

# Biokatalitička sinteza (R)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila

---

Jelačić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:075512>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Jelena Jelačić

BIOKATALITIČKA SINTEZA (*R*)-3-HIDROKSI-4,4-  
DIMETILPENTAN NITRILA

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

doc. dr. sc. Martina Sudar

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, srpanj 2020.

*Zahvaljujem se prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na izuzetno profesionalnom, otvorenom i toplom pristupu. Hvala Vam što se me vodili kroz ovaj rad, što ste bili otvoreni za sva moja pitanja i nedoumice te što ste me poticali na samostalan rad.*

*Pokazali ste mi koliko čovjek može uživati kada radi posao koji voli.*

*Hvala!*

*Zahvaljujem se mag. ing. oecoing. Neveni Milčić na nesebičnoj i velikodušnoj pomoći pri provođenju eksperimenata. Hvala Vam na strpljenju i svakom od bezbroj savjeta!*

*Želim se zahvaliti svoj obitelji na ljubavi, podršci, razumijevanju i strpljenju.*

*Mama, Tata, hvala Vam što ste vjerovali u mene čak i kada ja nisam. Hvala Vam što ste se zajedno sa mnom prolazili kroz moje uspone i padove. Uvijek ste davali i više nego što ste imali, u svakom smislu tih riječi.*

*Robi, hvala ti što vjeruješ u mene i potičeš me da slijedim svoje snove.*

## SAŽETAK

U ovom radu obrađena je tematika biokatalitičke sinteze kiralnih molekula, odnosno (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila iz 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana pomoću enzima halogenhidrin-dehalogenaze. Sinteza optički čistih tvari izuzetno je važan dio farmaceutske industrije s obzirom da dva enantiomera mogu imati potpuno različita svojstva, a nerijetko jedan od njih može pokazivati štetno i toksično biološko djelovanje. Epoksidi su visoko vrijedni spojevi u organskoj sintezi zbog toga što se epoksidni prsten može kemijski transformirati u brojne sintetski korisne intermedijere.

Reakcije u kojima su uključeni enzimi potrebno je dobro istražiti i okarakterizirati kako bi se mogle provoditi u industrijskom mjerilu. Obzirom na različitu aktivnost enzima u različitim reakcijskim uvjetima (temperatura, koncentracije supstrata, pH, zasićenost kisikom, prisutnost kofaktora) izuzetno je važno poznavati njihovu strukturu i reakcijski mehanizam kako bi se mogli odrediti najpogodniji reakcijski uvjeti koji će omogućiti dobivanje maksimalnih prinosa željenog produkta. Matematičko modeliranje izvrstan je alat za provođenje istraživanja ove vrste. Sastoji se od kinetičkog modela i bilanci tvari u reaktoru. Za potrebe razvoja matematičkog modela određena je stabilnost 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana u puferu te se došlo do spoznaje da je 3,3-dimetil-1,2-epoksibutan podložan kemijskoj hidrolizi. Provedbom simulacija u programskom paketu Scientist utvrđeno je da kemijska hidroliza epoksida ima znatan utjecaj na enzimsku reakciju. Najpogodniji reaktor za biokatalitičku sintezu (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila je kotlasti reaktor uz dotok supstrata jer je u njemu odabirom odgovarajućih radnih uvjeta moguće smanjiti utjecaj inhibicije enzima supstratom i raditi u uvjetima maksimalne aktivnosti enzima.

**KLJUČNE RIJEČI:** biokatalitička sinteza, epoksid, halogenhidrin-dehalogenaza, kemijska hidroliza, kinetika enzimске reakcije, matematičko modeliranje

## SUMMARY

This paper deals with the topic of biocatalytic synthesis of chiral molecules, i.e. (*R*)-3-hydroxy-4,4-dimethylpentane nitrile from 3,3-dimethyl-1,2-epoxybutane using the enzyme halohydrin dehalogenase. The synthesis of optically pure substances is an extremely important part of the pharmaceutical industry considering that two enantiomers can have completely different properties, and often one of them can have harmful and toxic biological effects. Epoxides are highly valuable compounds in organic synthesis because the epoxy ring can be chemically transformed into plenty of synthetically useful intermediates.

Reactions involving enzymes need to be well investigated and characterized to be carried out on an industrial scale. Given the different activity of enzymes in different reaction conditions (temperature, substrate concentrations, pH, oxygen saturation, presence of cofactor), it is extremely important to know their structure and reaction mechanism in order to determine the most suitable reaction conditions that will allow obtaining maximum yields of the desired product. Mathematical modelling is an excellent tool for conducting research of this kind. It consists of a kinetic model and a mass balance in the reactor. For the development of a mathematical model, the stability of 3,3-dimethyl-1,2-epoxybutane in buffer was determined and it was found that 3,3-dimethyl-1,2-epoxybutane is subject to chemical hydrolysis. Simulations in the package programme Scientist showed that chemical hydrolysis of epoxy have a significant impact on the enzymatic reaction. The most suitable reactor for biocatalytic synthesis of (*R*)-3-hydroxy-4,4-dimethylpentane nitrile is a fed-batch reactor with a continuous supply of substrate because it enables the selection of working conditions that minimize the effect of substrate inhibition, and working at the substrate concentration that provides the maximum reaction rate.

**KEY WORDS:** biocatalytic synthesis, epoxy, halohydrin dehalogenase, chemical hydrolysis, enzyme reaction kinetics, mathematical modelling

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>2.1. BIOKATALIZA</b> .....	2
<b>2.2. ENZIMI / BIOKATALIZATORI</b> .....	3
<b>2.2.1. STRUKTURA ENZIMA</b> .....	4
<b>2.2.2. DJELOVANJE ENZIMA</b> .....	5
<b>2.2.3. TEORIJE DJELOVANJA ENZIMA</b> .....	7
<b>2.2.4. PODJELA ENZIMA</b> .....	8
<b>2.3. IZOMERIJA, ENANTIOMERIJA I OPTIČKA AKTIVNOST</b> .....	9
<b>2.4. HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZE</b> .....	10
<b>2.4.1. ULOGA HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZA</b> .....	12
<b>2.4.2. KATALITIČKI MEHANIZAM HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZA</b> .....	13
<b>2.4.2.1. REAKCIJE NASTAJANJA EPOKSIDA</b> .....	14
<b>2.4.2.2. REAKCIJE OTVARANJA EPOKSIDNOG PRSTENA</b> .....	15
<b>2.4.3. HheC</b> .....	16
<b>2.4.4. EPOKSIDI – SUPSTRATI</b> .....	18
<b>2.4.5. NUKLEOFILI</b> .....	19
<b>2.4.6. MOGUĆA PRIMJENA HALOGENHIDRIN- DEHALOGENAZA</b> .....	20
<b>2.5. MICHAELIS-MENTENIČINA KINETIKA</b> .....	21
<b>2.6. MATEMATIČKO MODELIRANJE</b> .....	23
<b>2.6.1. KOTLASTI REAKTOR</b> .....	24
<b>2.6.2. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM SUPSTRATA</b> .....	24
<b>2.6.3. PROTOČNO-KOTLASTI REAKTOR</b> .....	25
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....	26
<b>3.1. APARATURA</b> .....	26
<b>3.1.1. TRESILICA</b> .....	26
<b>3.1.2. PLINSKI KROMATOGRAFI</b> .....	26
<b>3.1.3. OSTALA APARATURA</b> .....	27
<b>3.2. ANALITIČKE METODE</b> .....	28
<b>3.2.1. DETEKCIJA (R)-IZOMERA PRODUKTA</b> .....	28
<b>3.2.2. ISPITIVANJE STABILNOSTI EPOKSIDA</b> .....	29
<b>3.2.3. PRELIMINARNA REAKCIJA</b> .....	30
<b>3.3. PRIPRAVA KEMIKALIJA</b> .....	32
<b>3.3.1. POPIS KEMIKALIJA</b> .....	32
<b>3.3.2. PRIPRAVA PUFERA</b> .....	32

3.3.3. PRIPRAVA TEMELJNIH OTOPINA .....	32
4. MATEMATIČKO MODELIRANJE .....	34
4.1. KINETIČKI MODEL.....	34
4.2. REAKTORSKI MODEL ZA KOTLASTI REAKTOR.....	35
4.3. REAKTORSKI MODEL ZA KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM SUPSTRATA .....	35
4.4. REAKTORSKI MODEL ZA PROTOČNO-KOTLASTI REAKTOR .....	36
5. REZULTATI I RASPRAVA.....	37
5.1. DETEKCIJA ( <i>R</i> )-IZOMERA PRODUKTA.....	37
5.2. ISPITIVANJE STABILNOSTI EPOKSIDA .....	37
5.3. SINTEZA ( <i>R</i> )-3-HIDROKSI-4, 4,-DIMETILPENTAN NITRILA U KOTLASTOM REAKTORU .....	38
5.4. PROCJENA KINETIČKIH PARAMETARA .....	41
5.5. KOTLASTI REAKTOR.....	42
5.6. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM SUPSTRATA .....	44
5.7. PROTOČNO-KOTLASTI REAKTOR .....	49
6. ZAKLJUČAK.....	53
7. POPIS SIMBOLA I KRATICA KORIŠTENIH U RADU .....	55
8. LITERATURA .....	57
9. PRILOZI.....	62
10. ŽIVOTOPIS.....	68

# 1. UVOD

Danas se sve više razvija svijest o potrebi za održivim razvojem i očuvanjem okoliša pa se zbog toga sve više i sve češće tradicionalni načini kemijske proizvodne zamjenjuju s biokatalizom, i to na svjetskoj razini. U ovom procesu promjene glavnu ulogu imaju enzimi. Enzimi su vrlo atraktivni (bio)katalizatori s obzirom da se pomoću njih mogu dobiti (proizvesti) različite važne optički aktivne gradivne jedinice transformacijama koje su visoko regio-, stereo- i kemoselektivne. Upotreba velikih količina organskih otapala, ekstremni reakcijski uvjeti te skupocjene i dugotrajne metode pročišćavanja produkata postaju sve neprihvatljiviji, iz ekonomskih i ekoloških razloga. Činjenica da se većina lijekova sastoji od kiralnih molekula, a dva enantiomera mogu imati potpuno različita svojstva i biološku aktivnost (Zhong-Yu et al., 2014), pokazuje koliko veliki značaj ima dobivanje optički čistih spojeva.

Enzimi dobiveni iz prirodnih izvora često ne pokazuju dovoljnu aktivnost i stabilnost da bi se kao takvi mogli primjenjivati u industriji. Potrebno ih je dobro okarakterizirati, poznavati njihov mehanizam, uvjete rada i svojstva kako bi se pomoću novih tehnologija mogli proizvesti mutanti koji će naći svoju primjenu u industrijskoj proizvodnji. Glavnu ulogu u procesu razvoja industrijski pogodnih enzima ima provedba eksperimenata u manjem mjerilu i matematičko modeliranje. Oni pružaju potrebne preduvjete za brzo i učinkovito uvećanje procesa, čime se skraćuje vrijeme i smanjuju troškovi ispitivanja (Vasić-Rački et al., 2011).

Izvrstan primjer koji govori o važnosti razvoja biotehnologije te velikom potencijalu kojeg imaju biokatalizatori, osobito kada govorimo o razvoju „zelene industrije“, su enzimi halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH). Halogenhidrin-dehalogenaze u prirodi kataliziraju reakcije dehalogenacije (Majerić Elenkov et al., 2006; Majerić Elenkov et al., 2008), no istraživanjem njihove strukture i mehanizma djelovanja otkrivena je njihova aktivnost i u reakcijama transhalogenacije (Castro et al., 1986) te otvaranja epoksidnih prstenova pri čemu može doći do kidanja i stvaranja novih C-C veza (Janssen et al., 2006). Razvoj i sve češća primjena matematičkog modeliranja u (bio)kemijskim istraživanjima uvelike ubrzava razvoj i optimizaciju procesa za korištenje u industriji što ujedno dovodi i do značajnih ekonomskih ušteda.



## 2. OPĆI DIO

### 2.1. BIOKATALIZA

Biokataliza je teorija o djelovanju biokatalizatora. Biokatalizatori su stanice mikroorganizama, životinja, biljaka i/ili njihovi dijelovi – enzimi (Findrik Blažević, 2013), koji sudjeluju u različitim vrstama procesa u prirodi, tj. u živim stanicama aktivno sudjeluju u procesima proizvodnje novih produkata ili razgradnje toksičnih tvari. Enzime proizvode žive stanice kako bi izazvale specifične biokemijske reakcije povezane s metaboličkim procesima stanica. (Majerić Elenkov et al., 2006) Zbog njihovih jedinstvenih svojstava poput visoke specifičnosti prema supstratu, brzog djelovanja i biorazgradivosti, enzimi se smatraju potencijalno vrlo dobrim industrijskim biokatalizatorima. Primjena enzima poznata je još od stare antike za proizvodnju fermentirane hrane (Findrik Blažević, 2013) te filtraciju vina i piva (Brahmachari, 2016), a danas se sve više istražuju jer se pomoću njih iz jeftinog supstrata mogu dobiti skupe, optički čiste kemikalije kao što su farmaceutici i njihovi prekursori, antibiotici te proteini. Vjeruje se da u prirodi postoji oko 25 000 različitih enzima (Findrik Blažević, 2013), dok ih je danas identificirano oko 3000, a od te količine je samo 5% njih našlo primjenu u industrijskoj proizvodnji (Binod et al., 2013). Enzimski kataliza (biokataliza) predstavlja ekološki prihvatljiviju alternativu konvencionalnim kemijskim reakcijama u kojima se upotrebljavaju kemijski katalizatori (Majerić Elenkov et al., 2014). Biokatalizom nastaje manje otpada, troši se manje sirovina i energije, reakcije se provode u vodenim medijima te u blagim reakcijskim uvjetima, a enzimi su po svojoj prirodi vrlo selektivni te relativno jeftini jer se lako mogu proizvesti fermentacijom (Majerić Elenkov et al., 2012; Findrik, 2013).

Jedan od ključnih faktora za isplativost industrijskog procesa je volumna aktivnost (Deregnacourt et al., 2007), odnosno aktivnost enzima/biokatalizatora po volumenu reaktora ( $U \text{ mL}^{-1}$ , odnosno  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}$ ). Glavni nedostatak biokatalize u vodenom mediju je niska topljivost većine organskih spojeva u vodi (tj. hidrofobnost supstrata, obično iznosi nekoliko  $\text{gL}^{-1}$ ) što rezultira slabim prinosima u prostoru i vremenu (Deregnacourt et al., 2007). Ovaj nedostatak je moguće nadvladati korištenjem kootapala koja se ne miješaju s vodom, kao što su metil tert-butil eter (MTBE), dodekan, n-heksadekan ili izo-oktan (Deregnacourt et al., 2007).

Zbog jedinstvenih biokemijskih svojstava enzima, potražnja za industrijskim enzimima neprekidno raste, vođena rastućom potrebom za održivim rješenjima (Brahmachari, 2016). Unatoč brojnim prednostima, prirodni enzimi često ne ispunjavaju sve procesne zahtjeve i

potrebno ih je dodatno prilagoditi uvjetima u industrijskoj proizvodnji kako bi ostvarili svoj puni katalitički potencijal. Korištenje biotehnologije generira više od 250 milijardi dolara godišnje, s velikim brojem proizvoda za različita tržišta, a ta brojka ne uključuje biogoriva (Meyer et al., 2014).

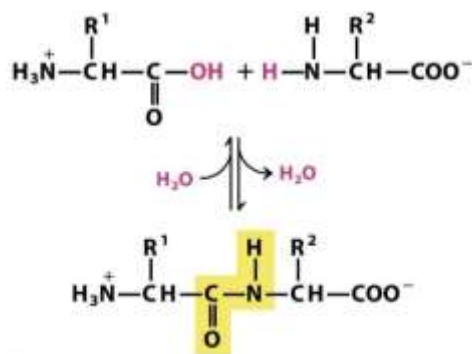
## **2.2. ENZIMI / BOKATALIZATORI**

Enzimi su velike organske molekule organizirane u četiri strukturalna nivoa. Nastaju u živoj stanici, a njihova uloga je kataliza biokemijskih reakcija važnih za život u kojima dolazi do sinteze ili cijepanja kemijskih veza. Molekula enzima se sastoji od linearnih lanaca više stotina aminokiselina koje su međusobno povezane specifičnim redoslijedom koji je određen DNK kodom organizma, odnosno genomom (Findrik Blažević, 2013). Enzimi danas zauzimaju vrlo važno mjesto u svjetskoj industrijskoj proizvodnji zahvaljujući svojim brojnim korisnim svojstvima. Njihovom razvoju je uvelike pridonijela činjenica da se mogu naći, ali i proizvesti u brojnim mikroorganizmima te da su podložni genetskim izmjenama u svrhu poboljšanja svojstava (Brahmachari, 2016).

Zahvaljujući velikom broju poznatih enzima te njihovoj katalitičkoj raznolikosti i stabilnosti, danas se posebna pažnja pridaje razvoju proteinskog inženjerstva čija je zadaća objasniti i predvidjeti ponašanje enzima te definirati njegovu proteinsku strukturu, koja je ujedno i zaslužna za njegova specifična svojstva (Findrik Blažević, 2013). Usmjerene evolucijske tehnike omogućile su oblikovanje specifičnijih enzima koji pokazuju bolju učinkovitost (Brahmachari, 2016). Uloga enzima (biokatalizatora) i konvencionalnih katalizatora je ista – kataliza uspostave ravnoteže u određenoj reakciji, no enzimi su mnogo aktivniji i selektivniji od kemijskih katalizatora. Enzimi se primjenjuju u mnogim industrijama, uključujući industriju hrane, pića, lijekova, deterdženata, tekstila, kože, celuloze i papira, kemijsku industriju i u proizvodnji biogoriva, stočne hrane, sredstava za osobnu njegu te u dijagnostici (Brahmachari, 2016).

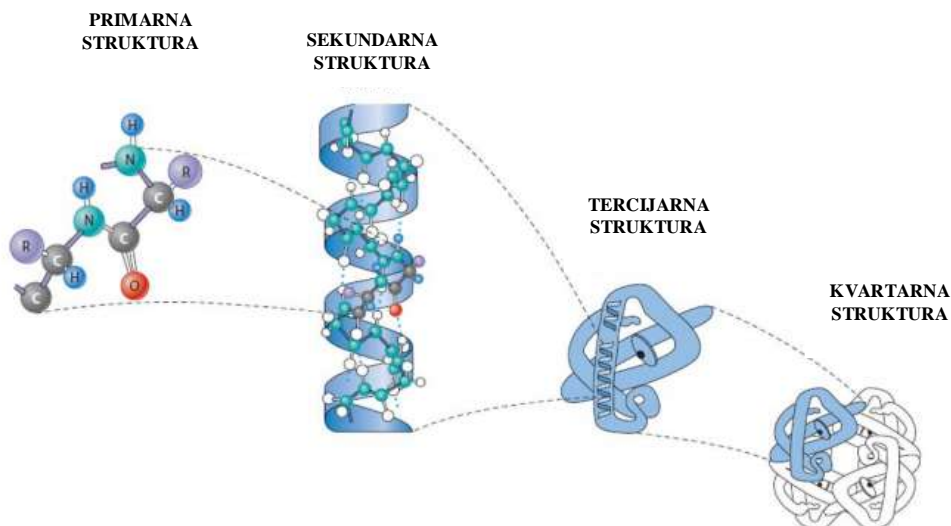
### 2.2.1. STRUKTURA ENZIMA

Enzimi su aktivni proteini koji nastaju kondenzacijom aminokiselina u živim stanicama, a nastala veza među aminokiselinama se naziva peptidnom vezom. Peptidna veza nastaje između karboksilne skupine jedne i amino skupine druge aminokiseline (Findrik Blažević, 2013), kao što je prikazano na shematskom prikazu na slici 1.



**Slika 1.** Nastajanje peptidne veze između dvije aminokiseline (Nelson et al., 2008)

Raspored, odnosno redoslijed vezanja aminokiselina, određen je genomom. S obzirom da su enzimi proteini, njihova struktura je organizirana u četiri strukturalna nivoa (Findrik Blažević, 2017), kao što se može vidjeti na slici 2.



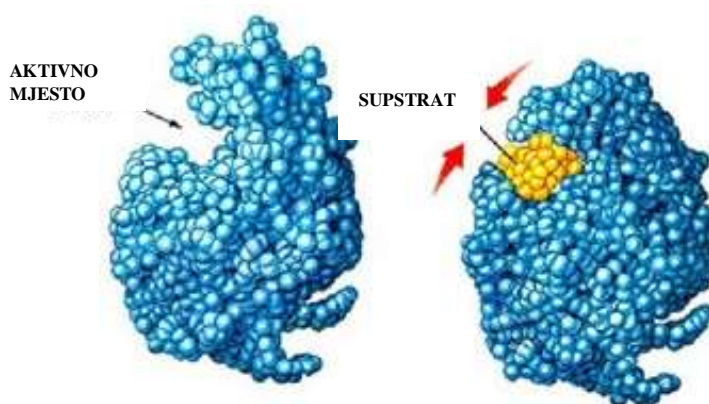
**Slika 2.** Četiri strukturalna nivoa proteina (enzima) (Hardin et al., 2012)

Primarna struktura je definirana peptidnim lancima – kratkim kondenzacijskim lancima aminokiselina čija je dimenzija poznata. Sekundarnu strukturu čine peptidni lanci međusobno povezani vodikovim vezama u planarnu (nabranu)  $\beta$ -strukturu ili u  $\alpha$ -uzvojnici. Preklapanjem peptidnih lanaca i njihovim povezivanjem kovalentnim vezama dolazi do formiranja tercijarne trodimenzijske strukture koja se naziva fibrilnom strukturom, a čine je proteinska vlakna koja su sastavni dio molekulskih agregata. Enzimi s tercijarnom strukturom mogu biti aktivni katalizatori (Findrik Blažević, 2017). Kvarturna struktura je najkompleksnija struktura, stabilizirana je disulfidnim mostovima i sekundarnim valencijskim silama (Findrik Blažević 2013; Findrik Blažević 2017). Sastoji se od podjedinica koje su građene od nekoliko peptidnih lanaca.

Najbolji biokatalizatori dolaze u obliku kvartarnih struktura, tj. globularnih kompleksa stabiliziranih disulfidnim mostovima i sekundarnim valencijskim silama. Kako su enzimi, odnosno njihove strukture, većinom stabilizirane slabim vezama (sve veze su slabe osim malobrojnih kovalentnih veza), enzimi su vrlo osjetljivi na promjene reakcijskih uvjeta kao što su temperatura, pH reakcijske otopine, ionska jakost i drugi. Ukoliko dođe do promjena u primarnoj strukturi, dolazi do promjena u svojstvima i funkciji enzima. Zahvaljujući njihovoj mogućnosti kristalizacije, lako ih se može identificirati i razlikovati jer po kristalnoj formi možemo razlikovati jedan protein od drugoga (Findrik Blažević, 2013).

### 2.2.2. DJELOVANJE ENZIMA

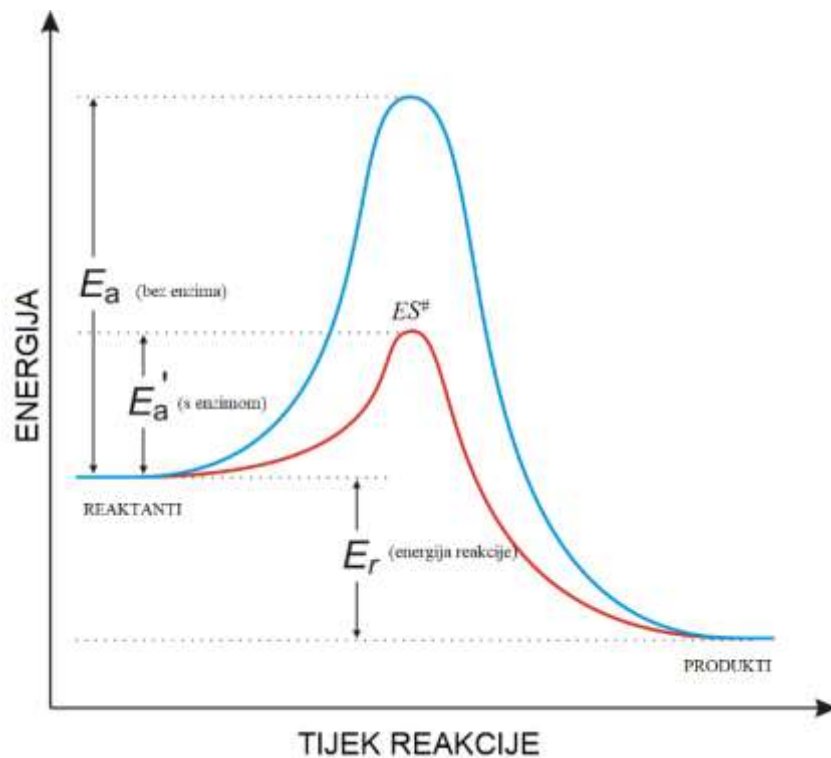
Enzimi, kao i kemijski katalizatori, ubrzavaju uspostavljanje kemijske ravnoteže određene reakcije (Brahmachari, 2016). Enzimom katalizirana reakcija se odvija na aktivnom mjestu enzima (slika 3).



**Slika 3.** Aktivno mjesto enzima na koje se veže supstrat i dolazi do katalize

(<https://www.tes.com/lessons/>)

Na površini aktivnog mjesta se nalaze bočni ogranci aminokiselina koji vežu supstrat i kataliziraju kemijsku pretvorbu supstrata. Tijekom reakcije, kada enzim i supstrat (molekula koja se veže na aktivno mjesto) dođu u fizički kontakt, dolazi do nastanka kompleksa enzim-supstrat ( $ES^\ddagger$ ) koji značajno snižava energiju aktivacije ( $E_a$ ) zbog čega je potrebno kraće vrijeme da nastane produkt i da se uspostavi kemijska ravnoteža (Patel et al., 2016), kao što možemo vidjeti iz shematskog prikaza na slici 4.

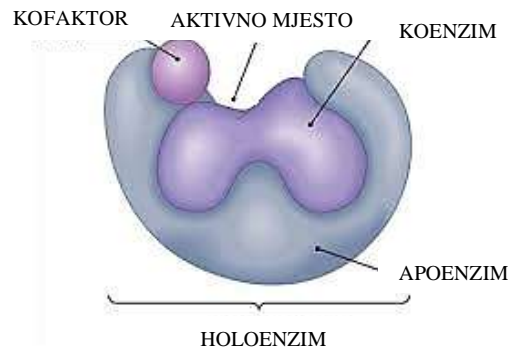


**Slika 4.** Shematski prikaz energija potrebnih za odvijanje reakcije bez i s enzimom pri čemu je  $E_a$  – energija aktivacije bez enzima,  $E_a'$  – energija aktivacije s enzimom,  $ES^\ddagger$  - kompleks enzim-supstrat i  $E_r$  – ukupna energija reakcije

Energija koja se dobije od enzim – supstrat interakcija nazivamo energijom vezanja ( $\Delta G_B$ ) i ona je glavni izvor energije zbog kojeg dolazi do smanjenja energije aktivacije reakcije. Energija vezanja, osim što doprinosi ubrzanju reakcije, doprinosi i specifičnosti reakcije između enzima i supstrata. Enzimi ne utječu na promjenu slobodne Gibbsove energije ( $\Delta G$ ) niti na ravnotežno stanje reakcije (Liu, 2016).

Za neke enzime nije dovoljan samo fizički kontakt sa supstratom da bi pokazali katalitičku aktivnost i ubrzali odvijanje reakcije već je potrebna prisutnost kofaktora i koenzima na aktivnom mjestu enzima. Kofaktori su neproteinske molekule koje se ili trajno ili privremeno vežu za enzim i time poboljšavaju odvijanje biokemijske transformacije. Najčešće su metalni

ioni (npr. Cu, Ca, Mg, Fe, K, Ni...), a ako se radi o organskim neproteinskim molekulama, tada se oni nazivaju koenzimi (Rucker et al., 2016). Koenzime čvrsto povezane s enzimom nazivamo prostetskim skupinama. Enzime povezane sa svojim kofaktorima nazivamo holoenzimima, a enzim kojemu je za aktivnost potrebna prisutnost kofaktora se naziva apoenzim. Shematski prikaz može se vidjeti na slici 5.



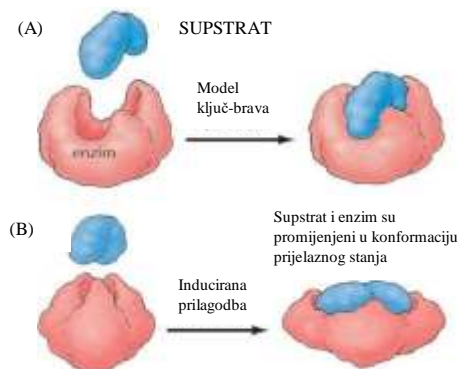
**Slika 5.** Shematski prikaz holoenzima s njegovim sastavnim dijelovima

(<https://enzimi.wordpress.com/kofaktori/>)

Važno je naglasiti da enzimi mijenjaju brzinu reakcije, ali ne mijenjaju ravnotežu reakcije. Reakcija katalizirane enzimima mogu biti i milijun puta brže od nekataliziranih (Brahmachari, 2016). Poznato je da enzimi kataliziraju oko 4000 biokemijskih reakcija u živim bićima (Bairoch et al., 2000).

### 2.2.3. TEORIJE DJELOVANJA ENZIMA

Od početka istraživanja enzima i njihovog katalitičkog mehanizma do danas, razvile su se dvije teorije o djelovanju enzima. Osnovna pretpostavka obje teorije je da enzim i supstrat moraju doći u kontakt kako bi moglo doći do katalize (ubrzavanja) reakcije.



**Slika 6.** Shematski prikaz teorija o djelovanju enzima: (A) model ključ – brava; (B) model inducirane prilagodbe (Cooper, 2000)

Prva teorija naziva se modelom „ključa i brave“. Prema ovom modelu, molekula supstrata („ključ“) mora odgovarati strukturi aktivnog mjesta enzima („brava“), odnosno oni moraju biti komplementarni (slika 6A). Druga teorija, model inducirane prilagodbe, pretpostavlja da supstrat inducira specifičnu prilagodbu u tercijarnoj strukturi aktivnog mjesta koja odgovara strukturi prijelaznog stanja supstrata koju on ostvaruje pri prelasku u produkt reakcije (Liu, 2016) (slika 6B).

U oba slučaja nastaje kompleks enzim-supstrat koji je stabiliziran pomoću elektrostatskih sila i van der Waalsovih sila te vodikovim vezama. Nešto rjeđe dolazi do nastanka kovalentnih veza u takvom kompleksu. Stvaranje, ali i raspad kompleksa enzim-supstrat moraju biti reverzibilni i izuzetno brzi, jer bi inače došlo do gubitka aktivnosti enzima, tj. enzim bi pokazao aktivnost prema samo jednoj molekuli što ne bi doprinijelo ubrzanju reakcije (Suzuki, 2015). Enzim mora biti komplementaran prijelaznom stanju reakcije, što znači da do optimalnih interakcija između enzima i supstrata dolazi samo u prijelaznom stanju reakcije.

#### **2.2.4. PODJELA ENZIMA**

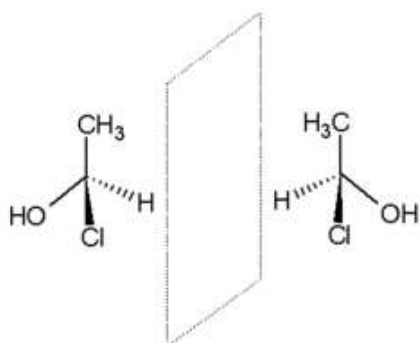
Prema Internacionalnoj uniji za biokemiju i molekularnu biologiju (*eng. International Union of Biochemistry and Molecular Biology – IUBMB*), enzime možemo podijeliti u 6 grupa (skupina) i to prema reakcijama koje kataliziraju. Razlikujemo oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze. (Brahmachari, 2016). Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije oksidacije i/ili redukcije, transferaze prijenos atoma/skupina među molekulama, hidrolaze kataliziraju reakcije hidrolize, izomeraze reakcije izomerizacije, liaze reakcije eliminacije funkcionalnih skupina kidanjem kovalentnih veza, dok su ligaze enzimi zaduženi za reakcije stvaranja kovalentne veze uz istodobnu hidrolizu pirofosfatne veze u molekuli ATP-a (adenin-trifosfata) ili sličnom nukleotidu (Palmer et al., 2011).

Ukoliko enzime želimo podijeliti prema njihovoj primjeni u industriji, tada razlikujemo enzime koji se primjenjuju u prehrambenoj industriji, enzime za obradu, enzime kao industrijske biokatalizatore, enzime za genetsko inženjerstvo i enzime koji se koriste u kozmetičkoj industriji (Brahmachari, 2016).

### 2.3. IZOMERIJA, ENANTIOMERIJA I OPTIČKA AKTIVNOST

Izomerija (*grč. isos - isti, meros – dio*) je pojava da neki spojevi iste molekulske formule imaju različite strukture. Takvi spojevi nazivaju se izomeri; to su različiti spojevi s različitim svojstvima. Stereokemija je dio kemije koja se bavi prostornom izomerijom i stereoizomerijom, odnosno proučava raspored atoma u prostoru i svojstva koja proizlaze iz toga. Stereoizomeri mogu biti konformacijski i konfiguracijski. Konformacijske izomere moguće je lako prevesti iz jednog u drugi oblik rotacijom oko jednostrukih veza (iz jedno konformacije u drugu), dok to nije slučaj s konfiguracijskim izomerima, ali se zato mogu lako izolirati (Pine, 1994).

Enantiomeri (*grč. enantios – suprotan*) su stereoizomeri koji se jedan prema drugome odnose kao zrcalne slike, kao što se može vidjeti na slici 7. Uvjet za enantiomeriju je kiralnost molekule. Molekula je kiralna kada se ne preklapa sa svojom zrcalnom slikom, ona ima kiralni centar – atom ugljika (C\*) na koji su vezana četiri različita atoma ili četiri različite atomske skupine.



**Slika 7.** Dva enantiomera koji se jedan prema drugom odnose kao zrcalne slike

Par enantiomera razlikuje se po konfiguraciji na kiralnom centru. Prevođenje jednog oblika u drugi zahtijevalo bi kidanje kemijske veze pa se može zanemariti. U fizikalnim i kemijskim svojstvima, enantiomeri se razlikuju samo po smjeru zakretanja ravnine polariziranog svjetla i po reakcijama s optički aktivnim reagensima, odnosno, enantiomerija je povezana s optičkom aktivnošću. Optički aktivan spoj je onaj koji zakreće ravninu titranja linearno polariziranog svjetla koje prolazi kroz nju. Enantiomeri zakreću ravninu polarizirane svjetlosti za isti iznos, ali u suprotnom smjeru (Pine, 1994). U reakcijama s optički aktivnim reagensima, enantiomeri će reagirati različitim brzinama koje se mogu toliko razlikovati da reakcija s jednim od enantiomera uopće neće teći. Takav slučaj često nalazimo u biološkim sustavima gdje neki enzim može djelovati samo na jedan izomer. Tada možemo govoriti o stereokemijskoj



specifičnosti enzimske katalize. Gotovo svi biološki polimeri moraju biti homokiralni (optički čisti, tj. 100% optički aktivni) da bi funkcionirali.

Zahvaljujući tome što enantiomeri reagiraju različitim brzinama s optički aktivnim tvarima, enantiomere je moguće izdvojiti iz racemične smjese upravo u takvim reakcijama. Ukoliko par enantiomera dovedemo u kontakt s optički aktivnim reagensom, može doći do nastajanja dva različita produkta – dva diastereoizomera, koji se lako mogu odvojiti. Enantiomere je iz racemične smjese moguće razdvojiti i enzimskom reakcijom s obzirom da su enzimi specifični prema supstratu, pa tako i prema određenom enantiomeru. S jednim od enantiomera će doći do reakcije, a drugi će zaostati u smjesi i može se lako izolirati (Pine, 1994). Ova metoda razdvajanja enantiomera s enzimima (kiralnim katalizatorima) naziva se kinetička rezolucija, a rezultira dobivanjem enantiomerno obogaćenog produkta. Reakcija se provodi na temelju različitih kemijskih svojstava dva različita enantiomera. S vremenom je razvijena i metoda dinamičke kinetičke rezolucije koja je zapravo kombinacija kinetičke rezolucije s *in situ* racemizacijom sporije reagirajućeg enantiomera. Dinamičkom kinetičkom rezolucijom moguće je dobiti iskorištenje od 100 % (teorijsko iskorištenje). Uvjeti za uspješnu DKR su enantioselektivnost glavne reakcije, velika brzina reakcije racemizacije, kompatibilnost obje reakcije s aspekta reakcijskih uvjeta te inertnost katalizatora prema produktu kako bi se izbjegle slijedne reakcije (Mikleušević, 2016).

## 2.4. HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZE

Halogenhidrin-dehalogenaze (haloalkohol-dehalogenaze, halogenhidrin-epoksidaze, halogenhidrin-vodik-halid-liaze) su bakterijski enzimi (Majerić Elenkov et al., 2014) koji se mogu naći u sastavu nekoliko bakterija koje koriste halogenirane alkohole ili neke druge spojeve koji nastaju raspadom halohidrina kao izvor ugljika koji im je potreban za rast (Janssen et al., 2006). Halogenhidrin-dehalogenaze su rijetki enzimi koji su do sada nađeni samo u mikrobiološki obogaćenim kulturama (Schallmey et al., 2012), no pokazuju izuzetna svojstva stabilnosti (Majerić Elenkov et al., 2006), katalitičku raznolikost te veliki potencijal primjene kao industrijski katalizatori, odnosno multifunkcionalan biokatalitički alat (Majerić Elenkov et al., 2014) zahvaljujući činjenici da se lako mogu pripremiti standardnim rekombinacijskim ekspresijskim sustavom u stanicama *Escherichia coli*. Pripadaju enzimskoj klasi liaza (Schallmey et al., 2016), a dodatno se mogu povezati sa superobitelji kratkolančanih enzima dehidrogenaza/reduktaza s kojima dijele zajedničke sekvence i strukturalne sličnosti. To su homotetrameri sastavljeni od dva dimera (Schallmey et al., 2012), kao što se može vidjeti na slici 8. Dugo vremena su bile podijeljene u tri povezane, ali različite filogenetičke grupe A, B i

C (Majerić Elenkov et al., 2014) koje dijele 24-32% identiteta sekvence (Majerić Elenkov et al., 2006). Značajan napredak u istraživanju ovih enzima je ostvaren nakon definiranja točne kristalne strukture halogenhidrin-dehalogenaza (De Jong et al., 2003) što je omogućilo identifikaciju 22 različite halogenhidrin-dehalogenaza (Calderini et al., 2019) koje su podijeljene u 7 filogenetičkih grupa, A – G (%). Svaka od navedenih grupa pokazuje različita katalitička svojstva (aktivnost, enantioselektivnost i enantiopreferenciju) (Majerić Elenkov et al., 2006).

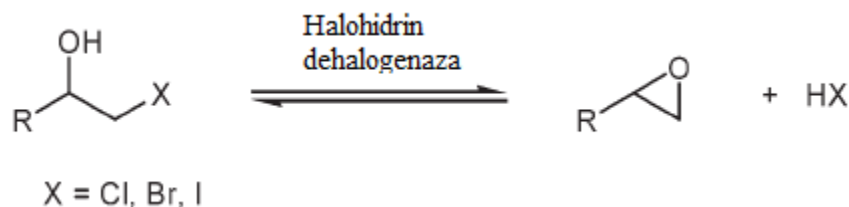


**Slika 8.** Homotetramerna struktura HheC enzima (Schallmey et al., 2012)

Za razliku od dehidrogenaza/reduktaza, halogenhidrin-dehalogenaze ne kataliziraju redoks reakcije i nemaju mogućnost vezanja nikotinamidnog kofaktora (Majerić Elenkov et al., 2014) pa tako niti njihova aktivnost ne ovisi o prisutnost kofaktora (Majerić Elenkov et al., 2006). Najveća sličnost između halogenhidrin-dehalogenaza i dehidrogenaza/reduktaza uočava se u njihovoj strukturi u kojoj nalazimo katalitičku triadu aminokiselina koja je zaslužna za njihovu katalitičku aktivnost. Kod halogenhidrin-dehalogenaza se radi o katalitičkoj triadi sastavljenoj od serina, tirozina i arginina (Ser-Tyr-Arg), dok je kod dehidrogenaza/reduktaza arginin zamijenjen s lizinom (Majerić Elenkov et al., 2014). Filogenetičke grupe A i C se mogu identificirati kao najbliži homolozi iz sekvencijske baze podataka, dok enzimi iz filogenetičke grupe B imaju više sličnosti s dehidrogenazama/reduktaza nego s članovima filogenetičkih grupa A i C. Iz ovog podatka je zaključeno da se evolucijska divergencija između dehidrogenaza/reduktaza i dehalogenaza dogodila barem dva puta. Halogenhidrin-dehalogenaze se mogu smatrati primjerom postindustrijske evolucije bakterijskih enzima kojom su stekli aktivnost za degradaciju halogeniranih ksenobiotika (Schallmey et al., 2012).

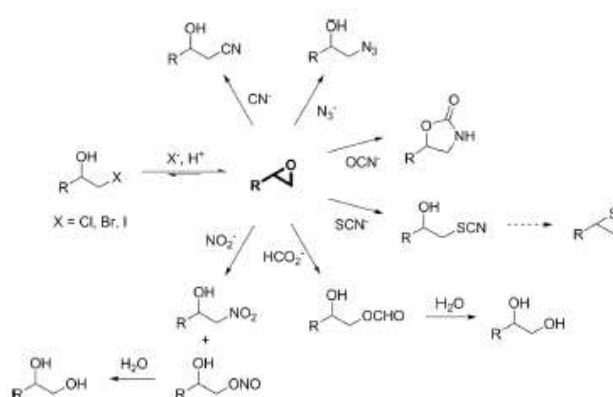
## 2.4.1. ULOGA HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZA

Prirodna uloga halogenhidrin-dehalogenaza je kataliza konverzije vicinalnih halohidrina u odgovarajuće epoksidge (reakcije dehalogenacije), odnosno kataliza reakcija zatvaranja epoksidnog prstena (Majerić Elenkov et al., 2006; Majerić Elenkov et al., 2008) pri čemu dolazi do otpuštanja halogenih iona (Janssen et al., 2006), shema reakcije prikazana je na slici 9.



**Slika 9.** Reakcijski mehanizam dehalogenacije kataliziran halogenhidrin-dehalogenazama

Osim svoje prirodne uloge, 1986. godine su Castro i Bartnicki otkrili da halogenhidrin-dehalogenaze mogu katalizirati reakcije izmjene halogenidnih iona (transhalogenacijske reakcije) (Castro et al., 1986). Kasnije je otkriveno da se mogu koristiti i za enantiomerno neselektivnu izmjenu halogenidnih supstituenata s nitrilnim grupa, a s vremenom je proširen spektar epoksidnih supstrata s kojima enzimi pokazuju aktivnost, kao i broj nukleofila koji se mogu koristiti u reverzibilnim reakcijama (slika 10). Prošireni spektar supstrata i nukleofila u reakcijama otvaranja epoksidnih prstena omogućio je otkriće da halogenhidrin-dehalogenaze mogu katalizirati enantiomerno selektivne reakcije otvaranja epoksidnog prstena intramolekulskom nukleofilnom supstitucijom halogena susjednom hidroksilnom skupinom (Janssen et al., 2006).



**Slika 10.** Reakcije otvaranja epoksidnih prstena uz prisutnost različitih nukleofila i halogenhidrin-dehalogenaza

Reakcije otvaranja epoksidnog prstena se odvijaju uz visoke stope regioselektivnosti i enantioselektivnosti (Majerić Elenkov et al., 2014) što pruža mogućnost za razvoj novih biokatalitičkih strategija za pripremu optički aktivnih spojeva (Majerić Elenkov et al., 2006), odnosno stereoselektivnih transformacija (Majerić Elenkov et al., 2014).

Tijekom reakcije otvaranja epoksidnog prstena moguća je ugradnja i drugih različitih malih anionskih nukleofila (kao što su cijanidi, azidi i nitriti (Majerić Elenkov et al., 2006), tiocijanati, cijanati, formijati (Majerić Elenkov et al., 2014) osim halogenih iona u strukturu spoja pri čemu nastaju različiti enantiomerno čisti  $\beta$ -supstituirani alkoholi (Majerić Elenkov et al., 2006).  $\beta$ -supstituirani alkoholi imaju izuzetno veliku važnost u farmaceutskoj industriji gdje se koriste kao intermedijeri i prekursori za dobivanje različitih farmaceutika (atorvastatin, (Schallmey et al., 2012), biološki aktivnih spojeva i čistih kemikalija (Miao et al., 2019) što govori koliko velika je potreba za njihovom jednostavnom i pouzdanom pripremom (Majerić Elenkov et al., 2012).

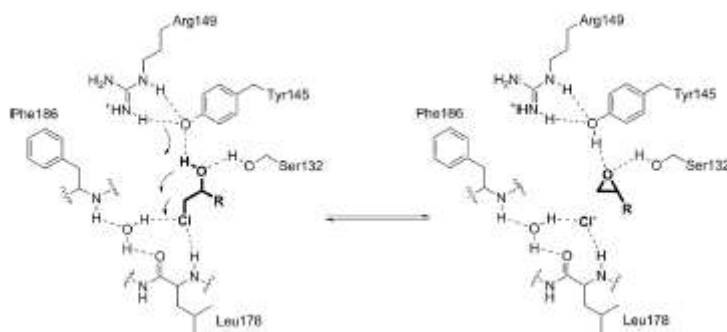
Iznimna važnost halogenhidrin-dehalogenaza leži u njihovoj sposobnosti kataliziranja nastajanja C-C (s cijanidima), C-N (s azidima i nitrilima), C-Cl, C-Br te C-O (s nitrilima i formijatima) i C-S veza (s tiocijanatima) (Janssen et al., 2006). Mogućnost (sposobnost) halogenhidrin-dehalogenaza da kidaju i/ili stvaraju nove kemijske veze te time omogućuju odvijanje mnogih kemijskih reakcija i nastajanje mnogih produkata, je primjer nevjerojatne katalitičke raznolikosti te se zbog toga intenzivno istražuju (Schallmey et al., 2012). Korištenjem cijanida kao nukleofila prilikom reakcija otvaranja epoksidnog prstena dolazi do formiranja nove C-C veze što daje na važnosti ovim reakcijama.

#### **2.4.2. KATALITIČKI MEHANIZAM HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZA**

Istraživanja ukazuju da se epoksidno i halogenidno vezno mjesto enzima poprilično razlikuju, što je u skladu s uočenim razlikama u enantioselektivnosti i vrsti supstrata s kojima različite grupe ovih enzima pokazuju aktivnost (Janssen et al., 2006). Otkriveni su detalji katalitičkog mehanizma halogenhidrin-dehalogenaza koji pokazuju način na koji se supstrati (epoksidi) vežu za/na aktivno mjesto (Schallmey et al., 2012).

### 2.4.2.1. REAKCIJE NASTAJANJA EPOKSIDA

Utvrđeno je da tijekom reakcije dehalogenacije (zatvaranje epoksidnog prstena) dolazi do formiranja vodikove veze između serina i hidroksilne grupe supstrata, arginin smanjuje pKa vrijednost odgovarajućeg tirozina, a asparagin smješten na površini enzima je uključen u transfer protona u otapalo. Transfer protona se odvija preko mreže vodikovih veza uspostavljenih između bočnih lanaca aminokiselina i molekula vode iz otapala. Nastali negativni naboj se stabilizira pomoću serina te dolazi do nukleofilnog napada na susjednom ugljikovu atomu. Posljedica nukleofilnog napada je pucanje veze ugljik-halogen (C-X veze) i otpuštanje halogenidnog iona koji se stabilizira na anionskom veznom mjestu enzima. Valjanost ovog predloženog reakcijskog mehanizma je potvrđena kvantno-mehaničkim izračunima (Schallmeyer et al., 2012). Katalitički mehanizam dehalogenacije prikazan je na slici 11.

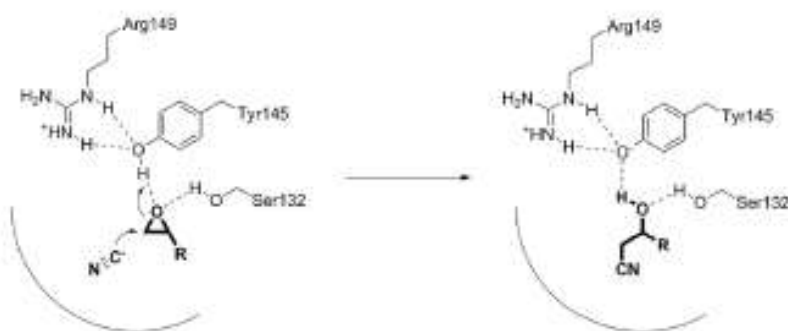


**Slika 11.** Katalitički mehanizam dehalogenacije na aktivnom mjestu halohidrin-dehalogenaza (enzim HheC)

Istraživanja su pokazala da se reakcije zatvaranja prstena vicinalnih halohidrina reverzibilne. Reverzibilnost ove reakcije smatra se nedostatkom ukoliko se radi o provođenju kinetičke rezolucije zbog toga što je reverzibilnost uzrok nepotpune konverzije vicinalnog halohidrina u epoksid (Majerić Elenkov et al., 2006), a ona se može umanjiti premještanjem ravnoteže reakcije na stranu produkata uklanjanjem epoksida i reakcijske smjese različitim kemijskim reakcijama (Majerić Elenkov et al., 2014). Osim pomaka ravnoteže prema produktima, moguće je spriječiti reverzibilnost reakcije zatvaranja prstena epoksida primjenom anionskih smola s hidroksilnim ionima koji će ukloniti nusprodukt dehalogenacije, HX (Majerić Elenkov et al., 2014).

### 2.4.2.2. REAKCIJE OTVARANJA EPOKSIDNOG PRSTENA

Mehanizam otvaranja epoksidnog prstena (slika 12) je obrnut od mehanizma zatvaranja epoksidnog prstena. Nukleofilni napad kombiniran s protoniranjem kisika dovodi do nastajanje veze ugljik-halogenid. Tirozin i serin doprinose tetrahedralnoj raspodjeli epoksidnog kisika doniranjem vodikovih veza preko svojih slobodnih elektronskih parova. Tirozin djeluje kao kiselina i tako aktivira arginin, a serin stabilizira hidroksilnu grupu dok asparagin omogućuje primitak protona iz otapala. Iz ovog mehanizma se može zaključiti (potvrđuje se) da se anionsko vezno mjesto aktivira u prisutnosti anionskih nukleofila (ne samo halogenida) koji napadaju terminalne pozicije epoksidnog prstena. Naboj površinskog asparagina utječe na pKa vrijednost aktivnog mjesta te je uzrok razlika u pH optimumu koji je može uočiti kod reakcija otvaranja i zatvaranja epoksidnog prstena. Neovisno koji nukleofil je prisutan, nukleofilni napad se uvijek odvija na terminalni ugljikov atom (Schallmeyer et al., 2012).



**Slika 12.** Katalitički mehanizam otvaranja epoksidnog prstena na aktivnom mjestu halogenhidrin-dehalogenaza (enzim HheC)

Kemijske metode koje se koriste za otvaranje epoksidnih prstenova pokazuju nisku regioselektivnost, zahtijevaju prisutnost Lewisove kiseline kao katalizatora, odvijaju se na visokim temperaturama, vrijeme odvijanja reakcije je produženo te zahtijevaju uporabu različitih organskih otapala. Za razliku od kemijskih metoda, biokatalitičke reakcije otvaranja prstena epoksida (sa cijanidima) se odvijaju u vodenom mediju pri blagim uvjetima te su reakcije visoko regio- i enantioselektivne (Majerić Elenkov et al., 2006; Majerić Elenkov et al., 2014). Visoko selektivnost ovih reakcija u određenim uvjetima može predstavljati i nedostatak jer je moguće dobiti samo jedan stereoisomer željenog produkta. Nedostatak ovih reakcija je ograničenje na terminalne epoksidne supstrate te manjak aktivnosti u prisutnosti nenabijenih nukleofila kao što su voda i amonijak (Majerić Elenkov et al., 2014).

### 2.4.3. HheC

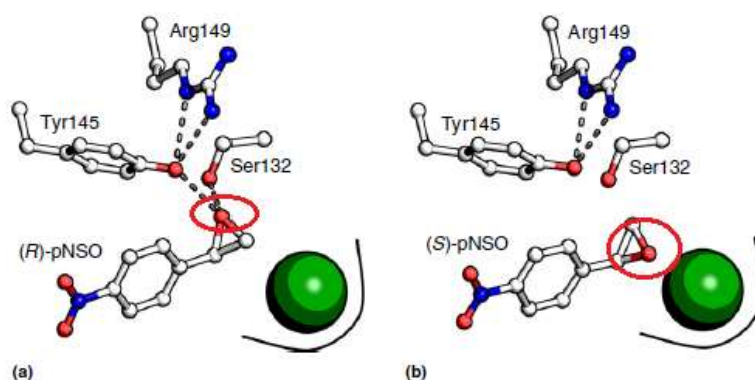
Halogenhidrin-dehalogenaze iz C filogenetičke grupe (HheC) su homotetramerni enzimi s podjedinicama od 28 kDa (Majerić Elenkov et al., 2006). Kod reakcija kataliziranih HheC enzimom, najsporiji korak je otpuštanje halogenidnog iona iz aktivnog mjesta (Janssen et al., 2006). HheC je najbolje istražen enzim među halogenhidrin-dehalogenazama zahvaljujući definiranoj kristalnoj strukturi i katalitičkom mehanizmu (Majerić Elenkov et al., 2006) te činjenici da postoji u dosta velikom broju organizama poput bakterija, gljiva, biljaka i sisavaca (Venuvanalingama et al., 2011). Također se pokazao i kao najselektivniji enzim među halogenhidrin-dehalogenazama. Pokazuje visoku selektivnost u reakcijama otvaranja alifatskih i aromatskih epoksida uz prisutnost azida, nitrita i cijanida. Najbolji supstrati za HheC su 2,2-disupstituirani epoksidi jer s njima pokazuje najvišu razinu enantioselektivnosti te velike prinose optički obogaćenih produkata (čistoća produkata > 99 % (Majerić Elenkov et al., 2007).

Kinetičkom rezolucijom se mogu dobiti enantiomerno čisti tercijarni alkoholi koji sadrže sintetski vrlo korisne nitrilne grupe. Katalitička svojstva HheC enzima se vrlo razlikuju od katalitičkih svojstava ostalih halogenhidrin-dehalogenaza. HheC enzim se općenito ponaša kao (*R*)-selektivni enzim, dok su HheA i HheB (*S*)-selektivni enzimi. Stupanj enantioselektivnosti HheC je značajno veći nego enantioselektivnost ostalih halogenhidrin-dehalogenaza (Majerić Elenkov et al., 2006).

Biokatalitička raznolikost i primjenjivost enzima lako se mogu poboljšati direktnom evolucijom. Otkriveno je da HheC enzim može podnijeti zamjenu više od 13% aminokiselina na razini sekvence bez da izgubi svoju strukturu i aktivnost te je zbog toga obećavajući kandidat za daljnju biokatalitičku evoluciju (Schallmey et al., 2012). Direktna evolucija je usmjerena na povećanje temperaturne stabilnosti, povećanje reakcijskih brzina, bolje otpornosti na visoke koncentracije supstrata i produkata te dobivanje željenih produkata visoke kiralne čistoće. Pomoću usmjerene mutageneze mogu se dobiti mutanti HheC enzima koji imaju veće brzine i razine konverzije supstrata u njihove odgovarajuće epoksidge. Veća brzina reakcije postiže se zahvaljujući mutaciji halogenidnog veznog mjesta (Janssen et al., 2006), odnosno anionskog veznog mjesta (Schallmey et al., 2012), koja omogućuje brže otpuštanje negativnog iona, a taj korak je ograničavajući korak za brzinu reakcije, odnosno za konverziju supstrata u produkt (Janssen et al., 2006). HheC je često predmet istraživanja u želji da se direktnom evolucijom stvori biokatalizator koji će zadovoljavati definirane uvjete za industrijsku primjenu (Schallmey et al., 2012). Stabilnost enzima narušava se u oksidativnim uvjetima jer može doći do nastajanja intramolekularnih disulfidnih veza između monomernih jedinica enzima što smanjuje njegovu

aktivnost (Tang et al., 2002). Kako bi se poboljšala stabilnost enzima u oksidacijskim uvjetima i on postao pogodniji za primjenu u biokatalitičkoj sintezi, cisteinski ostaci mogu se zamijeniti alaninskim direktnom evolucijom (Schallmeyer et al., 2012).

Kinetička istraživanja su pokazala da uočena (*R*)-preferencija HheC enzima nastaje zbog preferencije vezanja (*R*)-enantiomera prema (*S*)-enantiomeru (Schallmeyer et al., 2012) što je dokazano strukturalnim kristalografskim istraživanjima pomoću X-zraka (Janssen et al., 2006). Tijekom reakcije (*S*)- i (*R*)- enantiomeri zauzimaju slične pozicije na aktivnim mjestima, ali je njihova orijentacija drugačija, što se može vidjeti na slici 13.



**Slika 13.** Orijehtacija (*R*)-pNSO i (*S*)-pNSO na aktivnom mjestu halogenhidrin-dehalogenaze

Za preferirane (*R*)-epoksidge, kisik epoksidge se orijentira prema aktivnom mjestu te dolazi do interakcije (nastaju vodikove veze) s tirozinom i serinom, dok se kisik (*S*)-epoksidge orijentira suprotno od katalitičkih aminokiselina bez odgovarajućeg pravilnog obrasca uspostave vodikovih veza (Schallmeyer et al., 2012), odnosno nastaje neproduktivna konformacija s epoksidom koja kisik ne orijentira prema serinu i tirozinu već u suprotnom smjeru (Janssen et al., 2006).

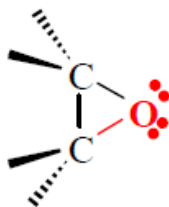
Osim što je (*R*)-selektivni enzim, HheC je i  $\beta$ -regioselektivni u reakcijama otvaranja epoksidnog prstena u prisutnosti različitih nukleofila (Miao et al., 2019). HheC je vrlo atraktivan i poželjan biokatalizator za proizvodnju  $\beta$ -cijano i  $\beta$ -azido tercijarnih alkohola zahvaljujući velikom rasponu supstrata čiju konverziju može katalizirati te činjenici da je optički čiste tercijarne alkohole vrlo teško proizvesti do sada poznatim metodama (Majerić Elenkov et al., 2007).



#### 2.4.4. EPOKSIDI – SUPSTRATI

Enzimaska aktivnost i brzina reakcije ovisi o supstratu. Činjenica da su enzimi vrlo specifični prema supstratima, čak na razini enantiomera istog spoja, čini enzime upravo tako privlačnima za primjenu u industriji. Mogućnost da se provedbom reakcije dobije upravo željeni produkt vrlo visoke čistoće otvorila je vrata enzimima u industriji. S obzirom da halogenhidrin dehalogenaze u prirodi kataliziraju reakcije dehalogenacije popraćene zatvaranjem epoksidnog prstena, ne čudi činjenica da su alifatski i aromatski vicinalni halohidriini vrlo pogodni supstrati za halogenhidrin-dehalogenaze. Halohidriini s aromatskim dijelom podliježu vrlo enantioselektivnim reakcijama s HheC enzimom (Majerić Elenkov et al., 2014). Otkrićem reverzibilnosti ove reakcije omogućena su dodatna istraživanja usmjerena prema epoksidima kao supstratima. Halogenhidrin-dehalogenaze iz sve tri filogenetičke grupe su pokazale aktivnost u prisutnosti velikog broja terminalnih epoksida: veća aktivnost je zabilježena s monosupstituiranim i disupstituiranim terminalnim epoksidima, dok je s neterminalnim epoksidima zabilježena skromnija aktivnost.

Epoksidi su tročlani ciklički eteri (IUPAC ime: oksirani) koji sadrže atom kisika u svojoj tročlanoj prstenastoj strukturi (slika 14) (McMurry, 2011).



**Slika 14.** Struktura epoksidnog prstena

Jako napregnut tročlani prsten epoksida čini ih mnogo reaktivnijim prema nukleofilnoj supstituciji od ostalih etera (Solomons et al., 2017). Kemijskom hidrolizom u kiselim uvjetima dolazi do otvaranja epoksidnog prstena i formiranja diola. Reakcija otvaranja epoksidnog prstena s kiselinama zapravo povećava njihovu reaktivnost nakon čega slijedi nukleofilna adicija (vode ako se odvija u vodenom mediju, odnosno nastajanja hidroksilne skupine) (McMurry, 2011). Voda koja djeluje kao nukleofil napada protonirani epoksid sa strane nasuprot epoksidnoj skupini (Solomons et al., 2017), odnosno dolazi do  $S_N2$  nukleofilnog napada gdje nukleofil napada manje ometani ugljik na epoksidnom prstenu i cijepa C-O vezu (Jespersen et al., 2012). Do otvaranja epoksida može doći i tijekom bazne katalize: ako je epoksid nesimetričan, nukleofil će napasti manje supstituirani atom ugljika (Solomons et al.,

2017). Epoksidi su izuzetno reaktivni i upravo zbog toga su kancerogeni. Epoksidi prolaze vrlo lagane nukleofilne reakcije supstitucije s DNK. Nukleofilna mjesta na DNK reagiraju na otvaranje epoksidnog prstena, uzrokujući alkiliranje DNK stvaranjem kovalentne veze s karcinogenom (Solomons et al., 2017).

Epoksidi su visoko vrijedni spojevi u organskoj sintezi zbog toga što se epoksidni prsten može kemijski transformirati u brojne sintetski korisne intermedijere (Waldmann, 2012). Zahvaljujući činjenici da je njihova biološka aktivnost često povezana samo s jednim enantiomerom (eutomerom) te činjenici da antipod (distomer) može imati potencijalno toksične i štetne efekte, proizvodnja ovih molekula u enantiomerno čistoj formi je trenutno važni industrijski izazov (Deregnacourt et al., 2007). Za sintezu ovih važnih gradivnih jedinica u enantiomerno čistoj formi razvijene su različite metode dobivanja: najznačajnije su asimetrična epoksidacija olefina i kinetička rezolucija epoksida. Metode se često baziraju na uporabi kiralnih katalizatora koji sadrže prijelazne metale. Danas se sve više razvijaju biokatalitičke metode dobivanja epoksida kao što su epoksidacija uz monooksigenaze te kinetička rezolucija racemičnih epoksida uz epoksid hidrolaze. Biokatalitička kinetička rezolucija racemičnih epoksida može biti vrlo prihvatljiva i atraktivna alternativa (zamjena) za potencijalno toksične i supstratom limitirane kemokatalitičke metode sinteze (Deregnacourt et al., 2007). Smatra se vrlo učinkovitim, jeftinom, blagom i jednostavnim metodom za uporabu te metodološki „zelenom kemijom“ koja se može primijeniti za efektivnu preparativnu (industrijsku) implementaciju (Deregnacourt et al., 2007). Otkrićem katalitičkih sposobnosti halogenhidrin-dehalogenaza, ovi enzimi su postali ključni biokatalitički alat za dobivanje optički čistih epoksida (Majerić Elenkov et al., 2008).

Dokazana je i aktivnost halogenhidrin-dehalogenaza prema spiroepoksidima (Majerić Elenkov et al., 2012). Istraživanja su pokazala da vicinalni fluorirani alkoholi nisu prikladni supstrati za halogenhidrin-dehalogenaze jer enzim ne može cijepati C-F vezu (Majerić Elenkov et al., 2018).

#### **2.4.5. NUKLEOFILI**

U reakcijama otvaranja epoksidnih prstena, različiti maleni negativno nabijeni ioni se mogu ponašati kao nukleofili i ugraditi u strukturu spoja: azidi, cijanidi, cijanati, tiocijanati, nitriti, formijati (Majerić Elenkov et al., 2012; Schallmeyer et al., 2012; Schallmeyer et al., 2016; Calderini et al., 2019). Među navedenim nukleofilima, cijanidi su vrlo zanimljivi zbog sintetske raznovrsnosti koju pružaju. Kako se nitrilna grupa može transformirati u amino skupinu, amide,

karboksilnu ili karbonilnu grupu, reakcijama mogu nastati različiti enantiomerno čisti produkti koji mogu poslužiti kao građevne jedinice za sintezu biološki aktivnih spojeva (Majerić Elenkov et al., 2008). Cijanide, kao nukleofile u reakcijama kataliziranim halogenhidrin-dehalogenazama, po prvi puta je istraživao Nakamura. Istraživanje je radio na reakcija otvaranja epoksidnog prstena 1,2-epoksibutana te je uočio nastajanje  $\beta$ -hidroksivaleronitrila (Janssen et al., 2006). U reakcijama kataliziranim s HheC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 u prisutnosti cijanida dolazi do formiranja velikog broja različitih  $\beta$ -cijano alkohola. Enantioselektivnost reakcija ovisi o supstratu (epoksidu), a *E* vrijednosti (razina enantioselektivnosti) su nešto više s HheC nego s HheA i HheB enzimima. Istraživanja su pokazala da u reakcijama cijanolize s HheC enzimom, prisutnost dodatnog supstituenta na epoksidnom prstenu uzrokuje vrlo visoku enantioselektivnost ( $E > 200$ ), koja se može iskoristiti za proizvodnju enantiomerno čistih tercijarnih alkohola (Schallmey et al., 2012).

Brzina reakcije jako ovisi o vrsti i prirodi nukleofila te su sa svim epoksidima najbrže reakcije zabilježene u prisutnosti azida (Majerić Elenkov et al., 2007). Iako su azidi snažniji nukleofili od cijanida, kemijski katalizirana azidoliza nije ništa brža nego s cijanidima, tj. spontana azidoliza je mnogo sporija nego enzimski katalizirana azidoliza te zbog toga spontana azidoliza nema utjecaja na optičku čistoću produkta (Majerić Elenkov et al., 2007).

S cijanatima je moguće prevesti mnogo manji broj reakcija jer halogenhidrin-dehalogenaza (HheC) pokazuje aktivnost samo s izrazito malim epoksidima (supstratima). Istraživanja su čak pokazala da cijanat može uzrokovati inhibiciju otvaranja epoksidnog prstena. Uzrok ovakvom ponašanju mogla bi biti struktura aktivnog mjesta enzima zbog koje cijanat ne može zauzeti povoljni položaj koji bi omogućio veću aktivnost enzima. Usprkos ovom nedostatku, cijanati su vrlo atraktivni nukleofili jer uzrokuju nastajanje oksazolidinonskog prstena (Majerić Elenkov et al., 2008).

#### **2.4.6. MOGUĆA PRIMJENA HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZA**

Enzimski katalizirana racemizacija predstavlja atraktivnu opciju za dinamičku kinetičku rezoluciju, s obzirom da se odvija na sobnoj temperaturi, pri neutralnom pH i atmosferskom tlaku, a sama reakcija je visoko kemoselektivna što sprječava racemizaciju produkta. Halogenhidrin-dehalogenaze su jedinstveni enzimi koji istovremeno mogu katalizirati i racemizaciju i kinetičku rezoluciju određenih supstrata (Majerić Elenkov et al., 2014). U posljednje vrijeme halogenhidrin-dehalogenaze sve češće zamjenjuju epoksid hidrolaze u

reakcijama enantioselektivne hidrolize racemičnih epoksida jer imaju veći spektar nukleofila s kojima mogu reagirati, odnosno koje mogu ugraditi u spoj (Majerić Elenkov et al., 2012).

Ovi enzimi predstavljaju vrlo obećavajući biokatalitički alat za sintezu optički čistih epoksida, halohidrina i  $\beta$ -supstituiranih alkohola zahvaljujući svojoj iznimnoj enantioselektivnosti i mogućnosti prihvaćanja neprirodnih nukleofila u reakcijama otvaranja epoksidnih prstenova (Majerić Elenkov et al., 2006). Primjenjivost halohidrin dehalogenaza u uklanjanju organohalogenidnih spojeva iz kontaminiranih otpadnih mjesta te za uklanjanje toksičnih tvari iz hrane, papira i polimerne industrije je dokazana na nekoliko primjera te pokazana njihova aktivnost (i cijelih stanica koje sadrže halohidrin dehalogenaze i djelomično pročišćenih enzima) u procesima proizvodnje optički aktivnih C3 i C4 finih kemijskih prekursora za vrijedne farmaceutike kao što su atovarstatin (Lipitor) ili vitamin E (Schallmey et al., 2012).

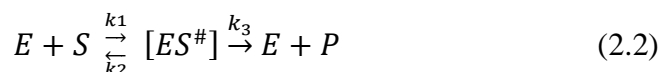
## 2.5. MICHAELIS-MENTENIČINA KINETIKA

Michaelis-Menteničina kinetika je kinetički model (jednadžba 2.1.) koji u obzir uzima enzimsku dinamiku:

$$r_S = \frac{V_m \times c_S}{K_m + c_S} \quad (2.1.)$$

gdje je  $r_S$  [mmol dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>] brzina reakcije s obzirom na reaktant  $S$  (supstrat),  $c_S$  [mmol dm<sup>-3</sup>] je koncentracija supstrata,  $V_m$  [mmol dm<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>] je maksimalna brzina reakcije, a  $K_m$  [mmol dm<sup>-3</sup>] je Michaelisova konstanta.

Razvijena je u 20. stoljeću od strane njemačkog biokemičara Leonora Michaelisa i kanadske liječnice Maud Menten. Model daje objašnjenje kako enzim utječe na povećanje kinetičke brzine reakcije te kako brzina reakcije ovisi o koncentracijama enzima i supstrata [XYZ]. Prema reakcijskoj shemi, supstrat ( $S$ ) se reverzibilno veže za enzim ( $E$ ) te nastaje kompleks enzim-supstrat ( $ES^\#$ ) koji nepovratno reagira dajući produkt ( $P$ ) i slobodan enzim ( $E$ ).



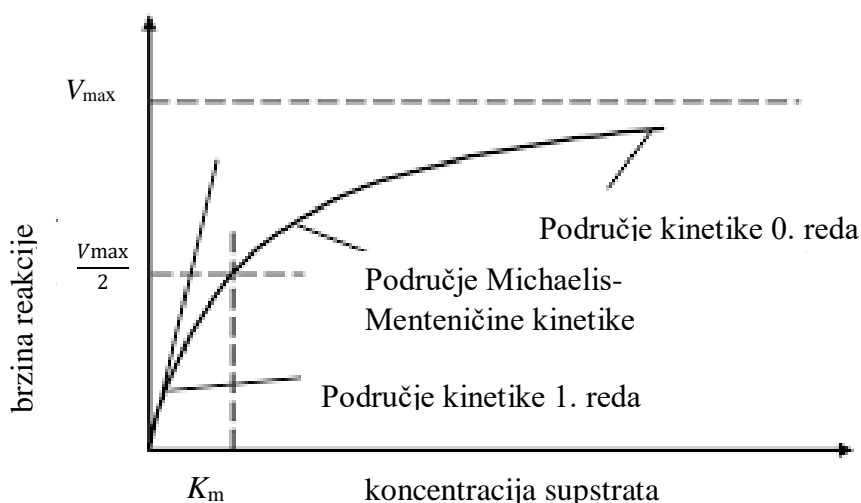
Prema ovoj reakcijskoj shemi moguće je definirati parametre ovog modela,  $V_m$  i  $K_m$ :

$$V_m = k_3 \times c_{E0} \quad (2.3.)$$

$$K_m = \frac{k_1 + k_3}{k_2} \quad (2.4.)$$

pri čemu je  $c_{EO}$  početna koncentracija enzima, a  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  su konstante iz reakcijske sheme.

Michaelisova konstanta  $K_m$  jednaka je koncentraciji supstrata u trenutnu kada brzina reakcije iznosi polovicu maksimalne brzine reakcije  $V_m$ , odnosno to je koncentracija supstrata pri kojoj je polovica aktivnih mjesta enzima zasićena supstratom (Doran, 2013).  $K_m$  je neovisan o koncentraciji enzima, ali ima drugačije vrijednosti za različiti enzime, kao i za različite supstrate s različitim enzimima. Smatra se relativnom mjerom afiniteta vezanja supstrata, odnosno stabilnosti supstrata enzim-supstrat: što  $K_m$  ima nižu vrijednost, to enzim pokazuje veći afinitet prema supstratu (Doran, 2013; Findrik Blažević 2017). Bitno obilježje (pretpostavka) Michaelis-Menteničine kinetike je da katalizator (enzim) postaje zasićen pri visokim vrijednostima supstrata te se zato ova kinetika naziva i kinetikom zasićenja. Iz grafičkog prikaza na slici 15 možemo vidjeti da brzina reakcije ne raste neograničeno s koncentracijom supstrata već se približava granici,  $V_m$ . Kada je brzina jednaka maksimalnoj brzini ( $r_s = V_m$ ), sva aktivna mjesta enzima su zasićena supstratom. Pri koncentracijama supstrata mnogo većim od  $K_m$ , brzina reakcije se približava konstantnoj vrijednosti neovisnoj o koncentraciji supstrata. U to rasponu koncentracija, reakcija je u osnovi nultog reda u odnosu na supstrat. Kada su koncentracije supstrata mnogo niže od  $K_m$ , tada se radi o reakciji prvog reda te postoji približno linearna ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata,  $c_s$ . U srednjem dijelu ove hiperbole uočava se područje Michaelis-Menteničine kinetike (Hegyí et al., 2013).



**Slika 15.** Grafički prikaz Michaelis-Menteničine kinetike

Michaelis-Menten kinetika sa zadovoljavajućom točnošću opisuje kinetiku mnogih industrijskih enzima, uz neke iznimke (npr. glukoza izomeraza). Ako postoji više supstrata,

moraju se primijeniti složenije kinetičke jednadžbe (Doran, 2013). Tako će za sustav s dva supstrata Michaelis-Menteničina jednadžba poprimiti slijedeći oblik:

$$r_S = \frac{V_m \times c_{S1} \times c_{S2}}{(K_m^{S1} + c_{S1}) \times (K_m^{S2} + c_{S2})} \quad (2.5.)$$

gdje su  $c_{S1}$  i  $c_{S2}$  koncentracije supstrata  $S_1$  i  $S_2$ ,  $K_m^{S1}$  i  $K_m^{S2}$  su Michaelisove konstante vezane uz enzim i supstrat  $S_1$ , odnosno supstrat  $S_2$ , a  $V_m$  je maksimalna brzina reakcije.

Također, mora se voditi računa dolazi li tijekom reakcije do inhibicije enzima, što se također mora uključiti u jednadžbu Michaelis-Menten kinetike (Findrik Blažević, 2017).

## 2.6. MATEMATIČKO MODELIRANJE

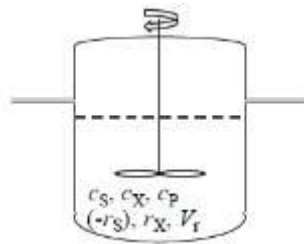
Matematičko modeliranje ima značajnu ulogu u razvoju biokemijskih reakcija u kojima enzimi sudjeluju kao (bio)katalizatori. Matematički model procesa (reakcije) sastoji se od kinetičkog i reaktorskog modela (Findrik Blažević, 2017). Dobar kinetički model je temelj matematičkog modeliranja. Postavlja se na temelju eksperimentalnih kinetičkih istraživanja, a zapravo opisuje vezu između brzine enzimske reakcije i veličina stanja reakcijskog sustava: koncentracije, temperature i/ili tlaka (Findrik Blažević, 2017). Kod enzimskih reakcija tlak nema značajni utjecaj na odvijanje reakcije. Postupak razvoja kinetičkog modela podloga je za projektiranje reaktora. Razvojem matematičkih, odnosno kinetičkih modela, omogućuje se brži i bolji razvoj reakcije i optimizacija reakcijskih parametara što uvelike smanjuje potrebu za provođenjem dodatnih eksperimenata što u konačnici doprinosi velikoj ekonomskoj uštedi. Tijekom razvoja kinetičkog modela poštuju se određeni koraci (Findrik Blažević, 2017):

- I. Odabire se model za koji se pretpostavlja da će moći opisati eksperimentalne podatke (na temelju iskustva),
- II. Odabrani model se testira,
- III. Provjerava se primjenjivost odabranog modela u širem rasponu reakcijskih uvjeta,
- IV. Model se potvrđuje procjenom kinetičkih parametara.

Reaktorski model je zapravo bilanca tvari u reaktorima koja se temelji na Zakonu o očuvanju mase. Osnovne izvedbe reaktorskih modela su: kotlasti reaktor, protočno-kotlasti reaktor i cijevni reaktor. Procesi u reaktorima mogu biti stacionarni ili nestacionarni. Temeljna razlika je u tome što kod stacionarnih procesa ne dolazi do akumulacije tvari (biomase, supstrata i/ili produkta), a kod nestacionarnih se tvari akumuliraju.

### 2.6.1. KOTLASTI REAKTOR

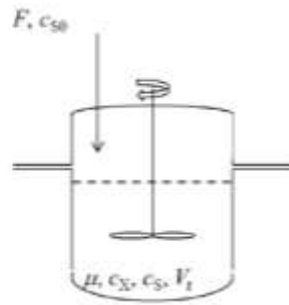
Idealni kotlasti reaktor je onaj koji u svakoj točki reaktora ima jednak (homogen) sastav reakcijske smjese, kao i temperaturu. U njega se na početku provedbe reakcije dodaje reakcijska smjesa, zatim enzimi/biokatalizator što označava početak provedbe reakcije. Ukupni volumen reakcijske smjese i enzima ne smije prelaziti 75% volumena reaktora. Supstrat(i) se troši s vremenom, a koncentracija produkta se istovremeno povećava. Ovaj reaktor karakterizira rad u nestacionarnom stanju, to je zatvoren sustav u kojem je volumen reakcijske smjese konstantan (slika 16). Često se upotrebljava miješalo za održavanje homogenosti reakcijske smjese. Kotlasti reaktor još može biti izveden kao kotlasti reaktor s dotokom supstrata.



**Slika 16.** Shematski prikaz kotlastog bioreaktora ( $c_S$  – koncentracija supstrata,  $\text{mol dm}^{-3}$ ,  $c_X$  – koncentracija biomase,  $\text{g dm}^{-3}$ ,  $c_P$  – koncentracija produkta,  $\text{mol dm}^{-3}$ ,  $V_r$  – volumen reaktora,  $\text{dm}^3$ ) (Findrik Blažević, 2017)

### 2.6.2. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM SUPSTRATA

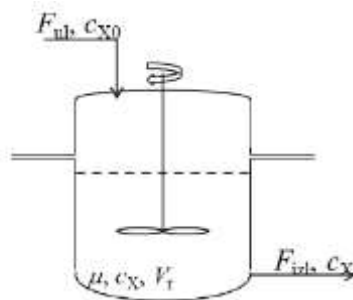
Kotlasti reaktor s dotokom supstrata idealno je rješenje za reakcijske sustave u kojima je biokatalizator inhibiran supstratom (Findrik Blažević, 2017). Kotlasti reaktor s dotokom supstrata nema izlazni tok kao niti klasičan kotlasti reaktor (poglavlje 2.6.1.), a razlika između ova dva tipa reaktora je u tome što se kod kotlastog reaktora s dotokom supstrata volumen u reaktoru konstantno mijenja (povećava) zbog kontinuiranog dovođenja supstrata u reaktor. Ovakva izvedba reaktora omogućava da se koncentracija supstrata održava na željenom nivou što doprinosi postizanju maksimalnog iskorištenja pretvorbe supstrata u željeni produkt. Poznavanjem kinetike reakcije moguće je odrediti uvjete koncentracija supstrata i njegovog protoka kako bi dobili maksimalnu koncentraciju produkta u reaktoru. Poželjno je da je koncentracija supstrata u dotoku visoka, a protok mali (Findrik Blažević, 2017). Bitno je osigurati dobro miješanje u reaktoru da se koncentracija supstrata dobro razdjeli po volumenu reaktora (slika 17).



**Slika 17.** Shematski prikaz kotlastog bioreaktora s dotokom supstrata ( $F$  – molarni protok supstrata,  $\text{mol h}^{-1}$ ,  $c_{s0}$  – koncentracija supstrata u dotoku,  $\text{mol dm}^{-3}$   $\mu$  – specifična brzina rasta biomase,  $\text{min}^{-1}$ ,  $c_S$  – koncentracija supstrata,  $\text{mol dm}^{-3}$ ,  $c_X$  – koncentracija biomase,  $\text{g dm}^{-3}$   $V_r$  – volumen reaktora,  $\text{dm}^3$ ) (Findrik Blažević, 2017)

### 2.6.3. PROTOČNO-KOTLASTI REAKTOR

Kod protočno-kotlastog reaktora (slika 18.), kemijski sastav reakcijske smjese se ne mijenja s vremenom s obzirom da se stalno dovodi nova reakcijska smjesa zbog čega je koncentracija produkta u svakoj točki protočno-kotlastog reaktora jednaka onoj na izlazu iz reaktora. Sastav reakcijske smjese ovisi samo o protoku reakcijske smjese, odnosno možemo reći da ga karakterizira prostorno vrijeme zadržavanja, tau ( $\tau$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) Pretpostavka stacionarnog stanja podrazumijeva da je ulazni protok reakcijske smjese jednak izlaznom protoku (Findrik Blažević, 2017).



**Slika 18.** Shematski prikaz protočno kotlastog bioreaktora ( $F_{ul}$  – molarni protok na ulazu,  $\text{mol h}^{-1}$ ,  $F_{izl}$  – molarni protok tvari na izlazu,  $\text{mol h}^{-1}$ ,  $c_{X0}$  – početna koncentracija biomase,  $\text{g dm}^{-3}$ ,  $c_X$  – koncentracija biomase,  $\text{g dm}^{-3}$ ,  $V_r$  – volumen reaktora,  $\text{dm}^3$ ,  $\mu$  – specifična brzina rasta biomase,  $\text{min}^{-1}$ ) (Findrik Blažević, 2017)

Ukoliko imamo biokatalizator inhibiran produktom, onda ne smijemo odabrati protočno kotlasti reaktor za taj sustav jer on radi u uvjetima izlazne koncentracije produkta u stacionarnom stanju te će u tim uvjetima brzina reakcije biti niska, a biokatalizator neiskorišten (Findrik Blažević, 2017).



### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. APARATURA

##### 3.1.1. TRESILICA

Reakcijski sustav za provođenje reakcija sastojao se od kotlastog reaktora i tresilice VIBROMIX 203 EVT (Tehtnica, Slovenija). Sustav je prikazan na slici 19.



Slika 19. Tresilica

##### 3.1.2. PLINSKI KROMATOGRAFI

Za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka korištena je plinska kromatografija (GC, *engl. gas chromatography*).



**Slika 20.** Sustav plinske kromatografije: **1** – generator vodika, **2** – sustav za automatsko injektiranje, **3** – plinski kromatograf, **4** – računalo

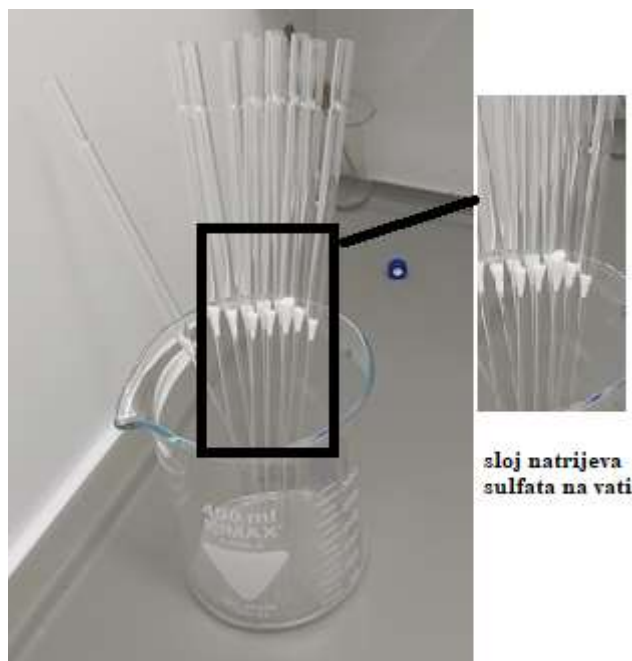
U ovoj analitičkoj metodi uzorak se injektira u struju inertnog plina nosioca (He, Ar, N<sub>2</sub>), nošen je strujom plina kroz stacionarnu fazu te dolazi do razdvajanja sastojaka uzoraka koji se različito vrijeme zadržavaju u sustavu s obzirom na razliku u vrsti i jačini interakcija koje

ostvaruju sa stacionarnom fazom. Kvalitativna analiza temelji se na različitim vremenima zadržavanja sastojaka (engl. *retention time*,  $t_R$ ), a kvantitativna na različitim intenzitetima odziva (površinama ispod kromatografske krivulje). Najčešće korišteni detektori u plinskoj kromatografiji su plameno ionizacijski detektori (engl. *flame ionization detector* – FID) koji detektiraju male promjene napona uzrokovane plamenom bogatim elektronima i ionima koji nastaje izgaranjem organskih tvari u smjesi vodik/zrak. U ovom radu uzorci su analizirani na uređaju GC-2014 (Shimadzu, Japan) prikazanom na slici 20.

### 3.1.3. OSTALA APARATURA

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

Za pripremu uzorka za analizu plinskom kromatografijom korištene su Pasteurove kapalice ispunjene vatom i slojem natrijeva sulfata, kao što je prikazano na slici 21.



**Slika 21.** Pasteurove kapalice sa slojem  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  na vati

Za miješanje i ekstrakciju uzoraka korištena je miješalica Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija).

## 3.2. ANALITIČKE METODE

### 3.2.1. DETEKCIJA (R)-IZOMERA PRODUKTA

Ispitana je specifičnost i selektivnost metode za detekciju (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila pomoću plinske kromatografije. Pripremljena je temeljna otopina (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila koncentracije 500 mM iz koje su pripremljene radne otopine koncentracija 12.5 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM i 100 mM. Pripremljeni uzorci (radne otopine) (*R*)-izomera analizirani su pomoću plinske kromatografije na uređaju GC-2014 (Shimadzu, Japan). Uzorci su se unosili pomoću sustava za automatsko injektiranje AOC-20i (Shimadzu, Japan) pri sljedećim uvjetima:  $T_{\text{injektor}} = 250^{\circ}\text{C}$ ,  $p = 37.8 \text{ kPa}$  te protok  $13.8 \text{ mL min}^{-1}$ . Mobilna faza bio je helij iz spremnika (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska), a stacionarna faza akiralna kolona HP-5 (Agilent Technologies, SAD). Osnovne karakteristike kolona preuzete od proizvođača dane su u tablici 1.

**Tablica 1.** Karakteristike kolone HP-5 (Agilent Technologies, SAD)

	HP-5
Literaturni izvor	<a href="https://www.agilent.com">https://www.agilent.com</a>
Tip kolone	Akiralne
Materijal	(5%-fenil)-metilpolisiloksan
Duljina / m	30
Promjer / mm	0.32
Debljina filma / $\mu\text{m}$	0.25
Temperaturni operativni raspon / $^{\circ}\text{C}$	od -60 do 325 (350)

Uređaj sadrži FID gdje su pri detekciji ( $T_{\text{detektor}} = 250^{\circ}\text{C}$ ) 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). Dobiveni rezultati iskorišteni su za izradu baždarnih pravaca (prilog 1). U prilogu 1 prikazani su i dobiveni kromatogrami. Uvjeti provedbe analize uzoraka, komponente i pripadajuća vremena zadržavanja dani su u tablici 2.

**Tablica 2.** GC metoda i vrijeme zadržavanja za kolonu HP-5

METODA			
STUPANJ	PROMJENA / min <sup>-1</sup>	T / °C	VRIJEME ODRŽAVANJA t / min
I.	/	75	2
II.	15	140	0
KOMPONENTA	t <sub>R</sub> / min		
(R)-izomer	4.737		

### 3.2.2. ISPITIVANJE STABILNOSTI EPOKSIDA

Za potrebe razvoja metode za praćenje odvijanja reakcije epoksida i natrijeva cijanida u prisutnosti halogenhidrin-dehalogenaze ispitana je stabilnost 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana (epoksida) u puferu. Ispitivanje stabilnosti odnosi se na sposobnost kemikalije da ostane u nepromijenjenom obliku tijekom vremena u određenim uvjetima. Razgradnja kemikalija, odvijanje neželjenih reakcija ili neke druge promjene koje utječu na strukturu i svojstva mogu znatno utjecati da odvijanje željene reakcije te zbog toga iznimno važno odrediti kako se kemikalije ponašaju u određenim reakcijskim uvjetima

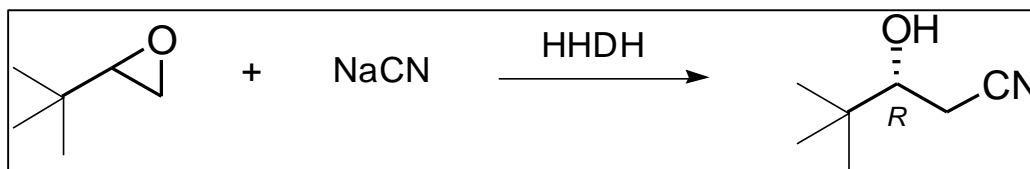
Iz temeljne otopine 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana od 5000 mM pripremljeno je sedam radnih otopina od 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM i 125 mM. Trenutak u kojem je radnim otopinama dodano 0.57 mL pufera (pomoću automatske pipete) uzimao se kao početak reakcije, odnosno kao početak raspada epoksida. Iz reakcijske smjese izuzeti su alikvoti uzoraka od 10 µL nakon 0 min, 1 min, 3 min, 5 min, 7 min, 9 min te 15 min od početka reakcije kako bi se pobliže odredila stabilnost epoksida u početku odvijanja reakcije. Alikvoti uzoraka su prebačeni u prethodno pripremljenu epruvetu s 500 µL etil acetata te homogenizirani na miješalici Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija) tijekom 20 s pri čemu je došlo do ekstrakcije uzorka u etil acetatu i nastanku dva nemješljiva sloja. Organski (gornji) sloj je prebačen u Pasteurovu kapalicu punjenu slojem natrijeva sulfata. Uzorci su do analize čuvani na ledu, a analizirani su pomoću plinske kromatografije na uređaju GC-2014 (Shimadzu, Japan). Uzorci su se unosili pomoću sustava za automatsko injektiranje AOC-20i (Shimadzu, Japan) pri sljedećim uvjetima: Tinjektor = 250°C, p = 40.8 kPa te protok 14.6 mL min<sup>-1</sup>. Mobilna faza bio je helij iz spremnika (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska), a stacionarna faza akiralna kolona HP-5 (Agilent Technologies, SAD). Ispitivanju stabilnosti je prethodila izrada baždarnih pravaca na HP-5 koloni u rasponu koncentracija epoksida 0-100 mM (prilog 2). Uvjeti provedbe analize uzoraka, komponente i pripadajuća vremena zadržavanja dani su u tablici 3.

**Tablica 3.** GC metoda i vrijeme zadržavanja za kolonu HP-5

METODA			
STUPANJ	PROMJENA / min <sup>-1</sup>	T / °C	VRIJEME ODRŽAVANJA t / min
I.	/	50	2
II.	15	140	0
KOMPONENTA	t <sub>R</sub> / min		
Epoksid	2.42		

### 3.2.3. PRELIMINARNA REAKCIJA

Provedena je preliminarna reakcija epoksida i natrijeva cijanida u prisutnosti halogenhidrin-dehalogenaze. Shema reakcije je prikazana na slici 22.



**Slika 22.** Shema reakcije nastajanja (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila biokatalitičkom sintezom iz 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana i natrijeva cijanida u prisutnosti halogenhidrin-dehalogenaze.

Tijek odvijanja reakcije praćen je pomoću plinske kromatografije na uređaju GC-2014 (Shimadzu, Japan). Uzorci su se unosili pomoću sustava za automatsko injektiranje AOC-20i (Shimadzu, Japan) pri sljedećim uvjetima:  $T_{\text{injektor}} = 250\text{ °C}$ ,  $p = 37.8\text{ kPa}$  te protok  $13.8\text{ mL min}^{-1}$ . Mobilna faza bio je helij iz spremnika (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska), a stacionarna faza akiralna kolona HP-5 (Agilent Technologies, SAD). Provođenju reakcije je prethodila izrada baždarnih pravaca za epoksid i produkt na HP-5 koloni u rasponu koncentracija 0-100 mM (prilog 1 i prilog 2).

Uvjeti provedbe analize uzoraka, komponente i pripadajuća vremena zadržavanja dani su u tablici 4.

**Tablica 4.** GC metoda i vrijeme zadržavanja za kolonu HP-5

METODA			
STUPANJ	PROMJENA / min <sup>-1</sup>	T / °C	VRIJEME ODRŽAVANJA t / min
I.	/	75	2
II.	15	140	0
KOMPONENTA	t <sub>R</sub> / min		
Epoksid	1.7		
Produkt	4.7		

Tijek odvijanja reakcije se pratio tijekom 24 h u dva kotlasta reaktora koja su cijelo vrijeme bila smještena na tresilici VIBROMIX 203 EVT (Tehtnica, Slovenija). U reaktore su dodane određene količine (redom): pufera, temeljne otopine epoksida (2000 mM), temeljne otopine natrijeva cijanida (200 mM) te na kraju enzim halogenhidrin-dehalogenaza, što je predstavljalo početak reakcije. U tablici 5. je prikazan sastav reakcijske smjese svakog od reaktora. Reakcija se provodila u digestoru.

**Tablica 5.** Sastav reakcijske smjese u *reaktoru 1* te *reaktoru 2*

	REAKTOR 1	REAKTOR 2
V <sub>reaktor</sub> / μL	1000	1000
V <sub>pufer</sub> / μL	435	400
c <sub>epoksid</sub> / mM	150	150
V <sub>TO-epoksid</sub> / μL	50	50
c <sub>NaCN</sub> / mM	100	100
V <sub>TO-NaCN</sub> / μL	500	500
V <sub>enzim</sub> / μL	15	50

Iz reakcijske smjese je uzet alikvot od 10 μL u trenutku 0 min, 5 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h i 24 h od trenutka pokretanja reakcije. Alikvoti uzoraka su prebačeni u prethodno pripremljenu epruvetu s 500 μL etil acetata te homogenizirani na miješalici Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija) tijekom 20 s pri čemu je došlo do ekstrakcije uzorka u etil acetatu i nastanku dva nemješljiva sloja. Organski (gornji) sloj je prebačen u Pasteurovu kapalicu punjenu slojem natrijeva sulfata. Uzorci su neposredno do analize čuvani na ledu.

### 3.3. PRIPRAVA KEMIKALIJA

#### 3.3.1. POPIS KEMIKALIJA

Kemikalije korištene tijekom izrade ovog rada navedene su u tablici 6. Uz komercijalno dostupne kemikalije naveden je proizvođač.

**Tablica 6.** Komercijalno dostupne kemikalije korištene u radu

PUNI NAZIV KEMIKALIJE	KRATICA KORIŠTENA U RADU	PROIZVOĐAČ
Metil-terc-butyl-eter	MTBE	Sigma-Aldrich, SAD
3,3-dimetil-1,2-epoksibutan	epoksid	Sigma-Aldrich
(R)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitril	(R)-produkt	Sintetiziran na IRB-u
Natrijev sulfat	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Kemika
Natrijev cijanid	NaCN	Sigma-Aldrich
Etil-acetat	EtOAc	Sigma-Aldrich
C tip halogenhidrin dehalogenaze	HheC	Pripremljen na IRB-u
2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer	TriS-SO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, SAD

#### 3.3.2. PRIPRAVA PUFERA

Tris-SO<sub>4</sub> pufer pripremljen je otapanjem čvrstog uzorka u ultračistoj vodi i podešavanjem pH vrijednosti na 7,5 razrijeđenom otopinom sumporne kiseline.

#### 3.3.3. PRIPRAVA TEMELJNIH OTOPINA

Temeljna otopina 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana (epoksida) od 5000 mM pripremljena je otapanjem 0.0767 g čvrstog 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana u 150 µL DMSO, odnosno otapanjem 0.0307 g čvrstog 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana u 150 µL DMSO za temeljnu otopinu od 2000 mM.

Temeljna otopina natrijeva cijanida od 200 mM pripremljena je otapanjem 0,0490 g čvrstog natrijeva cijanida u 5000 µL ultračiste vode. Vaganje i priprava otopine vršila se u digestoru.

Temeljna otopina (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitrila (produkta) pripremljena je otapanje 0.0100 g čvrstog (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitrila u 150  $\mu$ L DMSO.

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



## 4. MATEMATIČKO MODELIRANJE

U ovo radu je razvijen kinetički model za reakciju nastajanja (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila pomoću sheme reakcije (slika 21) i podataka o ovisnosti brzine reakcije o koncentraciji epoksida. Nakon procjene kinetičkih parametara, razvijeni su reaktorski modeli za kotlasti reaktor (KR) i kotlasti reaktor s dotokom supstrata (KRD) te protočno-kotlasti reaktor (PKR). Sve simulacije provedene su pomoću programskog paketa SCIENTIST.

### 4.1. KINETIČKI MODEL

Prvi korak u matematičkom modeliranju reakcije nastajanja (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila iz epoksida i natrijeva cijanida u prisutnosti halogenhidrin-dehalogenaze bio je određivanje kinetičkih parametara reakcije. Stoga su provedena kinetička mjerenja utjecaja koncentracije supstrata na brzinu enzimski katalizirane reakcije. Ova mjerenja su provedena kao dio drugog diplomskog rada, a ovdje su preuzeta za potrebe razvoja kinetičkog modela reakcije. Osim toga, bilo je potrebno odrediti utjecaj kemijske hidrolize epoksida, pa je u radu određena kinetika ove kemijske reakcije. Određen je red reakcije (*n*) i konstanta brzine reakcije (*k*). Ova reakcija može imati značajan utjecaj na ishod enzimske reakcije i kvalitetu konačnog produkta, stoga ju je potrebno istražiti.

Kinetički model biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila iz epoksida i natrijeva cijanida u prisutnosti halogenhidrin-dehalogenaze prikazan je jednadžbom 4.1. Pretpostavke modela su da se epoksid ponaša kao inhibirajući supstrat, a natrijev cijanid je supstrat koji se ponaša prema Michaelis-Menteničinoj kinetici.

$$r_1 = \frac{V_M \times c_{NaCN} \times c_{HHDH} \times c_{EPOKSID}}{(c_{EPOKSID} + K_m EPOKSID + c_{EPOKSID} \times \frac{c_{EPOKSID}}{K_i EPOKSID}) \times (c_{NaCN} + K_m NaCN)} \quad (4.1.)$$

pri čemu je  $r_1$  – brzina reakcije nastajanja produkta ( $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ),  $V_M$  – maksimalna brzina enzimske reakcije ( $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ),  $c_{NaCN}$  – koncentracija natrijeva cijanida (mM),  $c_{HHDH}$  – koncentracija enzima halogenhidrin-dehalogenaze (mM),  $c_{EPOKSID}$  – koncentracija 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana (mM),  $K_m EPOKSID$  – Michaelisova konstanta za 3,3-dimetil-1,2-epoksibutan ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ),  $K_i EPOKSID$  – konstanta inhibicije nastajanja produkta sa supstratom 3,3-dimetil-1,2-epoksibutanom ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ) i  $K_m NaCN$  – konstanta inhibicije nastajanja produkta sa supstratom natrijevim cijanidom ( $\text{mmol dm}^{-3}$ ).

Brzina kemijske hidrolize epoksida je opisana kinetikom *n*-tog reda, za koju su naknadno utvrđeni parametri (jed. 4.2.).

$$r_2 = k \times c_{EPOKSID}^n \quad (4.2.)$$

pri čemu je  $r_2$  – brzina reakcije ( $\text{mM dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ),  $k$  – konstanta brzina reakcije ( $\text{dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$ ),  $c_{EPOKSID}$  – koncentracija epoksida ( $\text{mM}$ ) i  $n$  – red reakcije.

## 4.2. REKTORSKI MODEL ZA KOTLASTI REAKTOR

Rektorski model za kotlasti reaktor sastoji se od bilancnih jednadžbi (4.3. – 4.5.) koje opisuju promjene koncentracija epoksida, natrijeva cijanida i produkta reakcija u vremenu.

$$\frac{dc_{NaCN}}{dt} = -r_1 \quad (4.3.)$$

$$\frac{dc_{EPOKSID}}{dt} = -r_1 - r_2 \quad (4.4.)$$

$$\frac{dc_{PRODUKT}}{dt} = r_1 \quad (4.5.)$$

## 4.3. REKTORSKI MODEL ZA KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM SUPSTRATA

Rektorski model za kotlasti reaktor s dotokom supstrata sastoji se od bilancnih jednadžbi (4.6. – 4.10.) koje opisuju promjene koncentracija epoksida, natrijeva cijanida i produkta reakcija u vremenu.

$$\frac{dc_{NaCN}}{dt} = -r_1 + \frac{(c_{NaCN,0} - c_{NaCN}) \times q}{V} \quad (4.6.)$$

$$\frac{dc_{EPOKSID}}{dt} = -r_1 - r_2 + \frac{(c_{EPOKSID,0} - c_{EPOKSID}) \times q}{V} \quad (4.7.)$$

$$\frac{dc_{PRODUKT}}{dt} = r_1 - \frac{c_{PRODUKT} \times q}{V} \quad (4.8.)$$

$$\frac{dc_{HHDH}}{dt} = -\frac{c_{HHDH} \times q}{V} \quad (4.9.)$$

$$\frac{dV}{dt} = q \quad (4.10.)$$

#### 4.4. REAKTORSKI MODEL ZA PROTOČNO-KOTLASTI REAKTOR

Reaktorski model za kotlasti reaktor s dotokom supstrata sastoji se od bilancnih jednadžbi (4.11. – 4.13.) koje opisuju promjene koncentracija epoksida, natrijeva cijanida i produkta reakcija u vremenu.

$$\frac{dc_{NaCN}}{dt} = -r_1 + \frac{c_{NaCN,0} - c_{NaCN}}{\tau} \quad (4.11.)$$

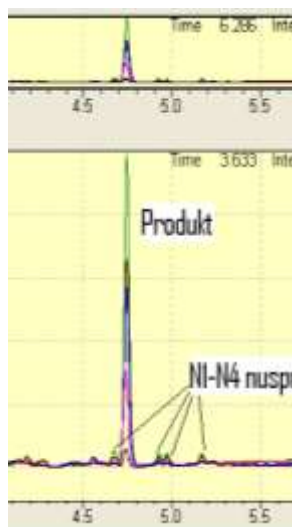
$$\frac{dc_{EPOKSID}}{dt} = -r_1 - r_2 + \frac{c_{EPOKSID,0} - c_{EPOKSID}}{\tau} \quad (4.12.)$$

$$\frac{dc_{PRODUKT}}{dt} = r_1 - \frac{c_{PRODUKT}}{\tau} \quad (4.13.)$$

## 5. REZULTATI I RASPRAVA

### 5.1. DETEKCIJA (R)-IZOMERA PRODUKTA

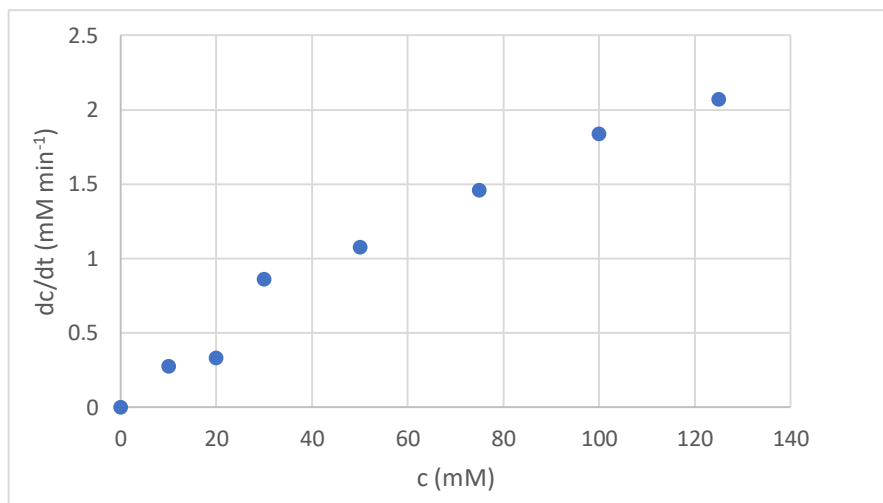
Provođenjem analize uzoraka (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitrila (produkta) prema razvijenoj metodi na plinskom kromatografu dobiveni su kromatogrami na kojima su vidljiva specifična retencijska vremena kao i površine kromatografskih krivulja („pikova“) koje se povećavaju proporcionalno povećanju koncentracije uzoraka, kao što se može vidjeti na slici 23. Također je moguće vidjeti tragove nusprodukta koji nastaju u reakciji, a nisu identificirani.



**Slika 23.** Kromatogram dobiven GC analizom (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitrila u rasponu koncentracija 0-100 mM

### 5.2. ISPITIVANJE STABILNOSTI EPOKSIDA

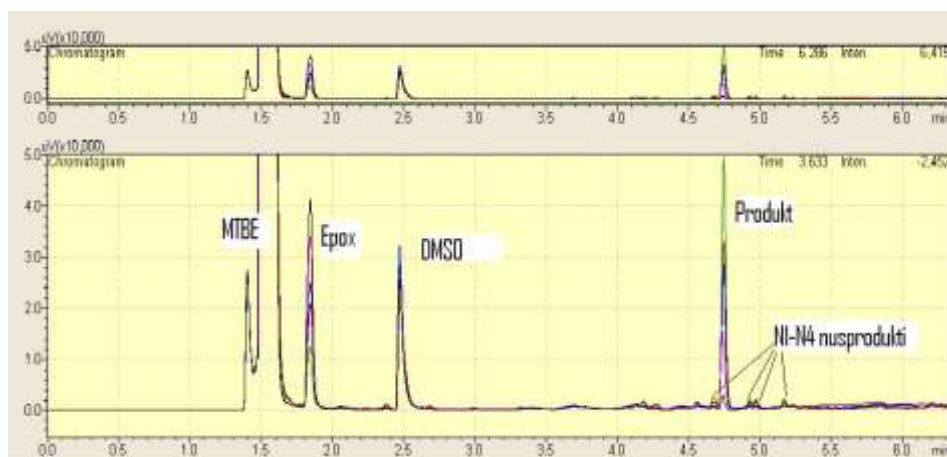
Provedbom ispitivanja stabilnosti epoksida u puferu dobiveni su rezultati prikazani na slici 24. Za svaku koncentraciju epoksida prikazanu na slici praćena je stabilnost tijekom 15 minuta te je iz dobivenih podataka procijenjena početna brzina reakcije koja je prikazana na slici. Kao što je pretpostavljeno, porastom koncentracije epoksida dolazi do povećanja brzine reakcije hidrolize epoksida. Iz ovih se rezultata može zaključiti da je hidroliza epoksida reakcija sa značajnim utjecajem na odvijanje enzimske reakcije.



**Slika 24.** Utjecaj koncentracije epoksida na početnu brzinu njegove kemijske hidrolize

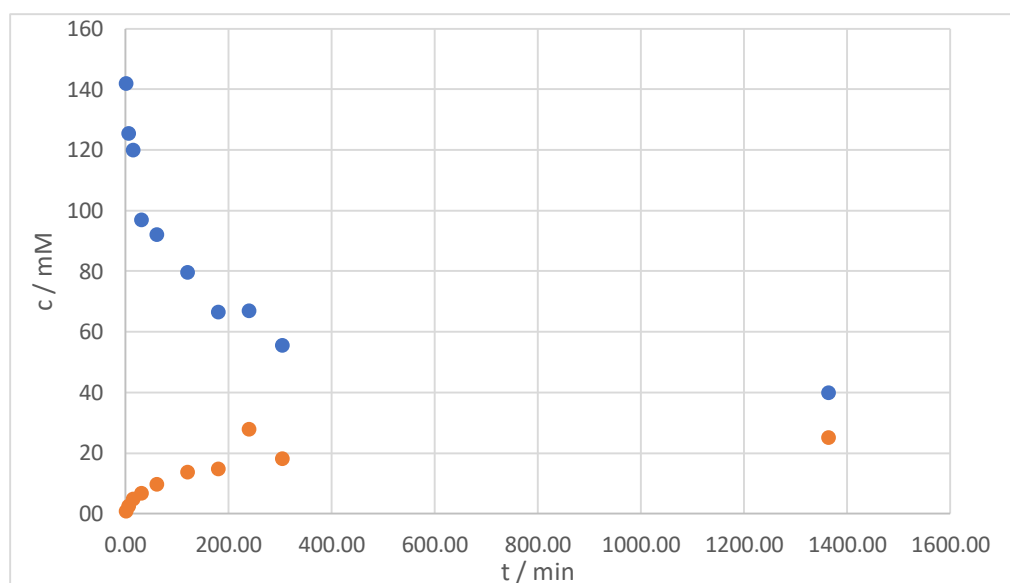
### 5.3. SINTEZA (*R*)-3-HIDROKSI-4,4,-DIMETILPENTAN NITRILA U KOTLASTOM REAKTORU

Provedene su preliminarne reakcije sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitrila pri različitim koncentracijama enzima kako bi se odabrala odgovarajuća koncentracija za daljnja kinetička istraživanja koja na kraju nisu provedena radi epidemije. Preliminarne reakcije u *reaktoru 1* i *reaktoru 2* odvijale su se uz istu početnu koncentraciju epoksida i natrijeva cijanida od 150 mM, ali različitu koncentraciju enzima, tijekom istog vremenskog razdoblja od 24 h, a uzorci za analizu izuzeti su u istim vremenskim periodima nakon početka odvijanja reakcije. Kromatogram prikazan na slici 25 dokaz su da se reakcija uistinu odvija te da nastaje produkt (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitril, odnosno vidljivo je da tijekom vremena dolazi do smanjenja koncentracije epoksida u reakcijskom smjesi (smanjenje površine pikova na RT1.7) dok istovremeno raste koncentracija produkta (povećanje površine pikova na RT4.7).

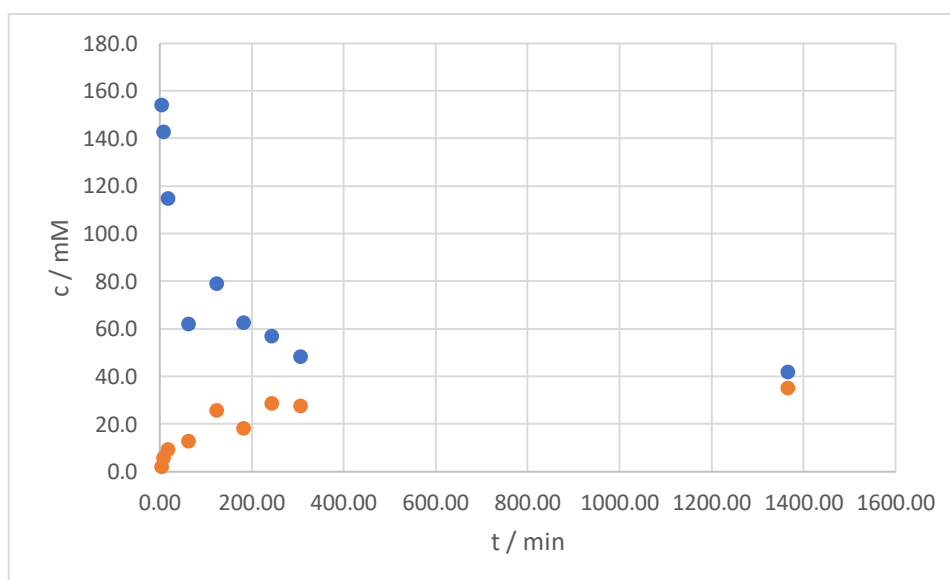


**Slika 25.** Kromatogram dobiven provedbom preliminarne reakcije

Provedbom preliminarne reakcije između epoksida i natrijeva cijanida u prisutnosti halogenhidrin-dehalogenaze dobiveni su rezultati prikazani na slikama 26 i 27. U oba slučaja može se zamijetiti nagli pad koncentracije epoksida u početku odvijanja reakcije (do  $\approx 400$  min) te nastajanje produkta. Osim toga, može se primijetiti da količina potrošenog epoksida ne odgovara količini nastalog produkta, što je bilo i za očekivati, s obzirom da se uz enzimsku reakciju odvija kemijska hidroliza epoksida.



**Slika 26.** Sastav reakcijske smjese u reaktoru 1 tijekom vremena ( $V_{\text{reaktor}} = 1000 \mu\text{L}$ ,  $c_{\text{EPOKSID},0} = 150 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 100 \text{ mM}$ ,  $V_{\text{HHDDH}} = 15 \mu\text{L}$ ).



**Slika 27.** Sastav reakcijske smjese u reaktoru 1 tijekom vremena ( $V_{\text{reaktor}} = 1000 \mu\text{L}$ ,  $c_{\text{EPOKSID},0} = 150 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 100 \text{ mM}$ ,  $V_{\text{HHDDH}} = 50 \mu\text{L}$ ).

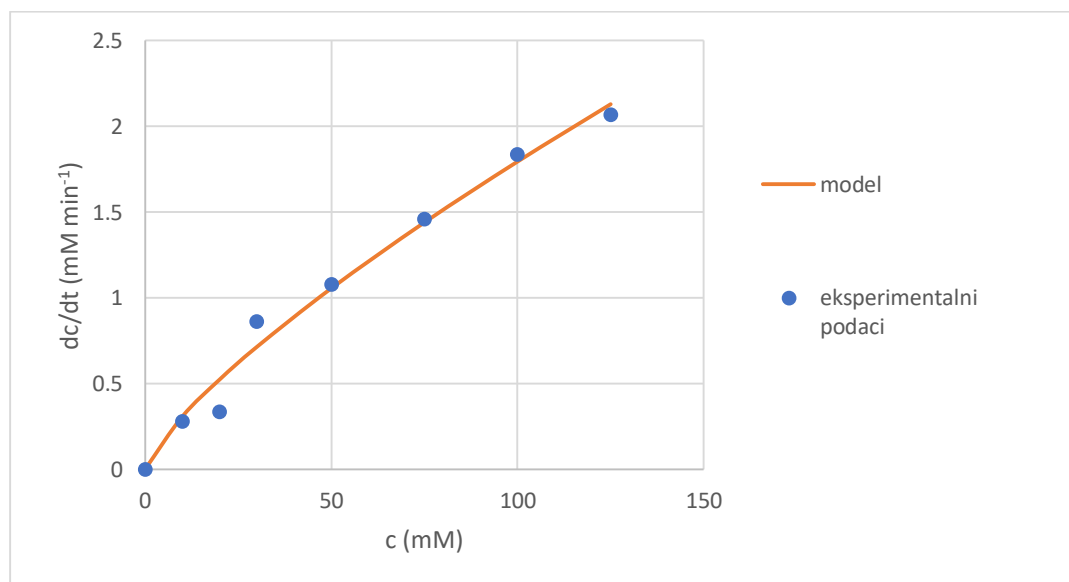
U *reaktoru 1* u 400-toj minuti koncentracija epoksida u reakcijskom sustavu iznosi 60 mM te nastavlja padati, ali znatno smanjenom brzinom. Nakon 24 h od pokretanja reakcije, koncentracija epoksida u reakcijskom sustavu iznosi 40 mM. Također je vidljivo da odmah nakon pokretanja reakcije (u 1. minuti) dolazi do formiranja produkta te da u 400.-toj minuti reakcija njegova koncentracija iznosi 20 mM. Nastavkom odvijanja reakcije ne dolazi do značajnog povećanja koncentracije produkta (nakon 24h iznosi  $c_{\text{PRODUKT}} \approx 25$  mM). Iz dobivenih podataka je vidljivo da značajno smanjenje koncentracije epoksida ne dovodi do značajnog povećanja koncentracije produkta u reakcijskom sustavu iz čega se može zaključiti da tijekom reakcije dolazi do drugih neželjenih reakcija u reakcijskom sustavu kao što je kemijska hidroliza epoksida (stabilnost epoksida, poglavlja 3.2.2. i 5.2.). U *reaktoru 2* u 400-toj minuti koncentracija epoksida u reakcijskom sustavu iznosi  $\approx 50$  mM te nastavlja padati smanjenom brzinom. Kao i u *reaktoru 1*, odmah nakon pokretanja reakcije (u 1. minuti) dolazi do nastajanja produkta te nakon 24h od pokretanja reakcija njegova koncentracija iznosi  $\approx 35$  mM. U *reaktoru 2* nastalo je više produkta, no i dalje je vidljivo da se odvijaju druge sporedne reakcije koje dovode do znatnog smanjenja koncentracije epoksida koja nije razmjerna s nastalom količinom produkta. S obzirom da na početku reakcije u oba reaktora imamo iste koncentracije supstrata, ali različite koncentracije enzima, možemo zaključiti da je u *reaktoru 1* premala koncentracija enzima što uzrokuje vrlo brzo zasićenje aktivnih mjesta na enzimu te prestanak odvijanja biokatalitičke sinteze produkta. U drugom reaktoru veća koncentracija enzima zaslužna je za nastajanje veće količine produkta. Također, vidljivo je da sporedne reakcije ometaju odvijanje enzimske reakcije. Prema tome proces bi se vjerojatno mogao poboljšati primjenom više koncentracije enzima.

## 5.4. PROCJENA KINETIČKIH PARAMETARA

Iz eksperimentalnih podataka o stabilnosti epoksida te kinetičke jednadžbe 4.2. procijenjeni su kinetički parametri  $n$  i  $k$  za reakciju biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila pomoću programskog paketa SCIENTIST. Dobivene vrijednosti su prikazane u tablici 7, a dokaz o valjanosti modela može se vidjeti na slici 28.

**Tablica 7.** Procijenjene vrijednosti konstante brzine reakcije ( $k$ ), reda reakcije ( $n$ ), Michaelisove konstante za epoksid i natrijev cijanid ( $K_{mEPOKSID}$ ,  $K_{mCIJANID}$ ), konstante inhibicije epoksidom ( $K_{iEPOKSID}$ ) i maksimalne brzine enzimske reakcije ( $V_m$ )

Parametar / Jedinica	Vrijednost
$k / \text{dm}^{-3} \text{min}^{-1}$	0.0527
$n$	0.7662
$K_{mEPOKSID} / \text{mmol dm}^{-3}$	373.69
$K_{mCIJANID} / \text{mmol dm}^{-3}$	4.8
$K_{iEPOKSID} / \text{mmol dm}^{-3}$	0.07
$V_m / \text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$	24.59



**Slika 28.** Grafički prikaz ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata (epoksida) – poklapanje eksperimentalnih podataka s pretpostavljenim modelom

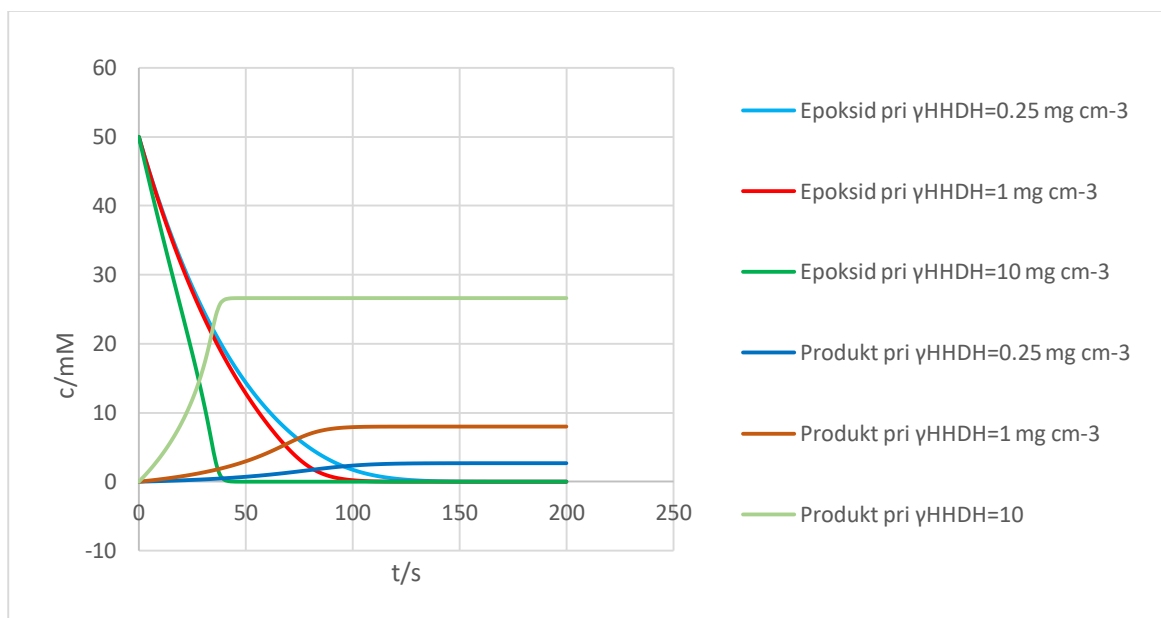
S obzirom na procijenjenu vrijednost reda reakcije ( $n = 0.7662$ ) može se zaključiti da se radi o složenoj kinetici te da je mehanizam reakcije složeniji od pretpostavljene kinetičke jednadžbe. Programski kod za ovu simulaciju dan je u prilogu 3. U nastavku razvijanja



matematičkog modela reakcije za kotlasti reaktor, kotlasti reaktor s dotokom supstrata i protočno-kotlasti reaktor polazilo se od pretpostavke da je epoksid supstrat koji inhibira reakciju, a da se natrijev cijanid ponaša prema Michaelis-Menteničinoj kinetici iz čega je razvijen kinetički model (jednadžba 4.1.).

## 5.5. KOTLASTI REAKTOR

U programskom paketu SCIENTIST provedene su simulacije za odvijanje biokatalitičke sinteze produkta u kotlastom reaktoru pri različitim početnim koncentracijama epoksida, natrijeva cijanida i enzima. Programski kod za ove simulacije dan je u prilogu 4. Tijekom prvih simulacija početne koncentracije epoksida i natrijeva cijanida iznosile su 50 mM, a varirana je koncentracija enzima ( $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ). Dobiveni rezultati prikazani su na slici 29.

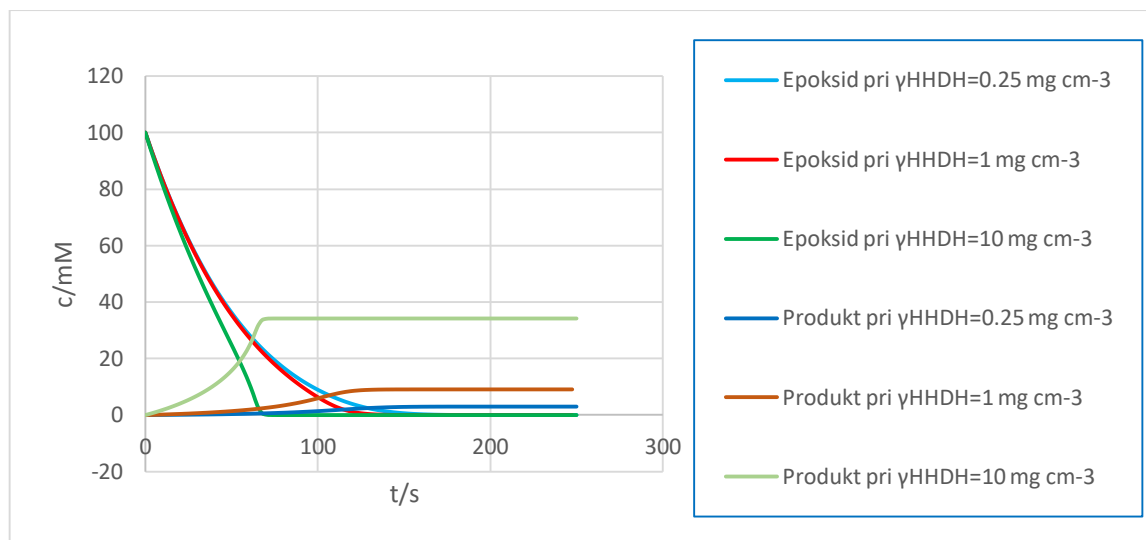


**Slika 29.** Simulacija odvijanja biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktor}} = 1000 \text{ L}$  pri  $c_{\text{EPOKSID},0} = 50 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 50 \text{ mM}$  te koncentracijama enzima  $\gamma_{\text{HHDH}} = 0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ )

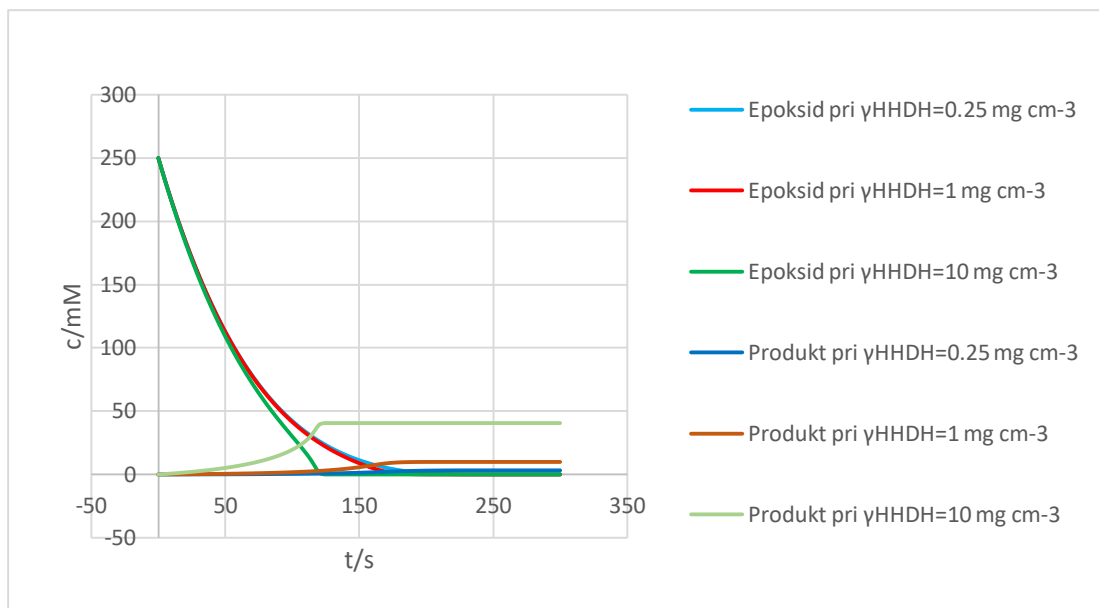
Iz dobivenih podataka, odnosno njihovog grafičkog prikaza na slici 29. možemo vidjeti da već pri maloj koncentraciji enzima od  $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$  dolazi do biokatalitičke sinteze produkta, iako je prinos produkta vrlo malen;  $c_{\text{PRODUKT}} \sim 2.7 \text{ mM}$  nakon uspostave ravnoteže u  $t = 100 \text{ min}$ . Povećanjem koncentracije enzima pri istim koncentracijama supstrata (epoksida i natrijeva cijanida) dolazi do nastajanja veće količine produkta. Pri koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg cm}^{-3}$  nastaje najviše produkta. S obzirom da povećanjem koncentracije enzima pri istim početnim

koncentracijama supstrata nastaje više produkta, možemo zaključiti da povećana koncentracija enzima pogoduje odvijanju enzimske reakcije. Pretpostavka je da pri niskim koncentracija enzima vrlo brzo dolazi do zasićenja aktivnih mjesta enzima zbog čega dolazi i do prekida odvijanja enzimske reakcije. Također je vidljivo da se povećanjem koncentracije enzima u reaktoru smanjuje vrijeme potrebno za uspostavu ravnoteže: pri  $\gamma_{\text{HHDH}} = 0.25 \text{ mg cm}^{-3}$  ravnoteža se uspostavila u  $t = 100 \text{ min}$ , pri  $\gamma_{\text{HHDH}} = 1 \text{ mg cm}^{-3}$  u  $t = 80 \text{ min}$  te pri  $\gamma_{\text{HHDH}} = 10 \text{ mg cm}^{-3}$  u  $t = 40 \text{ min}$ . Obzirom da nastajanje produkta nije proporcionalno smanjenju koncentraciji epoksida, možemo zaključiti da se u reaktorima odvijaju nepoželjne reakcije koje ometaju biokatalitičku sintezu produkta.

Provedene su i simulacije s početnim koncentracijama epoksida i natrijeva cijanida od 100 mM te 250 mM te variranjem koncentracije enzima od  $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ . Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 30 i 31.



**Slika 30.** Simulacija odvijanja biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktor}} = 1000 \text{ L}$  pri  $c_{\text{EPOKSID},0} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 100 \text{ mM}$  te koncentracijama enzima  $\gamma_{\text{HHDH}} = 0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ )



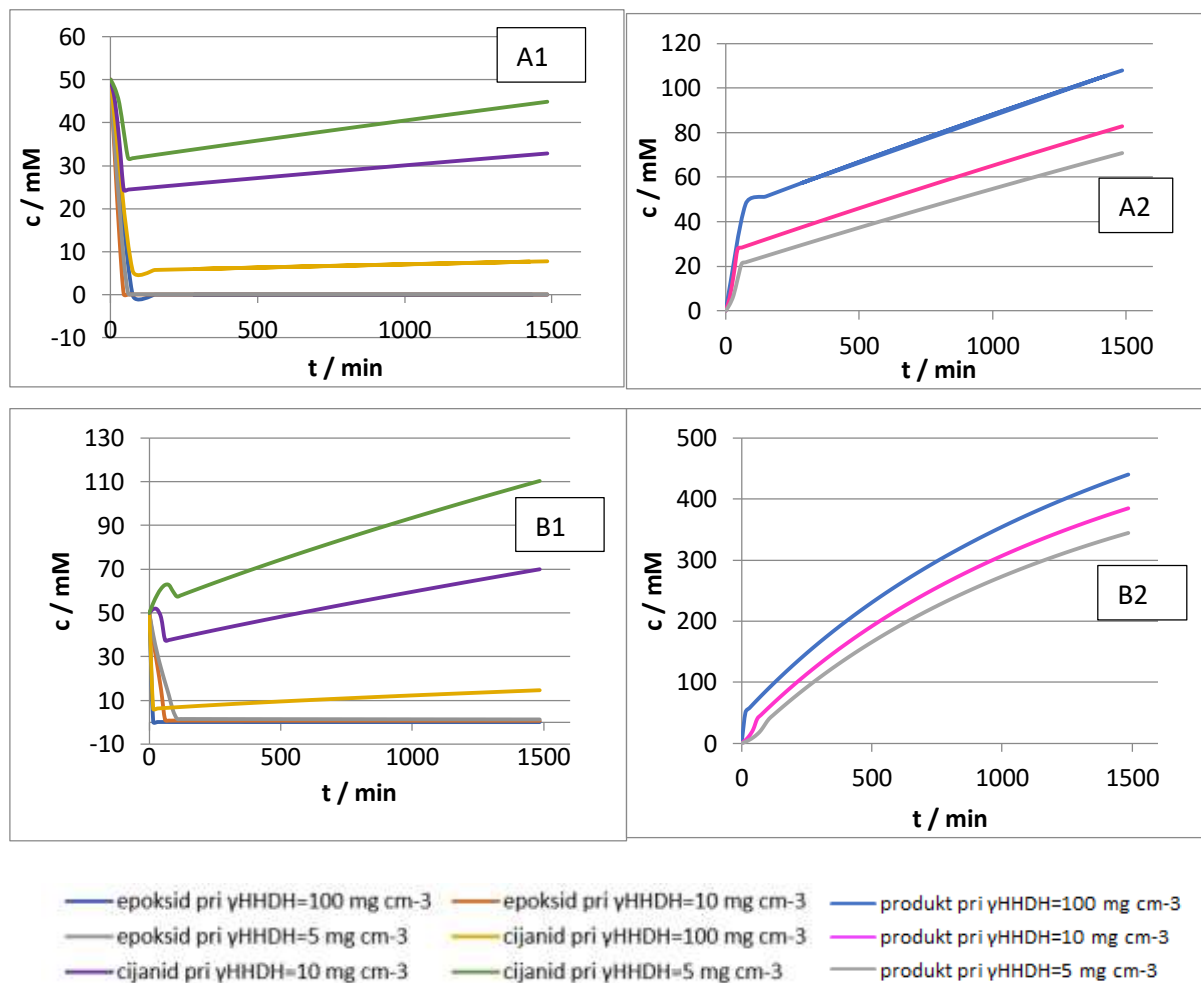
**Slika 31.** Simulacija odvijanja biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktor}} = 1000 \text{ L}$  pri  $c_{\text{EPOKSID},0} = 250 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 250 \text{ mM}$  te koncentracijama enzima  $\gamma_{\text{HHDH}} = 0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ )

Objekti simulacije pokazuju da pri većim koncentracijama enzima u reaktoru nastaje veća količina produkta, odnosno da pri većim koncentracijama enzima enzimska reakcija nije toliko ometena sporednim, neželjenim reakcijama. Simulacije su pokazale da povećanjem koncentracije supstrata na 100 mM, odnosno 250 mM, ne dolazi do značajnog povećanja koncentracije produkta. Iz toga možemo zaključiti da koncentracija supstrata nije limitirajući faktor za provođenje biokatalitičke sinteze produkta, već da to uvelike ovisi o koncentraciji enzima u reaktoru. Pri većoj koncentraciji supstrata uz istu koncentraciju enzima odvija se više sporednih reakcija koje ometaju biokatalitičku sintezu produkta zbog čega ne dolazi do značajnog porasta u koncentraciji nastalog produkta: pri  $\gamma = 1 \text{ mM}$  nastaje 15 mM produkta uz početnu koncentraciju supstrata od 100 mM dok uz početnu koncentraciju supstrata od 250 mM nastaje 20 mM produkta. Uzrok ovakvog trenda mogao bi biti inhibicija enzima supstratom.

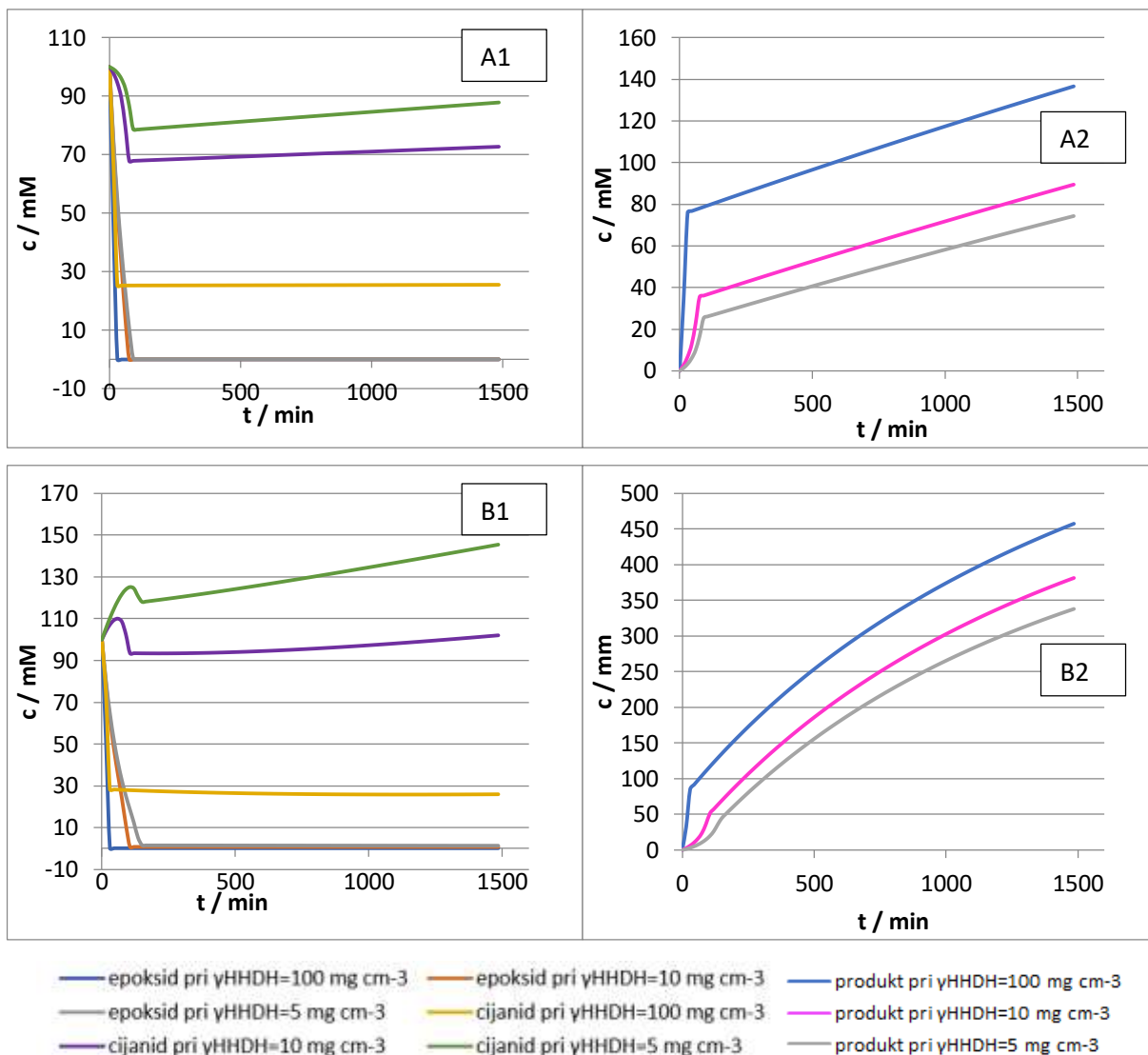
## 5.6. KOTLASTI REAKTOR S DOTOKOM SUPSTRATA

U programskom paketu SCIENTIST provedene su simulacije za odvijanje biokatalitičke sinteze produkta u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata pri istim početnim koncentracijama epoksida i natrijeva cijanida od 50 mM, 100 mM i 250 mM te koncentraciji epoksida i natrijeva cijanida u dotoku od 1 M. Uz variranje koncentracije supstrata, varirana je i koncentracija enzima ( $5 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $100 \text{ mg cm}^{-3}$ ) kao i brzina protoka ( $q = 0.05 \text{ mL min}^{-1}$  te 0.5

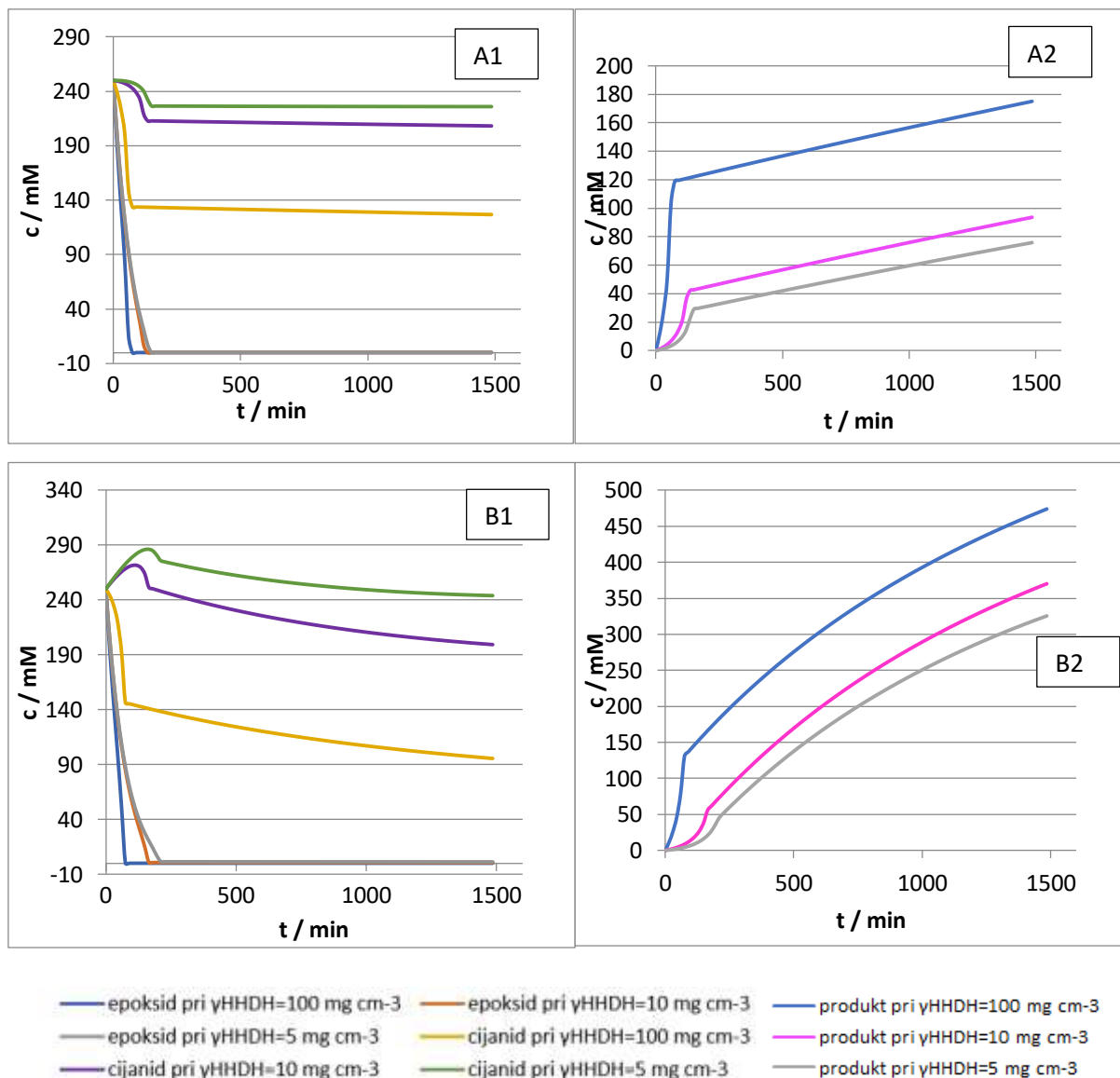
mL min<sup>-1</sup>). Simulirane su promjene uvjeta u reaktoru tijekom 24 h. Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 32, 33 i 34. Programski kod za ove simulacije dan je u prilogu 5.



**Slika 32.** Simulacija odvijanja biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata  $V_{\text{reaktor}} = 1000 \text{ L}$  pri  $c_{\text{EPOKSID},0} = 50 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 50 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{EPOKSID},d} = 1 \text{ M}$ ,  $c_{\text{NaCN},d} = 1 \text{ M}$ ,  $\gamma_{\text{HHDH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $100 \text{ mg cm}^{-3}$  te **A)**  $q = 0.05 \text{ mL min}^{-1}$ , **B)**  $q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$



**Slika 33.** Simulacija odvijanja biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata  $V_{\text{reaktor}} = 1000 \text{ L}$  pri  $c_{\text{EPOKSID},0} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{EPOKSID},d} = 1 \text{ M}$ ,  $c_{\text{NaCN},d} = 1 \text{ M}$ ,  $\gamma_{\text{HHDH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $100 \text{ mg cm}^{-3}$  te **A)**  $q = 0.05 \text{ mL min}^{-1}$ , **B)**  $q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$



**Slika 34.** Simulacija odvijanja biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata  $V_{\text{reaktor}} = 1000 \text{ L}$  pri  $c_{\text{EPOKSID},0} = 250 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NACN},0} = 250 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{EPOKSID},d} = 1 \text{ M}$ ,  $c_{\text{NACN},d} = 1 \text{ M}$ ,  $\gamma_{\text{HHDH}} = 5 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $100 \text{ mg cm}^{-3}$  te **A)**  $q = 0.05 \text{ mL min}^{-1}$ , **B)**  $q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$

Iz grafičkih prikaza rezultata simulacije biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata tijekom 24 h (1440 min) vidljivo je da u reaktoru dolazi do sinteze produkta. Na konverziju supstrata u produkt značajan utjecaj ima koncentracija enzima u reaktoru kao i brzina protoka. Koncentracija supstrata u dotoku je u svim simulacijama bila 1 M. Pri početnoj koncentraciji supstrata (epoksida i natrijeva cijanida) od 50 mM te protoku od  $0.05 \text{ mL min}^{-1}$  nakon  $t = 1440 \text{ min}$  u reaktoru je nastalo 70 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $5 \text{ mg cm}^{-3}$ . Povećanjem koncentracije enzima u reaktoru dolazi do povećanja konverzije supstrata u produkt te pri koncentraciji enzima od 10

mg cm<sup>-3</sup> nastaje 81 mM tijekom 1440 min, dok pri koncentraciji enzima od 100 mg cm<sup>-3</sup> nastaje 107 mM produkta. Pri protoku od 0.5 mL min<sup>-1</sup> nakon 1440 min u reaktoru je nastalo 344 mM produkta pri koncentraciji enzima od 5 mg cm<sup>-3</sup>, 384 mM produkta pri koncentraciji enzima od 10 mg cm<sup>-3</sup>, te 437 mM produkta pri koncentraciji enzima do 100 mg cm<sup>-3</sup>. Iz grafičkog prikaza na slici 32 (A1 i B1) se može vidjeti da nakon  $t = 225$  min (kada govorimo o manjem protoku), odnosno  $t = 150$  min, koncentracija epoksida pada na 0 mM.

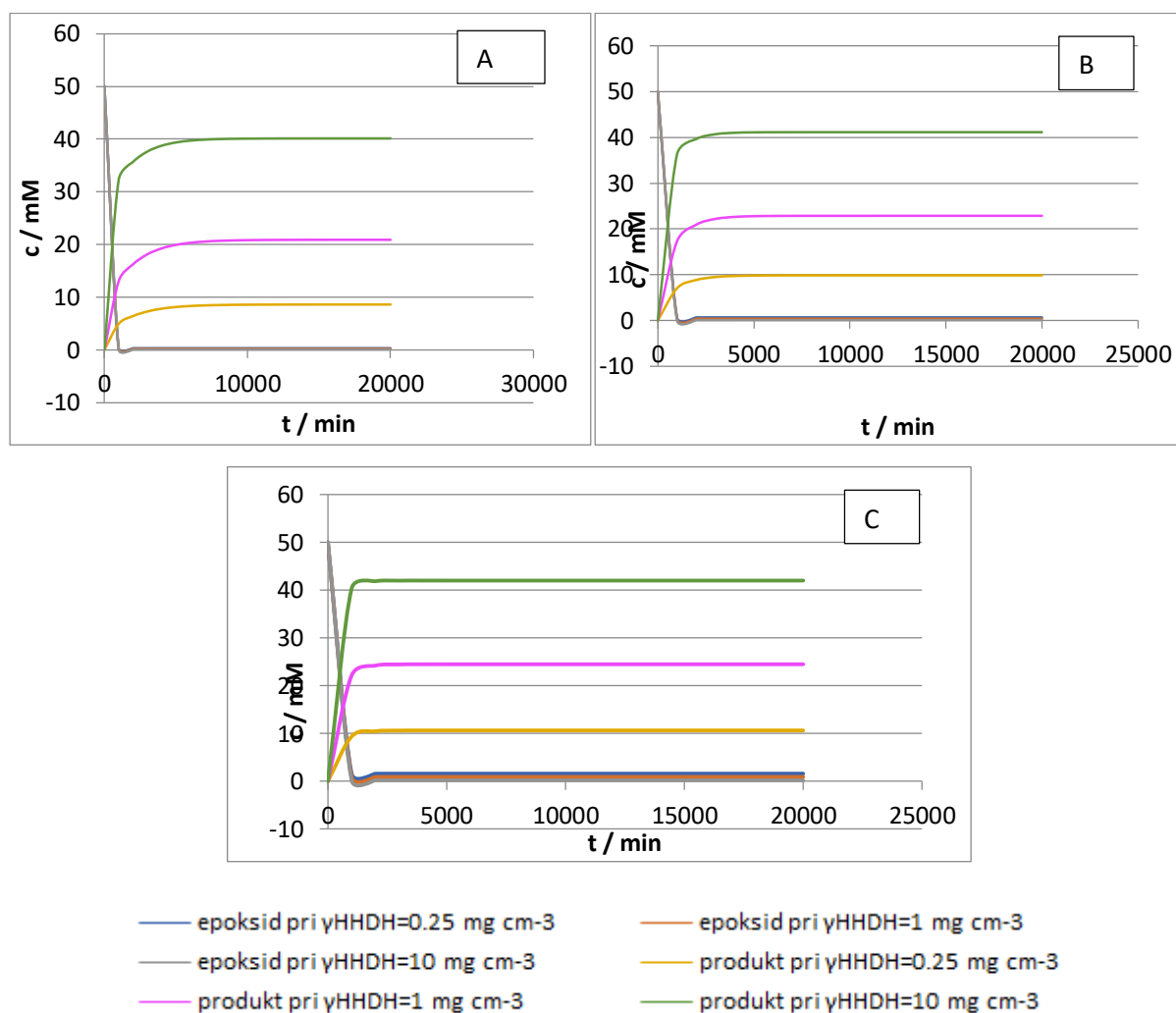
Pri početnoj koncentraciji supstrata od 100 mM te protoku od 0.05 mL min<sup>-1</sup> tijekom 1440 min nastaje 74 mM pri koncentraciji enzima od 5 mg cm<sup>-3</sup>, 88 mM pri koncentraciji enzima od 10 mg cm<sup>-3</sup> te 136 mM produkta pri koncentraciji enzima od 100 mg cm<sup>-3</sup>. Pri protoku od 0.5 mL min<sup>-1</sup> tijekom 1440 min nastaje 338 mM produkta pri najnižoj koncentraciji enzima, 381 mM produkta pri koncentraciji enzima od 10 mg cm<sup>-3</sup> te 457 mM produkta pri koncentraciji enzima od 100 mg cm<sup>-3</sup>. Kao i pri početnoj koncentraciji supstrata od 50 mM, i pri koncentraciji od 100 mM ubrzo nakon pokretanja reakcije dolazi do pada koncentracije epoksida na 0 mM.

Pri najvećoj početnoj koncentraciji supstrata od 250 mM (od odabranih za provednu simulacije) te protoku od 0.05 mL min<sup>-1</sup> tijekom 1440 min nastaje 75 mM produkta pri koncentraciji enzima od 5 mg cm<sup>-3</sup>, 93 mM produkta pri koncentraciji enzima od 10 mg cm<sup>-3</sup> te 175 mM produkta pri koncentraciji enzima od 100 mg cm<sup>-3</sup>; pri protoku od 0.5 mL min<sup>-1</sup> nastaje 325 mM produkta pri koncentraciji enzima od 5 mg cm<sup>-3</sup>, 370 mM produkta pri koncentraciji enzima od 10 mg cm<sup>-3</sup> te 474 mM produkta pri koncentraciji enzima od 100 mg cm<sup>-3</sup>. Koncentracija epoksida i u ovom slučaju ubrzo pada na 0 mM.

Uspoređujući reakcije koje su se odvijale uz iste početne koncentracije supstrata i iste koncentracije enzima u reaktoru, vidljivo je da povećanjem protoka dolazi do povećanja konverzije u reaktoru (pri  $c_{0\text{supstrat}} = 100$  mM i  $c_{\text{enzim}} = 10$  mg cm<sup>-3</sup> nastaje 88 mM produkta uz protok od 0.05 mL min<sup>-1</sup>, dok pri protoku od 0.5 mL min<sup>-1</sup> nastaje 381 mM produkta). Ove simulacije pokazuju da je potrebno jako pažljivo izbalansirati koncentraciju enzima, brzinu dotoka supstrata, kao i koncentraciju supstrata u dotoku, kako bi se mogao smanjiti utjecaj hidrolize epoksida na račun kvalitete dobivenog produkta.

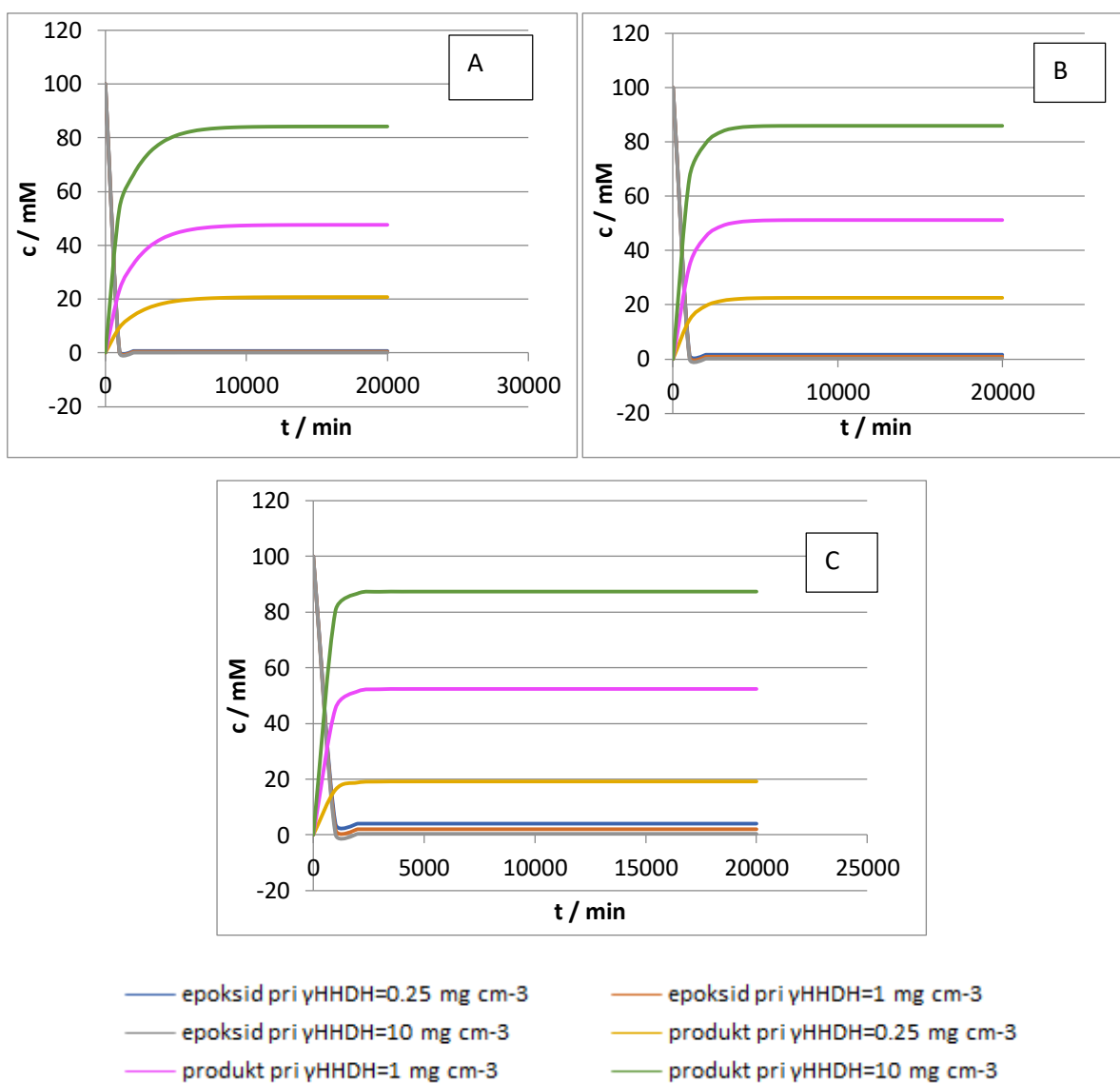
## 5.7. PROTOČNO-KOTLASTI REAKTOR

U programskom paketu SCIENTIST provedene su simulacije za odvijanje biokatalitičke sinteze produkta u protočno-kotlastom reaktoru pri istim početnim koncentracijama i koncentracijama epoksida i natrijeva cijanida u dotoku od 50 mM, 100 mM i 250 mM. Uz variranje koncentracije supstrata, varirana je i koncentracija enzima ( $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  i  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ) kao i brzina protoka ( $q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$ ,  $1 \text{ mL min}^{-1}$  i  $2 \text{ mL min}^{-1}$ ). Dobiveni rezultati prikazani su na slikama 35, 36 i 37. Programski kod za ove simulacije dan je u prilogu 6.

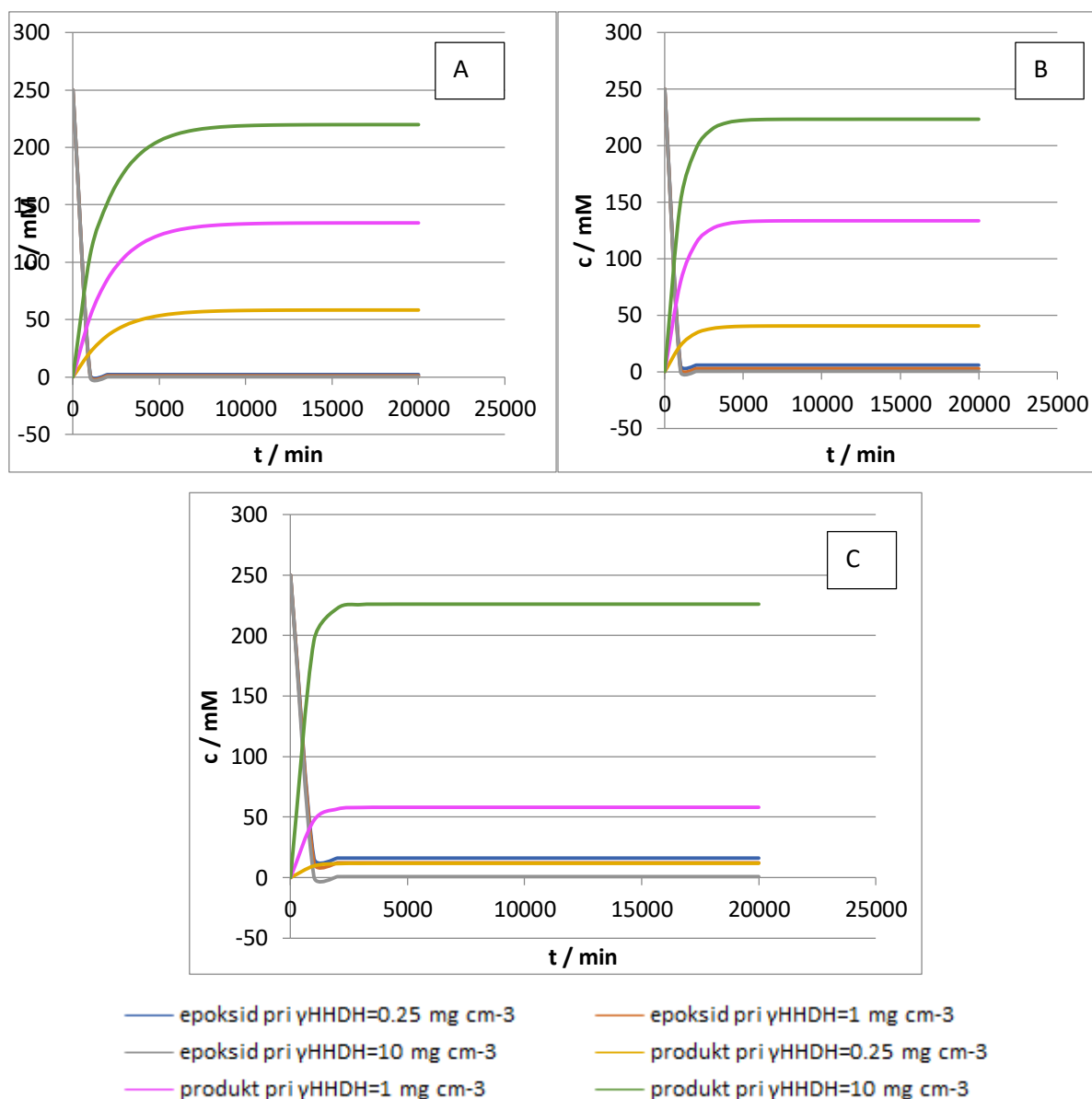


**Slika 35.** Simulacija odvijanja biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u protočno-kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktor}} = 1000 \text{ L}$  pri  $c_{\text{EPOKSID},0} = 50 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 50 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{EPOKSID}} = 50 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN}} = 50 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HHDH}} = 0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ) te **A)**  $q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$ , **B)**  $q = 1 \text{ mL min}^{-1}$  te **C)**  $q = 2 \text{ mL min}^{-1}$





**Slika 36.** Simulacija odvijanja biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u protočno-kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktor}} = 1000 \text{ cm}^3$  pri  $c_{\text{EPOKSID},0} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{EPOKSID}} = 100 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN}} = 100 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HHDH}} = 0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ) te **A)**  $q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$ , **B)**  $q = 1 \text{ mL min}^{-1}$  te **C)**  $q = 2 \text{ mL min}^{-1}$



**Slika 37.** Simulacija odvijanja biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u protočno-kotlastom reaktoru ( $V_{\text{reaktor}} = 1000 \text{ cm}^3$  pri  $c_{\text{EPOKSID},0} = 250 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN},0} = 250 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{EPOKSID}} = 250 \text{ mM}$ ,  $c_{\text{NaCN}} = 250 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HHDH}} = 0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ ,  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ) te **A)**  $q = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$ , **B)**  $q = 1 \text{ mL min}^{-1}$  te **C)**  $q = 2 \text{ mL min}^{-1}$

Iz grafičkih prikaza rezultata simulacije biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4-dimetilpentan nitrila u protočno-kotlastom reaktoru vidljivo je da u reaktoru dolazi do sinteze produkta. Na konverziju supstrata u produkt značajan utjecaj ima koncentracija enzima u reaktoru, dok brzina protoka nema tako značajan utjecaj pri uvjetima odabranim za usporedbu. Pri koncentraciji supstrata (epoksida i natrijeva cijanida) od  $50 \text{ mM}$  te protoku od  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$

<sup>1</sup> dolazi do uspostave stacionarnog stanja u  $t = 8000$  min te nastaje 8 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ . Povećanjem koncentracije enzima u reaktoru dolazi do povećanja konverzije supstrata u produkt te pri koncentraciji enzima od  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  nastaje 20 mM, dok pri koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg cm}^{-3}$  nastaje 39 mM produkta. Pri protoku od  $1 \text{ mL min}^{-1}$  stacionarno stanje se uspostavlja nakon 5000 min te nastaje 9 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ , 22 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $1 \text{ mg cm}^{-3}$ , te 41 mM produkta pri koncentraciji enzima do  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ . Pri najvećem protoku,  $q = 2 \text{ mL min}^{-1}$ , vrijeme potrebno za uspostavu stacionarnog stanja je najkraće, odnosno stacionarno stanje se uspostavlja nakon 3000 min. Nastaje 10 mM produkta pri koncentraciji enzima u reaktoru od  $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ , 24 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  te 41 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ . Vidljivo je da povećanjem protoka nastaje neznatno više produkta. Pri početnoj koncentraciji supstrata od 100 mM te protoku od  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  stacionarno stanje se uspostavlja nakon 10 000 min te nastaje 20 mM pri koncentraciji enzima od  $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ , 47 mM pri koncentraciji enzima od  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  te 83 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ . Pri protoku od  $1 \text{ mL min}^{-1}$  nastaje 22 mM produkta pri najnižoj koncentraciji enzima, 51 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  te 85 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ . Stacionarno stanje se uspostavlja nakon 6000 min. Pri početnoj koncentraciji supstrata od 250 mM te protoku od  $0.5 \text{ mL min}^{-1}$  stacionarno stanje se uspostavlja nakon 12 000 min te nastaje 57 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ , 133 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  te 219 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ ; pri protoku od  $1 \text{ mL min}^{-1}$  nastaje 40 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ , 133 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  te 223 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg cm}^{-3}$  dok pri protoku od  $2 \text{ mL min}^{-1}$  nastaje 11 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $0.25 \text{ mg cm}^{-3}$ , 58 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $1 \text{ mg cm}^{-3}$  i 225 mM produkta pri koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg cm}^{-3}$ . Iz dobivenih rezultata se može zaključiti da povećanje protoka pri odabranim uvjetima utječe na smanjenje vremena potrebnog za uspostavu stacionarnog stanja, no ne utječe značajno na povećanje konverzije u reaktoru.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom radu istražen je enzim halogenhidrin-dehalogenaza, odnosno njegova sposobnost da katalizira sintezu (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitrila iz 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana, uz prisutnost natrijeva cijanida. Epoksidi su važni prekursori u farmaceutskoj i kemijskoj industriji te se intenzivno istražuju s obzirom da se iz njih mogu dobiti optički aktivni enantiomeri koji pokazuju korisno biološko djelovanje. Dobivanje čistih enantiomera osobito je bitno i zanimljivo farmaceutskoj industriji, a često može biti iznimno skupo i dugotrajno. U ovom radu je razvijena GC metoda za detekciju (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitrila što je omogućilo provođenje i praćenje reakcije njegove biokatalitičke sinteze. S obzirom da su epoksidi iznimno podložni kemijskoj hidrolizi, ispitana je stabilnost supstrata 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana u puferu. Rezultati su pokazali da se povećanjem koncentracije epoksida poveća i brzina njegove hidrolize.

Poznavanjem stabilnosti epoksida i metode za detekciju željenog produkta, provedena je preliminarna reakcija biokatalitičke sinteze (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitrila iz 3,3-dimetil-1,2-epoksibutana, uz prisutnost natrijeva cijanida. Dobiveni rezultati su potvrdili da tijekom reakcije uistinu nastaje (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitril. S obzirom na epidemiološke uvjete, nije se krenulo u daljnje optimiranje reakcijskih uvjeta već su se dobiveni rezultati iskoristili za razvoj matematičkog modela biokatalitičke sinteze produkta.

Uz matematički model za reakciju nastajanja (*R*)-3-hidroksi-4,4,-dimetilpentan nitrila, razvijeni su reaktorski modeli za kotlasti reaktor, kotlasti reaktor s dotokom supstrata i protočno-kotlasti reaktor. Provedene simulacije biokatalitičke sinteze pokazale su da se reakcija odvija u sva tri reaktora, ali da je ona više ili manje ometana određenim čimbenicima. Odvijanju biokatalitičke sinteze produkta pogoduje veća koncentracije enzima u reaktorima te je pri koncentraciji enzima od  $10 \text{ mg cm}^{-3}$  uočena najveća konverzija u sva tri reaktora.

Simulacije su ukazale da povećanjem koncentracije supstrata u kotlastom reaktoru pri istoj koncentraciji enzima nastaje manja količina produkta jer vjerojatno dolazi do inhibicije enzima supstratom i odvijanja nepoželjnih sporednih reakcija, među kojima je vjerojatno prisutna i kemijska hidroliza epoksida.

U kotlastom reaktoru s dotokom supstrata provedene simulacije pri odabranim uvjetima pokazale su da protok ima veliki utjecaj na konverziju supstrata u produkt, kao i koncentracija enzima. U ovom je reaktoru bilo moguće postići najveću koncentraciju produkta. Ipak, bilo bi

još potrebno optimirati reakcijske uvjete kako bi se postigao zadovoljavajući rezultat po pitanju minimalne količine enzima.

U protočno-kotlastom reaktoru je uočeno da protok značajno ne utječe na povećanje konverzije pri istraživanim uvjetima, ali zato ima značajni utjecaj na vrijeme potrebno da se uspostavi stacionarno stanje.

## 7. POPIS SIMBOLA I KRATICA KORIŠTENIH U RADU

Arg - arginin

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

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

C\* - kiralni atom ugljika

$c_{E0}$  – početna koncentracija enzima,  $\text{mg dm}^{-3}$

$c_P$  – koncentracija produkta, mM

$c_S$  ( $c_{S1}$ ,  $c_{S2}$ ) – koncentracija supstrata (koncentracija supstrata1, koncentracija supstrata2), mM

$c_X$  – koncentracija biomase,  $\text{g dm}^{-3}$

$c_{X0}$  – početna koncentracija biomase,  $\text{g dm}^{-3}$

DKR – dinamička kinetička rezolucija

DMSO – dimetil sulfoksid

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

E – enzim

$E_a$  – energija aktivacije bez prisutnosti enzima, kJ

$E_a'$  – energija aktivacije u prisutnosti enzima, kJ

$E_r$  – ukupna energija reakcije, kJ

ES, ES<sup>#</sup> – kompleks enzim-supstrat

EtOAc – etil-acetat

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

$F_{ul}$  – molarni protok tvari na ulazu,  $\text{mol h}^{-1}$

$F_{izl}$  – molarni protok tvari na izlazu,  $\text{mol h}^{-1}$

G – Gibbsova slobodna energija, kJ

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

$\Delta G_B$  – energija vezanja, kJ

$\Delta G$  – promjena Gibbsove energije, kJ

He - helij

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

HheC – C tip halogenhidrin dehalogenaze

HX – halogen vodik

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,  $\text{min}^{-1}$   
 $k_d$  – konstanta deaktivacije,  $\text{min}^{-1}$   
 $K_m$  – Michaelisova konstanta,  $\text{mmol dm}^{-3}$   
 $K_{mS1}, K_{mS2}$  - Michaelisove konstante vezane uz enzim i supstrat  $S_1$ , odnosno supstrat  $S_2$ ,  $\text{mmol dm}^{-3}$   
 $K_i$  – konstanta inhibicije,  $\text{mmol dm}^{-3}$   
 KR – kotlasti reaktor  
 $m$  – masa, g  
 $M_r$  – molarna masa komponente,  $\text{g mol}^{-1}$   
 MTBE – metil terc-butil eter  
 $n$  – množina tvari, mol  
 P- produkt  
 pH – negativan logaritam aktiviteta vodikovih iona  
 pKa – negativan logaritam konstante disocijacije kiseline  
 (R)- R-izomer  
*rac* - racemat  
 $r_s$  – brzina enzimske reakcije,  $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$   
 S – supstrat  
 Ser – serin  
 $T$  – temperatura,  $^{\circ}\text{C}$   
 $t$  – vrijeme, s  
 $t_R$  – vrijeme zadržavanja na koloni (*engl. retention time*), min  
 Tyr – tirozin  
 $t^{1/2}$  – vrijeme poluživota, min  
 TO – temeljna otopina  
 Tris-SO<sub>4</sub> – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer  
 U – jedinica enzimske aktivnosti  
 UV zračenje – ultraljubičasto zračenje (*engl. ultraviolet radiation*)  
 $V$  – volumen,  $\text{cm}^3$   
 $V_m$  – maksimalna brzina enzimske reakcije,  $\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$   
 $V_r$  – volumen reakcijske smjese,  $\text{cm}^3$   
 $\gamma$  – masena koncentracija,  $\text{mg dm}^{-3}$   
 $d$  – promjena

## 8. LITERATURA

- B**airoch, A., The enzyme database in 2000, *Nucleic Acids Research*, 28 (2000), 304-305.
- Binod P., Palkhiwala P., Gaikawai R., Nampoothiri K. M., Duggal A., Dey K., Industrial Enzymes – Present Status and Future Perspectives for India, *Journal of Scientific and Industrial Research*, 72 (2013), 271 – 286.
- Brahmachari, G., *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, 1st Edition, Academic Press, New York, 2016, sections 1, 2, 6, 7, 11, 16.
- C**alderini, E., Wessel, J., Suss, P., Schrepfer, P., Wardenga, R., Schallmeyer, A., Selective Ring-opening of Di-substituted Epoxides Catalysed by Halohydrin Dehalogenases, *ChemCatChem*, 11 (2019), 2099-2106.
- Castro, C. E., Bartnički, E. W., Biodehalogenation. Epoxidation of Halohydrins, Epoxide Opening and Transhalogenation by a *Flavobacterium* sp., *Biochemistry*, 7 (1986), 3213-3218.
- Cooper, G. M., *The Cell*, 2nd edition, A Molecular Approach, Sinauer Associates, Sunderland (MA), 2000, Chapter 2. The Chemistry of Cells, Mechanisms of Enzymatic Catalysis, Sinauer Associates, Sunderland, str. 74
- D**e Jong, R.M., Tiesinga, J.J.W., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Tang, L., Janssen, D.B., Dijkstra, B.W., Aziridines and Epoxides in Organic Synthesis, *EMBO J.*, 22 (2003), 4933-4944.
- Deregnaucourt, J., Archelas, A., Barbirato, B., Paris, J.-M., Furstoss, R., Enzymatic Transformations 63. High-Concentration Two Liquid-Liquid Phase *Aspergillus niger* Epoxide Hydrolase-Catalysed Resolution: Application to Trifluoromethyl-Substituted Aromatic Epoxides, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349 (2007), 1405-1417.
- Doran, P.M., *Bioprocess Engineering Principles*, 2nd Edition, Elsevier Science Publishing Co Inc, Academic Press Inc, San Diego (USA), 2013, str. 268-275
- F**indrik Blažević, Z., *Bioreakcijska tehnika I*, interna skripta, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, lipanj 2013, 1-15, 37-52.



Findrik Blažević, Z., Bioreaktori, Interna skripta za dio kolegija Reaktori i bioreaktori, Zagreb 2017, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, str. 12-19, 21-31, 41–51.

**H**ardin, J., Bertoni, G., Kleinsmith, L.J., Becker's world of the cell, Eight Edition, Pearson; 2012.

Hegy 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.

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

Jespersen, A.N.D., Brady, J.E., Hyslop, A., Chemistry; The molecular Nature of Matter, 6th Edition, Wiley, 2012., str. 71-76.

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

Lutje, J. H., Tang, L., van Gelder, M., Kellogg, R. M., Janssen, D. B., Exploration of the biocatalytic potencial of halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates, Tetrahedron, Asymmetry 13 (2002), 1083-1089.

**M**ajerić Elenkov, M., Hauer, B., Janssen, D. B., Enantioselective ring opening of epoxides with cyanide catalysed by halohydrin dehalogenases: A new approach to non-racemic  $\beta$ -hydroxy nitriles, Advanced Synthesis & Catalysis. 348 (2006), 579-585.

Majerić Elenkov, M., Tang, L., Hauser, B., Janssen, D.B., Sequential kinetic resolution catalyzed by halohidrin dehalogenase, Organic Letters 8 (2006), 19, 4227-4229.

Majerić Elenkov, M., Hoeffken, H. W., Tang, L., Hauer, B., Janssen, D.B., Enzyme-catalyzed nucleophilic ring opening of epoxides for the preparation of enantiopure tertiary alcohols, Advanced Synthesis & Catalysis, 349 (2007), 2279-2285.

Majerić Elenkov, M., Tang, L., Meetsma, A., Hauer, B., Janssen, D. B., Formation of enantiopure 5-substituted oxazolidinones through enzyme-catalysed kinetic resolution of epoxides, Organic Letters 10 (12) (2008), 2417-2420.

Majerić Elenkov, M., Primožić, I., Hrenar, T., Smolko, A., Dokli, I., Salopek-Sondi, B., Tang, L., Catalytic activity of halohydrin dehalogenases towards spiroepoxides, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10 (2012), 5063-5072.

Majerić Elenkov, M., Szymanski, W., Janssen, D. B., *Biocatalysis*, Section 2.6.2., George Thieme Verlag Kf (2014)

Majerić Elenkov, M., Čičak, M., Smolko, A., Knežević, A., Halohydrin dehalogenase-catalysed transformations of epifluorohydrin, *Tetrahedron Letters* 59 (2018), 406-408.

McMurry, J., *Fundamentals of Organic Chemistry*, 7th Edition. Cornell University, Brooks/Cole, Cengage Learning, USA, 2011., str. 277-283.

Meyer, H.-P., Schmidhalter, D., *Industrial Scale Suspension Culture of Living Cells*, Wiley-Blackwell, Weinheim, 2014, str.1-37.

Miao, A., Wanyi, L., Xiaoying, Z., Ran, M., Huihui, W., Baodong, C., Wenyong, H., Nanwei, W., Yongzheng, C., Highly  $\alpha$ -position regioselective ring-opening of epoxides catalyzed by halohydrin dehalogenase from *Ilumatobacter coccineus*: a biocatalytic approach to 2-azido-2-aryl-1-ols, *RSC Advances*, 9 (2019), 16418-16422.

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

Nelson, D.L., Cox, M.M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th Edition, 2008, W.H. Freeman and Company, Figure 3-13

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

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

Pine, S. H., *Organska kemija, Školska knjiga*, Zagreb, 1994, 9-37.

Rucker R.B, Chowanadisai 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.

Schallmey, M., Floor, R.J., Szymanski, W., Janssen, D.B., Hydrolysis and Reverse Hydrolysis: Halohydrin Dehalogenases, University of Groningen, Groningen, The Netherlands, Elsevier Ltd., 2012, str.143-155.

Schallmey, A., Schallmey, M., Recent advances on halohydrin dehaloenases – from enzyme identification to novel biocatalytic applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100 (2016), 7827-7839.

Solomons, T.W.G., Fryhle, C.B., Snyder, S.A., Organic Chemistry, 10th Edition, John Wiley & Sons, 2011., str. 502 – 548.

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

Tang, L., van Hylckama Vlieg, J. E. T., Lutje Spelberg, J. H., Fraaije, M. W., Janssen, D. B., Improved stability of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by replacement of cysteine residues, *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30 (2), 251-258.

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

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

Waldmann, H., Enzyme catalysis in Organic Synthesis, Edited by Drauz, K., Groger, H., May, O., 3th Edition, Volume 1, 2012, 417.

Zhong-Yu, Y., Zhi-Qiang, L., Yu-Guo, Z., Chemical and enzymatic approaches to the synthesis of optically pure ethyl (R)-4-cyano-3-hydroxybutanoate, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (2014), 11-21.

***Web pristup:***

<https://www.tes.com/lessons/> (pristup 9. travnja 2020.)

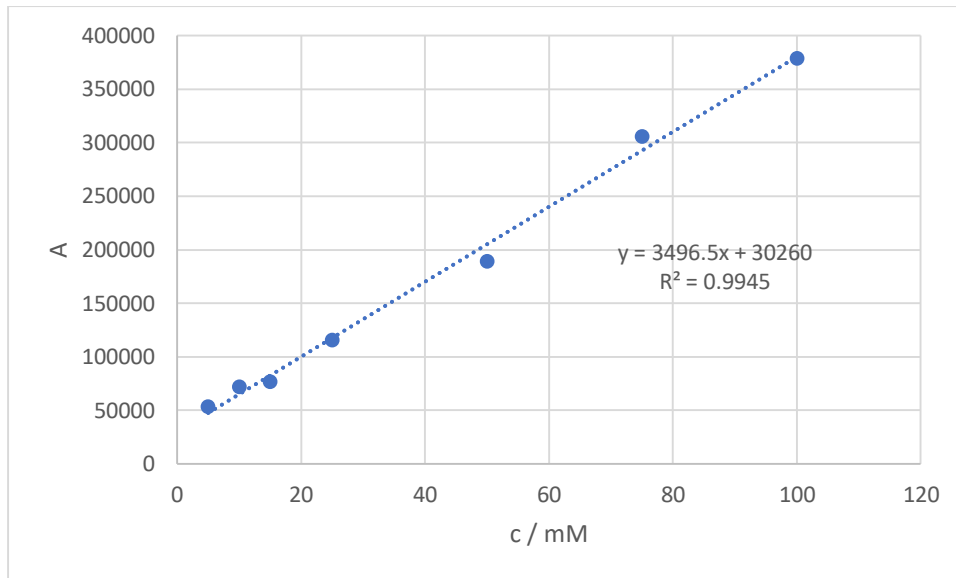
<https://enzimi.wordpress.com/kofaktori/> (pristup 9. travnja 2020.)

<https://chem.libretexts.org/> (pristup 10. travanja 2020.)

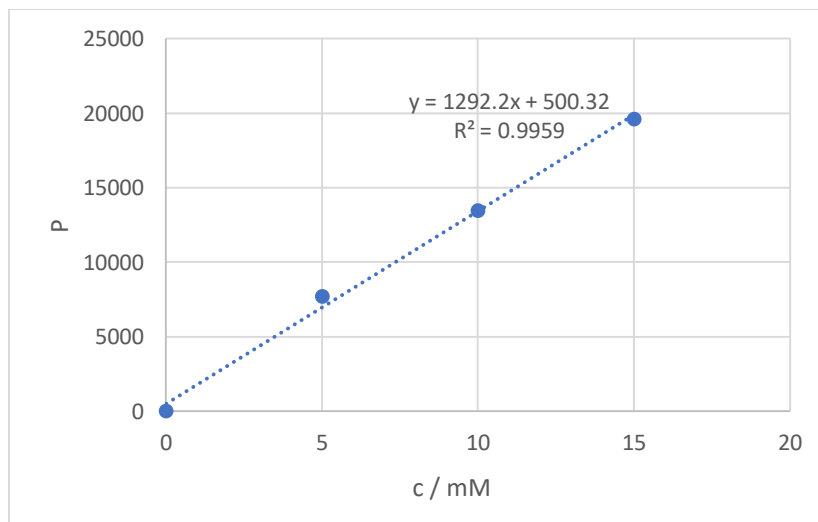
<https://www.agilent.com/> (pristup 5. lipnja 2020.)

## 9. PRILOZI

**Prilog 1.** Baždarni pravac za GC analizu (*R*)-3-hidroksi-4,4dimetilpentan nitrila (produkta) na HP-5 koloni



**Prilog 2.** Baždarni pravci za određivanje koncentracije epoksida GC analizom na HP-5 koloni



**Prilog 3.** Programski kod za procjenu kinetičkih parametara

```
// racunanje k i n
```

```
IndVars: cE
```

```
DepVars: r
```

```
Params: k, n
```

```
//kineticka jednadzba
```

```
r=k*((cE)^n)
```

```
//pocetne vrijednosti
```

```
k=0.1
```

```
n=0.1
```

```
***
```

**Prilog 4.** Programski kod za simuliranje reakcije u kotlastom reaktoru

// kotlasti reaktor

IndVars: t

DepVars: cCIJANID, cEPOKSID, cPRODUKT

Params: Vm, KmCIJANID, KmEPOKSID, KiEPOKSID

// kineticki model

$$r1 = (Vm * cCIJANID * cEPOKSID * cHHDH) / ((cEPOKSID + KmEPOKSID + cEPOKSID * (cEPOKSID / KiEPOKSID)) * (cCIJANID + KmCIJANID))$$

$$r2 = k * ((cEPOKSID)^n)$$

//reaktorski model

$$cCIJANID' = -r1$$

$$cEPOKSID' = -r1 - r2$$

$$cPRODUKT' = r1$$

//pocetne vrijednosti i parametri

t=0

Vm=24.59

KmCIJANID=4.8

KmEPOKSID=373.69

KiEPOKSID=0.07

cCIJANID=50

cHHDH=0.25

cEPOKSID=50

cPRODUKT=0

n=0.7663

k=0.0527

\*\*\*

**Prilog 5.** Programski kod za simulaciju reakcije u kotlastom reaktoru s dotokom supstrata

// kotlasti reaktor s dotokom supstrata

IndVars: t

DepVars: cCIJANID, cEPOKSID, cPRODUKT

Params: Vm, KmCIJANID, KmEPOKSID, KiEPOKSID

// kineticki model

$r1 = (Vm * cCIJANID * cEPOKSID * cHHDH) / ((cEPOKSID + KmEPOKSID + cEPOKSID * (cEPOKSID / KiEPOKSID)) * (cCIJANID + KmCIJANID))$

$r2 = k * (cEPOKSID)^n$

//reaktorski model

$cCIJANID' = -r1 + ((cCIJANIDd - cCIJANID) * (q/V))$

$cEPOKSID' = -r1 - r2 + ((cEPOKSIDd - cEPOKSID) * (q/V))$

$cPRODUKT' = r1 - (cPRODUKT * (q/V))$

$cHHDH' = -(cHHDH * (q/V))$

$V' = q$

//pocetne vrijednosti i parametri

t=0

Vm=24.59

KmCIJANID=4.8

KmEPOKSID=373.69

KiEPOKSID=0.07

cCIJANID=50

cHHDH=0.25

cEPOKSID=50

cPRODUKT=0

V=1000



q=0.5

cCIJANIDd=10000

cEPOKSIDd=10000

n=0.7663

k=0.0527

\*\*\*

### **Prilog 6.** Programski kod za simulaciju reakcije u protočno-kotlastom reaktoru

// protocno-kotlasti reaktor

IndVars: t

DepVars: cCIJANID, cEPOKSID, cPRODUKT

Params: Vm, KmCIJANID, KmEPOKSID, KiEPOKSID

// kineticki model

$$r1 = (Vm * cCIJANID * cEPOKSID * cHHDH) / ((cEPOKSID + KmEPOKSID + cEPOKSID * (cEPOKSID / KiEPOKSID)) * (cCIJANID + KmCIJANID))$$

$$r2 = k * (cEPOKSID)^n$$

//reaktorski model

$$cCIJANID' = -r1 + ((cCIJANID0 - cCIJANID) / \tau)$$

$$cEPOKSID' = -r1 - r2 + ((cEPOKSID0 - cEPOKSID) / \tau)$$

$$cPRODUKT' = r1 - (cPRODUKT / \tau)$$

//pocetne vrijednosti i parametri

t=0

Vm=24.59

KmCIJANID=4.8

KmEPOKSID=373.69

KiEPOKSID=0.07

cCIJANID=250

cHHDH=1

cEPOKSID=250

cPRODUKT=0

cCIJANID0=250

cEPOKSID0=250

$\tau = V/q$

V=1000

q=1

n=0.7663

k=0.0527

\*\*\*

