Matematički model aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru

Bohač, Mario

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:028058

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mario Bohač

MATEMATIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE DIHIDROKSIACETONA NA N-Cbz-GLICINAL U KOTLASTOM REAKTORU

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Zvjezdana Findrik Blažević

Članovi ispitne komisije: izv. prof. dr. sc. Zvjezdana Findrik Blažević
izv. prof. dr. sc. Ana Vrsalović Presečki
izv. prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2015.

Zahvaljujem se obitelji i prijateljima na svoj potpori, kolegici Anamariji na pomoći za vrijeme eksperimentalnog dijela u labosu, te posebno se zahvaljujem mentorici Zvjezdani Findrik Blažević na pomoći, usmjeravanju i pristupačnosti za vrijeme pisanja završnog rada i studiranja.

Sažetak

U radu je opisana reakcija aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru koja je katalizirana s D-fruktoza-6-fosfat aldolazom (FSA) dobivenom iz *E. coli*. Ispitana su tri potencijalna enzima kao katalizatora ove reakcije: FSA A129S, FSA A129S/A165G i FSA A129N. Odabran je enzim FSA A129N koji je dao najveću konverziju reaktanta u najkraćem vremenu u reakciji aldolne adicije. Kinetika ove reakcije je ispitana metodom početnih reakcijskih brzina. Ispitan je utjecaj komponenti reakcijskog sustava na početnu brzinu reakcije. Na temelju procijenjenih kinetičkih parametara i sheme reakcije razvijen je matematički model procesa u kotlastom reaktoru. U provedenim reakcijama aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru postignuta je maksimalna konverzija od 88%.

Ključne riječi: aldolna adicija, dihidroksiaceton, N-Cbz-glicinal, kotlasti reaktor, D-fruktoza-6-fosfat aldolaza

Abstract

This work deals with the reaction of aldol addition of dihydroxyacetone on N-Cbz-glycinal catalyzed by D-fructose-6-phosphate aldolase (an enzyme produced by *E. coli*) in the batch reactor. Three potential enymes were tested as catalysts for this reaction: FSA A129S, FSA A129S/A165G and FSA A129N. The chosen enzyme was the one that gave the best conversion in the shortest time in the reaction of aldol addition. The reaction kinetics were tested with the initial reaction rate method. The influence of the reaction components on the initial reaction rate is also presented in this work. The mathematical model of the process was developed on the basis of reaction scheme and estimated kinetic parameters. The maximum achieved conversion in the conducted experiments of aldol additions of dihydroxyacetone on N-Cbz-glycinal in the batch reactor was 88%.

Key words: aldol addition, dihydroxyacetone, N-Cbz-glicinal, batch reactor, D-fructose-6-phosphate aldolase

Sadržaj

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 2
2.1. Enzimi 2
2.2.1. Enzimska kinetika 3
2.2.2. Enzimska inhibicija 5
2.2. Matematički model 6
2.3. ALDOLAZE 6
2.3.1. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA; DHA ovisna aldolaza) 8
2.3.2. Aldolna adicija 8
3. EKSPERIMENTALNI DIO 9
3.1. APARATURA 9
3.1.1. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC) 9
3.1.2. Tresilica 10
3.1.3. Analitička vaga 10
3.1.4. Centrifuga 11
3.1.5. Inkubator 11
3.2. ANALITIČKE METODE 12
3.2.1. Mjerenje koncentracija reaktanata i produkata HPLC-om 12
3.3. ODŠTIĆIVANJE N-Cbz-GLICINALA 12
3.4. ODREĐIVANJE KINETIKE ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-CBZ-GLICINAL .. 13
3.4.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije 14
3.4.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije 15
3.4.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu reakcije aldolne adicije 15
3.5. ODREĐIVANJE KINETIKE RETRO-ALDOLNE REAKCIJE 16
3.5.1 Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije 16
3.5.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu retro-aldolne reakcije 16
3.5.3. Ispitivanje utjecaja DHA na početnu brzinu retro-aldolne reakcije 17
3.6. PROVEDBA EKSPERIMENTA U KOTLASTOM REAKTORU 17
4. MATEMATIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-CBZ-GLICINAL U KOTLASTOM REAKTORU 18
5. REZULTATI I RASPRAVA 19
5.1. ODABIR ENZIMA 19
5.2. ODREĐIVANJE KINETIKE ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-Cbz-GLICINAL ... 20

5.2.1. Ispitivanje utjecaja koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije 20
5.2.2. Ispitivanje utjecaja koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije 21
5.2.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu aldolne adicije 22
5.2.4. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije 23
5.2.5. Ispitivanje utjecaja koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu retro-aldolne reakcije 23
5.2.6. Ispitivanje utjecaja koncentracije DHA na početnu brzinu retro-aldolne reakcije 24
5.8. Procjena konstante inhibicije s N-Cbz-glicinalom u retroaldolnoj reakciji u kotlastom reaktoru 25
5.9. Validacija matematičkog modela aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru 26
6. ZAKLJUČAK 28
7. SIMBOLI 29
8. LITERATURA 30
9. PRILOG 32
10. ŽIVOTOPIS 34

1. UVOD

Uloga enzima u različitim procesima i reakcijama je poznata još od davnina. Njihovo korištenje je zabilježeno još u drevnoj Grčkoj gdje su se enzimima iz mikroorganizama služili u pekarstvu, proizvodnji sira, alkohola i procesu vrenja. Povećanjem znanja o enzimima i njihovom pročišćavanju povećale su se mogućnosti njihovog korištenja (Haki, Rashkit 2003). Upotreba enzima za potrebe biokatalize je danas vrlo uvriježena tehnika, pogotovo u farmaceutskoj industriji (Dodrick, Clark 2002).

Biokataliza se promovira kao čista, „zelena“ tehnologija koja ima potencijal da promjeni težište kemijske industrije iz petrokemijske u biokemijsku industriju (Tufvesson, Fu, Jensen, Woodley 2010). Interes za industrijsku biokatalizu i dalje raste, što nije čudno zbog sve veće integracije enzima u industrijske procese. Direktnom evolucijom i metaboličkim inženjerskim tehnologijama omogućena je proizvodnja stabilnih biokatalizatora s prilagodljivom aktivnošću i selektivnošću (Zaks 2001).

2. OPĆI DIO

2.1. Enzimi

Kemijske reakcije se odvijaju spontano, ili uz katalizator. Katalizatori su spojevi koji smanjuju energiju aktivacije, a iz reakcije izlaze nepromijenjeni. U idealnom slučaju katalizirana reakcija se odvija s istim katalizatorima sve dok ima supstrata koji bi se mogao pretvoriti u produkt. Ipak to nije moguće zbog kemijske stabilnosti katalizatora i kapaciteta za očuvanje svoje aktivne strukture u reakcijskim uvjetima (Illanes 2008).

Katalizatori koji sudjeluju u biokemijskim metaboličkim reakcijama živih organizama se zovu biokatalizatori, tj. enzimi. Enzimi su proteinske makromolekule koje su stvorene da bi funkcionirale u blagim uvjetima koje se nalaze unutar bioloških sustava. Enzimi su poželjni katalizatori zbog svoje specifičnosti, učinkovitosti, reakcijskih uvjeta u kojima djeluju, biorazgradivosti te svoje klasifikacije kao prirodnog produkta. Nedostatak im je visoka cijena i kompleksna struktura (Illanes 2008).

Upotreba enzima u farmaceutskoj industriji je danas potpuno uvriježena. Visoka selektivnost i jedinstvena katalitička aktivnost su kritične u pripravi mnogih analoga prirodnih spojeva. Najupotrebljeniji enzimi su lipaze koje su korištene u širokom spektru reakcija. Od esterifikacije, hidrolize pa do acilacije (Dodrick, Clark 2002).

U mnogim slučajevima biokataliza omogućuje prednosti naspram kemijske katalize zbog različitih stereoselektivnih i regioselektivnih transformacija u uvjetima sobne temperature i atmosferskog tlaka (Patel 2007).

Kod naziva enzima postoje četiri broja. Ti brojevi označavaju vrstu enzima, vrstu kemijske grupe i same kemijske grupe na koju enzim djeluje i korelacijski broj za preciznije imenovanje.

Enzime dijelimo na šest skupina ovisno o tipu kemijske reakcije koju kataliziraju:

1. Oksidoreduktaze kataliziraju redoks reakcije, odnosno sudjeluju u prijenosu elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma. Ti enzimi sudjeluju u centralnim metaboličkim putevima unutar stanice.
2. Transferaze premještaju funkcionalnu grupu spoja s donora na prikladni akceptor i važan su dio staničnog metabolizma.
3. Hidrolaze kataliziraju reakciju hidrolize. Posebnost kod hidrolaza je ta što ne zahtijevaju koenzime i zbog svoje robustnosti podnose teške procesne uvjete.
4. Liaze kataliziraju reakcije nehidrolitičkih i neoksidativnih cijepanja kemijskih veza. Podijeljene su u 7 grupa, ovisno koju vezu cijepaju (C-C; C-O; C-N; C-S; C-X ; P-O).
5. Izomeraze kataliziraju reakcije pretvaranja supstrata u izomer.
6. Ligaze kataliziraju reakcije spajanja dvije molekula kovalentnom vezom. Iako su organizmima bitni što se tiče metabolizma trenutno nema tehnološke primjene ovog enzima zbog svoje kompleksnosti, nestabilnosti i visoke cijene (Illanes 2008).

Enzimi su katalizatori koji su zaslužni za stanični metabolizam i mogu biti proizvedeni iz svih živih organizama, ili ekstrakcijom iz stanica ili iz eksudata. Šezdesetih godina prošlog stoljeća 70% enzima je bilo ekstrahirano iz biljaka i životinja, a dvadeset godina kasnije do danas se većina enzima ekstrahira iz mikroorganizama (npr. *E. coli*) (Illianes 2008).

2.2.1. Enzimska kinetika

Enzimska kinetika proučava brzinu reakcija koje se odvijaju pomoću enzima. Najjednostavniji primjer enzimske reakcije je primjer konverzije reaktanta (A) u produkt (P) pomoću enzima (E) (jed.2.1).

$$\mathrm{A} + \mathrm{E} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} \mathrm{EA} \xrightarrow{k_2} \mathrm{E} + \mathrm{P} \tag{2.1}$$

$$\frac{\mathrm{d}[\mathrm{A}]}{\mathrm{d}t} = -k_1[\mathrm{A}][\mathrm{E}] + k_{-1}[\mathrm{EA}] \tag{2.2}$$

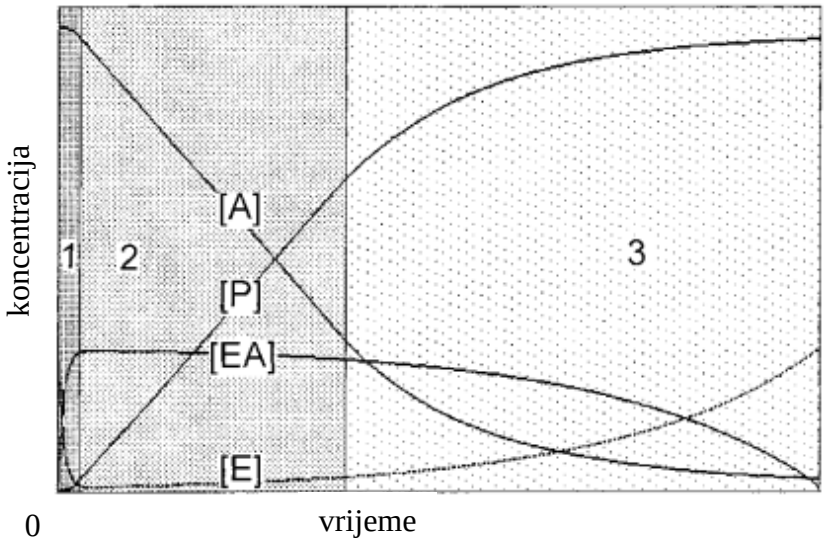
$$\frac{\mathrm{d}[\mathrm{E}]}{\mathrm{d}t} = -k_1[\mathrm{A}][\mathrm{E}] + (k_{-1} + k_2)[\mathrm{EA}] \tag{2.3}$$

$$\frac{\mathrm{d}[\mathrm{EA}]}{\mathrm{d}t} = k_1[\mathrm{A}][\mathrm{E}] - (k_{-1} + k_2)[\mathrm{EA}] \tag{2.4}$$

$$\frac{\mathrm{d}[\mathrm{P}]}{\mathrm{d}t} = k_2[\mathrm{EA}] = r \tag{2.5}$$

U jednadžbama (2.2)-(2.5) je prikazana vremenska ovisnost, odnosno promjena koncentracija reakcijskih komponenata (supstrata A, enzima E, kompleksa enzim-supstrat EA, produkta P) u vremenu. Brzina reakcije *r* je definirana promjenom koncentracije produkta P u vremenu, koja je proporcionalna koncentraciji kompleksa enzim-supstrat (jednadžba (2.5)).

Za rješavanje diferencijalnih jednadžbi, vremenski ovisne promjene koncentracija moraju biti poznate, što predstavlja velike probleme.



Slika 2.1. Promjene koncentracija reaktanta [A], produkta [P], enzima[E] i kompleksa enzim-supstrat [EA] u vremenu.

Reakcijski tijek se može podijeliti na tri dijela (Slika 2.1.):

- Prvi dio: Nakon kratkog perioda nastaje kompleks enzim-supstrat i smanjuje se koncentracija slobodnog enzima.
- Drugi dio: Karakterizira ga najveća brzina reakcije i skoro konstantna koncentracija kompleksa enzim-supstrat.
- Treći dio: Zadnji dio karakterizira raspad kompleksa enzim-supstrat što je uzrokovano smanjenjem suviška supstrata i brzine reakcije sve do 0.

Za pojednostavljenje izvoda za enzimsku kinetiku pretpostavljeno je da uvijek isti enzimi sudjeluju u reakciji te da nema njihovog raspada (isti broj molekula enzima unutar sustava; stacionarno stanje)

$$k_1[\mathrm{A}][\mathrm{E}] = (k_{-1} + k_2)[\mathrm{EA}] \tag{2.6}$$

$$[\mathrm{E}]_0 = [\mathrm{E}] + [\mathrm{EA}] \tag{2.7}$$

$$[\mathrm{EA}] = \frac{k_1[\mathrm{A}][\mathrm{E}]_0}{k_1[\mathrm{A}] + k_{-1} + k_2} \tag{2.8}$$

$$r = \frac{\mathrm{d}[\mathrm{P}]}{\mathrm{d}t} = k_2[\mathrm{EA}] = \frac{k_2[\mathrm{A}][\mathrm{E}]_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + [\mathrm{A}]} = \frac{V_m[\mathrm{A}]}{K_m + [\mathrm{A}]} \tag{2.9}$$

Jednadžba (2.6) se dobije izjednačavanjem reakcijske brzine reakcije nastajanja kompleksa enzim-supstrat i njegovog raspada na supstrat i enzim, a jednadžba (2.7.) predstavlja ukupnu koncentraciju enzima E koju čine enzim E koji će reagirati sa supstratom A i enzim koji se nalazi u enzim-supstrat kompleksu EA. Jednadžba (2.8) služi za izračunavanje koncentracije kompleksa enzim-supstrat. Brzina reakcije, odnosno promjena koncentracije produkta po jedinici vremena je prikazana u jednadžbi (2.9). Ona je dobivena međusobnim uvrštavanjem prijašnjih jednadžbi. Iz jednadžbe (2.9.) je dobivena Michaelis-Menteničina jednadžba zajedno s dvije konstante, V_m i K_m. Konstanta V_m označava maksimalnu brzinu reakcije, a konstanta K_m označava koncentraciju supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne (V_m) (Bisswanger 2002).

2.2.2. Enzimska inhibicija

Enzimska inhibicija je definirana kao negativni učinak liganda (inhibitora) na aktivnost enzima. Ligandi inhibiraju enzime vežući se na njihove katalitičke aktivne centre i time ometaju njihovu sposobnost sudjelovanja u katalizi.

Ovisno o tome da li se inhibitori mogu odvojiti od enzima razlikujemo reverzibilnu i ireverzibilnu inhibiciju (Bisswanger 2002).

2.2. Matematički model

Matematički model se može definirati kao skup matematičkih relacija koje opisuju ili definiraju veze između pojedinih fizičkih veličina u promatranom procesu (dimenzije uređaja, svojstva tvari, kinetički parametri, protoci, itd.) (Gomzi 2009).

Cilj pri razvoju matematičkog modela je da matematički model bude što jednostavniji i točniji. Prije nego što se započne modeliranje mora se jasno definirati sustav koji se modelira ili promatra, moraju se definirati pretpostavke te procesi koji se odvijaju unutar sustava ili koje imaju direktan utjecaj na sustav. Osnova matematičkog modela je opći zakon očuvanja, a on glasi :

ULAZ – IZLAZ + GENERACIJA U SUSTAVU = AKUMULACIJA U SUSTAVU

Pri razvoju modela potrebno je definirati pojedine članove bilance tvari, podatke o fizičko-kemijskim karakteristikama tvari (gustoće, specifične topline, entalpije), opisati ravnoteže faza, opisati reakcijske ravnoteže te metode proračuna brzina prijenosa topline, mase, količine gibanja i kinetiku kemijskih reakcija.

Modeliranje se bazira na pretpostavkama. Pretpostavke su bazirane na iskustvu i teorijskom znanju i bitno je da su realistične do neke mjere (Gomzi 2009).

2.3. ALDOLAZE

Aldolne reakcije predstavljaju važan način formiranja veza između atoma ugljika u sintetskoj organskoj kemiji. Biokataliza pomoću aldolaze omogućuje provođenje stereoselektivnog i „zelenog“ postupka dobivanja određenog produkta.

Aldolaze su se pokazale kao važni biokatalizatori pri dobivanju različitih važnih tipova molekulskih struktura kao što su kiralni kompleksi, bioaktivni spojevi (ugljikohidrati, aminokiseline itd.) (Clapés, Fessner 2011).

Aldolaze kataliziraju reverzibilno nastajanje C-C veza aldolnom adicijom nukleofilnog donora (često keto-enolat) na elektrofilni aldehidni akceptor (Clapés, Fessner 2011).

Temeljem mehanizma katalize, aldolaze se dijele u dvije skupine: Klasa I aldolaze koju obilježava formiranje Schiffove baze na aktivnom mjestu enzima kao intermedijer u reakciji. Klasa II aldolaze kojoj se dvovalentni metalni kofaktor (uglavnom Zn^{2+}, ponekad i Cu^{2+} i Fe^{2+}) dovodi do aktivnog mjesta enzima. Metalni se kation ponaša kao Lewisova kiselina i aktivira supstrat, karbonilni donor. Ova skupina aldolaza je često stabilnija od klasa I aldolaze (Ferrara 2011).

Aldolaze spadaju u specifičnu grupu liaza i često koriste širok raspon aldehida kao elektrofilne akceptore, ali donorski spoj je često strukturalno nepromjenjiv. Stoga se aldolaze mogu i klasificirati prema njihovoj donorskoj specifičnosti i djelimo ih na:

1. Dihidroksiacetonfosfat (DHAP) ovisne aldolaze koje kataliziraju *in vivo* reverzibilnu asimetričnu adiciju DHAP. Ovi enzimi su vrlo specifični što se tiče donorskog supstrata, ali prihvaćaju širok raspon aldehida kao akceptora,
2. Piruvat i fosfoenolpiruvat (PEP) ovisne aldolaze koje kataliziraju aldolnu adiciju piruvata ili PEP i različitih aldehida dajući nove spojeve s novim stereogenim centrom,
3. 2-deoksi-D-riboza-5-fosfatnu (DERA) ovisnu aldolazu koja *in vivo* katalizira reverzibilnu aldolnu adiciju acetaldehida na D-gliceraldehid-3-fosfat
4. Glicin ovisnu aldolazu koja uz kofaktor piridoksal-5-fosfat katalizira aldolnu adiciju glicina na različite aldehidne akceptore (Illanes 2008).

Većina organizama proizvodi aldolaze i poznato ih je više od 30. Aldolaze klase I se nalaze većinom u eukariotima, te u nekim prokariotima, a aldolaze klase II se nalaze u prokariotima i nižim eukariotima. DHAP ovisne aldolaze predstavljaju najvažniju grupu što se tiče biokatalitičkih primjena. Klasa I fruktoza-1,6-bifosfat ovisna aldolaza, koja je dobivena ekstrakcijom iz zečjih mišića, je najproučavanija aldolaza zbog njene komercijalne upotrebe. Pronađeno je da su neke DHAP ovisne aldolaze pogodne za sintetizu unutar mikroorganizmima, te se stoga često proizvode u rekombinantnoj *E. coli*. U protočno kotlastim bioreaktorima s visokom gustoćom mikroorganizama je moguće ostvariti veliku proizvodnju enzima. Nakon što prestane rast biomase, ona se izdvaja iz bioreaktora centrifugiranjem. Izdvajanjem stanica koje sadrže enzime nastupa njihovo razbijanje mehaničkim ili ultrazvučnim tehnikama, nakon čega slijedi pročišćavanje enzima (Illanes 2008).

Aldolaze se ponekad imobiliziraju čime se mogu stabilizirati te se može povećati raspon njihove upotrebe. Naime, imobilizacija potpomaže ponovno korištenje enzima i procese izolacije produkta. Iako je ta tehnika dostupna već trideset godina, malo je literature na raspolaganju o imobilizaciji aldolaza. Kod nekih enzima imobilizacija uzrokuje potpunu deaktivaciju enzima, a kod nekih samo smanjuje aktivnost (Illanes 208).

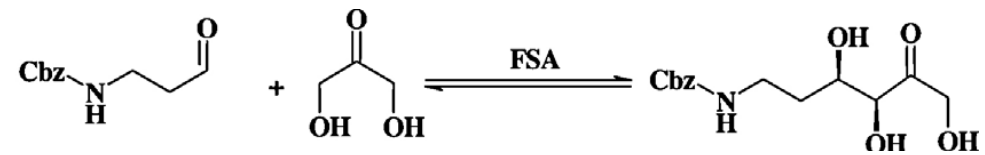
2.3.1. D-fruktoza-6-fosfat aldolaza (FSA; DHA ovisna aldolaza)

Jedan od nedostataka dihidroksiacetonfosfat (DHAP) ovisne aldolaze je njezina stroga specifičnost prema donorskom spoju i česta potreba za uklanjanjem fosfora iz produkta što rezultira povećanim troškovima. Otkriće dihidroksifosfat (DHA) ovisne aldolaze 2001. (Schürmann, Sprenger 2001) koja prihvaća nefosforilirani DHA kao donor je donijelo mnoga pojednostavljenja proizvodnog procesa.

FSA pripada u klasu I aldolaza, a dobivena je iz genetski modificirane *E. coli*. FSA se u korištenju prikazala kao robustan i koristan biokatalizator s velikim potencijalom za visoku stereoselektivnost pri aldolnim adicijama dihidroksiacetona, hidroksiacetona na velik broj aldehida (Clapés et al. 2010, Sudar et al. 2013).

2.3.2. Aldolna adicija

Aldolna adicija je jedna od metoda za formiranje C-C veza (Sudar et al. 2013). Reakcija se svodi na reakciju adicije molekula ketona na aldehid. Preferirani način izvođenja ove reakcije je pomoću enzima (slika 2.2.).



N-Cbz-3-aminopropanal dihidroksiaceton aldol

Slika 2.2. Reakcijska shema aldolne adicije DHA na N-Cbz-3-aminopropanal.

Smanjenjem temperature reakcijskog sustava, iskorištavanjem različitih temperaturnih ovisnosti reakcija nastalih kao posljedica različitih energija aktivacija i korištenjem suviška aldehida (da bi se proces usmjeravao prema sintezi), može se povećati konverzija i selektivnost enzima u aldolnoj adiciji. Za aldolaze je optimalna reakcijska temperatura u intervalu od 20-40°C. Što se tiče reakcija kataliziranih DHAP ovisnim enzimom smanjenjem temperature za 4°C, eliminira se kemijski raspad tog enzima, što rezultira povećanjem konverzije (Illanes 2008).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. APARATURA

3.1.1. Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Koncentracije uzoraka supstrata i produkata određivane su pomoću HPLC-a s UV detektorom. Uređaj proizvođača Shimadzu je prikazan na Slici 3.1.



Slika 3.1. HPLC proizvođača *Shimadzu.*

3.1.2. Tresilica

Svi eksperimenti su provedeni na tresilici *Biosan Multi-Vortex V-32* prikazanoj na Slici 3.2.



Slika 3.2. Tresilica *Biosan Multi-Vortex V-32.*

3.1.3. Analitička vaga

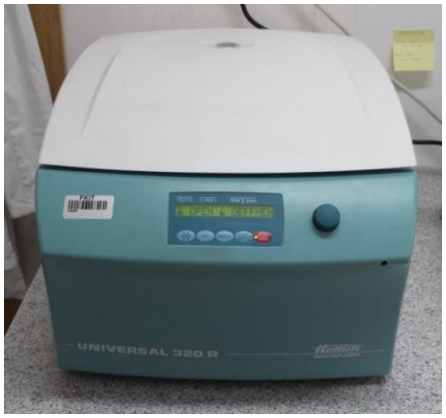
Sve odvage potrebne za provođenje eksperimenata su izvagane na analitičkoj vagi *Shimadzu* prikazanoj na slici 3.3.



Slika 3.3. Analitička vaga *Shimadzu.*

3.1.4. Centrifuga

Za centrifugiranje, odnosno odvajanje reakcijske smjese od enzima, je korištena centrifuga *Hettich Zentrifugen Universal 320R* prikazana na slici 3.4.



Slika 3.4. Centrifuga *Hettich Zentrifugen Universal 320R.*

3.1.5. Inkubator

Za odštićivanje N-Cbz-glicinala je korišten inkubator *MRC Orbital Shaker incubator* koji je prikazan na slici 3.5.



Slika 3.5. Inkubator *MRC Orbital Shaker incubator.*

3.2. ANALITIČKE METODE

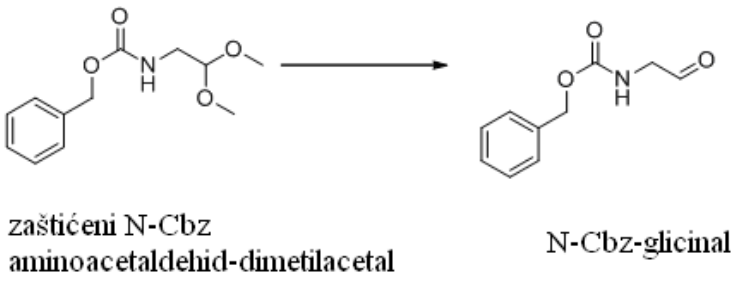
3.2.1. Mjerenje koncentracija reaktanata i produkata HPLC-om

Mjerenje koncentracija N-Cbz-glicinala i aldola provedeno je kapljevinskom kromatografijom visokog učinka pri temperaturi od 25°C. Za potrebe analize je korištena kolona LiChrospher 100, RP-18 (5µm) 250 x 4, mobilne faze A koju je činila redestilirana voda s dodatkom TFA (0.1 % v/v) i mobilne faze B od 80 % acetonitrila, 20 % vode i 0,095 % TFA. Korištena je izokratna metoda analize sa sastavom eluenta 66 % faze A i 34 % faze B pri protoku 1,2 mL/min.

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

Uzorci za analizu HPLC-om su razrjeđivani s metanolom. Po potrebi su pripremana različita razrjeđenja od 10-1000 puta. Metanol je korišten za denaturiraciju enzima i zaustavljanje reakcije. Uzorci su zatim centrifugirani 2 minute pri temperaturi 4 °C i 14000 okr/min pri čemu je enzim istaložen na dnu kivete. Gornji sloj je korišten za analizu na HPLC-u.

3.3. ODŠTIĆIVANJE N-Cbz-GLICINALA



Slika 3.6. Reakcija shema odštićivanja N-Cbz-glicinala

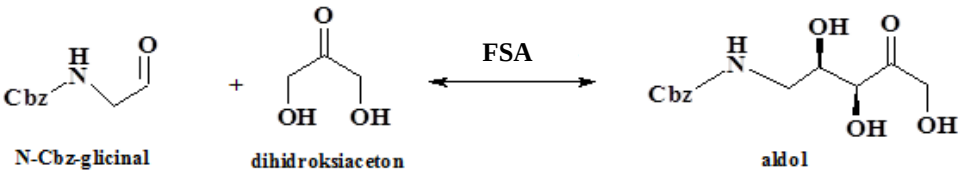
Pošto je N-Cbz-glicinal nestabilna molekula potrebno ju je „zaštititi“ odnosno pretvoriti u stabilnu molekulu. To čine proizvođači radi očuvanja i transporta proizvoda. Postupak je proveden tako da je 0,66 g zaštićenog N-Cbz-glicinala pomješano 3,5 mL acetonitrila, 1 mL vode i 1 mL (1M) HCl. Nakon toga je smjesa stavljena u inkubator pri

35°C i na 200 okr/min. Reakcija je praćena tijekom vremena na HPLC-u do postizanja maksimalne koncentracije N-Cbz-glicinala. Reakcijska shema odštićivanja N-Cbz-glicinala je prikazana na slici 3.6.

3.4. ODREĐIVANJE KINETIKE ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-CBZ-GLICINAL

Na slici 3.7. prikazana je shema ravnotežne reakcije aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-glicinal koja je katalizirana s enzimom FSA.

Utjecaj reaktanata i produkta u reakcijskom sustavu na početnu brzinu reakcije aldolne adicije ispitivana je metodom početnih brzina reakcije. Reakcija je praćena preko koncentracije aldola u reaktoru (Slika 3.8.). Prvo je bila ispitana kinetika aldolne adicije, a zatim retro-aldolne reakcije.

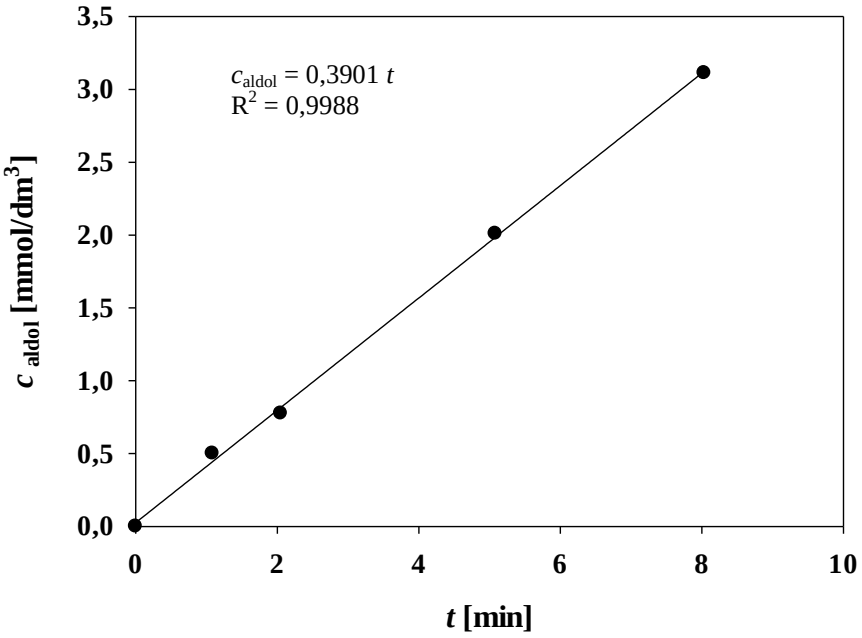


Slika 3.7. Reakcijska shema aldolne adicije dihidroksiacetona na N-Cbz-glicinal.

Sve reakcije su provedene pri 25°C te u 50 mmol/dm^3 TEA-HCl puferu pH 8,0, uz kootapalo acetonitril (10 % (*v/v*)).

Eksperimenti su provedeni u kivetama (radnog volumena 0,5 cm^3). Reaktor, odnosno kivete su bile mješane na tresilici. Prije dodavanja enzima za početak reakcije uzimani su nulti uzorci. Nakon dodavanja enzima uzorci su uzimani u prvoj, drugoj, petoj, osmoj i desetoj minuti.

Promjena koncentracije aldola u vremenu na početku reakcije je korištena za računanje nagiba pravca koji je proporcionalan enzimskoj aktivnosti, odnosno početnoj reakcijskoj brzini (Slika 3.8.).



Slika 3.8. Primjer određivanja aktivnosti aldolaze.

Iz nagiba pravca (dc/dt) izračunat je volumna aktivnost aldolaze prema jednadžbi (3.1.), te specifična aktivnost aldolaze prema jednadžbi (3.2.)

$$V.A. = \frac{\mathrm{d}c_{\mathrm{aldol}}}{\mathrm{d}t} \cdot \frac{V_r}{V_{enz}} \qquad \left[\frac{\mathrm{U}}{\mathrm{ml}}\right] \qquad (3.1)$$

$$S.A. = \frac{V.A.}{c_{enz}} \qquad \left[\frac{\mathrm{U}}{\mathrm{mg}}\right] \qquad (3.2)$$

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

Napravljen je niz eksperimenata u kojima je ispitan utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije aldolne adicije u kotlastom reaktoru. U eksperimentu je koncentracija DHA držana konstantnom (100 mmol/dm^3), a koncentracija N-Cbz-glicinala je

bila varirana od 0-45 mmol/dm^3. To je učinjeno da bi se vidio utjecaj N-Cbz-glicinala na brzinu aldolne adicije. Od pripremljenih reakcijskih smjesa su u različitim vremenskim intervalima (1, 2, 5, 8, 10 min) uzimani uzorci od 10 μL koji su razrjeđeni u 190 μL metanola, te su centrifugirani 2 min pri 14000 okr/min. Nakon toga su analizirani na HPLC-u.

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

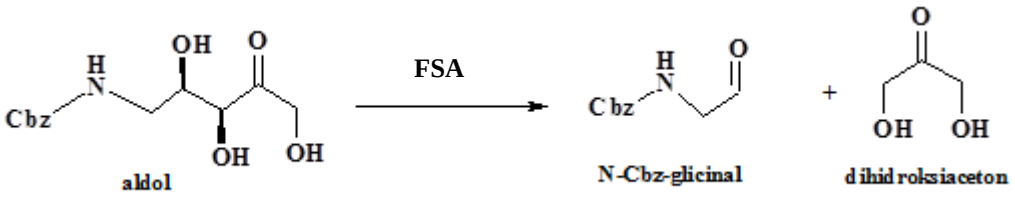
Napravljen je niz eksperimenata u kojima je ispitan utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije aldolne adicije u kotlastom reaktoru. U eksperimentu je koncentracija N-Cbz-glicinala držana konstantnom (45 mmol/dm^3), a koncentracija DHA je varirana od 0-200 mmol/dm^3. To je učinjeno da bi se vidio utjecaj DHA na brzinu aldolne adicije. Od pripremljenih reakcijskih smjesa su u različitim vremenskim intervalima (1, 2, 5, 8, 10 min) uzimani uzorci od 10 μL koji su razrjeđeni u 190 μL metanola, te su centrifugirani 2 min pri 14000 okr/min. Nakon toga su analizirani na HPLC-u.

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

Napravljen je niz eksperimenata u kojima je ispitan utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu reakcije aldolne adicije u kotlastom reaktoru. U eksperimentu je koncentracija N-Cbz-glicinala održavana pri konstantnoj vrijednosti od 45 mmol/dm^3, DHA pri 100 mmol/dm^3, dok je koncentracija aldola varirana od 0-150 mmol/dm^3. Time je ispitan utjecaj aldola kao produkta na početnu brzinu reakcije, odnosno ispitan je utjecaj inhibicije produktom na početnu brzinu reakcije. Od pripremljenih reakcijskih smjesa su u različitim vremenskim intervalima (1, 2, 5, 8, 10 min) uzimani uzorci od 10 μL koji su razrjeđeni u 190 μL metanola, te su centrifugirani 2 min pri 14000 okr/min. Nakon toga su analizirani na HPLC-u.

3.5. ODREĐIVANJE KINETIKE RETRO-ALDOLNE REAKCIJE

Ispitan je utjecaj koncentracija reaktanata aldola i produkata reakcije (N-Cbz-glicinal i dihidroksiaceton) na početnu brzinu retro-aldolne reakcije. Reakcija je prikazana na slici 3.9.



Slika 3.9. Shema povratne retro-aldolne reakcije .

3.5.1 Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

Napravljen je niz eksperimenata u kojima je ispitan utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu retro-aldolne reakcije u kotlastom reaktoru. U eksperimentu je koncentracija aldola varirana od 0-225 mmol/dm^3 kako bi bilo moguće procijeniti njegov utjecaj na početnu brzinu retro-aldolne reakcije. Od pripremljenih reakcijskih smjesa su u različitim vremenskim intervalima (1, 2, 5, 8, 10 min) uzimani uzorci od 10 μL koji su razrjeđeni u 190 μL metanola, te su centrifugirani 2 min pri 14000 okr/min. Nakon toga su analizirani na HPLC-u.

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

Napravljen je niz eksperimenata u kojima je ispitan utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na početnu brzinu reakcije retro-aldolne reakcije u kotlastom reaktoru. U eksperimentu je koncentracija N-Cbz-glicinala varirana od 0-28 mmol/dm^3, a koncentracija aldola održavana konstantnom na 100 mmol/dm^3. Od pripremljenih reakcijskih smjesa su u različitim vremenskim intervalima (1, 2, 5, 8, 10 min) uzimani uzorci od 10 μL koji su razrjeđeni u 190 μL metanola, te su centrifugirani 2 min pri 14000 okr/min. Nakon toga su analizirani na HPLC-u.

Time je ispitan utjecaj N-Cbz-glicinala kao produkta na početnu brzinu povratne reakcije i da li dolazi do inhibicije produktom.

3.5.3. Ispitivanje utjecaja DHA na početnu brzinu retro-aldolne reakcije

Napravljen je niz eksperimenata u kojima je ispitan utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu reakcije retro-aldolne reakcije u kotlastom reaktoru. U eksperimentu je koncentracija DHA bila varirana od 0-100 mmol/dm^3, a koncentracija aldola je bila održavana konstantnom pri 125 mmol/dm^3. Od pripremljenih reakcijskih smjesa su u različitim vremenskim intervalima (1, 2, 5, 8, 10 min) uzimani uzorci od 10 μL koji su razrijeđeni u 190 μL metanola, te su centrifugirani 2 min pri 14000 okr/min. Nakon toga su analizirani na HPLC-u.

Time je ispitivan utjecaj DHA na brzinu povratne reakcije, odnosno postoji li inhibicija produktom.

3.6. PROVEDBA EKSPERIMENTA U KOTLASTOM REAKTORU

Svi eksperimenti u kotlastom reaktoru su provedeni na tresilici pri 25 °C i u 50 mmol/dm^3 TEA-HCl puferu 8,0. Volumen reaktora je bio 1 cm^3.

U radu su ispitane tri različite aldolaze: FSA A129S, FSA A129S/A165G i FSA A129N kao katalizatori aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal. Bilo je potrebno ustvrditi koja od njih je najbolji enzim za provedbu aldolne adicije. U tu svrhu su provedena tri eksperimenta u kotlastom reaktoru. Pripremljene su 3 reakcijske smjese koje su sadržavale 43 mmol/dm^3 N-Cbz-glicinala, 45 mmol/dm^3 dihidroksiacetona, 10% (*v/v*) acetonitrila i 0,5 mg/cm^3 enzima FSA (u svakoj smjesi različiti enzim).

Radi validacije modela provedeni su eksperimenti u kotlastom reaktoru pri različitim ekvimolarnim koncentracijama reaktanata koje su iznosile 5 mmol/dm^3, 10 mmol/dm^3 i 20 mmol/dm^3. Svaki eksperiment je proveden 2 puta.

4. MATEMATIČKI MODEL ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-CBZ-GLICINAL U KOTLASTOM REAKTORU

Aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal je reverzibilna reakcija pa je bilo potrebno odrediti kinetiku reakcije u oba smjera.

Kinetika aldolne adicije je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom (jednadžba (4.1.)), a kinetika retro-aldolne reakcije je opisana jednosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom uz kompetitivnu inhibiciju N-Cbz-glicinalom i uz inhibiciju supstratom (jednadžba (4.2)).

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

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

$$\frac{\mathrm{d}c_{\text{glicinal}}}{\mathrm{d}t} = -r_1 + r_2 \tag{4.3}$$

$$\frac{\mathrm{d}c_{\text{DHA}}}{\mathrm{d}t} = -r_1 + r_2 \tag{4.4}$$

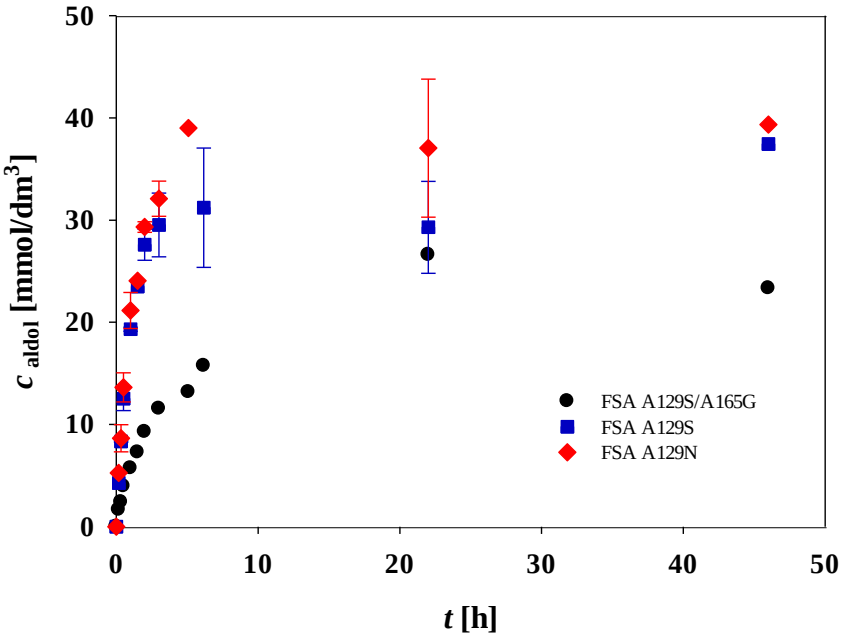
$$\frac{\mathrm{d}c_{\text{aldol}}}{\mathrm{d}t} = r_1 - r_2 \tag{4.5}$$

Jednadžbama (4.3), (4.4) i (4.5) su opisane bilancne jednadžbe u kotlastom reaktoru.

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. ODABIR ENZIMA

Na raspolaganju su bile tri aldolaze za provedbu reakcije aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal. To su bile FSA A129S, FSA A129S/A165G i FSA A129N. Rezultat eksperimenata je prikazan na slici 5.1. iz koje se vidi da je FSA A129N najpovoljniji za upotrebu jer njegovim utjecajem najbrže nastaje najviše produkta.

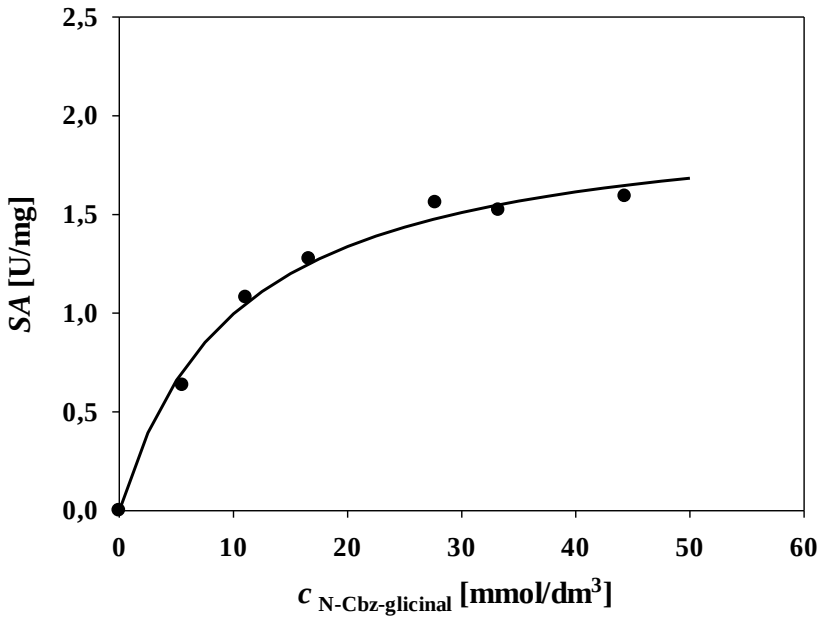


Slika 5.1. Aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru katalizirana s tri aldolaze (γ_{FSA}= 0,5 mg/cm^3, $c_{N\text{-}Cbz\text{-}glicinal}$= 43 mmol/dm^3, c_{DHA}= 45 mmol/dm^3, 10 % (*v*/*v*) acetonitrila i 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, $V_{reaktor}$= 0,5 cm^3).

5.2. ODREĐIVANJE KINETIKE ALDOLNE ADICIJE DHA NA N-Cbz-GLICINAL

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

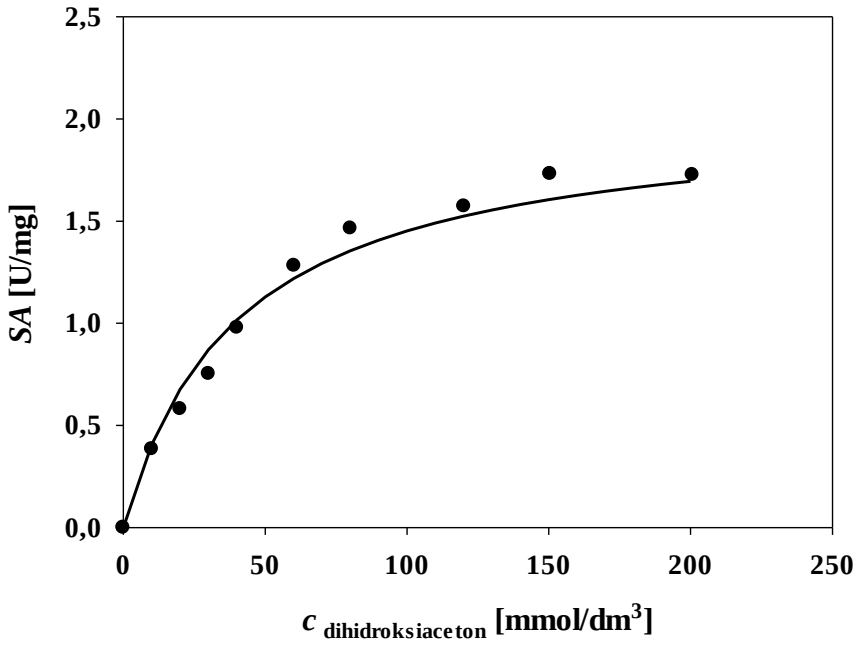
Utjecaj koncentracije supstrata N-Cbz-glicinala na brzinu aldolne adicije je prikazan na slici 5.2. Rezultati pokazuju da eksperimentalne vrijednosti prate trend Michaelis-Menteničine kinetike. Iz eksperimentalnih podataka su procijenjeni kinetički parametri V_{m1} i $K_m^{\text{N-Cbz-glicinal}}$ koji su prikazani u tablici 5.1.



Slika 5.2. Utjecaj koncentracije N-Cbz-glicinala na specifičnu aktivnost enzima u reakciji aldolne adicije (γ_{FSA}= 0,25 mg/cm^3, $c_{\text{N-Cbz-glicinala}}$= 0-45 mmol/dm^3, c_{DHA}= 100 mmol/dm^3, 10 % (*v/v*) acetonitrila, 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, V_{reaktor}= 0,5 cm^3).

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

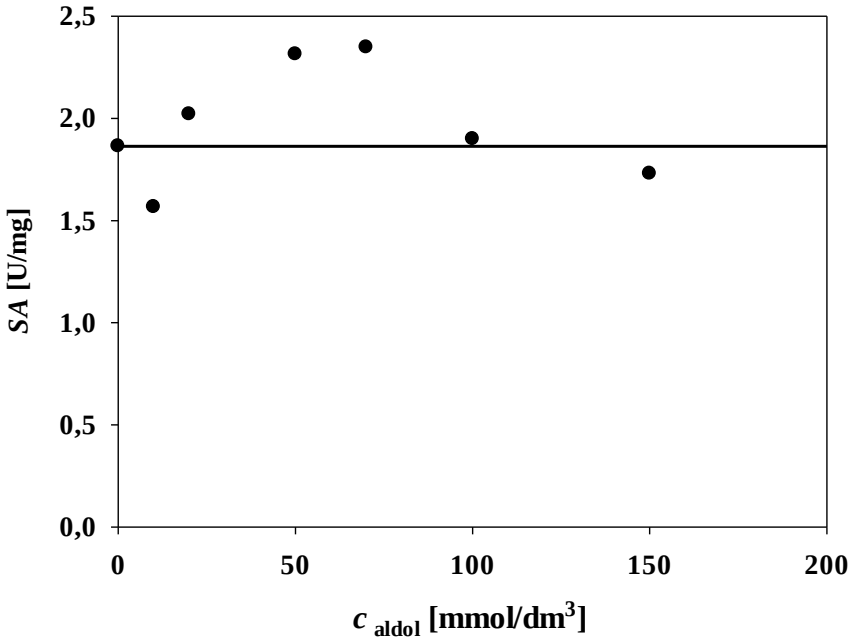
Utjecaj koncentracije supstrata DHA na brzinu aldolne adicije je prikazan na slici 5.3. Rezultati pokazuju da eksperimentalne vrijednosti prate trend Michaelis-Menteničine kinetike. Iz eksperimentalnih podataka su procijenjeni kinetički parametri V_{m1} i K_m^{DHA} koji su prikazani u tablici 5.1.



Slika 5.3. Utjecaj koncentracije DHA na specifičnu aktivnost enzima (γ_{FSA}= 0,25 mg/cm^3, $c_{N\text{-}Cbz\text{-}glicinal}$= 45 mmol/dm^3, c_{DHA}= 0-200 mmol/dm^3, 10 % (*v/v*) acetonitrila, 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, $V_{reaktor}$= 0,5 cm^3).

5.2.3. Ispitivanje utjecaja koncentracije aldola na početnu brzinu aldolne adicije

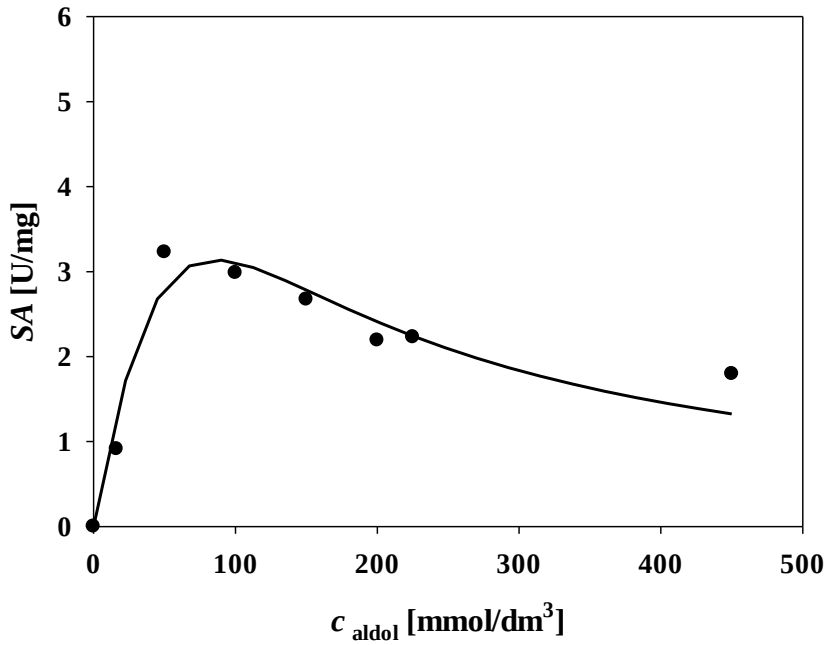
Utjecaj koncentracije aldola na početnu brzinu aldolne adicije je prikazan na slici 5.4. Rezultati pokazuju da povećanjem koncentracije aldola ne dolazi do smanjenja brzine aldolne reakcije, što znači da nema inhibicije ovim spojem.



Slika 5.4. Utjecaj koncentracije aldola na specifične aktivnost enzima (γ_{FSA}= 0,25 mg/cm^3, c_{aldol}= 0-150 mmol/dm^3, $c_{N\text{-}Cbz\text{-}glicinal}$= 45 mmol/dm^3, c_{DHA}= 100 mmol/dm^3, 10 % (*v*/*v*) acetonitrila, 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, $V_{reaktor}$=0,5 cm^3).

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

Utjecaj koncentracije supstrata aldola na brzinu retro-aldolne reakcije je prikazan na slici 5.5. Iz retultata je vidljivo da eksperimentalni podaci prate trend Michaelis-Menteničine kinetike uz inhibiciju supstratom. Iz eksperimentalnih podataka su procijenjeni kinetički parametri V_{m2}, K_m^{aldol} i K_i^{aldol} koji su prikazani u tablici 5.1.



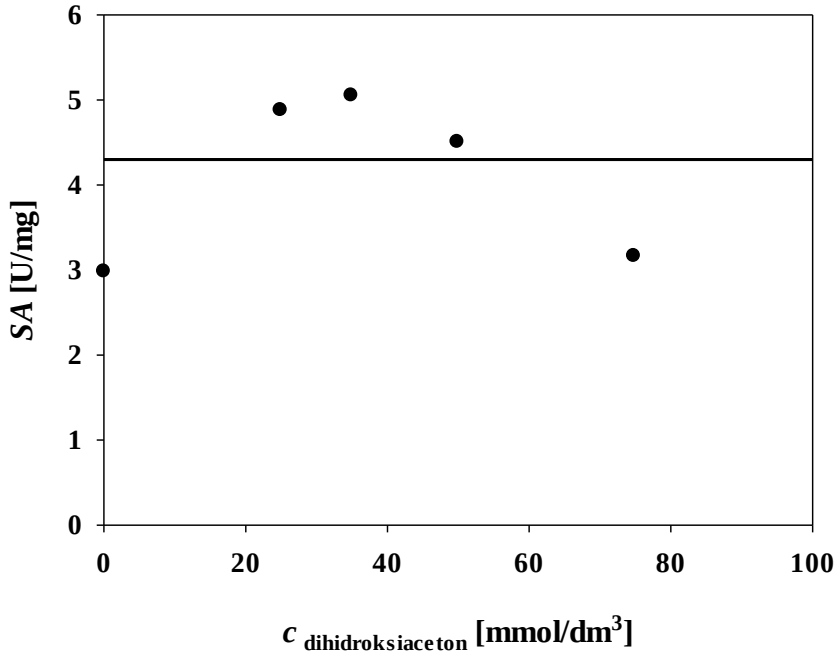
Slika 5.5. Utjecaja koncentracije aldola na specifičnu aktivnost enzima (γ_{FSA}= 0,25 mg/cm^3, c_{aldol}= 0-225 mmol/dm^3, 10 % (*v/v*) acetonitrila, 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, $V_{reaktor}$= 0,5 cm^3).

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

Obzirom na poteškoće kod kvantifikacije komponenti reakcijskog sustava (eksperimentalni rezultati nisu prikazani) konstanta inhibicije ovim spojem je procijenjena iz eksperimenta u kotlastom reaktoru, te će o tome biti riječi kasnije.

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

Utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu retro-aldolne reakcije je prikazan na slici 5.6. Rezultati pokazuju da povećanjem koncentracije DHA ne dolazi do smanjenja brzine retro-aldolne reakcije što znači da nema inhibicije ovim spojem.



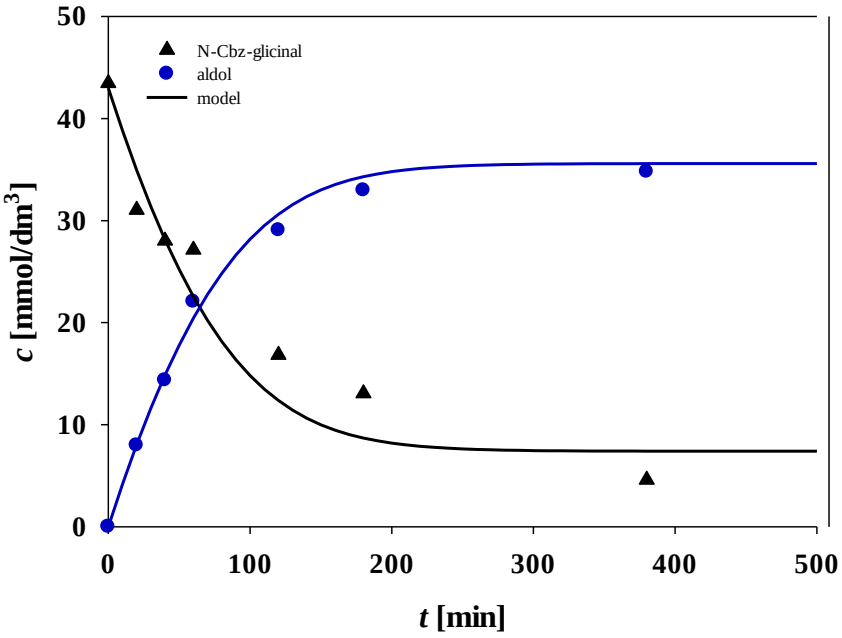
Slika 5.6. Utjecaj koncentracije DHA na početnu brzinu retro-aldolne adicije (γ_{FSA}= 0,25 mg/cm^3, c_{aldol}= 125 mmol/dm^3, c_{DHA}= 0-100 mmol/dm^3, 10 % (*v/v*) acetonitrila, 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, $V_{reaktor}$= 0,5 cm^3).

Tablica 5.1. Procijenjeni kinetički parametari aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal katalizirane s FSA A129N u kotlastom reaktoru.

Parametar	Jedinica	Vrijednost
V_{m1}	[U mg^{-1}]	2,035
V_{m2}	[U mg^{-1}]	15,415
$K_m^{\text{N-Cbz-glicinal}}$	[mmol/dm^3]	10,412
K_m^{DHA}	[mmol/dm^3]	40,097
K_m^{aldol}	[mmol/dm^3]	167,810
K_i^{aldol}	[mmol/dm^3]	43,853
$K_i^{\text{N-Cbz-glicinal}}$	[mmol/dm^3]	0,389

5.8. Procjena konstante inhibicije s N-Cbz-glicinalom u retroaldolnoj reakciji u kotlastom reaktoru

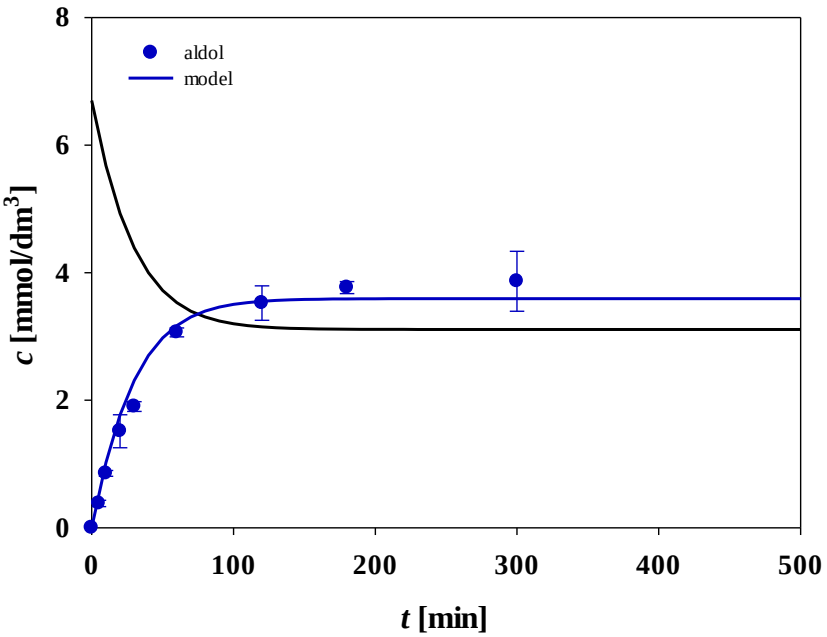
Prilikom mjerenja kinetike metodom početnih brzina reakcije nije bilo moguće procijeniti konstantu inhibicije u retro-aldolnoj reakciji te je stoga ona procijenjena iz eksperimenta aldolne adicije u kotlastom reaktoru prikazanog na slici 5.7. Procijenjena konstanta iznosi 0,389 ± 0,168 mmol/dm^3. Ova konstanta zajedno s ostalim kinetičkim parametrima je prikazana u tablici 5.1. Matematički model i primjer iz „Scientist-a“ je prikazan u Prilogu 3.



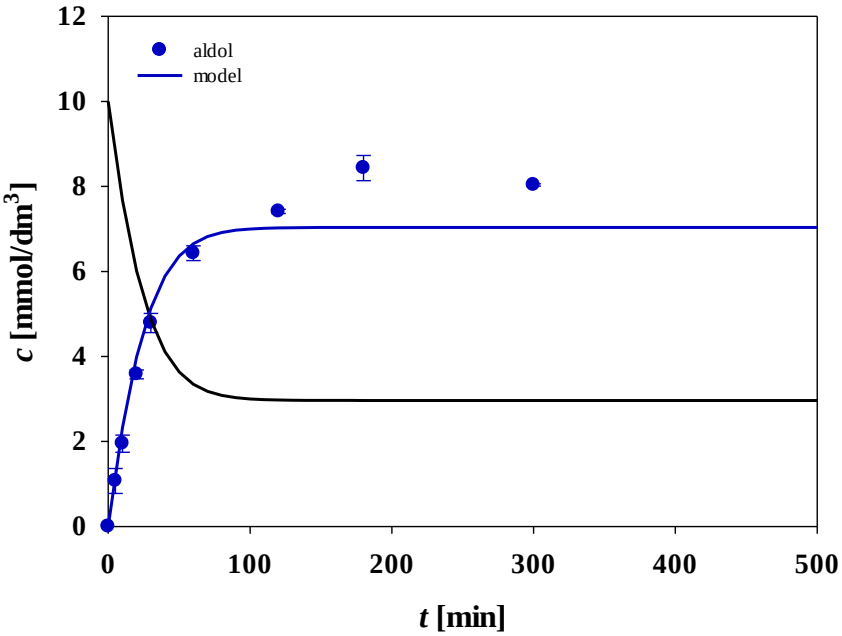
Slika 5.7. Aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru iz koje je procjenjena konstanta inhibicije s N-Cbz-glicinalom u povratnoj reakciji, $K_i^{\text{N-Cbz-glicinal}}$ (γ_{FSA}= 0,5 mg/cm^3, $c_{\text{N-Cbz-glicinal}}$= 43 mmol/dm^3, c_{DHA}= 45 mmol/dm^3, 10 % (*v/v*) acetonitrila, 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, V_{reaktor}=1 cm^3)

5.9. Validacija matematičkog modela aldolne adicije DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru

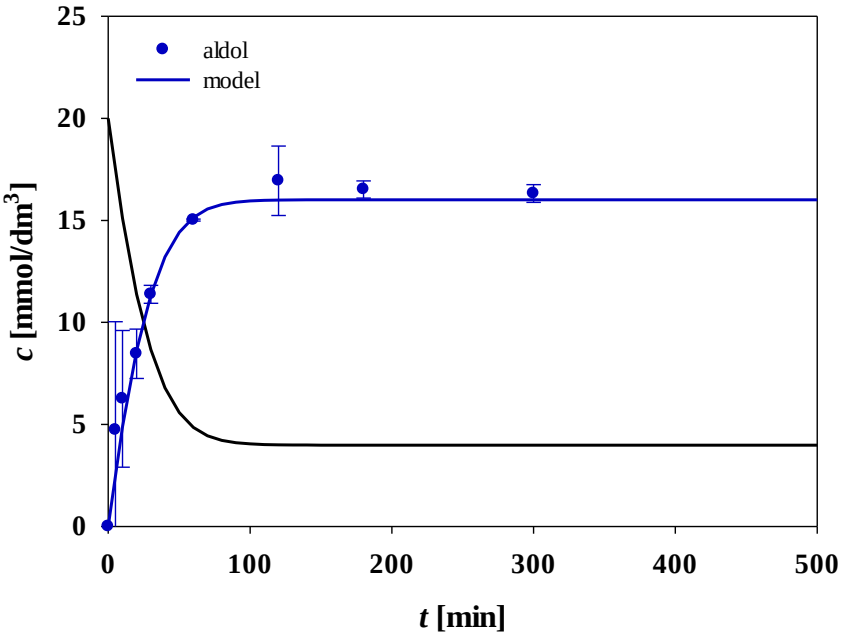
Kao što je opisano u poglavlju 3.6. provedeno je 6 eksperimenata aldolne adicije, odnosno po 3 paralelne reakcije. Rezultati su prikazani na slikama 5.8., 5.9., 5.10. te pokazuju dobro slaganje eksperimentalnih podataka i modela. Kako je svaki eksperiment ponavljan dva puta, prikazane su intervali pouzdanosti eksperimentalnih točaka. Koncentracije N-Cbz-glicinala nisu prikazane radi teže kvantifikacije ovog supstrata



Slika 5.8. Aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru (γ_{FSA}= 0,99 mg/cm^3, $c_{N\text{-}Cbz\text{-}glicinal}$= 5,54 mmol/dm^3, c_{DHA}= 5 mmol/dm^3, 10 % (*v/v*) acetonitrila, 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, $V_{reaktor}$= 1 cm^3)



Slika 5.9. Aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru (γ_{FSA}= 0,5 mg/cm^3, $c_{N\text{-}Cbz\text{-}glicinal}$= 10,24 mmol/dm^3, c_{DHA}= 10 mmol/dm^3, 10 % (*v/v*) acetonitrila, 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, $V_{reaktor}$= 1 cm^3)



Slika 5.10. Aldolna adicija DHA na N-Cbz-glicinal u kotlastom reaktoru (γ_{FSA}= 0,5 mg/cm^3, $c_{N\text{-}Cbz\text{-}glicinal}$= 20,22 mmol/dm^3, c_{DHA}= 20 mmol/dm^3, 10 % (*v/v*) acetonitrila, 50 mmol/dm^3 TEA-HCl pufer pH 8,0, 25°C, $V_{reaktor}$= 1 cm^3)

6. ZAKLJUČAK

Od tri ispitane aldolaze, najbolja za reakciju aldolne adicije pročavanu u ovom radu se pokazala FSA A129N radi najbrže postignute maksimalne konverzije supstrata pri istim uvjetima.

Određena je kinetika aldolne adicije katalizirane ovim enzimom. Kinetiku aldolne adicije moguće je opisati dvosupstratnim Michaelis-Menteničinim kinetičkim modelom, dok je povratnu retro-aldolnu reakciju moguće opisati Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju aldolom (supstratom) i kompetitivnom inhibicijom N-Cbz-glicinalom.

Usprkos visokoj maksimalnoj brzini povratne reakcije u odnosu na maksimalnu brzinu aldolne adicije postignuta je vrlo visoka maksimalna konverzija supstrata od 88%. To je moguće radi slabog afiniteta enzima prema aldolu kao supstratu, odnosno radi visoke Michaelis-Menteničine konstante za aldol.

Razvijeni matematički model je dobro opisao eksperimentalne rezultate.

7. SIMBOLI

DHA	dihidroksiaceton	
FSA	D-fruktoza-6 fosfat aldolaza	
V.A.	volumna aktivnost enzima	[U / mL]
S.A.	specifična aktivnost enzima	[U / mg]
c	molarna koncentracija	[mmol / dm^3]
K_i	konstanta inhibicije	[mmol / dm^3]
K_m	Michaelis – Menteničina konstanta	[mmol / dm^3]
V_m	maksimalna brzina reakcije	[U/cm^3, ili U/mg]
t	vrijeme	[min, ili s]
γ	masena koncentracija	[mg/cm^3]

8. LITERATURA

Arnold F.H., Volkov A.A. (1999); Directed evolution of biocatalysts. Current Opinion in Chemical Biology, 3:54-59

Bisswanger H. (2002); Enzyme kinetic principles and methods, Wiley-VCH, 55-80

Chartrain M., Salmon P.M., Robinson D.K., Buckland B.C. (2000); Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals. Current Opinion in Chemical Biotechnology, 11:209-214

Clapés P., Fessner W.D. (2011); Enzymatic direct aldol additions. In: Molander, G.A. (Ed.), Science of Synthesis. Stereoselective Synthesis 2. Stereoselective Reactions of Carbonyl and Imino Groups. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 677–734

Clapés P., Fessner W.D., Sprenger G.A., Samland A.K. (2010); Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases, Current Oppinion in Chemical Biology, 14:154-167

Clapés P., Garrabou X., (2011); Current trends in asymmetric synthesis with aldolases. Advanced Synthesis and Catalysis, 353, 2263–2283

Clapés P., Sprenger G.A., Lemaire M. (2010); A mutant D-fructose-6-phosphate aldolase (Ala129Ser) with improved affinity towards dihydroxyacetone for the synthesis of polyhydroxylated compounds. Advanced Synthesis and Catalysis, 352:1039–1046.

Dordick J.S., Clark D.S. (2002); Biocatalysis and biotransformation, Current Opinion in Chemical Biology, 6:123–124

Ferrara S., Mapelli E., Sello G., Di Gennaro P. (2011); Characterization of the aldol condensation activity of the trans-o-hydroxybenzylidenepyruvate hydratase-aldolase (tHBP-HA) cloned from *Pseudomonas fluorescens* N3, Biochimica et Biophysica Acta, 1814: 622–629

Gomzi Z. (1998) Kemijski reaktori, HINUS, Zagreb

Haki G.D., Rakshit S.K. (2003); Developments in industrially important thermostable enzymes: A review, Bioresource Technology, 89:17–34

IB-IGT., (2009); IB 2025 Maximizing UK opportunities from industrial biotechnology in a low carbon economy,
http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/+/http:/www.berr.gov.uk/files/file51144.pdf

Illanes A. (2008); Enzyme Biocatalysis, Priciples and aplications, 1-19

Schürmann M., Sprenger G.A. (2001); Fructose-6-phosphate aldolase is a novel classI aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases, Journal of Biological Chemistry, 276:11055–11061

Sudar M., Findrik Z., Vasić-Rački Đ., Clapés P., Lozano C. (2013); Mathematical model for aldol addition catalyzed by two D-fructose-6-phosphate aldolases variants overexpressed *in E. coli*, Journal of Biotechnology, 167:191– 200

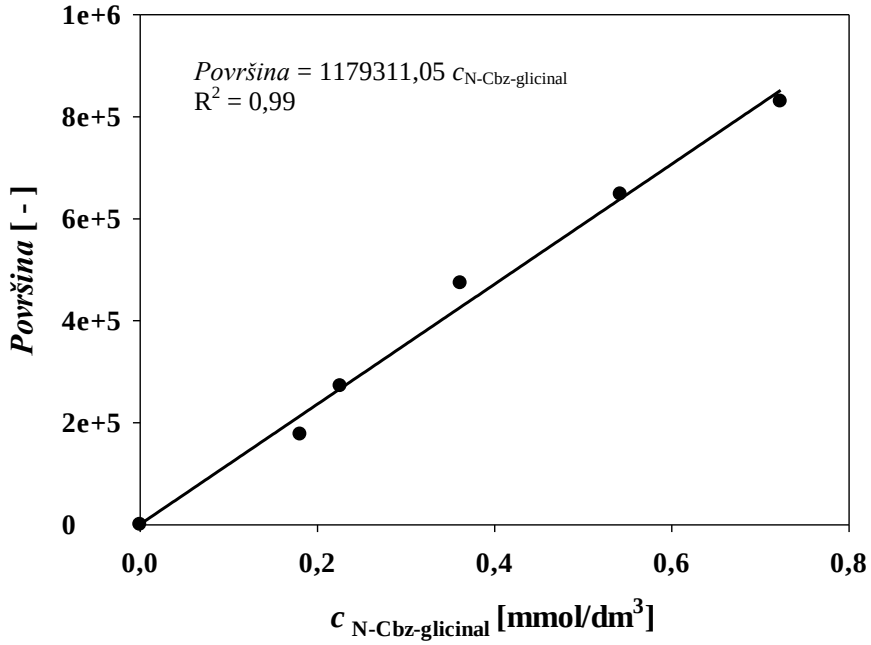
Sudar M., Findrik Z., Vasić-Rački Đ., Clapés P., Lozano C. (2013); Aldol addition of dihydroxyacetone to N-Cbz-3-aminopropanal catalyzed by two aldolases variants in microreactors, Enzyme and Microbial Technology, 53:38– 45

Tufvesson P., Fu W., Skibsted Jensen J., Woodley J. M. (2010); Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis, Food and Bioproducts Processing, 88:3–11

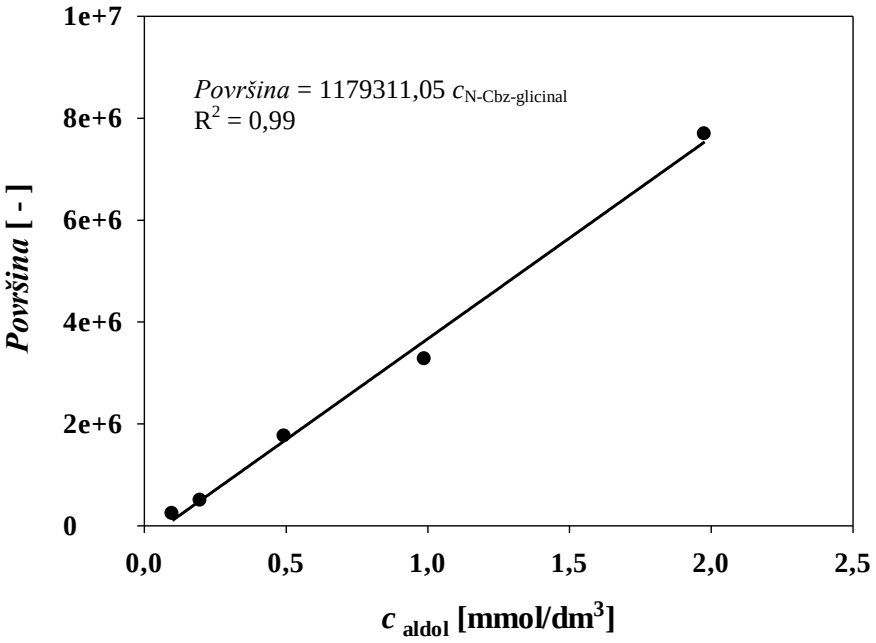
Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J. (2000); Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Journal of Molecular Catalysts B: Enzymatic, 9:113-148

Zaks A.(2001); Industrial biocatalysis, Current Opinion in Chemical Biology, 5:130–136

9. PRILOG



Prilog 1. Baždarni pravac za N-Cbz-glicinal



Prilog 2. Baždarni pravac za aldol

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t
DepVars: c1, c3
Params: Ki
r1=(Vm1*c1*c2*FSA)/((Km1+c1)*(Km2+c2))
r2=(Vm2*c3*FSA)/(Km3*(1+(c1/Ki))+c3+((c3^2)/Ki_aldol))
c1'=-r1+r2
c2'=-r1+r2
c3'=-r2+r1
Vm2=15,415
Km3=167,810
Ki_aldol=43.854
Ki=0,389
Km1=10,412
Km2=15,415
Vm1=2.035

t=0
c3=0
c1=43
c2=45
FSA=0.5
```

Prilog 3. Primjer iz „Scientista“

10. ŽIVOTOPIS

Rođen sam 7. siječnja 1994. godine u Zagrebu, gdje sam završio osnovnu školu „Cvjetno naselje“. Maturirao sam 2012. godine u XI. Gimnaziji u Zagrebu i iste godine sam upisao studij ekoiženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.