograf.....	18
3.1.3. Spektrofotometar	19
3.1.4. Ostala aparatura.....	19
3.2. Analitičke metode	20
3.2.1. Analiza uzoraka plinskom kromatografijom.....	20
3.2.2. Spektrofotometrijska karakterizacija enzima	22
3.2.2.1. Određivanje koncentracije enzima metodom po Bradfordu.....	22
3.2.2.2. Određivanje aktivnosti enzima testom kromogenog supstrata	23
3.3. Priprava kemikalija	25
3.3.1. Popis kemikalija	25

3.3.2. Priprava <i>rac</i> -2-bromometil-2-metil-oksirana.....	26
3.3.3. Priprava (<i>R</i>)-2-bromometil-2-metil-oksirana i (<i>S</i>)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona	27
3.3.4. Ispitivanje stabilnosti kemikalija.....	28
3.4. Eksperimenti određivanja kinetike dinamičke kinetičke rezolucije	29
3.4.1. Ispitivanje kinetike 1. stupnja reakcije	29
3.4.2. Ispitivanje kinetike 2. stupnja reakcije	32
3.4.3. Ispitivanje kinetike 3. stupnja reakcije	34
3.5. Validacija modela u kotlastom reaktoru	34
3.6. Obrada podataka	35
4. Matematičko modeliranje procesa dinamičke kinetičke rezolucije.....	37
4.1. Kinetički model procesa	38
4.1. Reaktorski model procesa	39
5. Rezultati i rasprava	40
5.1. Karakterizacija enzima.....	40
5.2. Stabilnost kemikalija.....	40
5.3. Kinetika dinamičke kinetičke rezolucije.....	43
5.3.1. Kinetika <i>i</i> . stupnja reakcije	45
5.3.2. Kinetika <i>ii</i> . stupnja reakcije.....	49
5.3.3. Kinetika <i>iii</i> . stupnja reakcije.....	52
5.4. Validacija modela	53
6. Zaključak	56
7. Popis pokrata i simbola.....	58
8. Literatura	61
9. Prilozi	65
10. Životopis.....	68

1. UVOD

Biokatalitički procesi posljednjih su godina u fokusu znanstvenih istraživanja jer prate sve intenzivniji svjetski trend „zelene kemije“. Provode se u blagim reakcijskim uvjetima, troše manje energije i proizvode manje otpada. Otkrića u biokatalizi preslikavaju se u industrijske procese čime se doprinosi ekonomičnosti procesa i zadovoljavaju se zakonske regulative s aspekta zaštite okoliša. Broj industrijskih primjena enzima bombastično je porastao posljednjih godina, a na prvom mjestu nalazi se proizvodnja sve složenijih finih kemikalija poput farmaceutika, agrokemikalija i dodataka prehrani, koja se više ne oslanja isključivo na klasičnu organsku sintezu već ju nadopunjava ili pak uspješno zamjenjuje sa selektivnim biokatalitičkim procesima (Kim et al., 2015; Blamey et al., 2017).

Osim iz ekonomskih i ekoloških razloga koji doprinose održivosti procesa, biokataliza svoju funkciju u farmaceutskoj industriji pronalazi radi mogućnosti dobivanja optički čistih spojeva iz prokiralnih supstrata pomoću selektivnih enzima (Pham-Huy et al., 2006). Biokatalitička pretvorba neprirodnih supstrata posljednjih je godina značajno porasla kao alternativa kemijskoj asimetričnoj sintezi (Tang et al., 2012). Iako su iste kemijske strukture, većina enantiomera kiralnih lijekova pokazuje značajne različitosti u biološkim aktivnostima. Eliminacijom neželjenih enantiomera dobivaju se moćniji, selektivniji i specifičniji lijekovi (Pham-Huy et al., 2006), čime se snižava doza, smanjuju varijabilnosti u metabolizmu te izbjegavaju potencijalno štetni učinci na organizam (Šinko, 2005).

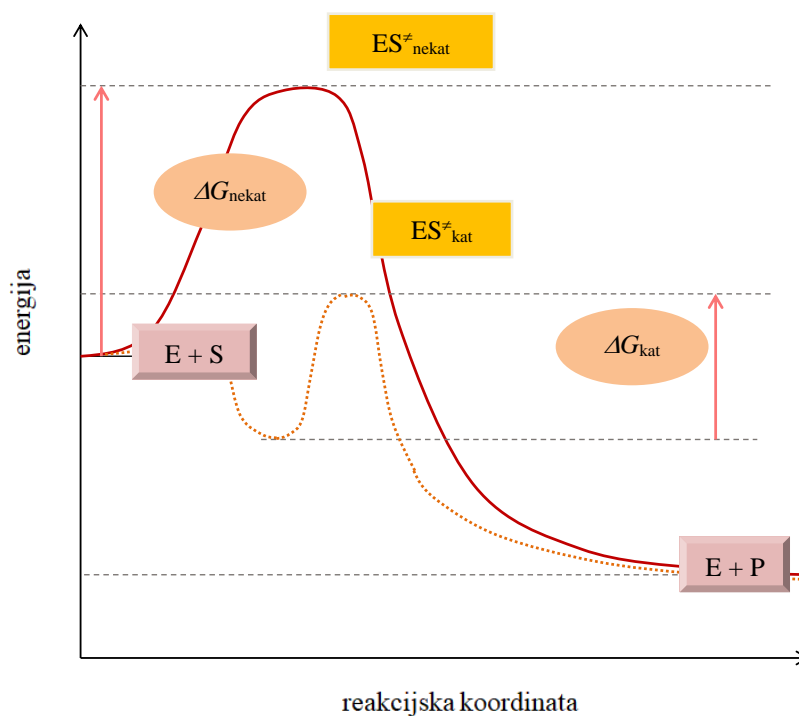
Kako bi se biokatalitički procesi implementirali u industrijski sektor, potreban je čitav niz ispitivanja iz područja genetičkog, proteinskog i biokemijskog inženjerstva. Biokemijsko reakcijsko inženjerstvo bavi se određivanjem kinetike enzimskih reakcija i od iznimne je važnosti pri komercijalizaciji biokatalitičkih procesa. Poznavanje čimbenika poput stabilnosti, specifične enzimske aktivnosti i potencijalnih inhibicija igra ključnu ulogu u poboljšanju kvalitete i kvantitete proizvoda (Gummadi et al., 2017). Provedba eksperimenata u manjem mjerilu i matematičko modeliranje preduvjeti su za brzo i učinkovito uvećanje procesa, čime se skraćuje vrijeme i smanjuju troškovi ispitivanja (Vasić-Rački et al., 2011).

2. OPĆI DIO

2.1. Biokatalizatori

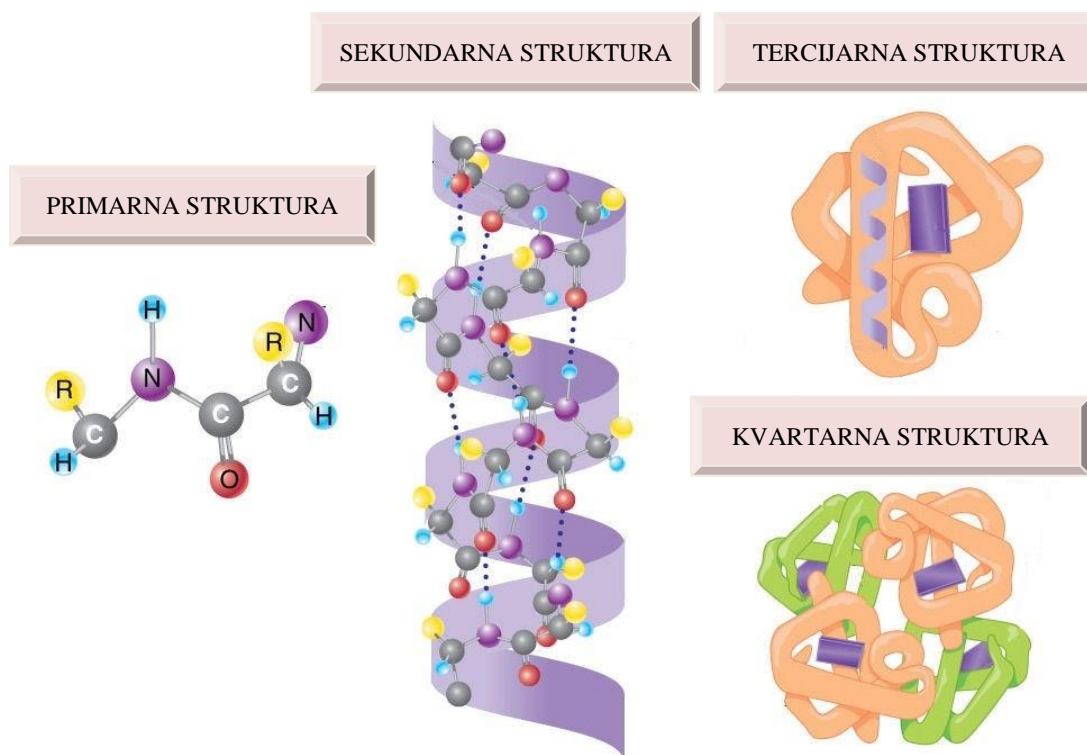
2.1.1. Općenito o biokatalizatorima

Biokatalizatori tj. enzimi (grč. *έν+ ζυμο* – u plijesni) su aktivni proteini koji kataliziraju biokemijske reakcije sinteze i cijepanja molekula u živim organizmima. Većina enzima djeluje intracelularno, tj. unutar stanice u kojoj se sintetiziraju, a neki se izlučuju i djeluju ekstracelularno. Poput kemijskih katalizatora, enzimi omogućavaju alternativni put reakcije kojim se izbjegava usko grlo, odnosno najsporija reakcija nekatalitički vođenog procesa. Za alternativni put potrebna je niža energija aktivacije (E_a) što ima za posljedicu brže formiranje produkata i uspostavljanje reakcijske ravnoteže (Patel et al., 2016). Enzimi ne utječu na promjenu slobodne Gibbsove energije (ΔG) niti na ravnotežno stanje reakcije (Liu, 2016). Slika 2.1 prikazuje djelovanje enzima sa stajališta energijskih promjena.



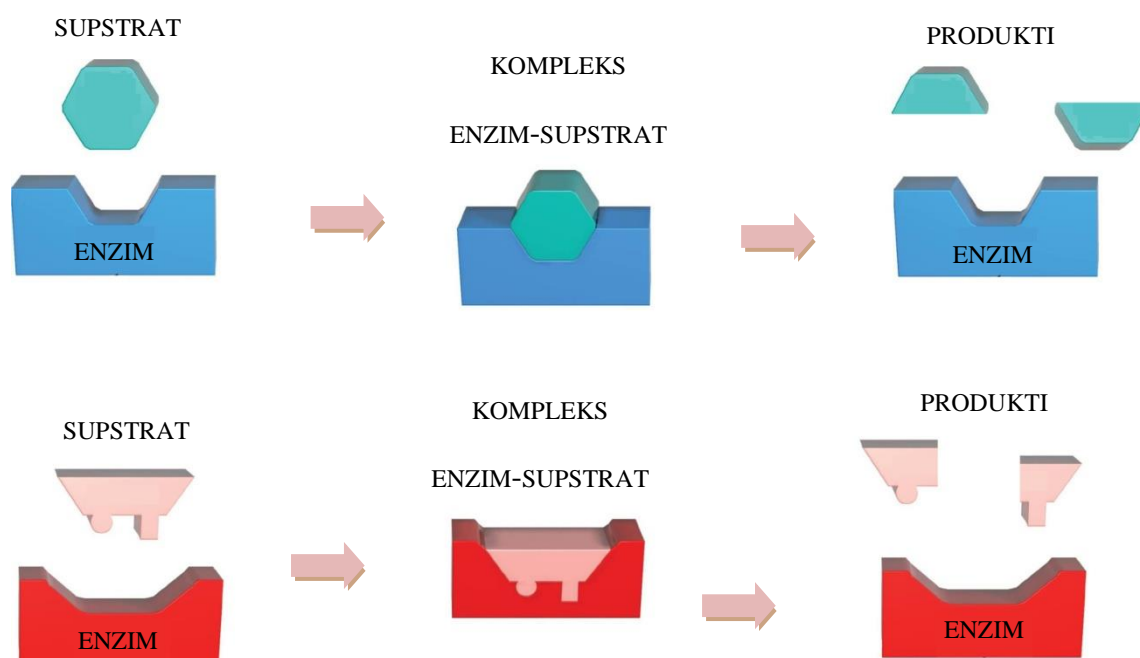
SLIKA 2.1. Shematski prikaz energijskih potreba katalizirane i nekatalizirane reakcije pri čemu su: E – enzim, S – supstrat, P – produkt, ΔG – slobodna energija, ES^{\neq} – kompleks enzim-supstrat, kat – katalizirana reakcija i nekat – nekatalizirana reakcija

Enzimi su proteini građeni od jednog ili više polipeptidnih lanaca čije se molekulske mase kreću između 15 000 i nekoliko milijuna g mol^{-1} . Aminokiseline se međusobno povezuju stvaranjem peptidnih veza između amino i karboksilnih skupina, tvoreći polipeptidne lance. Prosječni polipeptidni lanac, koji predstavlja primarnu strukturu proteina (slika 2.2), sastavljen je od 500 molekula aminokiselina, a upute o njihovom broju, vrsti i slijedu zapisane su u genu u molekuli deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid* – DNA) (Roskoski, 2007). Sekundarna struktura proteina odnosi se na lokalnu strukturnu konformaciju polipeptidnih lanaca, koji izvijanjem i stvaranjem vodikovih veza tvore alfa-uzvojnice ili beta-strukture proteina radi stabilizacije u prostoru i snižavanja energije makromolekule. Daljnje savijanje, uvijanje i zbijanje lanaca određuje trodimenzionalnu tercijarnu strukturu proteina. Ukoliko je protein građen od više polipeptidnih lanaca, tzv. podjedinica, kvartarna struktura odnosi se na njihov međusobni raspored i slaganje u veće agregate (Langan, 2006). Najbolji biokatalizatori dolaze u obliku kvartarnih struktura, tj. globularnih kompleksa stabiliziranih disulfidnim mostovima i sekundarnim valencijskim silama (Findrik, 2013).



SLIKA 2.2. Strukture proteina

Kako bi se reakcija ubrzala, enzim i supstrat moraju doći u fizički kontakt. Postoje dvije teorije koje opisuju tu interakciju. Prva pretpostavlja međusobnu komplementarnost supstrata i enzima odnosno da molekula supstrata pristaje u aktivno mjesto molekule enzima kao što ključ pristaje u bravu (slika 2.3-A). Druga pretpostavlja da je enzim komplementaran prijelaznom stanju supstrata (slika 2.3-B), tj. onom kemijskom obliku koji supstrat mora poprimiti pri prelasku u produkt reakcije (Liu, 2016). U oba slučaja enzim i supstrat tvore kompleks pomoću van der Waalsovih sila, elektrostatskih sila, vodikovih veza ili rijetko kovalentnih veza. Kompleksiranje i odvajanje mora biti vrlo brzo i reverzibilno kako bi nepromijenjeni enzim mogao nastaviti svoje katalitičko djelovanje na ostalim molekulama (Suzuki, 2015).



SLIKA 2.3. Shematski prikazi hipoteza djelovanja enzima: **A.** ključ-brava i **B.** pobudene prilagodbe

Ponekad su za katalitičku aktivnost enzima potrebni kofaktori. To su neproteinske molekule koje trajnim ili privremenim vezanjem za enzim poboljšavaju biokemijske transformacije, npr. jer služe kao intermedijeri u reakcijama prijenosa. Organske molekule kofaktora nazivaju se koenzimi (Rucker et al., 2016).

Enzimi su specifični prema supstratu te se stoga i klasificiraju prema reakcijama koje kataliziraju. Prema Internacionalnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju (engl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* – IUBMB) postoji 6 glavnih skupina enzima. Pojedine skupine su navedene u tablici 2.1 uz pripadajuće reakcije koje kataliziraju (Palmer et al., 2011).

TABLICA 2.1. Podjela enzima i pripadajućih reakcija prema IUBMB

SKUPINA ENZIMA	KATALIZIRANA REAKCIJA
<i>Oksidoredukaze</i>	oksidacija/redukcija
<i>Transferaze</i>	prijenos atoma ili skupine među molekulama (isključujući reakcije ostalih skupina enzima)
<i>Hidrolaze</i>	reakcije hidrolize
<i>Liaze</i>	reakcije eliminacije funkcionalnih skupina kidanjem kovalentnih veza
<i>Izomeraze</i>	reakcije izomerizacije
<i>Ligaze</i>	reakcije stvaranja kovalentne veze uz istodobnu hidrolizu pirofosfatne veze u adenzin-trifosfatu (ATP) ili sličnom nukleotidu

2.1.2. Biokataliza

Biokatalitički procesi koriste izolirane i pročišćene enzime ili žive stanice mikroorganizama za katalizu specifičnih reakcija ili dijelova reakcija. Poznato je oko 3000 različitih vrsta enzima (Binod et al., 2013) koji kataliziraju oko 4000 različitih procesa u živim organizmima, ali samo oko 5 % ih je komercijalizirano u industrijske svrhe. Iako se enzimi nalaze u svim živim organizmima, za industrijske procese dobivaju se većinom iz mikroorganizama, tj. prokariotskih bakterija i eukariotskih kvasaca i plijesni, zbog prednosti poput brže sposobnosti rasta, veće produktivnosti i lakše genetičke manipulacije za pojačanu proizvodnju (Patel et al., 2016).

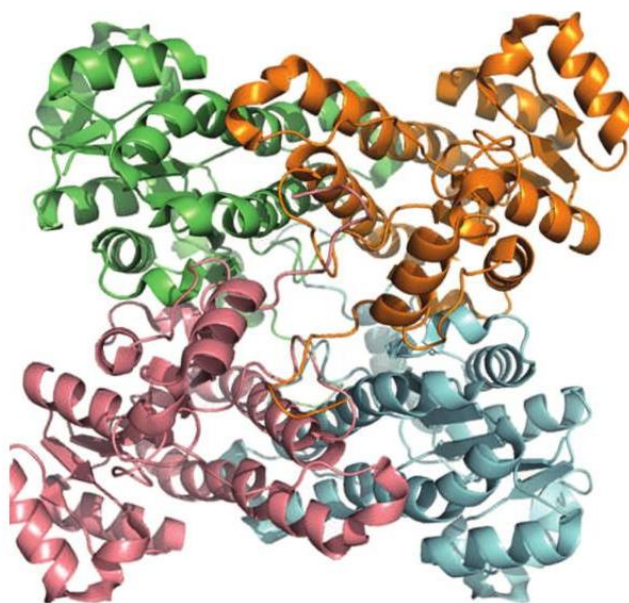
Enzimi u živim organizmima su specifični i visoko selektivni te obavljaju točno određenu funkciju u kompleksnim biološkim procesima. Međutim, istraživanjima u području biokatalize otkriveni su brojni enzimi koji imaju neprirodnu selektivnost, prihvaćaju ostale supstrate i aktivni su u neuobičajenom okolišu (Arnold et al., 2015).

Biokatalitički procesi od velikog su značaja u kemijskoj, farmaceutskoj i prehrambenoj industriji jer vode smanjenju vremena trajanja procesa, broja reakcijskih stupnjeva i ukupne količine otpada (Wohlgemuth, 2010). Njihovom upotrebom moguće je izbjeći ekstremne reakcijske uvjete poput visokih temperatura i tlakova, visokih i niskih pH vrijednosti te upotrebe organskih otapala (Sanchez et al., 2017). Osim navedenog, enzimi pružaju mogućnost proizvodnje optički čistih spojeva zahvaljujući visokoj kemooselektivnosti, regioselektivnosti i stereoselektivnosti (Nestl et al., 2011). Drugim riječima, u blagim reakcijskim uvjetima moguće je dobiti željene produkte visoke čistoće i niske toksičnosti, što smanjuje operacijske troškove, potrebne sigurnosne mjere i negativan utjecaj na okoliš (Sanchez et al., 2017).

2.1.3. Halogenhidrin dehalogenaza

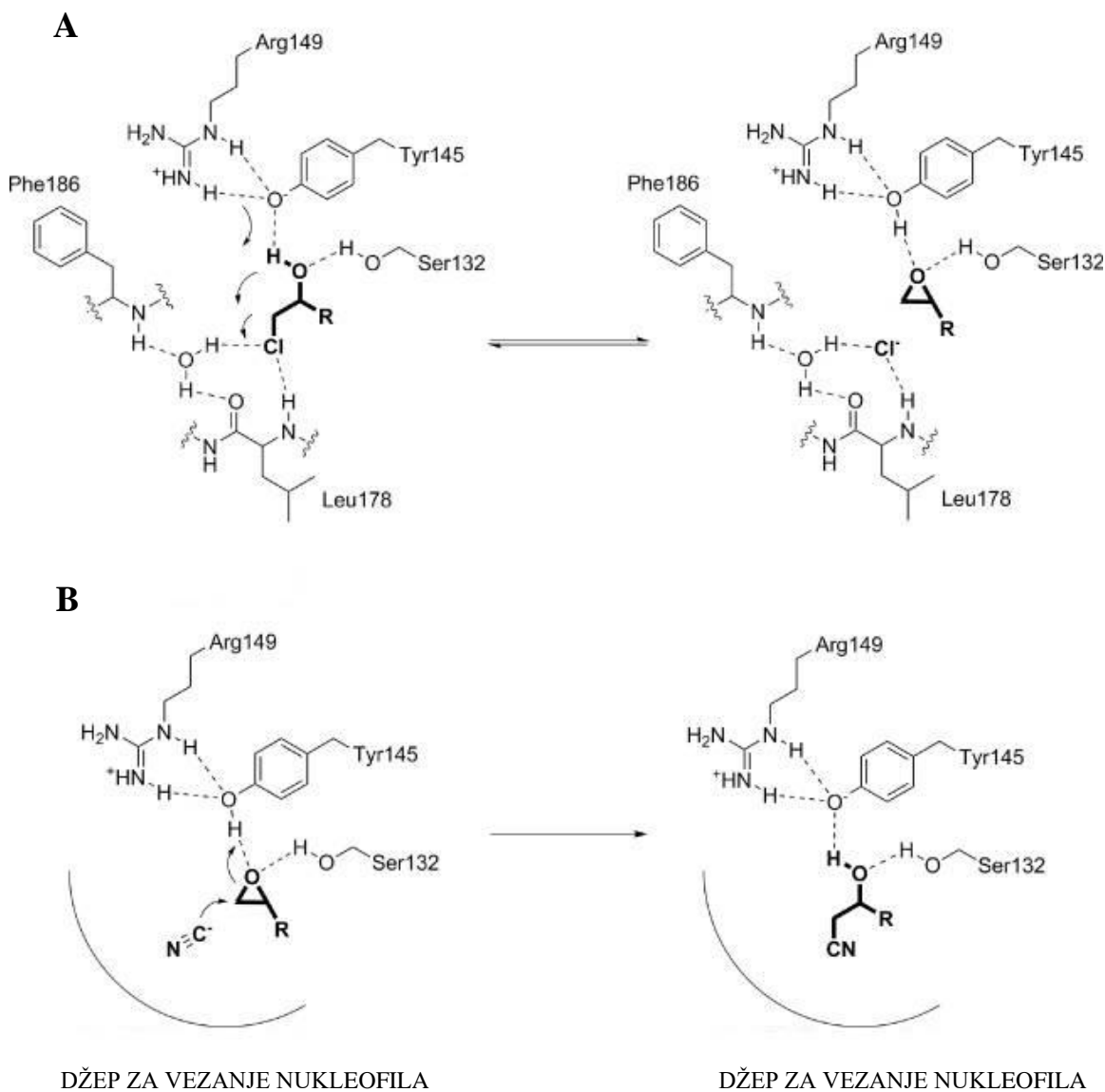
2.1.3.1. Klasifikacija, struktura i reakcijski mehanizmi

Halogenhidrin dehalogenaze (HHDH) filogenetski pripadaju kratkolančanim hidrogenazama/reduktazama jer dijele nekoliko strukturnih i mehanističkih značajki, poput one da su homotetramernog oblika i sastavljene od para dimera (slika 2.4). Za razliku od kratkolančanih hidrogenaza/reduktaza, na mjestu za vezanje nikotinamidnog kofaktora posjeduju prostrani džep za vezanje nukleofila.



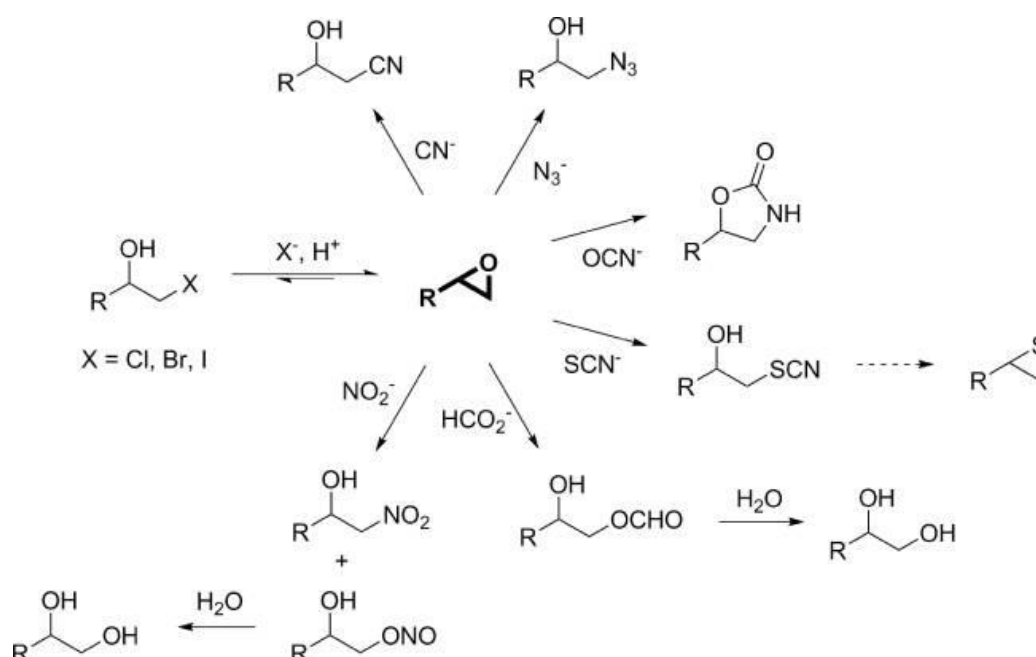
SLIKA 2.4. Struktura HheC

HHDH posjeduju aminokiselinsku triadu serin-tirozin-arginin (Ser-Tyr-Arg) te kataliziraju reverzibilnu dehalogenaciju halohidrina i stvaranje epoksida kroz intramolekulsku nukleofilnu supstituciju halogena susjednom hidroksilnom skupinom. Mehanizam reakcije u oba smjera prikazan je slikom 2.5.



SLIKA 2.5. Mehanizam **A.** dehalogenacije **B.** otvaranja epoksidnog prstena kataliziran HHDH

Zahvaljujući strukturi, HHDH također mogu iskoristiti druge, negativno nabijene nukleofile poput cijanida, azida ili nitrita (slika 2.6) u ireverzibilnom otvaranju epoksidnog prstena pri čemu nastaju nove C-C, C-N ili C-O veze (Schallmey et al., 2016).



SLIKA 2.6. Katalitičko područje djelovanja HHDH

2.1.3.2. Podjela i pregled korištenja HHDH u biokatalizi

Prema dosadašnjim saznanjima u vidu izolacije, pročišćavanja i istraživanja kodirajućih gena HHDH iz mikroorganizama, postoje tri filogenetska podtipa A, B i C u koje spadaju:

- ∴ 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 te
- ∴ dva identična HheC iz *Agrobacterium radiobacter*, soj AD1 i *Rhizobium* sp., soj NHG3 (Schallmey et al., 2016).

Od navedenih enzima najviše je proučavan HheC iz *A. radiobacter* AD1. Dokazano je da HheC postoji u velikom broju organizama poput bakterija, gljiva, biljaka i sisavaca (Venuvanalingama et al., 2011). Prema dosadašnjim saznanjima samo dva gena su dio operona koji upravlja metabolizmom epoksida, stoga ne treba isključiti mogućnost da je HheC uključena i u druge fiziološke funkcije (Schallmey et al., 2016).

Raznolike reakcije i šarolikost s aspekta prihvaćajućih nukleofila (slika 2.6) omogućuju stvaranje različitih epoksida, β -supstituiranih alkohola i drugih spojeva pomoću HDDH što ih čini atraktivnim kandidatima za praktičnu upotrebu u biokatalizi. To se ponajprije odnosi na HheC radi visoke stereoselektivnosti, odnosno prednosti za primjenu u sintezi optički čistih spojeva.

Najvažnija biokatalitička primjena je proizvodnja (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutirata iz etilnog (*S*)-4-kloro-3-hidroksibutirata preko odgovarajućeg (*S*)-epoksida kao intermedijera, koji služi u medicinskoj biokemiji kao prekursor za proizvodnju statina, lijekova za snižavanje kolesterola. Daljnje sintetske primjene HDDH uključuju sintezu optički čistih epihalohidrina i kiralnih tercijarnih alkohola.

Osim proizvodnje, HDDH se koriste i za biorazgradnju toksičnih ksenobiotika poput 1,2,3-trikloropropanola prisutnog u onečišćenim tlima i vodama te uklanjanje 3-kloro-1,2-propandiolnih estera nastalih u procesima proizvodnje hrane.

HDDH pronalaze primjenu i nešto novijeg datuma u analitičkoj kemiji pri kvantifikaciji azida i cijanida u vodenim otopinama. Ova metoda bazira se na enzimski kataliziranoj reakciji cijanida odnosno azida s 1,2-epoksibutanom pri čemu se produkti 1-azidobutan-2-ol i 3-hidroksipentannitril analiziraju plinskom kromatografijom (engl. *gas chromatography* – GC) (Schallmeyer et al., 2016).

2.2. Optički čiste tvari

2.2.1. Svojstvo kiralnosti

Kiralnost je svojstvo nesimetričnih molekula da nisu u mogućnosti poklopiti se pomacima ili zakretima s vlastitom zrcalnom slikom. Svojstvo se odnosi prvenstveno na molekule koje kao središte kiralnosti sadrže asimetrični ugljikov atom, odnosno ugljikov atom na koji su vezana četiri različita atoma ili skupine. Spojevi koje odlikuje svojstvo kiralnosti te se odnose kao predmet i njegova zrcalna slika (slika 2.7) su prostorni izomeri (stereoizomeri) i nazivaju se enantiomeri (grčki: *ἐναντίος* – suprotan, *μέρος* – dio). Enantiomeri pokazuju optičku aktivnost odnosno zakreću ravninu polarizirane svjetlosti za isti iznos kuta, ali u suprotnim smjerovima. Već prema tome u kojem smjeru zakreću ravninu, razlikujemo (*R*)-enantiomere (lat. *rectus* – desni) i (*S*)-enantiomere (lat. *sinister* – lijevi).

Optička čistoća uobičajeno se izražava enantiomernim omjerom E (2.1) ili enantiomernim viškom (engl. *enantiomeric excess* – ee) koji je prema definiciji omjer razlike i zbroja molova oba enantiomera (2.2), a može se izračunati kao omjer optičkoga zakretanja uzorka koji sadržava smjesu enantiomera i optičkoga zakretanja jednoga čistog enantiomera (2.3).

$$E = \frac{n(R)}{n(S)} \quad (2.1)$$

$$ee = \frac{n(R) - n(S)}{n(R) + n(S)} \cdot 100, [\%] \quad (2.2)$$

$$ee = \frac{\alpha_{\text{izmjereno}}}{\alpha_{\text{maksimalno}}} \cdot 100, [\%] \quad (2.3)$$

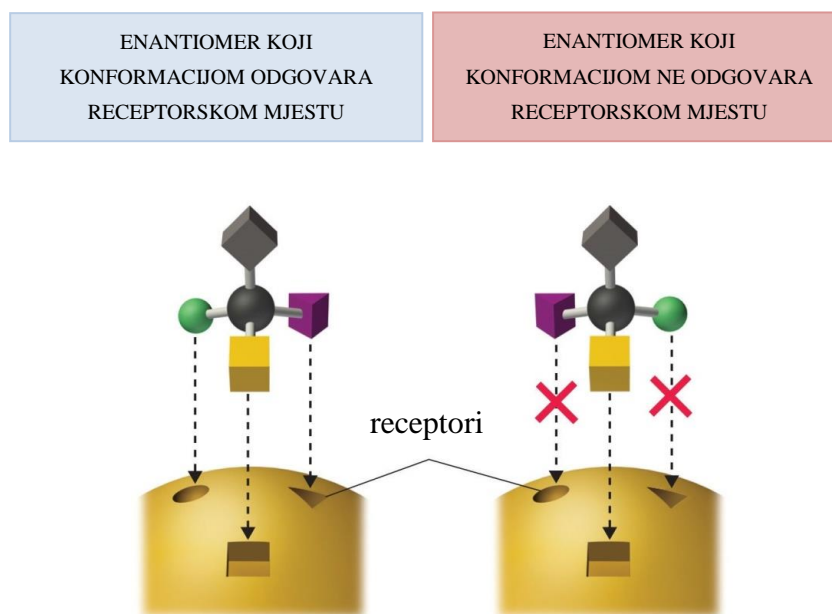
Tri su moguća ishoda mjerenja optičke aktivnosti spoja:

- i. enantiomerno čisti spoj – kiralni spoj koji zakreće ravninu polarizacije samo u jednom smjeru,
- ii. enantiomerno obogaćen spoj – kiralni spoj čiji enantiomerni omjer iznosi više od 50 : 50, a manje od 100 : 1,
- iii. racemična smjesa (racemat) – ekvimolarna smjesa obaju enantiomera jednog stereoizomera koja uslijed anulirajućeg učinka ne pokazuje optičku aktivnost.

2.2.2. Optički čiste tvari u farmaceutskoj industriji

Kiralnost je vrlo česta pojava u spojevima koje sadrže živi organizmi, poput aminokiselina, nukleinskih kiselina, proteina, šećera i hormona. Približno 50 % lijekova na tržištu je kiralno, a svega 25 % je dostupno u enantiomerno čistom obliku, pri čemu samo jedna konformacija uzrokuje željeni učinak (slika 2.7) dok je druga inaktivna ili u najboljem slučaju slabo aktivna (Solomons et al., 2013). Enantiomerno čisti lijekovi imaju bolja terapijska svojstva zbog sniženja doze, smanjenja varijabilnosti u metabolizmu lijeka, jednostavnijeg odnosa doza-odgovor te poboljšanja tolerantnosti, stoga je uvođenje kiralnih lijekova sve važnije u medicinskoj praksi (Šinko, 2005). U nekim slučajevima drugi enantiomer aktivne tvari čak uzrokuje ozbiljne nuspojave ili je toksičan. Radi toga optički čiste tvari su vrijedni prekursori u farmaceutskoj industriji i industriji finih kemikalija. Klasične organske sinteze često se provode u ekstremnim reakcijskim uvjetima koji, osim što zahtijevaju visoke sigurnosne mjere, također mogu dovesti do neželjenih sporednih reakcija. Biokataliza je naročito važna s industrijskog gledišta u proizvodnji

aktivnih farmaceutskih tvari (engl. *active pharmaceutical ingredient* – API) jer je u mogućnosti zadovoljiti ekstremno visoke zahtjeve u vidu regio-, stereo- i enantioselektivnosti lijekova (Patel, 2018).



SLIKA 2.7. Enantioselektivnost receptora u živim organizmima

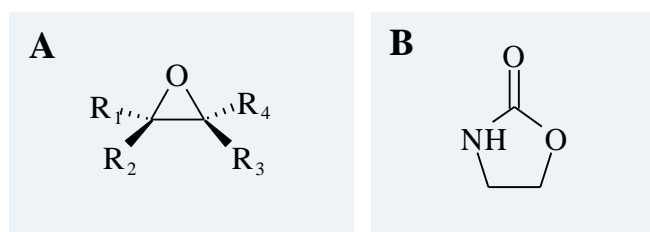
2.2.2.1. Epoksidi

Epoksidi (oksidani) su ciklički eteri koji u tročlanom prstenu sadrže kisikov atom (slika 2.8-A). Sadrže djelomično pozitivno nabijene atome ugljika i bazični kisik, a napetost prstena i polarnost čini ih podložnima za reakcije s raznovrsnim reagensima; nukleofilima i elektrofilima te kiselinama i bazama (Nakano et al., 2007). Iako su sami rijetko lijekovi, *Becker Conceptus Pharmaceutical Intermediates Database* navodi mnogo epoksida kao intermedijere za dobivanje API-ja. U farmaceutskoj industriji epoksidi se smatraju vrijednim i multifunkcionalnim polaznim tvarima jer se zahvaljujući velikoj reaktivnosti lako mogu pretvarati u druge, stabilnije organske tvari (Janssen et al., 2008). Osim reaktivnosti, velika prednost epoksida je svojstvo kiralnosti. Monosupstituirani epoksidi mogu reagirati na stereocentru s inverzijom konfiguracije produkta ili na akiralnom centru uz zadržavanje konfiguracije, pri čemu je regioselektivnost otvaranja prstena određena kombinacijom kemijske reaktivnosti, koja se temelji na elektronskim i steričkim faktorima, te selektivnosti enzima (Lutje Spelberg et al., 2012).

2.2.2.2. Oksazolidinoni

Obilno korištenje, propisivanje bez adekvatne indikacije i nepravilno zbrinjavanje antibiotika dovelo je do alarmantnog porasta u broju vrsta bakterija rezistentnih na nekada učinkovite antibiotike. Zdravstvena zaštita zahtijeva neprestana ulaganja i napretke u istraživanju i razvoju inovativnih lijekova. Oksazolidinoni su spojevi koji sadrže peteročlani heterociklički prsten 2-oksazolidon u svojoj strukturi (slika 2.8-B) i pokazuju potencijalna ljekovita svojstva s preferencijalnim antibakterijskim djelovanjem. Oksazolidinoni pripadaju novoj vrsti sintetičkih antimikrobnih agensa koji imaju jedinstvenu strukturu i dobru aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija poput meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* (MRSA), penicilin rezistentnog *Streptococci* sp. i vankomicin rezistentnog *Enterococci* sp. Oksazolidinoni selektivno inhibiraju sintezu bakterijskih proteina jer se vežu na mjesta na bakterijskom ribosomu i sprječavaju stvaranje funkcionalnog 70S kompleksa u fazi inicijacije stadija translacije (Singla et al., 2012). Tržišne formulacije oksazolidinona dolaze u formi tableta i intravenoznih terapija, kao npr. Linezolid 600 mg (Pliva Hrvatska d.o.o.), prvi komercijalno dostupni oksazolidinon koji služi za liječenje upale pluća uzorkovane gram-pozitivnim bakterijama (<http://www.halmed.hr>).

Klasične metode sinteze oksazolidinona uključuju velik broj reakcijskih stupnjeva (npr. reakcijom anilina i glicidola nastaje amino-diol koji podliježe kiralnoj rezoluciji (*R*)-mandelinskom kiselinom, a zatim slijede tosilacija alkohola, zamjena azida, redukcija i acilacija amina), korištenje štetnih kemikalija (npr. jodokarmabacija dodatkom piridina), teške reakcijske uvjete (npr. visokotemperaturna ciklizacija uz refluks katalizatora otopljenog u ksilenu), skupe katalizatore (npr. premještanje skupina unutar propagilnih *tert*-butilkarbamata katalizirano zlatom) i slično (Singla et al., 2012). Iz tog razloga biokatalitička sinteza oksazolidinona predstavlja ekonomski i ekološki isplativu alternativu.



SLIKA 2.8. Općenita strukturalna formula **A.** epoksida i **B.** 2-oksazolidinona

2.2.3. Dobivanje optički čistih tvari

Optički čiste tvari mogu se pripremiti separacijskim i asimetričnim sintetskim metodama. Separacijske metode odnose se na razdvajanja enantiomera iz racemične smjese i temelje se na činjenici da kiralne molekule u kiralnom okruženju pokazuju različita svojstva. Među separacijske metode spadaju kokristalizacija s enantiomerno čistim reagensima, preparativna kromatografija s kiralnim nepokretnim fazama i kinetička rezolucija. Uz često vrlo visoku cijenu separacijskih metoda, njihov glavni nedostatak je iskorištenje koje u idealnom slučaju iznosi 50 %. Suprotno tome, u asimetričnim sintetskim metodama primjenjuju se stereoselektivni katalizatori koji reagiraju s jednim od enantiomera supstrata pa je pomoću njih teoretski moguće dobiti iskorištenje od 100 % (Šinko, 2005 ; Mikleušević, 2016).

2.2.3.1. Dinamička kinetička rezolucija

Kinetička rezolucija kao metoda separacije zasniva se na bržem reagiranju jednog enantiomera od drugog dajući enantiomerno obogaćen produkt. Produkt i neizreagirani enantiomer supstrata imaju različita fizikalna svojstva na temelju kojih je njihovo odvajanje pojednostavljeno. Kako bi se doskočilo problemu polovičnog iskorištenja kinetičke rezolucije, razvijena je metoda dinamičke kinetičke rezolucije (DKR). DKR predstavlja kombinaciju kinetičke rezolucije s *in situ* racemizacijom sporije reagirajućeg enantiomera polaznog supstrata pri čemu je moguće teoretsko iskorištenje od 100 %. Uvjeti za uspješnu DKR su enantioselektivnost glavne reakcije, velika brzina reakcije racemizacije, kompatibilnost obaju reakcija s aspekta reakcijskih uvjeta te inertnost katalizatora prema produktu kako bi se izbjegle slijedne reakcije (Mikleušević, 2016).

2.3. Modeliranje biotransformacija

Iako su biokatalitički procesi slični konvencionalnim kemijskim procesima, pri provedbi procesa nužno je uzeti u obzir enzimsku kinetiku i operacijsku stabilnost enzima. Izrada matematičkog modela procesa ključan je korak pri ispitivanju novog sustava, jer se njegovom primjenom mogu odrediti optimalni radni uvjeti i mikrookoliš za biokatalizatore s ciljem konačnog optimiranja produktivnosti. Strategija razvoja modela za enzimске reakcije može se podijeliti na pet koraka:

- i. karakterizacija biokatalizatora u ovisnosti o pH vrijednosti, T i supstratu u koncentracijama relevantnim za industrijsku skalu te određivanje mehanizma enzimske reakcije,
- ii. prikupljanje eksperimentalnih podataka metodom početnih reakcijskih brzina i ispitivanjem utjecaja svih spojeva reakcijskog medija na brzinu reakcije,
- iii. procjena kinetičkih parametara nelinearnom regresijskom analizom,
- iv. validacija modela u kotlastom reaktoru (KR) pri različitim koncentracijama biokatalizatora i supstrata,
- v. upotreba modela, tj. provedba reakcija u različitim tipovima reaktora, optimizacija koncentracija enzima i supstrata te izrada simulacija produktivnosti procesa u ovisnosti o prostoru i vremenu.

Matematički model enzimske reakcije sastoji se od kinetičkog modela te reaktorskog modela. Kinetički modeli opisuju ovisnost brzine enzimske reakcije o reakcijskim veličinama stanja i parametrima, a reaktorski modeli sastoje se od bilanca tvari koje ovise o tipu reaktora (Vasić-Rački et al., 2011). Po razvoju modela slijedi njegova validacija odnosno utvrđivanje valjanosti. Validacija modela se definira kao dokaz da računalni model unutar svoje domene primjenjivosti posjeduje zadovoljavajući raspon točnosti (Sargent, 2005).

2.3.1. Kinetički modeli enzimskih reakcija

Jednosupstratna enzimska kinetika (2.4) naziva se Michalis-Menteničina kinetika prema njezinim predlagачima, pri čemu r_S [mmol dm³ min⁻¹] predstavlja brzinu enzimske reakcije, c_S [mmol dm⁻³] koncentraciju supstrata, V_m [mmol dm³ min⁻¹] maksimalnu brzinu enzimske reakcije i K_m [mmol dm⁻³] Michaelisovu konstantu.

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_m + c_S} \quad (2.4)$$

Također se naziva i kinetika zasićenja jer su Michaelis i Menten pretpostavili da enzim posjeduje fiksni broj aktivnih mjesta koja u slučaju visokih koncentracija supstrata budu zasićena. Kinetika zasićenja supstratom može se prikazati jednostavnom reakcijskom shemom (2.5) koja uključuje reverzibilnu reakciju formacije enzim-supstrat kompleksa te oslobađanje produkta i nepromijenjenog enzima disocijacijom kompleksa:



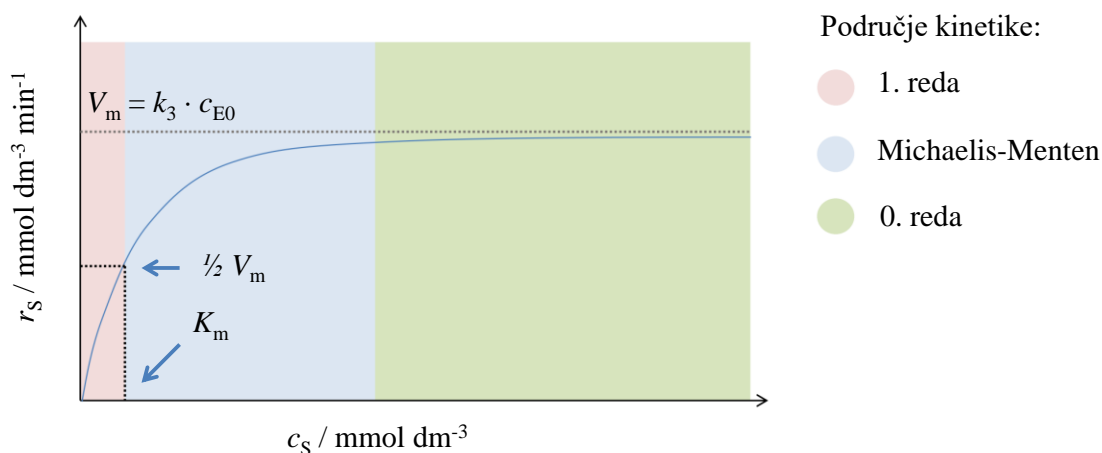
Parametri Michaelis-Menteničine kinetike matematički se definiraju prema jednadžbama 2.6 i 2.7:

$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad (2.6)$$

$$K_m = \frac{k_1 + k_3}{k_2} \quad (2.7),$$

pri čemu c_{E0} [mg mL^{-1}] predstavlja početnu koncentraciju enzima, a k_1 , k_2 i k_3 konstante iz reakcijske sheme 2.5. Maksimalna brzina enzimske reakcije odgovara onim koncentracijama supstrata pri kojima dolazi do zasićenja svih aktivnih mjesta enzima. Michaelisova konstanta numerički izražava afinitet enzima prema supstratu i što je niža, afinitet je veći. Definira se kao koncentracija supstrata kod koje je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine (slika 2.9), a ovisi o supstratu te o okolišnim odnosno procesnim uvjetima poput pH vrijednosti i temperature (Roskoski, 2007a).

Hiperbolična ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata prikazana je slikom 2.9 i može se podijeliti na tri područja. Pri niskim koncentracijama supstrata, gdje vrijedi da je $c_S \ll K_m$, brzina reakcije proporcionalno raste porastom koncentracije supstrata stoga se područje naziva područjem kinetike 1. reda. Drugo područje hiperbolične ovisnosti je Michaelis-Menteničina ovisnost. U trećem području, kada je $K_m \ll c_S$, brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata stoga se područje naziva područjem kinetike 0. reda (Hegyi et al., 2013).



SLIKA 2.9. Grafički prikaz Michaelis-Menteničine kinetike

Michaelis-Menteničina kinetika primjenjiva je i u sustavima s dva supstrata kada jednadžba poprima oblik:

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) \cdot (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (2.8)$$

Neke molekule male molekulske mase u enzimskoj reakciji mogu se ponašati kao inhibitori jer se vežu na enzim i smanjuju ili blokiraju katalitičko djelovanje. Njihov učinak može biti reverzibilan, pri čemu inhibitori mogu naknadno disocirati, ili ireverzibilan odnosno trajan, pri čemu inhibitor i enzim formiraju stabilan kompleks. Inhibitori mogu modificirati jednu aminokiselinu ili nekoliko sporednih lanaca koji su potrebni za katalitičku aktivnost.

Kompetitivna inhibicija odnosi se na slučaj kad je molekula inhibitora strukturno analogna supstratu i konkurira mu za vezanje za aktivno mjesto. Kompetitivni inhibitori smanjuju broj molekula enzima dostupnih supstratu, stoga se pojava očituje smanjenjem brzine reakcije koje je osobito istaknuto pri niskim koncentracijama supstrata. Nekompetitivna inhibicija odnosi se na inhibitore koji se vežu na bilo koji dio enzima i mijenjaju njegovu prostornu konformaciju. Nakon promjene oblika enzim nije u mogućnosti katalizirati reakciju stoga nekompetitivna inhibicija smanjuje broj dostupnih i funkcionalnih molekula enzima (Sharma, 2012). Antikompetitivna inhibicija mješavina je kompetitivne i nekompetitivne inhibicije. Michaelis-Menteničini izrazi za kompetitivnu, nekompetitivnu i antikompetitivnu inhibiciju dani su jednadžbama 2.9 – 2.11, pri čemu c_i [mmol dm⁻³] predstavlja koncentraciju inhibitora, a K_i [mmol dm⁻³] konstantu inhibicije.

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

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

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{(K_m + c_S) \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.11)$$

Inhibicija supstratom je učestalo odstupanje od Michaelis-Menteničine kinetike pri povišenim koncentracijama supstrata i široko je rasprostranjen fenomen u enzimskoj kinetici jer često igra ekstremno važnu ulogu u metaboličkim putovima živih organizama (Yoshino et al., 2015).

Osim poznavanja potencijalnih inhibicija, prilikom procjene kinetike reakcije potrebno je poznavati enzimsku operacijsku stabilnost jer utječe na volumnu produktivnost s vremenom u reaktoru. Stabilnost ovisi o očuvanju aktivne enzimske konformacije, a izražava se kao vrijeme poluživota, $t_{1/2}$ [min⁻¹], tj. vrijeme potrebno da se enzimska aktivnost snizi na polovinu svoje početne vrijednosti. Vrijednost konstante deaktivacije k_d [min⁻¹] može se izračunati prema izrazu 2.12 i uvrstiti u Michaelis-Menteničinu kinetiku prema izrazu 2.13., pod uvjetom da se kinetika deaktivacije može opisati modelom 1. reda (Findrik, 2013).

$$k_d = -\frac{\ln 0,5}{t_{1/2}} \quad (2.12)$$

$$\frac{dV_m}{dt} = -k_d \cdot V_m \quad \rightarrow \quad V_m = V_{m0} \cdot e^{-k_d \cdot t} \quad (2.13.)$$

2.3.2. Model kotlastog reaktora

Osnovne izvedbe reaktorskih modela su KR, protočno-kotlasti reaktor i cijevni reaktor. Za postavljanje jednostavnih matematičkih zakonitosti koje opisuju promjenu tvari u KR uvode se sljedeće pretpostavke:

- i.* KR je zatvoreni sustav, što pretpostavlja da za vrijeme reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom i da je volumen reakcijske smjese konstantan, te
- ii.* idealno miješanje pretpostavlja da su sastav reakcijske smjese i temperatura u svakoj točki volumena isti.

Idealno miješanje (pretpostavka *ii.*) također nalaže izotermnost rada tj. da je toplina dovedena u reaktor jednaka odvedenoj (uključujući i reakcijsku entalpiju) te nepostojanje difuzijskog prijenosa tvari i topline odnosno koncentracijskih i temperaturnih gradijenata.

Usljed provođenja vremenski ovisne reakcije u konstantnom volumenu dolazi do promjena veličina stanja stoga je KR uvijek u nestacionarnom radu. Promjena koncentracije u KR s vremenom može se opisati diferencijalnom jednadžbom 2.14 (Gomzi, 2009):

$$r_s = -\frac{dc_s}{dt} \quad (2.14)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Reakcijski sustav

Reakcije su provođene u sustavu prikazanom na slici 3.1. Reakcijski sustav sastojao se od KR, magnetske miješalice Rotamix 550 MMH (Tehtnica, Slovenija) i magneta za postizanje homogenih uvjeta te igle i šprice za uzorkovanje reakcijske smjese.



SLIKA 3.1. Reakcijski sustav

3.1.2. Plinski kromatograf

GC je analitička metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka. Uzorak se kvalitativno analizira prema vremenu zadržavanja (engl. *retention time* – t_R) koje se definira kao vrijeme koje razlučeni sastojak provede u kromatografskom sustavu i specifično je za pojedinačne komponente. Uzorak se kvantitativno analizira prema intenzitetu odziva, odnosno integracijom površine ispod krivulje. U GC analizi uzorak se injektira u struju plina nosioca koji je inertan prema uzorku i stacionarnoj fazi (najčešće He, Ar ili N_2). Uzorak je nošen strujom plina kroz stacionarnu fazu gdje dolazi do razdvajanja i različitog zadržavanja komponenata uzorka na temelju specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija. Najčešći i gotovo univerzalni detektor u GC kromatografima je

plameno ionizacijski detektor (engl. *flame ionization detector* – FID). Izgaranjem organskih tvari u smjesi H₂/zrak nastaje plamen bogat elektronima i ionima. Kada se na plamen primijeni mali napon, potječe mjerljiva struja koja daje koristan analitički signal (Harvey, 1996). U ovom radu uzorci su analizirani na uređaju GC-2014 (Shimadzu, Japan) prikazanom na slici 3.2.



SLIKA 3.2. GC sustav: 1 – generator vodika, 2 – sustav za automatsko injektiranje, 3 – plinski kromatograf, 4 – PC

3.1.3. Spektrofotometar

Spektrofotometrijska analiza služi za određivanje koncentracije tvari u uzorku indirektnim mjerenjem količine apsorbirane svjetlosti određene valne duljine i zasniva se na Lambert-Beerovom zakonu. Svjetlost se iz izvora širi i kroz pukotinu usmjerava na monokromator čime se dobiva svjetlost točno određene valne duljine. Zraka se potom usmjerava na kvarcnu kivetu punjenu uzorkom koji apsorbira dio svjetlosti, a izlazna zraka smanjenog intenziteta usmjerava se na detektor koji očitava signal (Harvey, 1996). U ovom radu određivanje koncentracije i aktivnosti enzima provedeno je pomoću UV-1601 i UV-1800 spektrofotometara (Shimadzu, Japan).

3.1.4. Ostala aparatura

Uzorci su odvagani na analitičkoj vagi AUW120 (Shimadzu, Japan).

Podšavanje pH vrijednosti otopine pufera provedeno je pH-metrom Lab 860 (Schott Instruments, Njemačka). Prethodno je provedena kalibracija pH-metra pomoću tehničkih puferskih otopina pH vrijednosti 4,01 i 7,00 (Mettler Toledo, Švicarska).

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

Odvajanje enzima od reakcijske smjese provedeno je u centrifugi Multifuge 3 (S)-R (Heareus, Njemačka).

Uparivanje uzoraka provedeno je na rotacionom vakuurom uparivaču RE 111 (Büchi, Švicarska).

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Analiza uzoraka plinskom kromatografijom

U ovom radu uzorci su analizirani na uređaju GC-2014 (Shimadzu, Japan). Pri analizi uzoraka plinskom kromatografijom uzorak se unosio pomoću sustava za automatsko injektiranje AOC-20i (Shimadzu, Japan) pri sljedećim uvjetima: $T_{\text{injektor}} = 250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 39,4 \text{ kPa}$ te protok $14,8 \text{ mL min}^{-1}$. Mobilna faza bio je He iz spremnika (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska). Stacionarne faze bile su akiralna kolona HP-5 (Agilent Technologies, SAD) i kiralna kolona Alpha DEXTM 120 (Supelco Inc, SAD). Osnovne karakteristike kolona preuzete od proizvođača dane su u tablici 3.1. Uređaj sadrži FID gdje su pri detekciji ($T_{\text{detektor}} = 300 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 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).

Uzorci za GC analizu pripremljeni su na sljedeći način. Alikvot od $10 \text{ }\mu\text{L}$ uzorka prebačen je automatskom pipetom u prethodno pripremljenu epruvetu s $500 \text{ }\mu\text{L}$ smjese metil *terc*-butil etera (MTBE) i unutarnjeg standarda mesitilena. Tako pripremljen uzorak miješan je 20 s na miješalici kako bi došlo do ekstrakcije uzorka u MTBE pri čemu nastaju dva međusobno nemješljiva, ali golim okom nevidljiva sloja. Gornji organski sloj je prebačen u kapalicu punjenu slojem natrijevog sulfata. Uzorak je osušen potiskivanjem kroz kapalicu u vijalicu za GC analizu. Ovako pripremljeni uzorci čuvani su na ledu do neposredno prije analize. Uzorci su analizirani na kiralnoj i akiralnoj koloni, a uvjeti provedbe analiza te komponente uz pripadajuća vremena zadržavanja dane su u tablicama 3.2 i 3.3.

TABLICA 3.1. Stacionarne faze

	HP-5	Alpha DEX™ 120
LITERATURNI IZVOR	https://www.agilent.com	https://www.sigmaaldrich.com
TIP KOLONE	akiralna	kiralna
MATERIJAL	(5%-fenil)-metilpolisiloksan	kvarcno staklo
DULJINA, m	30	30
PROMJER, mm	0,32	0,25
DEBLJINA FILMA, µm	0,25	0,25
TEMPERATURNI OPERATIVNI RASPON, °C	- 60 – 325 (350)	30 – 230

TABLICA 3.2. GC metoda i vremena zadržavanja za HP-5 kolonu

METODA			
STUPANJ	PROMJENA, min ⁻¹	T, °C	VRIJEME ODRŽAVANJA T, min
I.	/	50	2
II.	15	200	0
VREMENA ZADRŽAVANJA			
KOMPONENTA		t _R , min	
Epoksid		3,7	
Mesitylen		5,4	
Dibromoalkohol		6,7	
Oksazolidinon		10,7	

TABLICA 3.3. GC metoda i vremena zadržavanja za Alpha DEX™ 120 kolonu

METODA			
STUPANJ	PROMJENA, min ⁻¹	T, °C	VRIJEME ODRŽAVANJA T, min
I.	/	70	10
II.	15	200	/
VREMENA ZADRŽAVANJA			
KOMPONENTA		t _R , min	
(R)-epoksid		7,3	
(S)-epoksid		7,6	
Mesitylen		11,7	

3.2.2. Spektrofotometrijska karakterizacija enzima

3.2.2.1. Određivanje koncentracije enzima metodom po Bradfordu

Određivanje koncentracije proteina u uzorku HheC enzima metodom po Bradfordu provedeno je korištenjem UV-1601 spektrofotometra (Shimadzu, Japan) pri $\lambda = 595$ nm. Vrijednosti apsorbancija (A) očitane su direktno na zaslonu uređaja.

Metoda po Bradfordu zasniva se na vezanju proteina hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama za boju Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. Dolazi do stabilizacije boje u anionskom obliku te posljedično vidljive promjene iz smeđe ($\lambda_{\max} = 465$ nm) u plavu boju ($\lambda_{\max} = 595$ nm). Metoda se široko primjenjuje zbog jednostavnosti, brzine i širokog opsega proporcionalnosti intenziteta obojenja i koncentracije proteina.

Razrjeđenjem standardne otopine albumina goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin* – BSA) pripremljene su standardne otopine koncentracija $1 \mu\text{g cm}^{-3}$; $2,5 \mu\text{g cm}^{-3}$; $5 \mu\text{g cm}^{-3}$; $7,5 \mu\text{g cm}^{-3}$ i $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ za izradu baždarnog pravca ovisnosti apsorbancije o koncentraciji proteina.

Reagens za određivanje proteina pripremljen je miješanjem 100 mg boje CBB s 50 cm^3 etanola, 100 cm^3 85 %-tne otopine fosforne kiseline i 850 cm^3 ultračiste vode. Reagens je korišten za određivanje apsorpcijskog maksimuma za koji je potvrđeno da se javlja pri valnoj duljini od 595 nm.

Enzim je razrijeđen 2000 puta kako bi apsorbancija razrijeđenog uzorka bila unutar područja apsorbancije baždarnog pravca.

Postupak pripreme uzorka za mjerenje bio je isti za sve otopine proteina, tj. za standardne otopine BSA i enzim HheC, a za svaku otopinu načinjene su tri paralelne probe. Alikvot od $0,8 \text{ cm}^3$ uzorka proteina pomiješan je s $0,2 \text{ cm}^3$ reagensa pri čemu je nastalo plavo obojenje (slika 3.3). Uzorak je 5 s miješan na miješalici te ostavljen da inkubira pri sobnoj temperaturi 5 min, a potom je očitana apsorbancija uzorka.

Iz poznatih koncentracija i pripadajućih izmjerenih apsorbancija standardnih otopina BSA konstruiran je baždarni pravac opisan jednadžbom $A = f(c)$ (prilog 1). Mjerenjem apsorbancije neposredno je dobiven podatak o koncentraciji HheC.

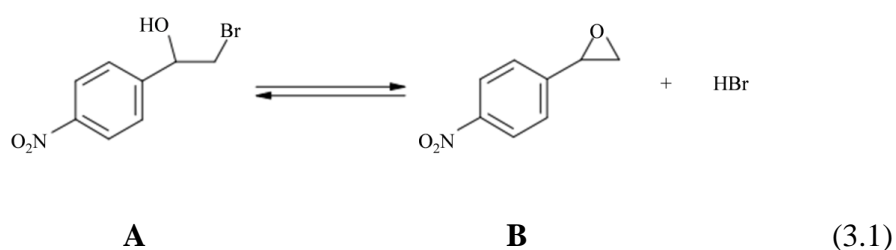


SLIKA 3.3. Određivanje koncentracije proteina spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu

3.2.2.2. Određivanje aktivnosti enzima testom kromogenog supstrata

Određivanje aktivnosti HheC enzima provedeno je testom kromogenog supstrata pomoću 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanol (PNSHH) uz korištenje UV-1800 spektrofotometra (Shimadzu, Japan) pri $\lambda = 310$ nm. Podaci su obrađivani uz programsku podršku UV Probe (Shimadzu, Japan) na osobnom računalu.

Test se zasniva na razlici u apsorbanciji pri $\lambda = 310$ nm između halohidrina (A) i epoksida (B) te se može prikazati jednadžbom 3.1:



Test je proveden prema protokolu opisanom u (Schallmey et al., 2008) uz prilagodbe koncentracija navedene u nastavku.

Pripravljena je temeljna otopina (TO) racemične smjese PNSHH u dimetil sulfoksidu (DMSO) 20 mM koncentracije. Tako pripravljena TO skladištena je u hladnjaku na temperaturi +4 °C i korištena po potrebi.

Otopina supstrata pripravljena je u kvarcnoj kiveti dodavanjem 10 μL TO PNSHH u TriS-SO₄ pufer i intenzivnim miješanjem na miješalici, kako bi DMSO ostao dispergirani

u otopini. Vodena otopina supstrata nije stabilna stoga je pripravljena neposredno prije korištenja.

Reakcija je pokrenuta dodavanjem HheC te je od nultog trenutka praćena spektrofotometrijski. Debljina kvarcne kivete bila je 1 cm. U različitim ispitivanjima korišteni su različiti volumeni enzima, kako bi promjena apsorbancije uvijek bila u rasponu $0,02 - 0,2 \text{ min}^{-1}$, te različiti volumeni pufera, kako bi ukupni volumen u kivetu uvijek bio 1 mL. Pregledniji prikaz navedenog dan je u tablici 3.4.

TABLICA 3.4. Sastav kvarcne kivete ($d = 1 \text{ cm}$) pri provedbi PNSHH testa

V_r , mL	$V_{\text{TO PNSHH}}$, μL	V_{HheC} , μL	$V_{\text{Tris-SO}_4}$, mL
1	10	X ($5 < X < 15$)	$990 - X$

Volumna aktivnost enzima izračunata je iz promjene apsorbancije prema jednadžbi 3.2:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon d V_E} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3.2),$$

gdje su:

$V.A.$ – volumna aktivnost [U mL^{-1}],

U – jedinica enzimске aktivnosti,

V_r – volumen uzorka u kivetu [mL],

ε – ekstinkcijski koeficijent [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$],

d – širina kivete [cm],

V_E – volumen enzima [mL],

$\Delta A/\Delta t$ – promjena apsorbancije u vremenu [min^{-1}].

Ekstinkcijski koeficijent epoksida iznosi $4,289 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Specifična aktivnost enzima izračunata je prema jednadžbi 3.3:

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma} \quad (3.3)$$

gdje su:

$S.A.$ – specifična aktivnost [U mg^{-1}],

γ – masena koncentracija [mg dm^{-3}].

3.3. Priprava kemikalija

3.3.1. Popis kemikalija

Za potrebe provođenja eksperimenata u ovom radu korištene su kemikalije dane u tablicama 3.5 i 3.6. Uz komercijalno dostupne kemikalije naveden je proizvođač. Uz komercijalno nedostupne kemikalije navedeno je poglavlje u kojem je opisana sinteza, ako je sinteza provedena u sklopu ovog rada, ili literaturni izvor protokola, ako je već sintetizirana kemikalija preuzeta u Zavodu za organsku kemiju Instituta „Ruđer Bošković“ (IRB).

TABLICA 3.5. Komercijalno dostupne kemikalije korištene u radu

PUNI NAZIV KEMIKALIJE	POKRATA ILI KEMIJSKI SIMBOL	PROIZVOĐAČ
2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer	Tris-SO ₄	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Albumin goveđeg seruma	BSA	Honeywell Fluka, SAD
Coomassie Brilliant Blue G-250	CBB	Honeywell Fluka, SAD
Diklorometan	DCM	Carlo Erba Reagents, Italija
Dimetil sulfoksid	DMSO	Kemika d.d., Hrvatska
Etanol	EtOH	Kemika d.d., Hrvatska
Etil-acetat	EtOAc	Carlo Erba Reagents, Italija
Fosforna kiselina	H ₃ PO ₄	Kemika d.d., Hrvatska
Mesitilen	/	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Metil- <i>tert</i> -butil-eter	MTBE	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
<i>m</i> -klorperbenzojeva kiselina	/	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Natrijev bromid	NaBr	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Natrijev cijanat	NaOCN	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Natrijev hidrogenkarbonat	NaHCO ₃	Kemika d.d., Hrvatska
Natrijev metabisulfit	Na ₂ S ₂ O ₅	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Natrijev sulfat	Na ₂ SO ₄	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Sumporna kiselina	H ₂ SO ₄	Kemika d.d., Hrvatska

Tris-SO₄ pufer pripremljen je otapanjem čvrstog uzorka u ultračistoj vodi i podešavanjem pH vrijednosti na 7,5 razrijeđenom otopinom sumporne kiseline.

TO natrijevog cijanata i natrijevog bromida 1000 mM koncentracije pripravljene su otapanjem čvrstih uzoraka (Sigma-Aldrich Corporation, SAD) u ultračistoj vodi. Ovako

pripravljene TO skladištene su u hladnjaku na temperaturi +4 °C i vađene neposredno prije korištenja.

TABLICA 3.5. Komercijalno nedostupne kemikalije korištene u radu

PUNI NAZIV KEMIKALIJE	POKRATA ILI OZNAKA U RADU	LITERATURNI IZVOR PROTOKOLA ZA SINTEZU ILI POGLAVLJE U KOJEM JE PROTOKOL OPISAN
1-(<i>p</i> -nitrofenil)-2-bromoetanola	PNSHH	Lutje Spelberg et al., 2012a
1,3-dibromo-2-metil-2-propanol	dibromoalkohol	Sharghi et. al, 2003
2-bromometil-2-metil-oksiran	Racemat	<i>rac</i> -epoksid
	(<i>R</i>)-enantiomer	(<i>R</i>)-epoksid
	(<i>S</i>)-enantiomer	(<i>S</i>)-epoksid
5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on	oksazolidinon	3.3.3.
C tip halogenhidrin dehalogenaze	HheC	Schallmey et al., 2008

Sirovi enzimski ekstrakt HheC skladišten je u zamrzivaču pri temperaturi – 20 °C i odmrzavan neposredno prije korištenja.

TO epoksida, alkohola i oksazolidinona 1000 mM koncentracije pripravljene su miješanjem odvaga kapljevito uzorka sa smjesom pufera TriS-SO₄ i DMSO ($\varphi = 3\%$). Ovako pripravljene TO skladištene su u hladnjaku na temperaturi +4 °C i vađene neposredno prije korištenja.

3.3.2. Priprava *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana

2-bromometil-2-metil-oksiran nije komercijalno dostupan, stoga je sintetiziran iz prekursora 2-brom-2-metilpropena (Sigma-Aldrich Corporation, SAD) prema postupku opisanom u nastavku. U Erlenmeyerovoj tikvici pripravljena je otopina *m*-klorperbenzojeve kiseline otapanjem 11,6 g čvrstog uzorka ($w = 77\%$) u 150 mL diklormetana. Voda iz otopine uklonjena je u lijevku za odjeljivanje. Otopina je prebačena u tikvicu s okruglim dnom te joj je dodano 6,7 g 2-brom-2-metilpropena. Reakcijska smjesa zaštićena je od svjetla i miješana na magnetskoj miješalici 24 h pri sobnoj temperaturi. Potom je filtrirana preko naboranog filtarskog papira. Filtratu je dodano 110 mL otopine Na₂S₂O₅ ($w = 10\%$) te je miješan 20 min na magnetskoj miješalici. Vodeni sloj je uklonjen u lijevku za odjeljivanje. Organskom sloju dodano je 120 mL zasićene otopine NaHCO₃ te je miješan na opisani način 10 min. Potom su vodeni i

organski sloj ponovno odvojeni u lijevku za odjeljivanje. Organski sloj dodatno je osušen pomoću Na_2SO_4 i potom filtriran. Filtrat je pažljivo uparen pri 40 kPa te je kao produkt dobiveno 4,7 g racemične smjese epoksida čistoće $w = 98\%$ u obliku žućkaste, prozirne kapljevine.

3.3.3. Priprava (*R*)-2-bromometil-2-metil-oksirana i (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona

U tikvicu s okruglim dnom odvagano je 2 g racemične smjese epoksida, jedan molarni ekvivalent natrijevog cijanata ($m = 0,84$ g) te je dodano 60 mL pufera. Otopina je homogenizirana na magnetskoj miješalici, a po završetku otapanja uzorka NaOCN pokrenuta je reakcija dodatkom 3 mL enzima. Reakcijska smjesa uzorkovana je svakih 30 min, a napredovanje reakcije praćeno je GC analizom. U preliminarnim pokusima na kiralnoj koloni (prilog 2) utvrđeno je da se dodatkom enzima počinju trošiti oba enantiomera. Međutim, zahvaljujući enantioselektivnosti enzima (*S*)-enantiomer troši se znatno brže, te se pri ovim uvjetima do ukupne konverzije od otprilike 60 % potroši sav (*S*)-enantiomer. Iz tog razloga reakcija je zaustavljena pri 60 %-tnoj konverziji epoksida hlađenjem reakcijske smjese na 5 °C te konačno odvajanjem enzima od reakcijske smjese.

Odvajanje je provedeno centrifugiranjem reakcijske smjese u Amicon ultracentrifugalnim filtrima (Sigma-Aldrich Corporation, SAD) granične molekulske mase (engl. *molecular weight cut-off* – MWCO) 10 000 g mol^{-1} . MWCO se definira kao molekulska masa komponente koja je zadržana u količini većoj od 90 %. Budući da molarna masa HheC iznosi 27 954 g mol^{-1} (Janssen et al., 2001) i gotovo je tri puta veća od MWCO ultracentrifugalnih filtra, ovom metodom odvojen je sav enzim. Reakcijska smjesa je centrifugirana 45 min u uređaju Multifuge 3 (S)-R (Heareus, Njemačka) pri sobnoj temperaturi ($T = 27$ °C) i 5000 okr min^{-1} . Dobiveni filtrat (otopina (*R*)-epoksida i oksazolidinona u puferu) pažljivo je uparen do suha pri 20 kPa.

Odvajanje (*R*)-epoksida od nastalog oksazolidinona provedeno je pripremnom kromatografijom na stupcu. Smjesa je otopljena u diklormetanu (engl. *dichloromethane* – DCM), a otapanje je potpomognuto ultrazvučnom kupelji radi slabije topivosti oksazolidinona. Smjesa je propuštena kroz stupac silikagela. Uz kontinuirano dodavanje DCM, mobilne faze manje polarosti, sakupljane su frakcije od 10 mL čiji je sadržaj praćen GC analizom. (*R*)-epoksid eluira prvi uslijed manje polarosti. Po završetku eluiranja (*R*)-epoksida, polarnost mobilne faze modificirana je dodatkom etil-acetata

(EtOAc). Mobilna faza veće polarnosti (DCM:EtOAc = 1:1) dodavana je do završetka eluiranja oksazolidinona. Frakcije s epoksidom prebačene su u jednu, a frakcije s oksazolidinonom u drugu tikvicu. Sadržaj obaju tikvica pažljivo je uparen pri 20 kPa. Dobiveno je 0,67 g čistog (*R*)-epoksida. NMR analizom uzorka dobiven je podatak o čistoći uzorka ($w_{(R)\text{-epoksid}} = 0,98$). Enantiomerna čistoća uzorka (*R*)-epoksida određena je pomoću baždarnog pravca na kiralnoj koloni (prilog 3). Udio (*R*)-epoksida iznosio je $91,5 \pm 0,7 \%$, a enantiomerni suvišak izražen prema (*R*)-epoksidu iznosio je $83,0 \pm 1 \%$.

3.3.4. Ispitivanje stabilnosti kemikalija

Određivanju kinetike reakcije prethodila su ispitivanja stabilnosti kemikalija u reakcijskom mediju. Pregled ispitivanja i eksperimentalni uvjeti dani su u tablici 3.6.

Tablica 3.6. Eksperimentalni uvjeti ispitivanja stabilnosti supstrata

KEMIKALIJA	ISPITIVANJE STABILNOSTI	EKSPERIMENTALNI UVJETI
<i>rac</i> -epoksid	u puferском mediju	10 mM epoksid, pufer, $V_r = 2,5$ mL tijekom 60 min
	u prisutnosti bromidnog iona	10 mM epoksid, 10 mM NaBr, pufer, $V_r = 2,5$ mL tijekom 90 min
<i>R</i> -epoksid	u ultračistoj vodi	5 mM epoksid, ultračista voda, $V_r = 1$ mL tijekom 24 h
	u puferском mediju	5 mM epoksid, pufer, $V_r = 1$ mL tijekom 24 h
	uz HheC	100 mM epoksid, pufer, $V_r = 1$ mL tijekom 6 h
dibromoalkohol	u puferском mediju	8 mM alkohol, pufer, $V_r = 1$ mL tijekom 12 min
<i>S</i> -oksazolidinon	u puferском mediju	40 mM oksazolidinon, pufer, $V_r = 2,5$ mL tijekom 10,5 h

Promjene koncentracija supstrata praćene su GC analizom. Ispitivanju stabilnosti prethodila je izrada baždarnih pravca na:

- ∴ Alpha-DEX koloni za *rac*-epoksid u rasponu koncentracija 0 – 10 mM (prilog 3),
- ∴ HP-5 koloni za *rac*-epoksid u rasponu koncentracija 0 – 1 mM (prilog 4), dibromoalkohol 0 – 10 mM (prilog 5) te oksazolidinona 0 – 25 mM (prilog 6).

3.4. Eksperimenti određivanja kinetike dinamičke kinetičke rezolucije

Uvjeti provedbe reakcije pri određivanju kinetike dani su u tablici 3.7.

Tablica 3.7. Uvjeti provedbe reakcija određivanja kinetike i eksperimenata validacije modela

Temperatura*	$26,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$
Broj okretaja magnetske miješalice	$1000 \text{ okr min}^{-1}$
V_r^{**}	1 – 2,5 mL
Medij	Tris-SO ₄ pufer pH 7

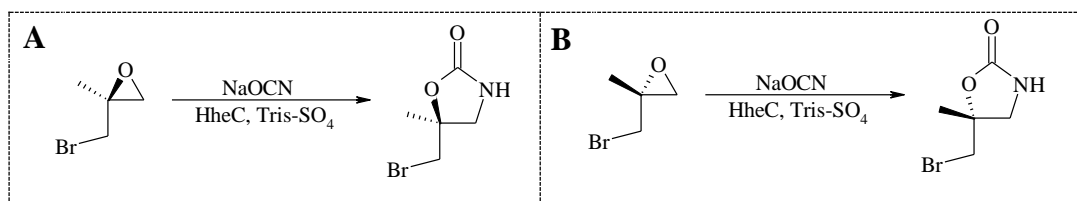
*sobna temperatura prikazana kao srednja vrijednost svih mjerenja $\pm \sigma$

**volumen reakcijske smjese odabran je kao optimum između minimalne potrošnje kemikalija i pridržavanja pravila o uzorkovanju maksimalno 10 % volumena reakcijske smjese

Određivanje kinetike reakcije provedeno je metodom početnih reakcijskih brzina, odnosno uzorkovanja su provedena u prvih 10 % konverzije supstrata, pri čemu je reakcijska smjesa uzorkovana minimalno 5 puta u pravilnim vremenskim intervalima. Uzorkovanje je provedeno iglom i špricom kroz čep sa septumom kako bi se gubitak uzoraka uslijed hlapljenja sveo na minimum.

3.4.1. Ispitivanje kinetike 1. stupnja reakcije

Prvi stupanj je reakcija 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona uz HheC enzim u TriS-SO₄ puferu pri čemu nastaje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on (slika 3.4). Određivanje kinetike provedeno je polazeći od čistih enantiomera (*S*)- i (*R*)-epoksida. Reakcija je praćena GC analizom preko koncentracije produkta oksazolidinona.



SLIKA 3.4. Shematski prikaz 1. stupnja DKR s **A.** (*S*)-epoksidom i **B.** (*R*)-epoksidom

Kinetika reakcije ispitana je s obzirom na supstrate epoksid i cijanatni ion, produkt oksazolidinon te bromidni ion koji je prisutnih u sustavu radi *ii.* stupnja DKR koji se simultano odvija. Ispitivanje utjecaja koncentracija pojedine komponente na kinetiku

reakcije provedeno je variranjem koncentracija komponente od odabrane minimalne prema odabranoj maksimalnoj vrijednosti uz držanje koncentracija ostalih komponenata konstantnima.

Sastav reakcijske smjese pri određivanju *i.* stupnja kinetike DKR s obzirom na (*S*)-epoksid dan je u tablicama 3.8. – 3.10. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije (*S*)-epoksida na početnu brzinu reakcije dan je u tablici 3.8., cijanata u tablici 3.9., a bromida u tablici 3.10. Sastav reakcijske smjese pri određivanju *i.* stupnja kinetike DKR s obzirom na (*R*)-epoksid dan je u tablicama 3.11. – 3.13. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije (*R*)-epoksida na početnu brzinu reakcije dan je u tablici 3.11., cijanata u tablici 3.12., a bromida u tablici 3.13. Utjecaj koncentracije produkta oksazolidinona na početnu brzinu reakcije ispitan je u pokusima s *rac*-epoksidom. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja oksazolidinona dan je u tablici 3.14.

TABLICA 3.8. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije (*S*)-epoksida na početnu brzinu reakcije u *i.* stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>S</i>)-epoksid	1000	X (1 < X < 250)
NaOCN	1000	75
HheC	-	4
TriS-SO ₄	500	$V_r - (79 + X)$

TABLICA 3.9. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije cijanatnih iona na početnu brzinu reakcije u reakciji sa (*S*)-epoksidom u *i.* stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>S</i>)-epoksid	1000	100
NaOCN	1000	X (2,5 < X < 250)
HheC	-	4
TriS-SO ₄	500	$V_r - (104 + X)$

TABLICA 3.10. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije bromidnih iona na početnu brzinu reakcije u reakciji sa (*S*)-epoksidom u *i.* stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>S</i>)-epoksid	1000	5
NaOCN	1000	25
NaBr	100	X (5 < X < 50)
HheC	-	4
TriS-SO ₄	500	$V_r - (34 + X)$

TABLICA 3.11. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije (*R*)-epoksida na početnu brzinu reakcije u *i*. stupnju DKR ($V_r = 1$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>R</i>)-epoksid	1000	X (1 < X < 500)
NaOCN	1000	150
HheC	-	4
TriS-SO ₄	500	$V_r - (154 + X)$

TABLICA 3.12. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije cijanatnih iona na početnu brzinu reakcije u reakciji s (*R*)-epoksidom u *i*. stupnju DKR ($V_r = 1$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>R</i>)-epoksid	1000	10
NaOCN	1000	X (5 < X < 500)
HheC	-	4
TriS-SO ₄	500	$V_r - (14 + X)$

TABLICA 3.13. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije bromidnih iona na početnu brzinu reakcije u reakciji s (*R*)-epoksidom u *i*. stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

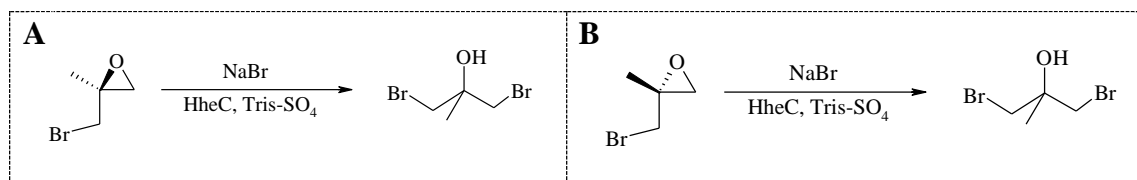
TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>R</i>)-epoksid	1000	5
NaOCN	1000	25
NaBr	100	X (5 < X < 100)
HheC	-	4
TriS-SO ₄	500	$V_r - (34 + X)$

TABLICA 3.14. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije oksazolidinona na početnu brzinu reakcije u *i*. stupnju DKR ($V_r = 2,5$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
<i>Rac</i> -epoksid	2500	100
NaOCN	1000	375
HheC	-	100
Oksazolidinon	300	X (250 < X < 750)
TriS-SO ₄	500	$V_r - (575 + X)$

3.4.2. Ispitivanje kinetike 2. stupnja reakcije

Drugi stupanj je reakcija između 2-bromometil-2-metil-oksirana i bromidnog iona uz HheC enzim u Tris-SO₄ puferu pri čemu nastaje 1,3-dibromo-2-metil-2-propanol (slika 3.5). Ispitivanje kinetike provedeno je polazeći od čistih enantiomera (*S*)- i (*R*)-epoksida. Reakcija je praćena GC analizom preko koncentracije supstrata epoksida.



SLIKA 3.5. Shematski prikaz 2. stupnja DKR s **A.** (*S*)-epoksidom i **B.** (*R*)-epoksidom

Kinetika reakcije ispitana je s obzirom na supstrate epoksid i bromidni ion te cijanatni ion koji je prisutnih u sustavu radi *i.* stupnja DKR koji se simultano odvija. Ispitivanje utjecaja koncentracija pojedine komponente na kinetiku reakcije provedeno je variranjem koncentracija komponente od odabrane minimalne prema odabranoj maksimalnoj vrijednosti uz držanje koncentracija ostalih komponenata konstantnima. Sastav reakcijske smjese pri određivanju *ii.* stupnja kinetike DKR s obzirom na (*S*)-epoksid dan je u tablicama 3.15. – 3.17. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije (*S*)-epoksida na početnu brzinu reakcije dan je u tablici 3.15., bromida u tablici 3.16., a cijanata u tablici 3.17. Sastav reakcijske smjese pri određivanju kinetike *ii.* stupnja DKR s obzirom na (*R*)-epoksid dan je u tablicama 3.18. – 3.20. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije (*R*)-epoksida na početnu brzinu reakcije dan je u tablici 3.18., bromida u tablici 3.19., a cijanata u tablici 3.20.

TABLICA 3.15. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije (*S*)-epoksida na početnu brzinu reakcije u *ii.* stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>S</i>)-epoksid	1000	X (2 < X < 250)
NaBr	1000	2
HheC	-	60
Tris-SO ₄	500	$V_r - (62 + X)$

TABLICA 3.16. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije bromidnih iona na početnu brzinu reakcije u reakciji sa (*S*)-epoksidom u *ii.* stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>S</i>)-epoksid	1000	10
NaBr	10	X (3,5 < X < 100)
	1000	
HheC	-	60
TriS-SO ₄	500	$V_r - (70 + X)$

TABLICA 3.17. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije cijanatnih iona na početnu brzinu reakcije u reakciji sa (*S*)-epoksidom u *ii.* stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>S</i>)-epoksid	1000	5
NaOCN	1000	X (5 < X < 25)
NaBr	1000	5
HheC	-	60
TriS-SO ₄	500	$V_r - (70 + X)$

TABLICA 3.18. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije (*R*)-epoksida na početnu brzinu reakcije u *ii.* stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>R</i>)-epoksid	1000	X (4 < X < 250)
NaBr	1000	2
HheC	-	60
TriS-SO ₄	500	$V_r - (62 + X)$

TABLICA 3.19. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije bromidnih iona na početnu brzinu reakcije u reakciji sa (*R*)-epoksidom u *ii.* stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

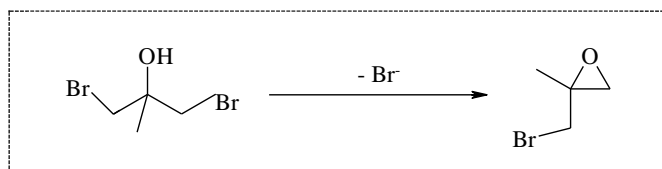
TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>R</i>)-epoksid	1000	100
NaBr	10	X (2,4 < X < 100)
	1000	
HheC	-	60
TriS-SO ₄	500	$V_r - (160 + X)$

TABLICA 3.20. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja koncentracije cijanatnih iona na početnu brzinu reakcije u reakciji sa (*R*)-epoksidom u *ii.* stupnju DKR ($V_r = 0,5$ mL)

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
(<i>R</i>)-epoksid	1000	5
NaOCN	1000	X ($5 < X < 20$)
NaBr	1000	5
HheC	-	60
TriS-SO ₄	500	$V_r - (70 + X)$

3.4.3. Ispitivanje kinetike 3. stupnja reakcije

Treći stupanj je reakcija odlaska bromidnog iona i zatvaranja 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola u TriS-SO₄ puferu pri čemu nastaje *rac*-2-bromometil-2-metil-oksiran (slika 3.6).



SLIKA 3.6. Shematski prikaz 3. stupnja DKR

Određivanje kinetike provedeno je variranjem koncentracije dibromoalkola od odabrane minimalne prema maksimalnoj vrijednosti. Reakcije je praćena GC analizom preko koncentracije dibromoalkohola i epoksida. Sastav reakcijske smjese dan je u tablici 3.21.

TABLICA 3.21. Sastav reakcijske smjese pri ispitivanju utjecaja alkohola

TVAR	c_{TO} [mmol dm ⁻³]	V [μL]
Alkohol	400	X ($10 < X < 100$)
TriS-SO ₄	500	$V_r - X$

3.5. Validacija modela u kotlastom reaktoru

Eksperimenti validacije modela provedeni su u KR pri zajedničkim uvjetima navedenim u tablici 3.7., pri čemu je volumen reaktora uvijek iznosio 2,5 mL. Uvjeti provođenja pojedinih eksperimenata validacije dani su u tablici 3.22. Oznake V-1 do V-3 odnose se na sustave bez bromidnih iona, a V-4 do V-7 na sustave s bromidnim ionima. Eksperimenti su, izuzev V-3, praćeni na akiralnoj i kiralnoj koloni kako bi ujedno bili

sakupljeni rezultati o promjeni koncentracije oksazolidinona i pojedinih epoksida. U testovima V-2 i V-3 praćena je stabilnost enzima u reaktoru.

TABLICA 3.22. Uvjeti provedbe pojedinih eksperimenata validacije modela

OZNAKA	SASTAV REAKCIJSKE SMJESE
V-1	$c_{rac-epoksid} = 50 \text{ mM}$, $c_{NaOCN} = 50 \text{ mM}$, $\gamma_{HheC} = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$
V-2	$c_{rac-epoksid} = 35 \text{ mM}$, $c_{NaOCN} = 50 \text{ mM}$, $\gamma_{HheC} = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$
V-3	$c_{rac-epoksid} = 100 \text{ mM}$, $c_{NaOCN} = 100 \text{ mM}$, $\gamma_{HheC} = 0,40 \text{ mg mL}^{-1}$
V-4	$c_{rac-epoksid} = 40 \text{ mM}$, $c_{NaOCN} = 40 \text{ mM}$, $c_{NaBr} = 1 \text{ mM}$, $\gamma_{HheC} = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$
V-5	$c_{rac-epoksid} = 100 \text{ mM}$, $c_{NaOCN} = 100 \text{ mM}$, $c_{NaBr} = 10 \text{ mM}$, $\gamma_{HheC} = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$
V-6	$c_{rac-epoksid} = 200 \text{ mM}$, $c_{NaOCN} = 200 \text{ mM}$, $c_{NaBr} = 5 \text{ mM}$, $\gamma_{HheC} = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$
V-7	$c_{rac-epoksid} = 20 \text{ mM}$, $c_{NaOCN} = 20 \text{ mM}$, $c_{NaBr} = 1 \text{ mM}$, $\gamma_{HheC} = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$

3.6. Obrada podataka

Kinetička ispitivanja u ovom radu koncipirana su kao neovisna mjerenja koja se temelje na metodi početnih reakcijskih brzina. Ispitivan je utjecaj jedne komponente na brzinu reakcije variranjem koncentracije od odabrane minimalne prema maksimalnoj vrijednosti, dok su koncentracije ostalih komponenata držane konstantnima kako bi se isključio njihov utjecaj. Vrijednosti parametara procijenjene su nelinearnom regresijskom analizom upotrebom modela temeljenih na Michaelis-Menteničinoj kinetici i sličnih unutar programskog paketa SCIENTIST iz eksperimentalnih podataka ovisnosti početne reakcijske brzine o koncentraciji.

Nelinearna regresija u SCIENTIST-u koristi simpleks metodu i metodu najmanjih kvadrata za procjenu parametara. Metode obuhvaćaju uzastopno uspoređivanje eksperimentalnih i izračunatih podataka te proračunavanje matematičkog modela u optimizacijskom programu dok se ne postigne minimalna pogreška. Razlika među eksperimentalnim i izračunatim podacima dana je kao suma kvadrata odstupanja.

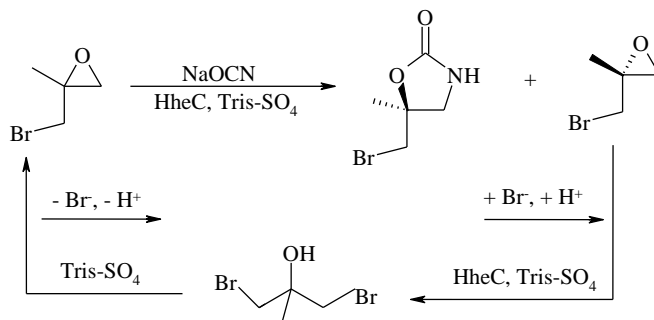
Metoda najmanjih kvadrata omogućava dobivanje funkcionalne ovisnosti mjerenih veličina iz eksperimentalnih podataka, pri čemu se funkcija i vrijednosti parametara određuju tako da je zbroj kvadratnih devijacija između izmjerenih i izračunatih vrijednosti minimalan, odnosno da krivulja funkcije bude što bliže eksperimentalnim točkama. Dobivena funkcionalna ovisnost omogućava predviđanje vrijednosti mjerenje veličine u područjima koja nisu obuhvaćena mjerenjem.

Simpleks metoda se koristi kada iz seta eksperimentalnih podataka nije moguće intuitivno postaviti zadovoljavajuće početne vrijednosti parametara za njihovu procjenu pomoću metode najmanjih kvadrata, odnosno kada je razlika između početne i prave vrijednosti parametara velika. Simpleks metoda korisna je za određivanje približne vrijednosti parametara.

Prilikom nelinearnog optimiranja u programskom paketu SCIENTIST postoje četiri različite vrste integratora: Eulerova metoda, metoda Runge-Kutta IV, Bulirsch-Stoer metoda i Episode metoda (Findrik, 2006 ; www.micromath.com)

4. MATEMATIČKO MODELIRANJE PROCESA DINAMIČKE KINETIČKE REZOLUCIJE

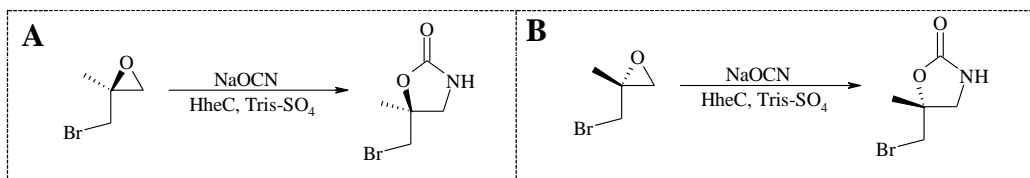
U ovom radu razvijen je cjeloviti matematički model DKR dobivanja (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona reakcijom *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnih iona uz katalitičko djelovanje HheC u prisutnosti bromidnih iona (slika 4.1).



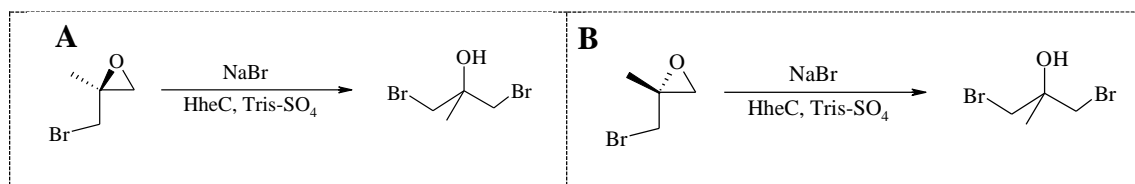
SLIKA 4.1. DKR dobivanja (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona katalizirana HheC

Za potrebe razvoja matematičkog modela prikazani sustav DKR raščlanjen je u tri odvojena reakcijska stupnja:

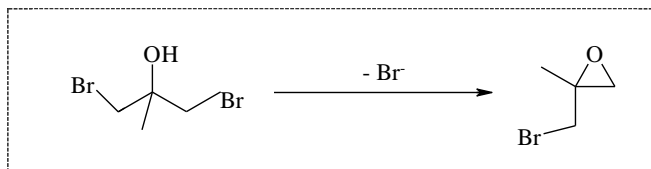
- nastajanje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona reakcijom cijanatnog iona s 2-bromometil-2-metil-oksiranom (slika 4.2),
- otvaranje 2-bromometil-2-metil-oksirana u prisustvu bromidnih iona te nastajanje 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola (slika 4.3), te
- nastajanje *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana iz 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola odlaskom bromidnog iona i protona (slika 4.4).



SLIKA 4.2. Shematski prikaz 1. stupnja DKR s **a.** (*S*)-epoksidom i **b.** (*R*)-epoksidom



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



SLIKA 4.4. Shematski prikaz 3. stupnja DKR

Matematički model procesa sastoji se od kinetičkog i reaktorskog modela. Kinetičke jednadžbe razvijene su, uz sheme reakcija, i iz kinetičkih podataka određenih metodom početnih reakcijskih brzina u KR, te su iz njih procijenjeni kinetički parametri linearnom i nelinearnom regresijskom analizom. Reaktorski model za KR sastavljen je od bilančnih jednadžbi za supstrate i produkte pojedinih reakcijskih stupnjeva uzimajući u obzir pretpostavke *i.* i *ii.* (str. 17).

4.1. Kinetički model procesa

Prvi stupanj DKR je nastajanje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona reakcijom 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona uz enzim HheC.

Nastajanje (*S*)-oksazolidinona opisano je dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom. Uz inhibiciju supstratom (*S*)-epoksidom prisutne su i dvije kompetitivne inhibicije. Molekule (*R*)-epoksida odnosno bromidnih iona strukturno su analogne molekulama (*S*)-epoksida odnosno cijanatnih iona, stoga djeluju kao kompetitivni inhibitori enzima (4.1).

Nastajanje (*R*)-oksazolidinona opisano je dvosupstratnom kinetikom pri čemu NaOCN slijedi Michaelis-Menteničinu, a (*R*)-epoksid kinetiku 1. reda. Kao i u prethodnom slučaju, strukturno analogne molekule epoksida i iona djeluju kao kompetitivni inhibitori (4.2).

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

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

Drugi stupanj DKR je reakcija 2-bromometil-2-metil-oksirana i bromidnog iona uz enzim HheC pri čemu nastaje 1,3-dibromo-2-metil-2-propanol. Nastajanje

dibromoalkohola otvaranjem epoksida i vezanjem bromida opisano je dvosupstratnom kinetikom pri čemu enantiomeri epoksida slijede kinetiku 1. reda, a bromidni ioni Michaelis-Menteničinu kinetiku. U slučaju (*S*)-epoksida prisutna je inhibicija suprotnim enantiomerom, inhibicija bromidnim ionom kao supstratom te kompetitivna inhibicija cijanatnim ionom (4.3, 4.4).

$$r_3 = \frac{k_3 \cdot c_{(S)\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{NaBr}} \cdot \gamma_{\text{HHeC}}}{\left(K_{m3}^{\text{NaBr}} \left(1 + \frac{c_{\text{NaOCN}}}{K_{i3}^{\text{NaOCN}}} \right) + c_{\text{NaBr}} + \frac{c_{\text{NaBr}}^2}{K_{i3}^{\text{NaBr}}} \right) \cdot \left(1 + \frac{c_{(R)\text{-epoksid}}}{K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}}} \right)} \quad (4.3)$$

$$r_4 = \frac{k_4 \cdot c_{(R)\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{NaBr}} \cdot \gamma_{\text{HHeC}}}{(K_{m4}^{\text{NaBr}} + c_{\text{NaBr}})} \quad (4.4)$$

Treći stupanj DKR je nastajanje *rac*-epoksida odlaskom bromidnog iona i protona iz molekule 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola. Zatvaranje dibromoalkohola kemijski je stupanj reakcije koji slijedi kinetiku 1. reda (4.5).

$$r_5 = k_5 \cdot c_{\text{dibromoalkohol}} \quad (4.5)$$

4.1. Reaktorski model procesa

Reaktorski model DKR sastoji se od bilančnih jednadžbi (4.6 – 4.12) koje opisuju promjene koncentracija pojedinih supstrata i produkta reakcija u vremenu.

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

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

$$\frac{dc_{\text{dibromoalkohol}}}{dt} = r_4 + r_3 - r_5 \quad (4.8)$$

$$\frac{dc_{\text{NaOCN}}}{dt} = -r_2 - r_1 \quad (4.9)$$

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

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

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

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Karakterizacija enzima

Masena koncentracija enzima određena je spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu (prilog 1) te u sirovom enzimskom ekstraktu iznosi $12,945 \text{ mg mL}^{-1}$. Volumna aktivnost enzima određena je testom kromogenog supstrata pomoću PNSHH prema postupku opisanom u poglavlju 3.2.2.2. ($V.A. = 9,44 \text{ U mL}^{-1}$). Iz masene koncentracije enzima u reaktoru te volumne aktivnosti izračunata je početna specifična aktivnost enzima ($S.A. = 1,17 \text{ U mg}^{-1}$).

5.2. Stabilnost kemikalija

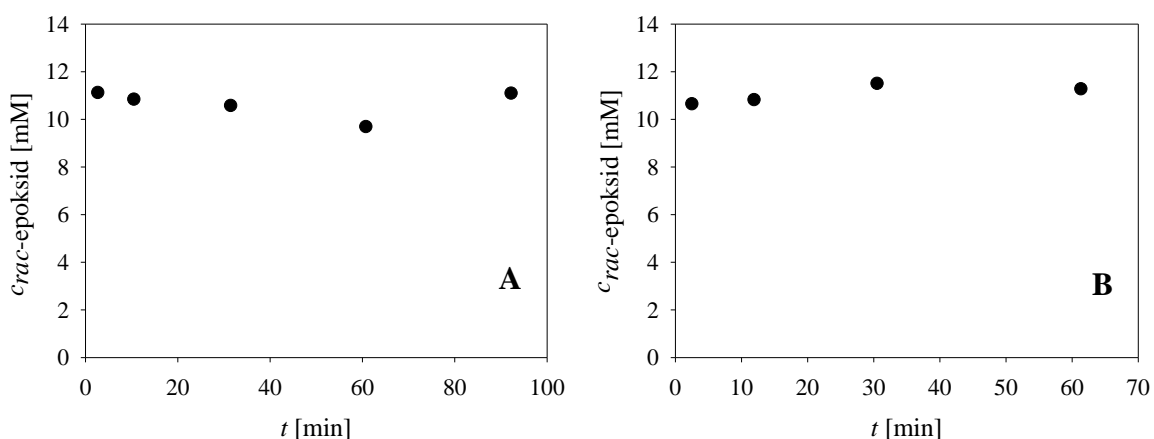
Pri određivanju kinetike reakcija potrebno je ispitati stabilnost supstrata, međuprodukata i produkata. Stabilnost se odnosi na sposobnost kemikalija da ostanu u nepromijenjenom i korisnom obliku tijekom potrebnog vremena u određenim uvjetima. Potrebno je znati jesu li kemikalije stabilne u reakcijskom mediju te dolazi li do razgradnje, nepoželjnih reakcija ili drugih promjena strukture s vremenom, mehaničkim miješanjem, u prisutnosti drugih komponenata reakcijskog medija ili u određenim reakcijskim uvjetima poput pH i temperature. U ovom radu određivanju kinetike prethodilo je ispitivanje stabilnosti epoksida, dibromoalkohola i oksazolidinona prema uvjetima danim u tablici 3.6. Rezultati ispitivanja dani su na slikama 5.1 – 5.3.

Na slici 5.1-A uočljivo je da je *rac*-epoksid stabilan u puferskom mediju tijekom 100 minuta, a na slici 5.1-B da bromidni ioni ne utječu na njegovu strukturu tijekom 60 minuta, što je više nego dovoljan vremenski period za provedbu kinetičkih ispitivanja. Međutim, za validaciju modela reakciju je potrebno provoditi dulji vremenski period, stoga je provedena analiza enantiomerno obogaćenog (*R*)-epoksida ($ee = 83 \%$, $w = 91,5 \%$) tijekom 24 h na kiralnoj koloni pri čemu je vidljivo ponašanje oba enantiomera. Tijekom prvih 5 h u puferskom mediju (slika 5.2-A) gotovo da nema negativnih promjena, odnosno promjena koncentracije oba enantiomera iznosi manje od 5 %. Nakon 24 h koncentracija se smanjuje za 31 % u slučaju (*R*)-epoksida te za 23 % u slučaju (*S*)-epoksida. Poznato je da epoksidi hidroliziraju u neutralnim i kiselim uvjetima čime nastaju pretežito dioli i u manjoj mjeri ketoni mehanizmom pregradnje karbokationa (Solomons et al., 2013). Kako

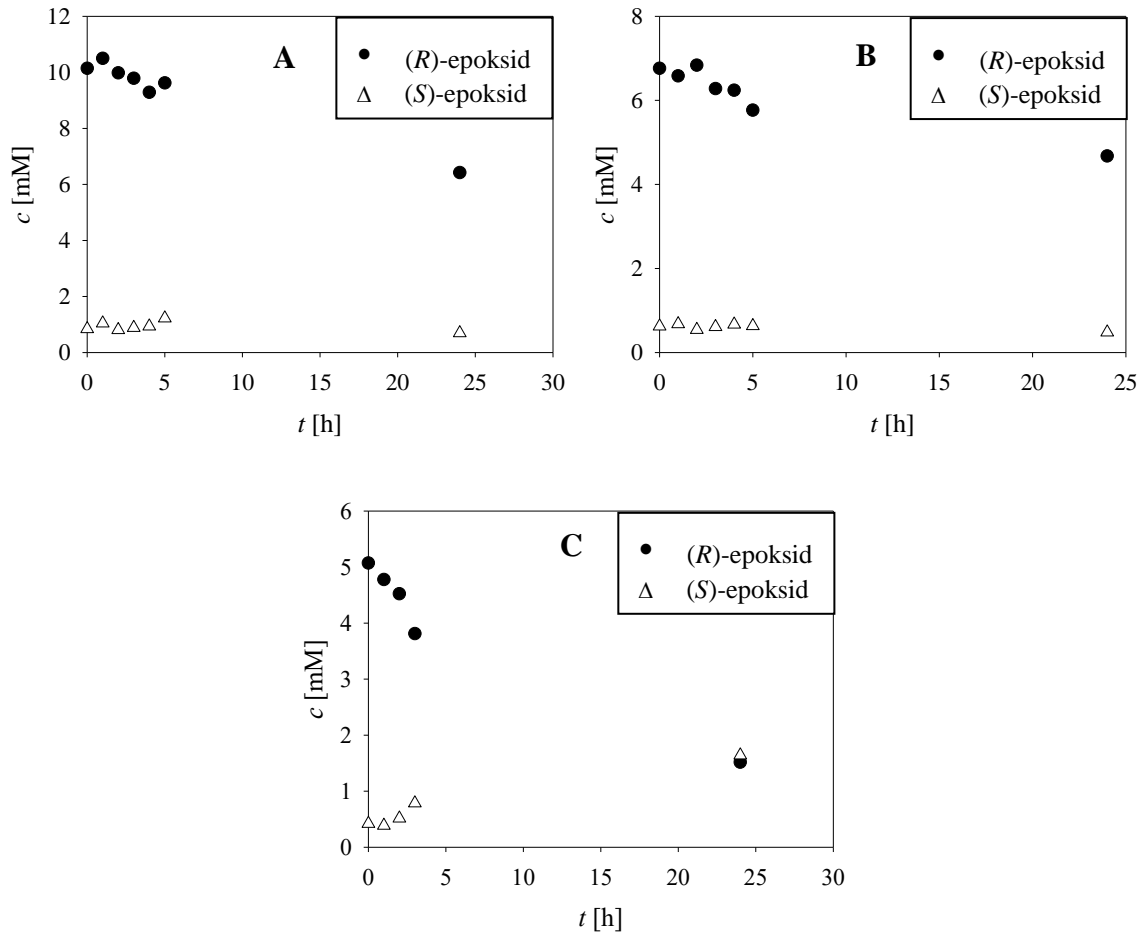
bi se smanjenje koncentracije moglo pripisati hidrolizi, a ne reakciji s komponentama puferuskog medija, ispitivanje stabilnosti provedeno je u ultračistoj vodi uz ostale uvjete nepromijenjene. Sličan trend prikazan je slikom 5.2-B gdje nakon 3 h dolazi do neznatnih promjena ($\Delta c < 5\%$), a nakon 24 h koncentracija se smanjuje za 37 % u slučaju (*R*)-epoksida te za 17 % u slučaju (*S*)-epoksida. Na temelju iznesenog smanjenje koncentracije epoksida u puferuskom mediju može se pripisati upravo hidrolizi, čiji doprinos postaje značajan nakon 5 h reakcije. Slika 5.2-C prikazuje ponašanje enantiomerno obogaćenog (*R*)-epoksida u puferu u prisustvu HheC enzima. Reakcija racemizacije započinje već dodatkom enzima, a nakon 24 h epoksid je potpuno racemiziran. Naime, poznato je da HheC enzim katalizira reverzibilnu dehalogenaciju vicinalnih halogenhidrina do epoksida, pri čemu pokazuje visoku enantioselektivnost za otvaranje epoksidnog prstena i nisku enantioselektivnost za zatvaranje halogenhidrina, što rezultira nastankom racemične smjese (Janssen et al., 2006).

Oksazolidinon je stabilan u puferuskom mediju prvih 10,5 h (slika 5.3-A), a nakon 24 h uzorak nije bilo moguće analizirati uslijed raspada oksazolidinona. Slika 5.3-B prikazuje ponašanje dibromoalkohola u puferuskom mediju. Smanjenje koncentracije dibromoalkohola prati ekvivalentno povećanje koncentracije *rac*-epoksida, što upućuje na činjenicu da je zatvaranje dibromoalkohola kemijski, a ne enzimski kataliziran reakcijski stupanj.

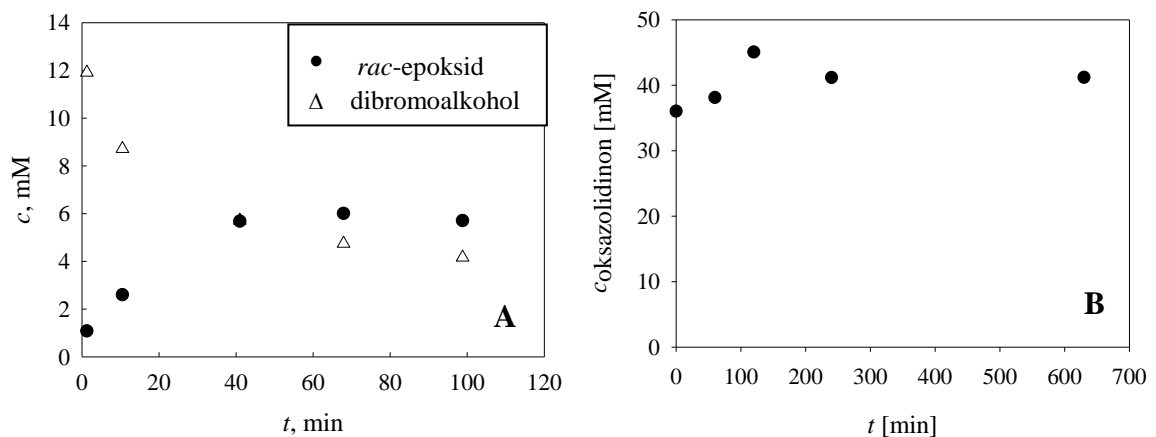
Iz objedinjenih rezultata ispitivanja stabilnosti proizlazi da je točnu kvantitativnu analizu moguće provoditi unutar 5 h od postavljanja reakcije jer tijekom tog perioda nema sporednih reakcija niti degradacije komponenata reakcijskog medija.



SLIKA 5.1. Stabilnost *rac*-epoksida (500 mM Tris-SO₄ pH 7, $T = 27\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 2,5\text{ mL}$, $c_{rac-epoksid} = 10\text{ mM}$) u **A.** puferuskom mediju i **B.** prisutnosti bromidnih iona ($c_{NaBr} = 10\text{ mM}$)



SLIKA 5.2. Stabilnost (*R*)-epoksida (500 mM Tris-SO₄ pH 7, $T = 24,5$ °C, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 2,5$ mL) u **A.** puferском mediju ($c_{R\text{-epoksid}} = 10$ mM), **B.** ultračistoj vodi ($c_{R\text{-epoksid}} = 10$ mM) i **C.** prisutnosti HheC enzima ($c_{R\text{-epoksid}} = 5$ mM, $V_{\text{HheC}} = 10$ μL)



SLIKA 5.3. Stabilnost u puferском mediju (500 mM Tris-SO₄ pH 7, $T = 25$ °C, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 2,5$ mL) **A.** dibromoalkohola ($c_{\text{dibromoalkohol}} = 12$ mM) i **B.** oksazolidinona ($c_{\text{oksazolidinon}} = 40$ mM)

5.3. Kinetika dinamičke kinetičke rezolucije

HheC katalizira visoko enantioselektivnu dehalogenaciju vicinalnih haloalkohola u epokside, kao i reverzibilnu reakciju enantioselektivnog i β -regioselektivnog nukleofilnog otvaranja epoksidnog prstena uz razne male anione poput halogena (Cl^- , Br^- , I^-) i pseudohalogeni (N_3^- , CN^- , OCN^- itd.). Majerić Elenkov i sur. prikazali su primjer učinkovite višestupnjevite DKR (slika 4.1) za dobivanje enatiomerno čistog derivata oksazolidinona koja obuhvaća navedene reakcije katalizirane HheC (Majerić Elenkov et al., 2015). Proučavana DKR može se podijeliti na tri stupnja: enantioselektivno otvaranje epoksidnog prstena s OCN^- ionom i brza ciklizacija dobivenog alkohola u (*S*)-oksazolidinon (stupanj *i.* – slika 4.2.-A), reakcija otvaranja prstena zaostalog (*R*)-epoksida s Br^- ionom (stupanj *ii.* – slika 4.2.-B) te reverzibilna reakcija dehalogenacije dibromoalkohola i nastajanje epoksida (stupanj *iii.* – slika 4.2.-C).

Janssen i sur. prikazali su mehanizam *i.* stupnja reakcije epoksidnog prstena s cijanatom ionom. Reakcija je visoko regioselektivna pri čemu dominira nukleofilni napad na manje supstituiranom mjestu epoksida. OCN^- je ambidentni nukleofil što znači da je negativni naboj u molekuli delokaliziran rezonancijom i stoga se otvaranje epoksidnog prstena može odvijati preko dušikovog ili kisikovog napada. Takva priroda nukleofila dovodi do nastajanja dva izomera produkta, β -hidroksiizocijanata i β -hidroksicijanata. Organski cijanat je vrlo nestabilna tvar i pri sobnoj temperaturi podliježe izomerizaciji u izocijanat. Nastali hidroksiizocijanat ne može se izolirati već spontano i brzo ciklizira u oksazolidinon (Janssen et al., 2008). Majerić Elenkov i sur. proveli su *i.* stupanj reakcije s 0,5 g *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana i 1 molarnim ekvivalentom cijanatom iona uz pročišćeni enzim HheC. Reakcija je bila brza do 50 %-tne konverzije, a potom je usporila, iz čega proizlazi da je enantioselektivnost ove biotransformacije visoka. U ovom slučaju produkt (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on izoliran je s iskorištenjem 47 % i *ee* 98 %.

Nedovoljnom iskorištenju reakcije (< 50 %) može se doskočiti provedbom DKR. DKR podrazumijeva opisanu kinetičku rezoluciju i *in situ* racemizaciju sporije reagirajućeg enantiomera supstrata kataliziranu istim HheC enzimom preko intermedijera dibromoalkohola. Naime, u prisutnosti bromidnih iona dolazi do otvaranja prstena (*R*)-epoksida zaostalog u reakcijskoj smjesi i nastajanja prokiralnog dibromoalkohola (*ii.* stupanj). To je enzimski katalizirana reakcija i predstavlja usko grlo procesa. Kako bi se odredila koncentracija bromidnih iona potrebna za učinkovitu racemizaciju, Majerić

Elenkov i sur. proveli su DKR sa 100 mM *rac*-epoksidom, 150 mM NaOCN i različitim koncentracijama NaBr (0, 10, 50, 100 mM). U odsutnosti NaBr provedena je kinetička rezolucija (48 % iskorištenje na (*S*)-epoksidu uz 98 % *ee*), a DKR je uspješno provedena pri svim koncentracijama NaBr. Za daljnje pokuse odabrana je najmanja učinkovita koncentracija, tj. 10 mM.

Slijedi vrlo brza dehalogenacija dibromoalkohola odlaskom protona i bromidnog iona (*iii.* stupanj). Pretpostavljeno je da je reakcija također enzimski katalizirana i enantioselektivna te da kao produkt nastaje (*S*)-epoksid (Majerić Elenkov et al., 2015). Takva pretpostavka temeljena je na činjenici da su sekundarni dibromoalkoholi prirodni supstrati HHDH pri čemu nastaju enantiomerno obogaćeni epoksidi. Štoviše, enzimi pripadnici HheA podtipa pokazuju iznimno visoku aktivnost prema 1,3-dibromo-2-propanolu (Lutje Spelberg et al., 2012). Enantioselektivnost ove reakcije pripisana je prokiralnosti molekule 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola, odnosno svojstvu molekule da u samo jednom stupnju desimetrizacije postane kiralna.

Uz usvojena saznanja prethodno opisanih pojedinačnih ispitivanja, Majerić Elenkov i sur. proveli su uspješnu DKR s 0,5 g *rac*-2-bromometil-2-metil-oksirana i 1,5 molarnim ekvivalentom NaOCN uz 0,1 molarni ekvivalent NaBr u prisustvu sirovog enzimskog ekstrakta HheC. Kao produkt je dobiven (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-on uz visoko iskorištenje (87 %) i optičku čistoću (*ee* > 99 %) (Majerić Elenkov et al., 2015).

Iz navedenog rada vidljiva je mogućnost dobivanja visokog iskorištenja na (*S*)-oksazolidinonu uz visoku enantiomernu čistoću. Izneseno predstavlja veliki potencijal za ekonomski i ekološki isplativu proizvodnju optički čistog oksazolidinona, a time ujedno i potrebu za detaljnijim razumijevanjem navedenog sustava. Naime, *i.* stupanj reakcije nije potpuno enantioselektivan, već ishod uvelike ovisi o odabiru reakcijskih uvjeta, odnosno početnim koncentracijama supstrata i enzima. Također, Janssen i sur. uočili su da cijanatni anion može uzrokovati inhibiciju otvaranja epoksidnog prstena. Pretpostavka je da neproduktivno vezanje rezultira nepovoljnim položajem epoksidnog prstena, u kojem je umjesto terminalnog ugljikovog atoma prema nukleofilu usmjeren epoksidni kisik (Janssen, 2008). Kinetičkim ispitivanjima *i.* stupnja moguće je odrediti postoji li negativan utjecaj OCN⁻ iona pri različitim koncentracijama. Nadalje, uočeno je da *ii.* stupanj reakcije predstavlja usko grlo procesa i time diktira njegovu cjelokupnu brzinu. Brzina reakcije ovisi o koncentracijama supstrata, stoga saznanja iz kinetičkih ispitivanja omogućuju odabir optimalnih koncentracija supstrata koja mogu skratiti vrijeme trajanja procesa. Također, Majerić Elenkov i sur. pokazali su da povećanjem koncentracije bromidnih iona

brzina racemizacije raste (4 h pri 10 mM te 3 h pri 50 mM), ali da se daljnjim povećanjem koncentracije brzina smanjuje (4 h pri 100 mM). Takvo opažanje upućuje na potencijalnu inhibiciju enzima bromidnim ionima. Kao i za cijanatne ione, poznavanjem kinetike procesa moguće je odrediti postoji li negativan utjecaj Br⁻ iona pri višim koncentracijama. Saznanja iz kinetičkih ispitivanja pojedinačnih stupnjeva DKR također omogućuju odabir najpovoljnijeg reaktora za provođenje reakcija. Odabirom najpovoljnijeg reaktora te početnih uvjeta, odnosno koncentracija supstrata i enzima, moguće je postići optimalni ishod reakcije tj. najviša iskorištenja na produktu i njegovu optičku čistoću u što kraćem vremenu.

Iz navedenih razloga, u ovom radu je razvijen i validiran cjeloviti matematički model prikazane DKR. Iako se *i.* stupanj odnosi se na favorizirano nastajanje (*S*)-oksazolidinona, a *ii.* stupanj na pretežno otvaranje (*R*)-epoksida, zbog kompleksnosti reakcijskog sustava sa stajališta reakcijskog inženjerstva, svaki je od ovih reakcijskih stupnjeva proučavan zasebno za (*S*)- i (*R*)-epoksid kao supstrate.

5.3.1. Kinetika *i.* stupnja reakcije

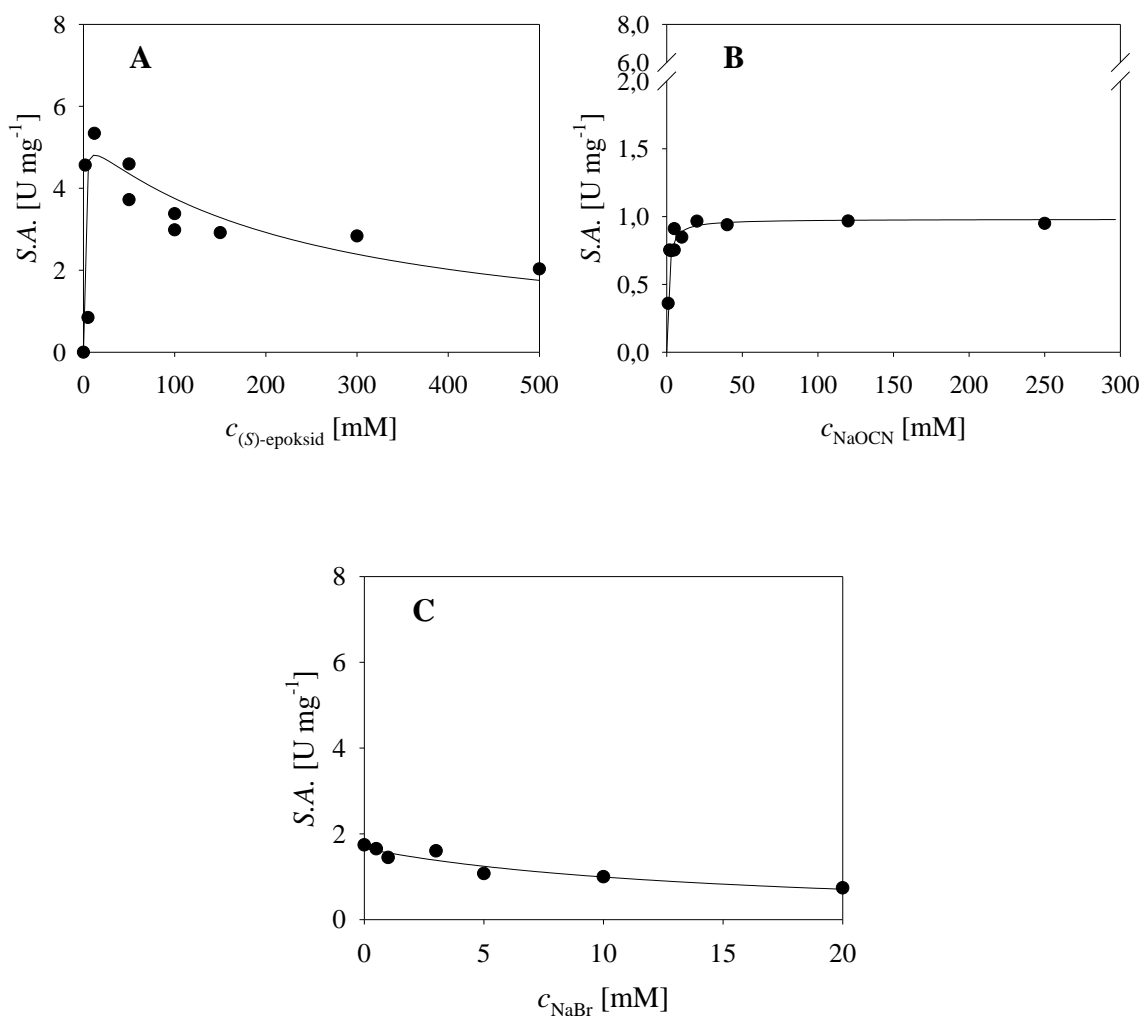
Prvi stupanj DKR je nastajanje 5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona reakcijom 2-bromometil-2-metil-oksirana i cijanatnog iona uz enzim HheC. Kinetika *i.* stupnja reakcije ispitana je polazeći od oba enantiomera epoksida pojedinačno, pri čemu je ispitivan utjecaj koncentracija supstrata (epoksida i OCN⁻), produkta (oksazolidinona) i Br⁻ (priustan u sustavu DKR) na specifičnu aktivnost enzima. Utjecaj oksazolidinona ispitivan je u eksperimentima s *rac*-epoksidom kako bi se odredilo postoji li inhibicija produktom. Utjecaj bromidnih iona, koji su prisutni u sustavu kao supstrati u *ii.* stupnju DKR koji se simultano odvija, ispitivan je na enantiomerima pojedinačno.

Rezultati mjerenja kinetike *i.* stupnja reakcije s obzirom na (*S*)-epoksid dani su na slici 5.4. koja prikazuje ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama (*S*)-epoksida (5.4-A), cijanatnog iona (5.4-B) i bromidnog iona (5.4-C). Supstrati (*S*)-epoksid i cijanatni ion prate Michaelis-Menteničinu kinetiku, uz inhibicijski učinak (*S*)-epoksida na enzim pri višim koncentracijama. Bromidni ioni također imaju inhibicijski učinak na enzim pri višim koncentracijama. Iz prikazanih rezultata procijenjeni su kinetički parametri i navedeni u tablici 5.1.

Rezultati mjerenja kinetike *i.* stupnja reakcije s obzirom na (*R*)-epoksid dani su na slici 5.5. Slike prikazuju ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama

(*R*)-epoksida (5.5-A), cijanatnog iona (5.5-B) i bromidnog iona (5.5-C). Analogno slučaju sa (*S*)-epoksidom, cijanatni ioni prate Michaelis-Menteničinu kinetiku a bromidni ioni imaju inhibicijski učinak na enzim pri povišenim koncentracijama, uz glavnu razliku da (*R*)-epoksid prati kinetiku 1. reda. Iz prikazanih rezultata procijenjeni su kinetički parametri i navedeni u tablici 5.2.

Rezultati ispitivanja utjecaja produkta oksazolidinona na specifičnu aktivnost enzima dani su na slici 5.6. Budući da s povećanjem koncentracije produkta specifična aktivnost enzima ostaje nepromijenjena, moguće je zaključiti da inhibicije produktom nema.

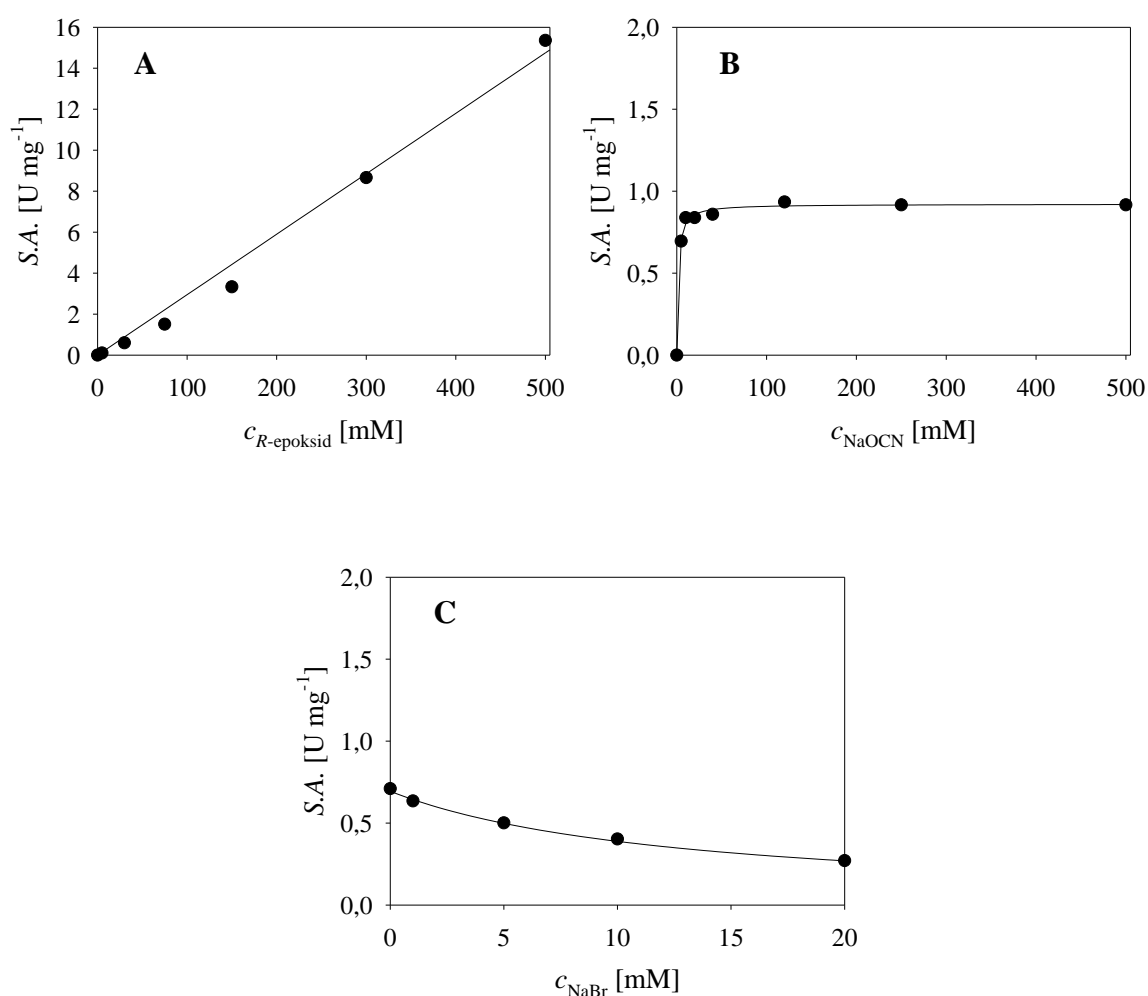


SLIKA 5.4. Utjecaj koncentracije **A.** (*S*)-epoksida ($c_{\text{NaOCN}} = 150,1$ mM), **B.** NaOCN ($c_{(S)\text{-epoksid}} = 200$ mM) i **C.** NaBr ($c_{\text{NaOCN}} = 50,02$ mM, $c_{(S)\text{-epoksid}} = 10$ mM) na specifičnu aktivnost HheC (500 mM Tris-SO₄ pH 7, 1000 okr min⁻¹, $V_f = 0,5$ mL, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,08$ mg cm⁻³)

TABLICA 5.1. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju između (S)-epoksida i NaOCN

PARAMETAR	JEDINICA	VRIJEDNOST
V_{m1}	U mg^{-1}	$5,287 \pm 1,698$
$K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}}$	mM	$0,611 \pm 0,144$
K_{m1}^{NaOCN}	mM	$1,036 \pm 0,235$
$K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}}$	mM	$248,140 \pm 28,505$
K_{i1}^{NaBr}	mM	$0,129 \pm 0,033$
$K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}*}$	mM	$0,154 \pm 0,012$

*vrijednost procijenjena naknadno tijekom validacije modela iz eksperimenta u kotlastom reaktoru

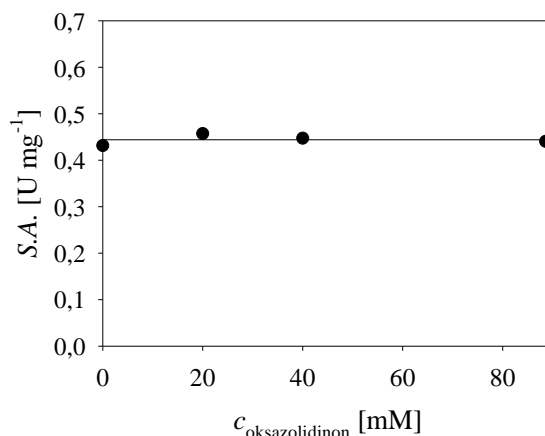


SLIKA 5.5. Utjecaj koncentracija **A.** (R)-epoksida ($c_{\text{NaOCN}} = 150 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,08 \text{ mg cm}^{-3}$), **B.** NaOCN ($c_{(R)\text{-epoksid}} = 10 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,04 \text{ mg cm}^{-3}$) i **C.** NaBr ($c_{\text{NaOCN}} = 50 \text{ mM}$, $c_{(R)\text{-epoksid}} = 10 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,08 \text{ mg cm}^{-3}$) na specifičnu aktivnost HheC (500 mM Tris-SO₄ pH 7, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 0,5 \text{ mL}$)

TABLICA 5.2. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju između (*R*)-epoksida i NaOCN

PARAMETAR	JEDINICA	VRIJEDNOST
k_2	$\text{U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$0,041 \pm 0,001$
K_{m2}^{NaOCN}	mM	$29,030 \pm 0,224$
K_{i2}^{NaBr}	mM	$0,371 \pm 0,022$
$K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}*}$	mM	$8,391 \pm 0,853$

*vrijednost procijenjena naknadno tijekom validacije modela iz eksperimenta u kotlastom reaktoru



SLIKA 5.6. Utjecaj koncentracije oksazolidinona na specifičnu aktivnost HheC (500 mM Tris- SO_4 pH 7, 1000 okr min^{-1} , $V_r = 2,5 \text{ mL}$, $c_{\text{rac-epoksid}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{NaOCN}} = 150 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,32 \text{ mg cm}^{-3}$)

Usporedbom podataka za *i.* stupanj DKR (tablice 5.1 i 5.2) uočljiv je različit afinitet enzima prema enantiomerima. Vrijednost maksimalne brzine reakcije za (*S*)-epoksid je niska ($V_{m1} = 5,287 \text{ U mg}^{-1}$) i postiže se pri niskim koncentracijama (*S*)-epoksida, dok pri višim koncentracijama ($c_{(S)\text{-epoksid}} > 10 \text{ mM}$) dolazi do izražaja inhibicija enzima i smanjenje brzine reakcije što je numerički izraženo vrlo visokom vrijednosti konstante inhibicije ($K_i^{(S)\text{-epoksid}} = 248,140 \text{ mM}$). U slučaju (*R*)-epoksida vrijednost maksimalne brzine reakcije nije bilo moguće odrediti jer supstrat slijedi kinetiku prvoga reda s konstantom brzine reakcije $k = 0,041 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$. To ustvari znači da se brzina reakcije linearno povećava s povećanjem koncentracije (*R*)-epoksida no uz vrlo nisku konstantu proporcionalnosti, odnosno da je za više brzine reakcije nastajanja (*R*)-oksazolidinona potrebna vrlo visoka početna koncentracija (*R*)-epoksida. Iz navedenog slijedi da bi pri niskim koncentracijama *rac*-epoksida brzina nastajanja (*S*)-oksazolidinona bila visoka, a (*R*)-oksazolidinona niska, no povećanjem koncentracije *rac*-epoksida situacija se mijenja. Drugim riječima, iz kinetičkih mjerenja *i.* stupnja DKR vidljivo je da je za postizanje

visokog iskorištenja na (*S*)-oksazolidinonu reakciju potrebno provoditi pri nižim početnim koncentracijama *rac*-epoksida.

Kad su prisutni u sustavu, bromidni ioni inhibiraju enzim u oba slučaja, stoga *i*. stupnju DKR odgovara provedba pri nižim koncentracijama bromidnih iona. Uspoređujući konstante vidljivo je da je inhibicija u slučaju (*S*)-epoksida nešto izraženija u odnosu na (*R*)-epoksid ($K_{i1}^{\text{NaBr}} = 0,129 \text{ mM}$, $K_{i2}^{\text{NaBr}} = 0,371 \text{ mM}$).

5.3.2. Kinetika *ii*. stupnja reakcije

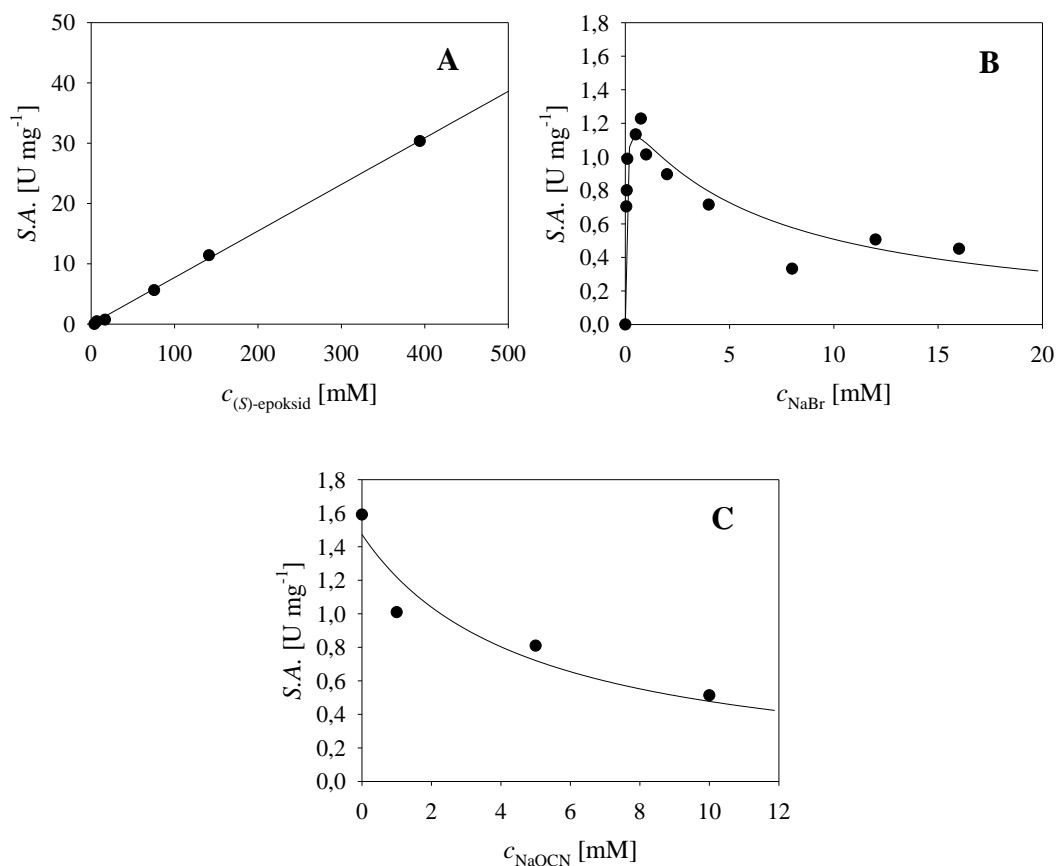
Drugi stupanj DKR je reakcija 2-bromometil-2-metil-oksirana i bromidnog iona uz enzim HheC pri čemu nastaje 1,3-dibromo-2-metil-2-propanol. Kinetika *ii*. stupnja reakcije ispitana je polazeći od oba enantiomera epoksida pojedinačno, pri čemu je ispitivan utjecaj supstrata (epoksida i bromidnih iona) te cijanatnih iona, koji su prisutni u sustavu radi *i*. stupnja DKR koji se simultano odvija, na specifičnu aktivnost enzima.

Rezultati mjerenja kinetike *ii*. stupnja reakcije s obzirom na (*S*)-epoksid dani su na slici 5.7. Slike prikazuju ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama (*S*)-epoksida (5.7-A), bromidnog iona (5.7-B) i cijanatnog iona (5.7-C). Supstrat (*S*)-epoksid prati kinetiku 1. reda, a bromidni ioni Michaelis-Menteničinu kinetiku uz inhibicijski učinak na enzim pri višim koncentracijama. Cijanatni ioni također pokazuju inhibicijski učinak na enzim pri višim koncentracijama. Iz prikazanih rezultata procijenjeni su kinetički parametri i navedeni u tablici 5.3.

Rezultati mjerenja kinetike *ii*. stupnja reakcije s obzirom na (*R*)-epoksid dani su slikom 5.8. Slike prikazuju ovisnost specifične aktivnosti enzima o koncentracijama (*R*)-epoksida (5.8-A), bromidnog iona (5.8-B) i cijanatnog iona (5.8-C). Supstrat (*R*)-epoksid prati kinetiku 1. reda, a bromidni ioni Michaelis-Menteničinu kinetiku. Cijanatni ioni u ovom slučaju nemaju inhibicijski učinak na enzim. Iz prikazanih rezultata procijenjeni su kinetički parametri i navedeni u tablici 5.4.

Budući da (*S*)- i (*R*)-epoksid prate kinetiku 1. reda, brzina reakcije povećava se proporcionalno s povećanjem koncentracije supstrata. Kao što je vidljivo u tablicama 5.3 i 5.4, konstante brzina reakcija u oba slučaja su vrlo niske, odnosno potrebne su vrlo visoke koncentracije supstrata kako bi se reakcija odvijala većom brzinom. Pri tome je konstanta za (*S*)-epoksid ($k_3 = 0,077 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) više nego dvostruko veća od one za (*R*)-epoksid ($k_4 = 0,030 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Vrijednosti Michaelisove konstante u oba slučaja upućuju na visok afinitet enzima prema bromidnim ionima ($K_{m3}^{\text{NaBr}} = 0,0380 \text{ mM}$, $K_{m4}^{\text{NaBr}} = 1,630 \text{ mM}$), odakle je vidljivo da je za uspješno provođenje ove reakcije u reaktor potrebno dodati malu količinu bromidnih iona. Štoviše, u slučaju (*S*)-epoksida više koncentracije bromidnih iona ($c_{\text{NaBr}} > 1 \text{ mM}$) inhibiraju reakciju što je i ranije pretpostavljeno prema literaturi (Majerić Elenkov et al., 2015). Također, cijanatni ioni inhibiraju reakciju u slučaju (*S*)-epoksida ($K_{i3}^{\text{NaOCN}} = 0,0071 \text{ mM}$), dok u reakcijama s (*R*)-epoksidom nemaju utjecaja. Budući da se pri provedbi DKR *ii.* stupanj odnosi na otvaranje (*R*)-epoksida zaostalog u smjesi, činjenicu da bromidni i cijanatni ioni inhibiraju reakciju sa (*S*)-epoksidom moguće je uzeti u obzir pri odabiru uvjeta za postizanje željenog ishoda reakcije. Kinetička ispitivanja potvrđuju stoga podatak iz literature da je *ii.* stupanj reakcije usko grlo procesa, koliko zbog kinetike prvog reda u odnosu na epoksid, toliko i zbog pojave inhibicija. Pri niskim koncentracijama supstrata može se ostvariti samo niska brzina reakcije, a uzevši u obzir da se DKR provodi uz barem ekvimolarne koncentracije cijanatnog iona, tu dolazi i do inhibicije supstratom iz *i.* stupnja reakcije koja je neizbježna.

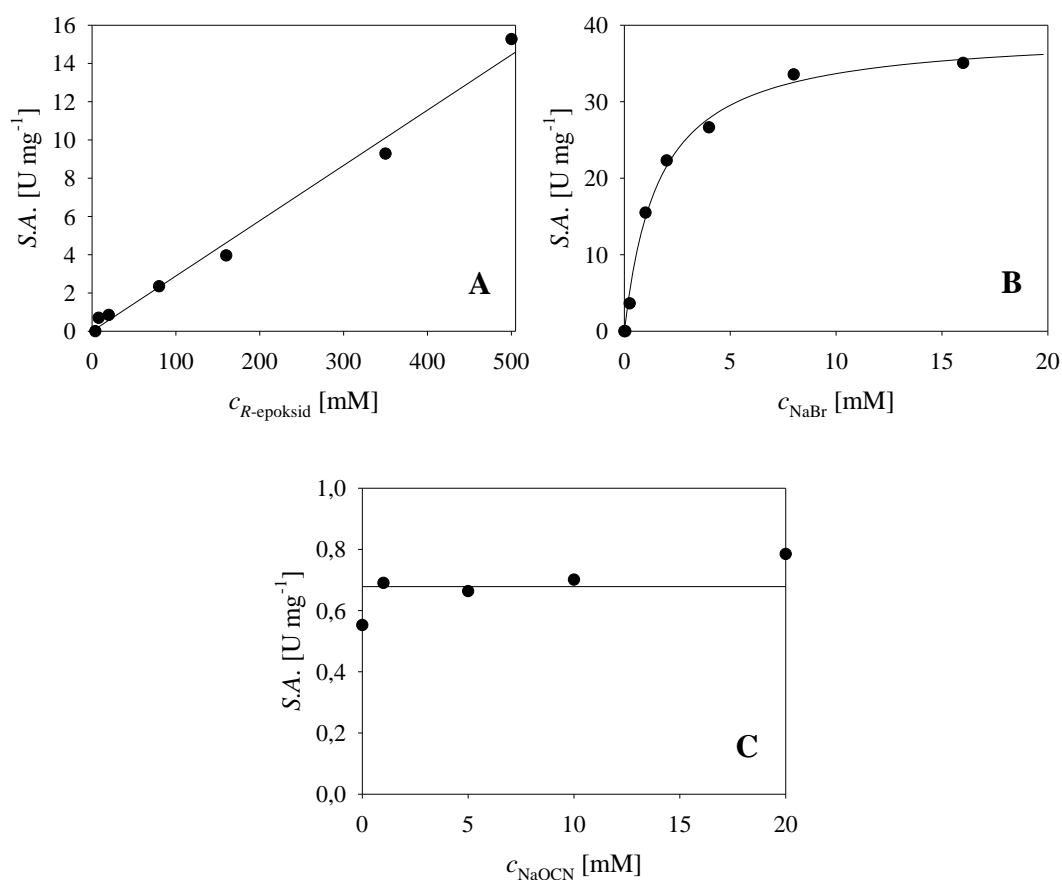


SLIKA 5.7. Utjecaj koncentracije **A.** (*S*)-epoksida ($c_{\text{NaBr}} = 4 \text{ mM}$), **B.** NaBr ($c_{(S)\text{-epoksid}} = 20,01 \text{ mM}$) i **C.** NaOCN ($c_{\text{NaBr}} = 10 \text{ mM}$, $c_{(S)\text{-epoksid}} = 10,01 \text{ mM}$) na specifičnu aktivnost HheC (500 mM Tris- SO_4 pH 7, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 0,5 \text{ mL}$, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,08 \text{ mg cm}^{-3}$)

TABLICA 5.3. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju između (S)-epoksida i NaBr

PARAMETAR	JEDINICA	VRIJEDNOST
k_3	$\text{U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$0,077 \pm 0,001$
K_{m3}^{NaBr}	mM	$0,038 \pm 0,009$
K_{i3}^{NaBr}	mM	$6,533 \pm 1,425$
K_{i3}^{NaOCN}	mM	$0,007 \pm 0,002$
$K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}*}$	mM	$0,012 \pm 0,001$

*vrijednost procijenjena naknadno tijekom validacije modela iz eksperimenta u kotlastom reaktoru



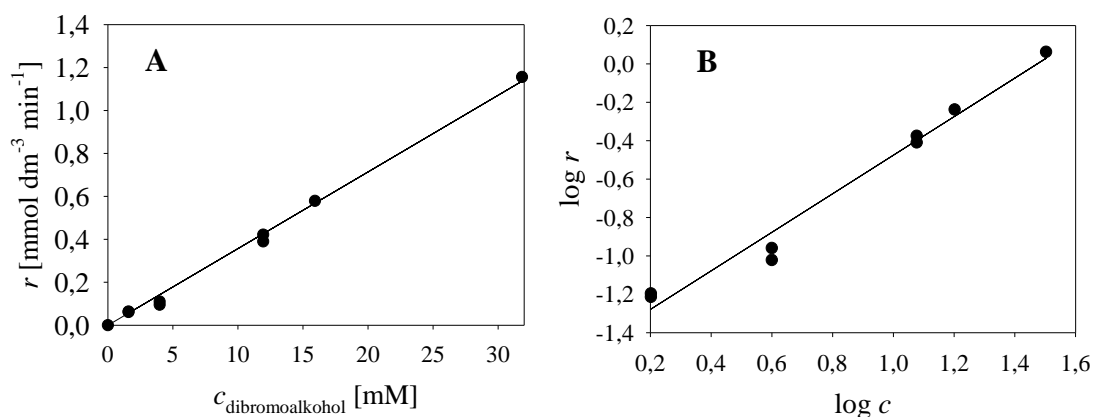
SLIKA 5.8. Utjecaj koncentracije **A.** (R)-epoksida ($c_{\text{NaBr}} = 4$ mM), **B.** NaBr ($c_{(R)\text{-epoksid}} = 200,1$ mM) i **C.** NaOCN ($c_{\text{NaBr}} = 10$ mM, $c_{(S)\text{-epoksid}} = 10,01$ mM) na specifičnu aktivnost HheC (500 mM Tris-SO₄ pH 7, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 0,5$ mL, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,08$ mg cm⁻³)

TABLICA 5.4. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju između (R)-epoksida i NaBr

PARAMETAR	JEDINICA	VRIJEDNOST
k_4	$\text{U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$	$0,030 \pm 0,0004$
K_{m4}^{NaBr}	mM	$1,630 \pm 0,183$

5.3.3. Kinetika *iii.* stupnja reakcije

Treći stupanj DKR je nastajanje *rac*-epoksida odlaskom bromidnog iona i protona iz molekule 1,3-dibromo-2-metil-2-propanola. Rezultat mjerenja kinetike *iii.* stupnja reakcije prikazani su na slici 5.9. Iako je *iii.* stupanj reakcije u ranijim istraživanjima pripisan djelovanju enzima, u ovom radu otkriveno je da HheC ne prihvaća tercijarni alkohol kao supstrat. Reakcija zatvaranja dibromoalkohola je spontan kemijski proces te kao produkt nastaje *rac*-epoksid. Budući da je brzina dehalogenacije proporcionalna koncentraciji dibromoalkohola, radi se o reakciji kinetike 1. reda. Procijenjeni kinetički parametri dani su u tablici 5.5.



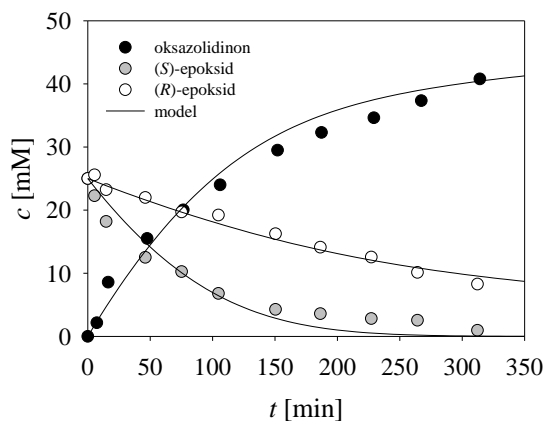
Slika 5.9.-A. Utjecaj koncentracije dibromoalkohola na brzinu reakcije, **B.** utvrđivanje reda reakcije (500 mM Tris-SO₄ pH 7, 1000 okr min⁻¹, 0.5 mL, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,08 \text{ mg cm}^{-3}$)

TABLICA 5.5. Kinetički parametri *iii.* stupnja reakcije

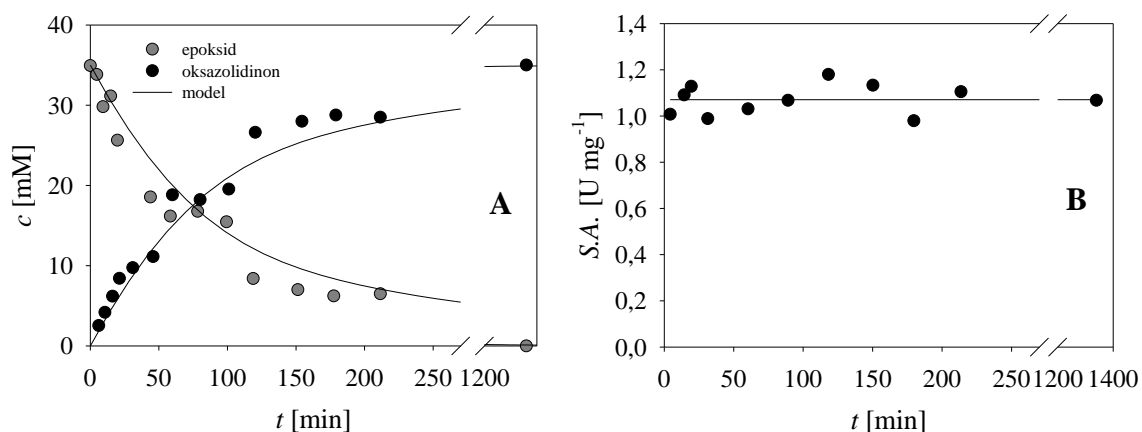
Parametar	Jedinica	Vrijednost
k_5	min ⁻¹	$0,0357 \pm 0,0011$
n	-	1

5.4. Validacija modela

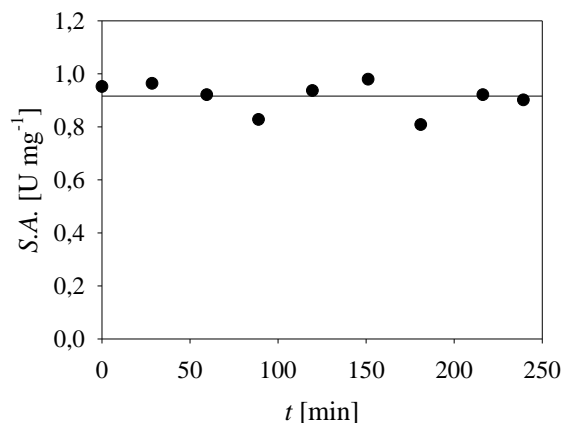
Nakon razvoja matematičkog modela DKR uslijedila je njegoa validacija provedbom eksperimenata u KR prema uvjetima danim u tablici 3.22. Rezultati validacije odnosno provjere valjanosti modela dani su na slikama 5.10 – 5.17.



SLIKA 5.10. V-1: dobivanje oksazolidinona reakcijom *rac*-epoksida i cijanatnih iona u KR praćeno na kiralnoj i akiralnoj koloni (500 mM Tris-SO₄ pH 7, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 2,5\text{ mL}$, $c_{rac\text{-epoksid}} = 50\text{ mM}$, $c_{\text{NaOCN}} = 50\text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,25\text{ mg mL}^{-1}$)



SLIKA 5.11. V-2: dobivanje oksazolidinona reakcijom *rac*-epoksida i cijanatnih iona u KR (500 mM Tris-SO₄ pH 7, $T = 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 2,5\text{ mL}$, $c_{rac\text{-epoksid}} = 35\text{ mM}$, $c_{\text{NaOCN}} = 50\text{ mM}$, $\gamma_{\text{HheC}} = 0,25\text{ mg mL}^{-1}$) **A.** praćenje koncentracija na akiralnoj koloni i **B.** praćenje stabilnosti enzima u reaktoru



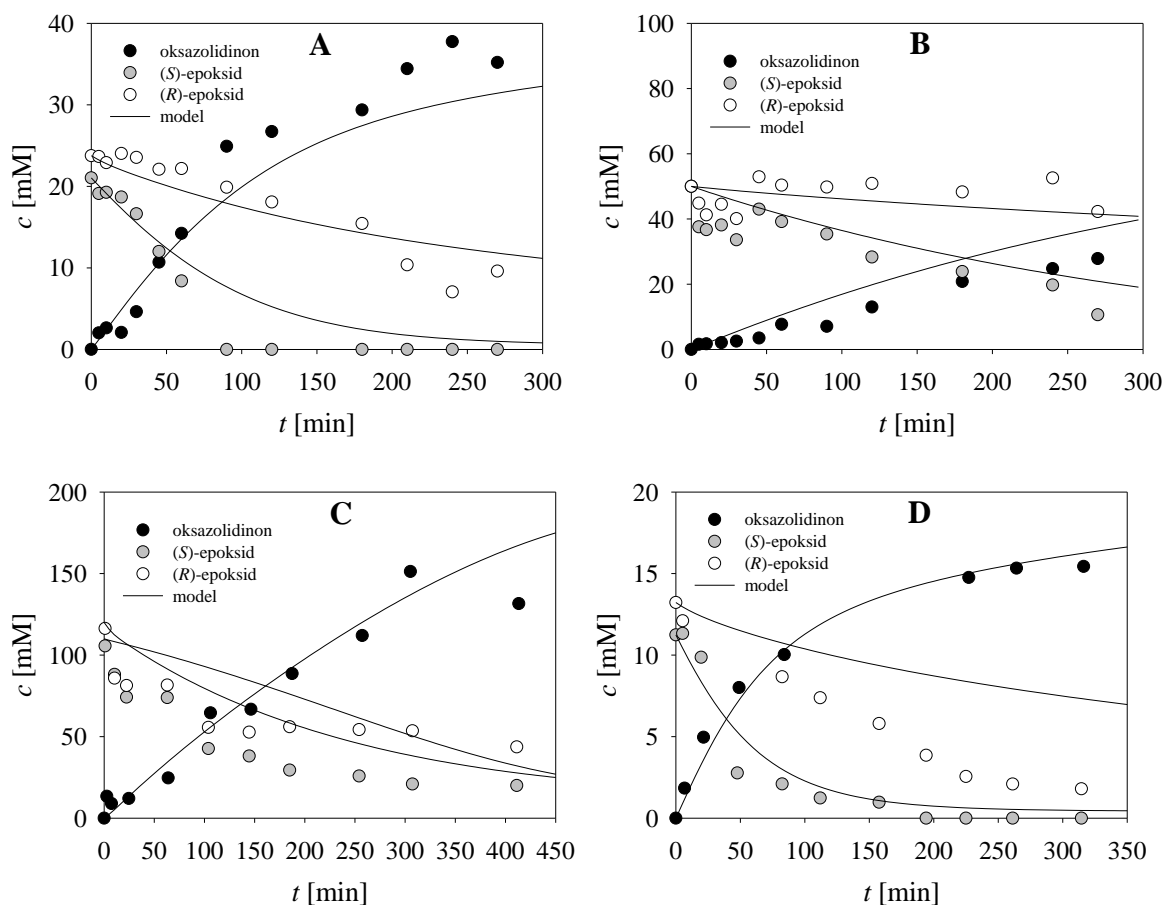
SLIKA 5.12. V-3: stabilnost enzima za vrijeme pokusa u KR (500 mM Tris-SO₄ pH 7, $T = 25$ °C, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 2,5$ mL, $c_{rac\text{-epoksid}} = 100$ mM, $c_{NaOCN} = 100$ mM, $\gamma_{HheC} = 0,40$ mg mL⁻¹)

Slike 5.10 i 5.11-A prikazuju eksperimente u sustavu s *rac*-epoksidom i cijanatnim ionima, odnosno eksperimente *i.* stupnja DKR. Početnim testiranjem uočena su odstupanja eksperimentalnih podataka od vrijednosti modela. Jedan od mogućih razloga odstupanja je inhibicija enzima. Pri određivanju kinetike *i.* stupnja DKR ispitane su sve potencijalne inhibicije osim inhibicija reakcija suprotnim enantiomerom. Iz tog razloga ove inhibicije su pretpostavljene, a parametri procijenjeni iz eksperimentalnih podataka u reaktoru gdje su bile poznate koncentracije pojedinih enantiomera epoksida. Za inhibiciju (*S*)-epoksida suprotnim enantiomerom u *i.* stupnju DKR dobivena je vrijednost $K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}} = 0,154$ mM, a za inhibiciju (*R*)-epoksida $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}} = 8,391$ mM. Model uz dodane vrijednosti procijenjenih konstanti inhibicije pokazuje vrlo zadovoljavajuće slaganje s eksperimentalnim podacima u validacijama V-1 i V-2.

U eksperimentima V-2 (slika 5.11-B) i V-3 (slika 5.12) praćena je stabilnost enzima. Specifična aktivnost enzima ostala je nepromijenjena, odnosno potvrđeno je da je enzim stabilan u vremenu od 4 h. Dodatno, u eksperimentu V-2 enzim je ostavljen u reakcijskoj smjesi po završetku reakcije te je aktivnost izmjerena nakon 24 h. Kako niti u tom vremenskom periodu ne dolazi do deaktivacije enzima, može se zaključiti da je HheC vrlo stabilan te se time otvara mogućnost njegovog višestrukog korištenja.

Slika 5.13 prikazuje eksperimente u sustavu s *rac*-epoksidom, cijanatnim i bromidnim ionima, odnosno eksperimente sustava DKR. Kao i u prethodnom slučaju, početna odstupanja eksperimentalnih podataka od modela navode na pretpostavku da postoji inhibicija enzima suprotnim enantiomerom epoksida. Uz dodane procijenjene konstante inhibicija iz *i.* stupnja te uz novu konstantu inhibicije (*S*)-epoksida suprotnim

enantiomerom u *ii.* stupnju DKR ($K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}} = 0,012 \text{ mM}$) model pokazuje zadovoljavajuće slaganje s eksperimentalnim podacima, uz slučaj da u eksperimentu V-7 (slika 5.13-D) model predviđa nešto sporiju potrošnju (*R*)-epoksida, čemu može biti razlog i analitička eksperimentalna pogreška.



SLIKA 5.13. Dobivanje oksazolidinona iz *rac*-epoksida u KR (500 mM Tris-SO₄ pH 7, $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$, 1000 okr min⁻¹, $V_r = 2,5 \text{ mL}$, $\gamma_{\text{HHeC}} = 0,25 \text{ mg mL}^{-1}$) praćeno na kiralnoj i akiralnoj koloni: **A.** V-4: $c_{\text{rac-epoksid}} = 40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaOCN}} = 40 \text{ mM}$, $c_{\text{NaBr}} = 1 \text{ mM}$, **B.** V-5: $c_{\text{rac-epoksid}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{NaOCN}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{NaBr}} = 10 \text{ mM}$, **C.** V-6: $c_{\text{rac-epoksid}} = 200 \text{ mM}$, $c_{\text{NaOCN}} = 200 \text{ mM}$, $c_{\text{NaBr}} = 5 \text{ mM}$, **D.** V-7: $c_{\text{rac-epoksid}} = 20 \text{ mM}$, $c_{\text{NaOCN}} = 20 \text{ mM}$, $c_{\text{NaBr}} = 1 \text{ mM}$

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu razvijen je i validiran cjeloviti matematički model višestupnjevite DKR 2-bromometil-2-metil-oksirana katalizirane HheC enzimom za dobivanje produkta (*S*)-5-bromometil-5-metiloksazolidin-2-ona.

U *i.* stupnju DKR uočen je različit afinitet enzima prema enantiomerima. S obzirom na (*S*)-epoksid utvrđeno je da supstrati prate Michaelis-Menteničinu kinetiku ($K_{m1}^{(S)\text{-epoksid}} = 0,0611 \text{ mM}$, $K_{m1}^{\text{NaOCN}} = 1,036 \text{ mM}$) uz inhibicijski učinak (*S*)-epoksida na enzim pri koncentracijama višim od 10 mM ($K_{i1}^{(S)\text{-epoksid}} = 248,140 \text{ mM}$). U slučaju (*R*)-epoksida on prati kinetiku 1. reda ($k_2 = 0,041 \text{ mM}$), a cijanatni ioni Michaelis-Menteničinu kinetiku ($K_{m2}^{\text{NaOCN}} = 29,030 \text{ mM}$). Bromidni ioni u oba slučaja pokazuju inhibicijski učinak na enzim koji je izraženiji u slučaju (*R*)-epoksida ($K_{i1}^{\text{NaBr}} = 0,129 \text{ mM}$, $K_{i2}^{\text{NaBr}} = 0,371 \text{ mM}$). Suprotni enantiomeri epoksida također se međusobno inhibiraju, pri čemu je inhibicija (*S*)-epoksida znatno izraženija ($K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}} = 0,154 \text{ mM}$, $K_{i2}^{(S)\text{-epoksid}} = 8,391 \text{ mM}$). U *i.* stupnju DKR može se zaključiti da je za preferirano nastajanje (*S*)-oksazolidinona reakciju potrebno provoditi pri koncentracijama *rac*-epoksida nižim ili jednakim 20 mM. Radi se o koncentracijama koje su dovoljno niske da pri njima (*S*)-epoksid ne pokazuje svojstvo inhibicije supstratom, a brzina nastajanja (*R*)-oksazolidinona je niska.

U *ii.* stupnju DKR oba enantiomera epoksida prate kinetiku 1. reda ($k_3 = 0,077 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$, $k_4 = 0,030 \text{ U mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$), a bromidni ioni Michaelis-Menteničinu kinetiku ($K_{m3}^{\text{NaBr}} = 0,038 \text{ mM}$, $K_{m4}^{\text{NaBr}} = 1,630 \text{ mM}$). U slučaju (*S*)-epoksida prisutne su inhibicija bromidnim ionima ($K_{i3}^{\text{NaBr}} = 6,533 \text{ mM}$), cijanatnim ionima ($K_{i3}^{\text{NaOCN}} = 0,0071 \text{ mM}$) te suprotnim enantiomerom ($K_{i3}^{(R)\text{-epoksid}} = 0,012 \text{ mM}$). Budući da je afinitet enzima prema bromidnim ionima vrlo visok, u reaktor je potrebno dodati malu količinu bromidnih iona za željeni ishod reakcije. Štoviše, visoke koncentracije bromidnih iona u slučaju (*S*)-epoksida inhibiraju reakciju. Ta činjenica ide u prilog provođenju DKR, budući da bromidni ioni u *i.* stupnju inhibiraju reakciju između (*S*)-epoksida i cijanatnih iona.

Otkriveno je da je reakcija zatvaranja dibromoalkohola odnosno *iii.* stupanj DKR spontan kemijski proces pri kojem *rac*-epoksid nastaje prema kinetici 1. reda ($k_5 = 0,036 \text{ min}^{-1}$).

Iz objedinjenih rezultata kinetičkih ispitivanja proizlazi zaključak da je za željeni ishod reakciju potrebno provoditi pri niskim koncentracijama *rac*-epoksida, radi inhibicije

supstratom (*S*)-epoksidom u *i.* stupnju, te niskim koncentracijama bromidnih iona, koje su dovoljne za provođenje *ii.* stupnja i ne inhibiraju enzim u *i.* stupnju. U eksperimentima validacije model je pokazao zadovoljavajuće slaganje s eksperimentalnim vrijednostima, pri čemu je potvrđeno predviđanje optimalnih uvjeta za potpunu konverziju (*S*)-epoksida i dobivnje produkta (*S*)-oksazolidinona visoke čistoće.

7. POPIS POKRATA I SIMBOLA

A – apsorbancija, /

API – aktivna farmaceutska tvar (engl. *active pharmaceutical ingredient*)

ATP – adenzin-trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)

BSA – albumin goveđeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

c – množinska koncentracija, mmol dm⁻³

d – debljina kvarcne kivete, cm

DCM – diklormetan (engl. *dichloromethane*)

DKR – dinamička kinetička rezolucija

DMSO – dimetil sulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

E – enantiomerni omjer, %

E – enzim

E_a – energija aktivacije, kJ

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

ES[‡] – kompleks enzim-supstrat

EtOAc – etil-acetat

EtOH – etanol

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

G – Gibbsova slobodna energija, kJ

GC – plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*)

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

HheC – C tip halogenhidrin dehalogenaze

IRB – Institut „Ruđer Bošković“

IUBMB – Internacionalna unija za biokemiju i molekularnu biologiju (engl. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*)

k_1, k_2, k_3 – konstante brzine reakcija formacije i disocijacije kompleksa enzim-supstrat te nastajanja produkta, min^{-1}

k_d – konstanta deaktivacije, min^{-1}

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

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

KR – kotlasti reaktor

m – masa, g

M_r – molarna masa komponente, g mol^{-1}

MRSA – meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus*

MTBE – metil *tert*-butil eter

MWCO – granična molekulska masa komponente (engl. *molecular weight cut-off*), g mol^{-1}

n – množina tvari, mol

P – produkt

PC – osobno računalo (engl. *personal computer*)

pH – negativan logaritam aktiviteta vodikovih iona

PNSHH – 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanol

R^2 – koeficijent linearne regresije

rac-epoksid – racemična smjesa epoksida

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

S – supstrat

S.A. – specifična aktivnost, U mg^{-1}

T – temperatura, $^{\circ}\text{C}$

t – vrijeme, s

$t_{1/2}$ – vrijeme poluživota, min

TO – temeljna otopina

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

Tris-SO₄ – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer

Trizma® – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol

U – jedinica enzimatske aktivnosti

UV zračenje – ultraljubičasto zračenje (engl. *ultraviolet radiation*)

V – volumen, cm³

V.A. – volumna aktivnost, U cm⁻³

V_m – maksimalna brzina enzimatske reakcije, mmol dm⁻³ min⁻¹

V_r – volumen reakcijske smjese, cm³

w_A – maseni udio komponente A, $w_A = \frac{m_A}{\sum m_i}$, %

X – konverzija, %

α – kut optičkog zakretanja, °

γ – masena koncentracija, mg dm⁻³

Δ – promjena

ε – ekstincijski koeficijent, mM⁻¹ cm⁻¹

λ – valna duljina, nm

σ – standardna devijacija, -

φ_A – volumni udio komponente A, $\varphi_A = \frac{V_A}{\sum V_i}$, %

8. LITERATURA

Arnold F. H., Renata H., Wang J., Expanding the Enzyme Universe: Accessing Non-Natural Reactions by Mechanism-Guided Directed Evolution, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **54** (11) (2015) 3351 – 3367.

Binod P., Palkhiwala P., Gaikawai R., Nampoothiri K. M., Duggal A., Dey K., Industrial Enzymes – Present Status and Future Perspectives for India, *J. Sci. Indust. Res.*, **72** (2013) 271 – 286.

Blamey J. M., Fischer F., Meyer H. P., Sarmiento F., Zinn M., Enzymatic Biocatalysis in Chemical Transformations: A Promising and Emerging Field in Green Chemistry Practice, u: Brahmachari G., *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, New York, Elsevier, (2017) 347–403.

Findrik Blažević Z., *Bioreakcijska tehnika I*, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2013.

Findrik Z., studij reakcija kataliziranih oksidazama aminokiselina, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2006.

Gomzi Z., *Kemijski reaktori*, Hinus, Zagreb, 2009, str. 7 – 30.

Gummadi S. N., *Biochemical Reaction Engineering*, u: R. Ravi, R. Vinu, S. N. Gummadi, *Coulson and Richardson's Chemical Engineering: Chemical and Biochemical Reactors and Reaction Engineering*, New York, Elsevier, (2017) 451 – 568.

Harvey D., *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, New York, 1996, str. 369 – 385, 563 – 577.

Hegyí G., Kardos J., Kovács M., Málnási-Csizmadia A., Nyitray L., Pál G., Radnai L., Reményi A., Venekei I., *Introduction to Practical Biochemistry*, ELTE TTK, Budimpešta, 2013, str. 121 – 139.

<http://www.halmed.hr> (pristup 17. travnja 2018.)

<https://www.agilent.com> (pristup 10. travnja 2018.)

<https://www.micromath.com> (pristup 12. srpanj 2018.)

<https://www.sigmaaldrich.com> (pristup 10. travnja 2018.)

Janssen D. B., Majerić Elenkov M., Tang L., Meetsma A., Hauer B., Formation of Enantiopure 5-Substituted Oxazolidinones through Enzyme-Catalysed Kinetic Resolution of Epoxides, *Org. Lett.*, **10** (12) (2008) 2417 – 2420.

Janssen D. B., Majerić-Elenkov M., Hasnaoui G., Hauer B., Lutje Spelberg J. H., Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases, *Biochem. Soc. T.*, **34** (2) (2006) 291 – 295.

Janssen D. B., van Hylckama Vlieg J. E. T., Tang L., Lutje Spelberg J. H., Smilda T., Poelarends G. J., Bosma T., van Merode A. E. J., Fraaije M. W., Halohydrin Dehalogenases are Structurally and Mechanistically Related to Short-chain Dehydrogenases/Reductases, *J. Bacteriol.*, **183** (17) (2001) 5058–5066.

Kim H. S., Choi J. M., Han S. S., Industrial Applications of Enzyme Biocatalysis: Current Status and Future Aspects, *Biotechnol. Adv.*, **33** (7) (2015) 1443 – 1454.

Langan P. A., Finding out How Enzymes Work, *Los Alamos. Sci.*, **30** (2006) 186–195.

Lebel H., Jacobsen E. N., Chromium catalyzed kinetic resolution of 2,2-disubstituted epoxides, *Tetrahedron Lett.*, **40** (41) (1999) 7303 – 7306.

Liu S., Enzymes, u: Liu S., *Bioprocess Engineering: Kinetics, Sustainability and Reactor Design*, New York, Elsevier, (2016) 297 – 373.

Lutje Spelberg J. H., de Vries E. J., Hydrolysis and Formation of Epoxides, u Drauz, K., Gröger H., May O.; *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, New York, John Wiley & Sons, 1 (2012) 363 – 411.

Lutje Spelberg J. H., Tang L., van Gelder M., Kellogg R. M. , Janssen D. B.; Exploration of the Biocatalytic Potential of a Halohydrin Dehalogenase Using Chromogenic Substrates, *Tetrahedron Asymmetry*, **13** (2012a) 1083–1089.

Majerić Elenkov M., Mikleušević A., Hamersak Z., Salopek-Sondi B., Tang L., Janssen D. B., Oxazolidinone Synthesis through Halohydrin Dehalogenase-Catalyzed Dynamic Kinetic Resolution, *Adv. Synth. Catal.*, **357** (8) (2015) 1709 – 1714.

Mikleušević A.; Enantioselectivna sinteza optički aktivnih 2-oksazolidinona i alkohola katalizirana halogenhidrin-dehalogenazama, *Doktorski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu*, 2016.

Nakano K., Nozaki K., Polymerization of Epoxides, u: Mingos D. M. P., Crabtree R. H., Comprehensive Organometallic Chemistry III: From Fundamentals to Applications, New York, Elsevier, **11** (2007) 595 – 621.

Nestl B. M., Nebel B. A., Hauer B., Recent progress in industrial biocatalysis, Curr. Opin. Chem. Biol., **15** (2011) 187 – 193.

Palmer T., Bonner P. L., Enzymes, Elsevier, New York, 2011, str. 2 – 13.

Patel A. K., Singhanian R. R., Pandey A., Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes, u: G. Brahmachari, Biotechnology of Microbial Enzymes, New York, Elsevier, (2016) 13 – 41.

Patel R. N., Bristol-Myers Squibb: Preparation of Chiral Intermediates for the Development of Drugs and APIs, u: Gonzalo G., María P. D., Biocatalysis: An Industrial Perspective, London, Royal Society of Chemistry, (2018) 125 – 167.

Pham-Huy C., Nguyen L. A., Hua H., Chiral Drugs: An Overview, Int. J. Biomed. Sci., **2** (2) (2006) 85 – 100.

Roskoski R.; Enzyme Structure and Function, u: Enna S. J., Bylund D. B., xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, New York, Elsevier, (2007) 1 – 7.

Roskoski R.; Michaelis-Menten kinetics, u: Enna S. J., Bylund D. B., xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, New York, Elsevier, (2007a) 1 – 10.

Rucker R.B, Chohanadisai W.; Coenzymes and Cofactors, u: Caballero B., Finglas P. M., Toldrá F., Food Science Encyclopedia of Food and Health, New York, Elsevier, (2016) 206 – 224.

Sanchez S., Demain A.L.; Useful Microbial Enzymes – An Introduction, u: Demain, A. L., Adrio, J. L., Biotechnology of Microbial Enzymes, Amsterdam, Elsevier, (2017) 1–11.

Sargent R. G., Verification and Validation of Simulation Models, Winter Simulation Conference, Orlando, Florida, 2005, 130 – 143.

Schallmey A., Schallmey M., Recent Advances on Halohydrin Dehalogenases – From Enzyme Identification to Novel Biocatalytic Applications, Appl. Microbiol. Biotechnol., **100** (2016) 7827 – 7839.

Schallmey M., Tarabion C., Tang L., Postema C.; Production and Isolation of Halohydrin Dehalogenases; Protokol; Biotransformation and Biocatalysis, Sveučilište u Groningenu; 2008.

Sharghi H., Eskandari M. M., Conversion of Epoxides into Halohydrins With Elemental Halogen Catalyzed By Thiourea, *Tetrahedron*, **59 (43)** (2003) 8509 – 8514.

Sharma, R.; Enzyme Inhibition and Bioapplications, InTech, Rijeka, 2012, str. 3 – 5.

Singla R. K., Pandit N., Shrivastava B.; Current Updates on Oxazolidinone and Its Significance, *Int. J. Med. Chem.*, (2012) 1 – 24.

Solomons T. W. G., Fryhle C. B., Snyder S. A., *Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 2013, str. 191 – 239.

Suzuki H.; *How Enzymes Work: From Structure to Function*, Taylor & Francis, Boca Raton, 2015, str. 1–46.

Šinko G.; Preparations and Biological Properties of Chiral Compounds, *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, **56** (2005) 351 – 361.

Tang L., Zhu X., Zheng H., Jiang R., Majerić Elenkov M., Key residues for controlling enantioselectivity of Halohydrin dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain AD2, revealed by structure-guided directed evolution, *Appl. Environ. Microbiol.*, **78 (8)** (2012) 2631 – 2637.

Vasić-Rački Đ., Findrik Z., Vrsalović Presečki A.; Modelling as a Tool of Enzyme Reaction Engineering for Enzyme Reactor Development, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **91** (2011) 845 – 856.

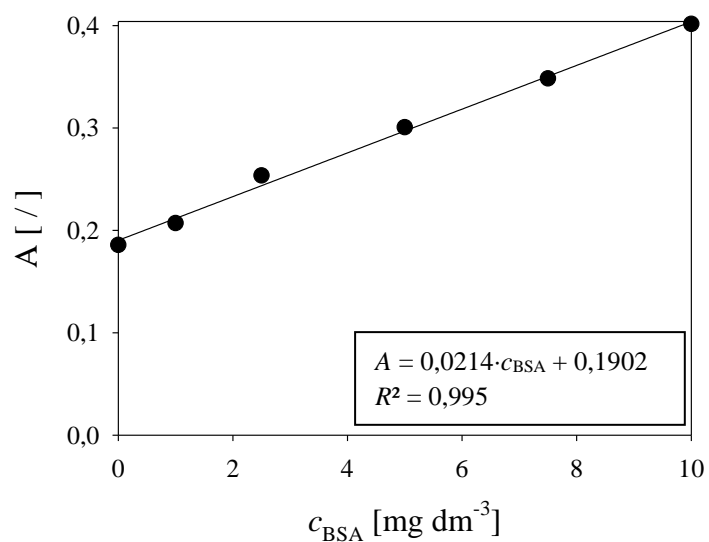
Venuvanalingama P., Senthilnathana D., Tamilmanib V.; Biocatalysis of azidolysis of epoxides: Computational evidences on the role of halohydrin dehalogenase (HheC), *J. Chem. Sci.*, **123 (3)** (2011) 279 – 290.

Wohlgemuth R.; Biocatalysis – key to sustainable industrial chemistry, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **21** (2010) 713 – 724.

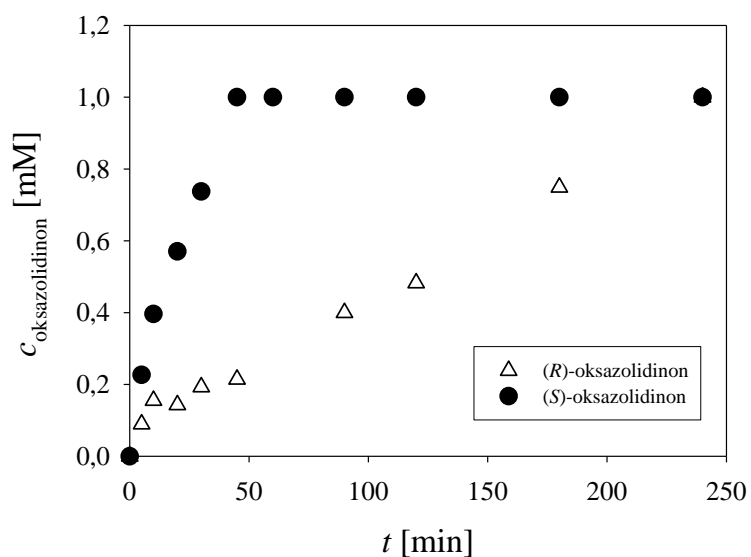
Yoshino M., Murakami K.; Analysis of the substrate inhibition of complete and partial types, *SpringerPlus*, **4** (2015) 292 – 300.

9. PRILOZI

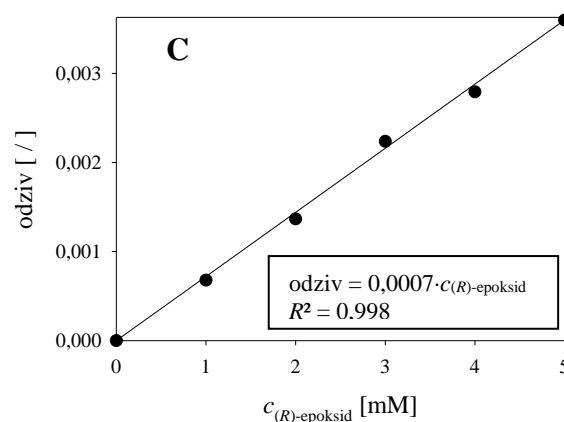
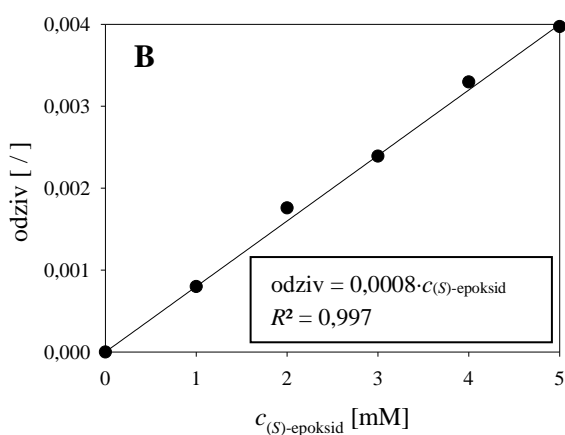
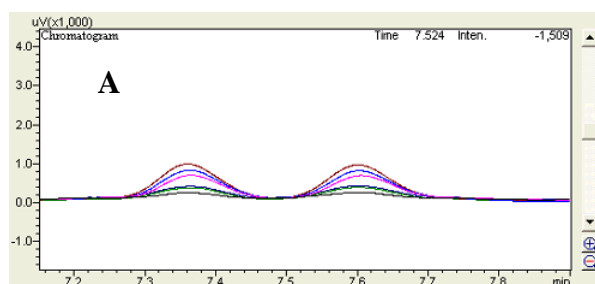
PRILOG 1. Baždarni pravac metode po Bradfordu



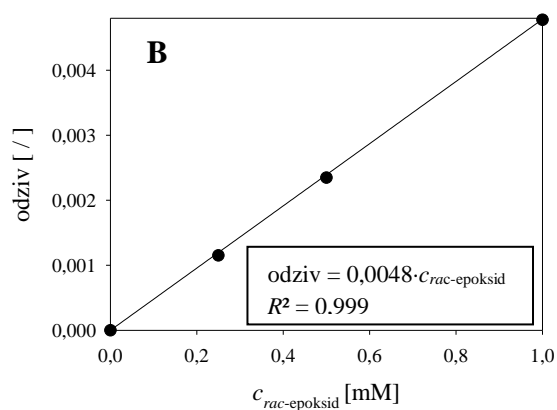
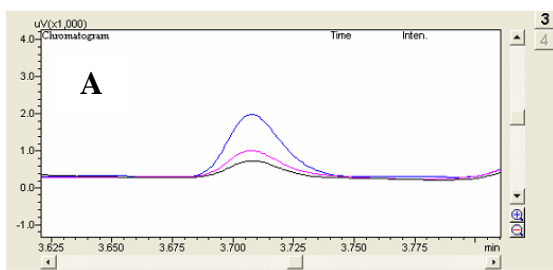
PRILOG 2. Rezultat preliminarog pokusa praćenog na Alpha-DEX koloni



PRILOG 3. A. Kromatogram i baždarni pravci za GC analizu **B.** (S)-epoksida i **C.** (R)-epoksida na Alpha-DEX koloni

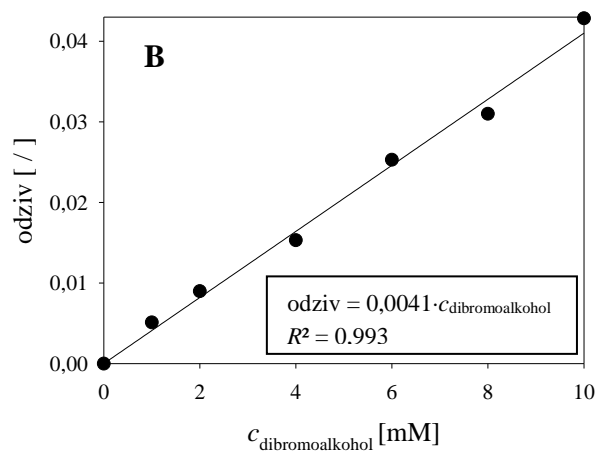
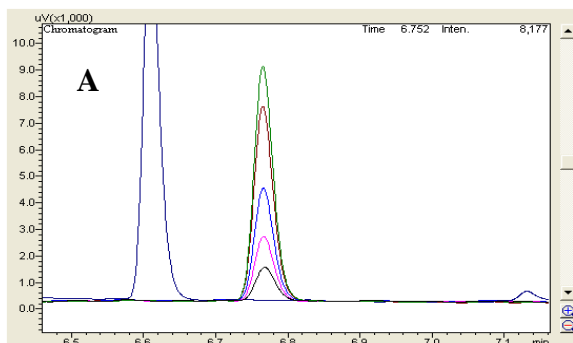


PRILOG 4. A. Kromatogram i **B.** baždarni pravac za GC analizu *rac*-epoksida na HP-5 koloni

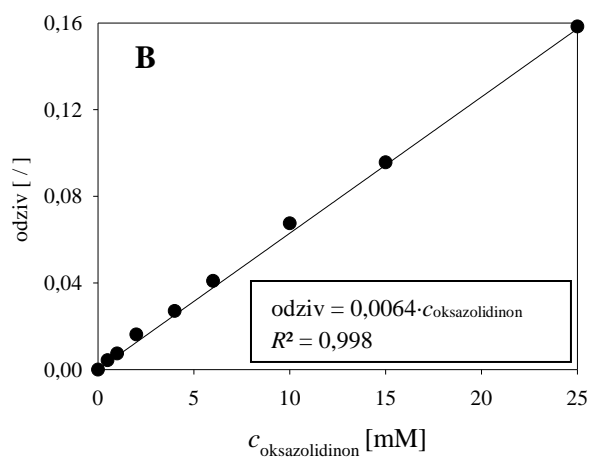
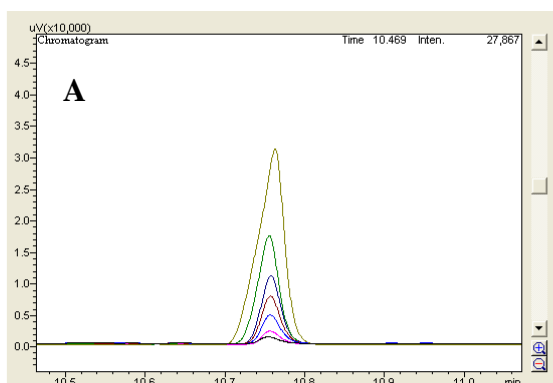


Napomena: pikovi za *rac*-epoksid pri višim koncentracijama pokazuju povlačenje (engl. *peak tailing*) stoga je baždarni pravac napravljen u rasponu koncentracija 0 – 1 mM, a uzorci iz reakcijske smjese razrjeđivani su kako bi upadali u mjerno područje pravca.

PRIOLOG 5. A. Kromatogram i **B.** baždarni pravac za GC analizu dibromoalkohola na HP-5 koloni



PRIOLOG 6. A. Kromatogram i **B.** baždarni pravac za GC analizu oksazolidinona na HP-5 koloni



10. ŽIVOTOPIS

Nevena Milčić [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje završila je u OŠ Petar Zrinski, a srednjoškolsko u Klasičnoj gimnaziji u Zagrebu. 2013. godine upisala je preddiplomski studij Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, koji je završila 2016. godine obranom završnog rada na temu *Utjecaj pH vrijednosti na veličinsku raspodjelu pora RO/NF membrana* te stekla titulu prvostupnice ekoinženjerstva uz pohvalu (*cum laude*). Iste godine u rujnu upisala je diplomski studij Ekoinženjerstvo. Akademskih godina 2014./2015. – 2016./2017. radila je kao demonstratorica na Zavodu za analitičku kemiju, godina 2015./2016. i 2016./2017. na Zavodu za fizikalnu kemiju, a zimski semestar 2017./2018. godine na Zavodu za industrijsku ekologiju. Dobitnica je Rektorove nagrade akademske godine 2016./2017. za individualan znanstveni rad pod nazivom *Oporaba kafilnerijske otpadne vode za navodnjavanje hibridnim postupkom koagulacije, pješčane filtracije i ultrafiltracije* te 2. nagrade za najbolji studentski rad na Sajmu ideja 2017. s posterskim priopćenjem istog naslova. Sudjelovala je u izradi predavanja *Primjena matematičkog modela u razvoju enzimatskog procesa* u sklopu *Prve radionice HDKI-HKD: Intelektualno vlasništvo i komercijalni pristup za novo eksperimentalno i tehnološko rješenje u organskoj kemiji*. Sudjelovala je na CEST 2017 konferenciji (Rhodos, Grčka) s posterskim priopćenjem pod naslovom *Wastewater reuse for irrigation by coagulation and ultrafiltration* te na Susretu mladih kemijskih inženjera 2017. s posterskim priopćenjem *Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije katalizirane halogenhidrin dehalogenazom*. Odradila je Erasmus+ stručnu praksu u razdoblju 01. travanj – 31. kolovoz 2018. u Katalonskom institutu za istraživanje voda (Girona, Španjolska). U razdoblju ožujak 2017. – ožujak 2018. vodila je Odbor za projekte Studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera i tehnologa. Akademske godine 2016./2017. primala je stipendiju Sveučilišta u Zagrebu za izvrsnost, a 2017./2018. Stipendiju Grada Zagreba u istoj kategoriji.