

# Validacija modela biokatalitičke sinteze (R)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola u šaržnom reaktoru

---

Tomljenović, Emanuel

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:149:954362>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-05**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Emanuel Tomljenović

# DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Emanuel Tomljenović

VALIDACIJA MODELA BOKATALIČKE SINTEZE  
(*R*)-2-AZIDO-1-(4-TRIFLUOROMETIL-FENIL)-ETANOLA  
U ŠARŽNOM REAKTORU  
DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

doc. dr. sc. Dragana Vuk

Zagreb, rujan 2021.

## SAŽETAK

Enzimi su biološki katalizatori koji su prisutni u živim stanicama i neophodni su za život kakav poznajemo. Reakcije u kojima su prisutni enzimi potrebno je dobro istražiti i okarakterizirati kako bi se mogle provoditi u industrijskim mjerilima. Prednost uporabe enzima u biokatalitičkim reakcijama leži u činjenici da su djelotvorniji i pri vrlo blagim uvjetima, puno blažim od kemijskih katalizatora. Potrebno je obratiti pažnju i na aktivnost enzima u različitim reakcijskim uvjetima (temperatura, koncentracija supstrata, pH, zasićenost kisikom) jer optimizacijom reakcijskih uvjeta omogućujemo maksimalan prinos željenog produkta i smanjenje nastanka neželjenog ili štetnog nusprodukta.

Fluorirani aromatski spojevi su iznimno važni u farmaceutskoj industriji kao prekursori i kao građevni blokovi. Bitno je da takvi spojevi budu optički čisti jer je poznato da dva enantiomera mogu imati znatno različita svojstva i biološko djelovanje, često štetno i toksično. Jedna od metoda sinteze takvih spojeva uključuje korištenje enzima halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH). U ovom radu proučavana je reakcija otvaranja epoksidnog prstena, fluoriranog derivata stiren oksida uz azid kao nukleofil prilikom čega nastaje fluorirani azidoalkohol. Reakcija je katalizirana enzimom HHDH (C-tip) koji je poznat i pod nazivom HheC-W249P.

Cilj ovog rada bio je validirati matematički model biokatalitičke sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola u šaržnom reaktoru. Model je uspješno validiran provedbom reakcije u pet različitih kotlastih reaktora s različitim početnim uvjetima u reaktoru. Uzorci reakcijske smjese su analizirani na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti. Praćena je i stabilnost enzima pri različitim uvjetima prilikom čega je pokazano da početni uvjeti u reaktoru ne utječu značajno na stabilnost enzima. Stabilnost enzima se pratila spektrofotometrijskom metodom.

**Ključne riječi:** enzimi, biokatalitičke reakcije, halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH), epoksidi

# Model validation for the biocatalytic synthesis of (*R*)-2-azido-1-(4-trifluoromethyl-phenyl)-ethanol in batch reactor

## ABSTRACT

Enzymes are biological catalysts that are present in living cells and are necessary for life as we know it. Reactions in which enzymes are present need to be well investigated and characterized in order to be carried out on an industrial scale. The advantage of using enzymes in biocatalytic reactions lies in the fact that they are effective even under very mild conditions, much milder than catalysts of chemical reactions. It is necessary to pay attention to the activity of enzymes in different reaction conditions (temperature, substrate concentration, pH, oxygen saturation) because by optimizing the reaction conditions we enable maximum yield of the desired product and reduction of unwanted or harmful by-products.

Fluorinated aromatic compounds are extremely important in the pharmaceutical industry as precursors and as building blocks. It is important that such compounds be optically pure because it is known that the two enantiomers can have significantly different properties and biological effect, often harmful and toxic. One of the methods of synthesis of such compounds is the use of the enzyme halohydrin-dehalogenase (HHDH). In this paper, the reaction of opening an epoxy ring, a fluorinated derivative of styrene oxide with an azide as a nucleophile, during which a fluorinated azidoalcohol is formed, was studied. The reaction is catalyzed by the HHDH (C-type) enzyme also known as HheC-W249P.

The aim of this work was to validate a mathematical model of biocatalytic synthesis of (*R*)-2-azido-1-(4-trifluoromethyl-phenyl)-ethanol in a batch reactor. The model was successfully validated by carrying out the reaction in five different batch reactors with different initial conditions in the reactor. Samples of the reaction mixture were analyzed on a high performance liquid chromatograph. The stability of the enzyme under different conditions was also monitored, and it was shown that the initial conditions in the reactor did not significantly affect the stability of the enzyme. Enzyme stability was monitored by spectrophotometric method.

**Keywords:** enzymes, biocatalytic reactions, halohydrin-dehalogenase (HHDH), epoxides



Ovaj rad financirala je Hrvatska zaklada za znanost u okviru projekta "Enzimska sinteza fluoriranih kiralnih građevnih blokova (EnzyFluor)", IP-2018-01-4493

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	8
2. OPĆI DIO.....	9
2.1. Enzimi.....	9
2.1.1. Djelovanje enzima.....	9
2.1.2. Mehanizam djelovanja enzima.....	10
2.1.3. Svojstva enzima.....	12
2.1.4. Struktura enzima.....	12
2.1.5. Podjela enzima.....	15
2.1.6. Nomenklatura enzima.....	15
2.1.7. Primjena enzima.....	16
2.2. Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH).....	16
2.2.1. Struktura i katalitički reakcijski mehanizam djelovanja halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH).....	17
2.2.1.1. Reakcije nastajanja epoksida djelovanjem halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH).....	17
2.2.1.2. Reakcije otvaranja epoksidnog prstena djelovanjem halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH).....	18
2.2.2. Podjela halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH).....	20
2.2.3. Primjena halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH).....	20
2.2.4. C-tip halogenhidrin-dehalogenaze (HheC).....	22
2.3. Epoksidi.....	23
2.3.1. Stiren oksid i njegovi derivati.....	24
2.4. Kotlasti reaktor.....	24
2.5. Kinetički model enzimske reakcije.....	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	31
3.1. Aparatura i kemikalije.....	31
3.1.1. Reakcijski sustav.....	31
3.1.2. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC).....	32
3.1.3. Spektrofotometar.....	32
3.1.4. Ostala aparatura.....	33
3.1.5. Kemikalije.....	35
3.2. Analitičke metode.....	35
3.2.1. Analiza uzoraka na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (HPLC).....	35

3.2.2. Izrada baždarnih dijagrama .....	37
3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima spektrofotometrijskim testom s PNSHH.....	38
3.3. Eksperimenti u kotlastim reaktorima .....	40
3.4. Matematički model procesa.....	41
3.4.1. Kinetički model procesa .....	42
3.4.2. Reaktorski model procesa .....	43
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	44
4.1. Ispitivanje stabilnosti HheC-W249P pri provođenju reakcija .....	44
4.2. Biokatalitička sinteza ( <i>R</i> )-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola u kotlastom reaktoru ...	48
5. ZAKLJČAK.....	56
6. POPIS SIMBOLA.....	57
7. LITERATURA .....	60
8. PRILOZI .....	71



# 1. UVOD

U današnje vrijeme sve je razvijenija svijest o potrebi za održivim razvojem i očuvanjem okoliša pa se teži prelasku na biokatalizatore s tradicionalnih kemijskih katalizatora. Iz ekonomskih i, još bitnijih, ekoloških razloga uporaba velikih količina organskih otapala, teško, dugotrajno i skupocijeno pročišćavanje produkata i ekstremni reakcijski uvjeti postaju sve nepoželjniji u industriji.<sup>7</sup> Pojam biokatalize je sve prisutniji i nalazi sve širu primjenu, posebice u farmaceutskoj i agrokemijskoj industriji gdje postoji velika potreba za optički čistim spojevima.<sup>1</sup> Biokataliza je izraz koji obuhvaća sve kemijske reakcije, s prirodnim ili umjetnim spojevima, katalizirane biokatalizatorom ili enzimom.<sup>2</sup> Enzimi su danas vrlo atraktivni katalizatori s obzirom da se pomoću njih, transformacijama mogu proizvoditi različite važne, optički aktivne građevne jedinice koje su visoko regioselektivne, stereoselektivne i kemoselektivne.<sup>7</sup>

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su se nedavno pojavile kao vrlo atraktivni i zanimljivi enzimi zbog svojstva da kataliziraju nekolicinu različitih neprirodnih reakcija.<sup>1</sup> Otkriveno je da HHDH ima sposobnost kataliziranja reakcije otvaranja epoksida s malim anionskim nukleofilima, poput azida, cijanida, cijanata, nitrita i drugih.<sup>3</sup> Reakcije otvaranja epoksida su vrlo korisne i predstavljaju izvrsnu metodu pripreme enantiomerno čistih azidoalkohola<sup>4</sup>, cijanoalkohola<sup>4,5</sup>, nitroalkohola<sup>6</sup> i sličnih spojeva.

Fluorirani aromatski spojevi se koriste kao insekticidi, herbicidi, fungicidi<sup>8</sup>, kao pomoćne tvari u formulaciji lijekova<sup>9</sup>, a koriste se i u industriji boja i polimera.<sup>10</sup> Takvi spojevi nisu rasprostranjeni u prirodi i za industrijske potrebe se sintetiziraju.<sup>11</sup> Kemijska sinteza uključuje metalne katalizatore i toksične reagense dok enzimaska sinteza izbjegava potrebu za uklanjanjem nepoželjnih tvari iz reakcijske smjese i daje enantiomerno čist produkt.<sup>12</sup>

U ovom radu validiran je matematički model kojim je opisana enzimaska reakcija otvaranja epoksidnog prstena katalizirana enzimom HheC-W249P uz azid kao nukleofil prilikom čega se dobiva (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanol kao produkt.

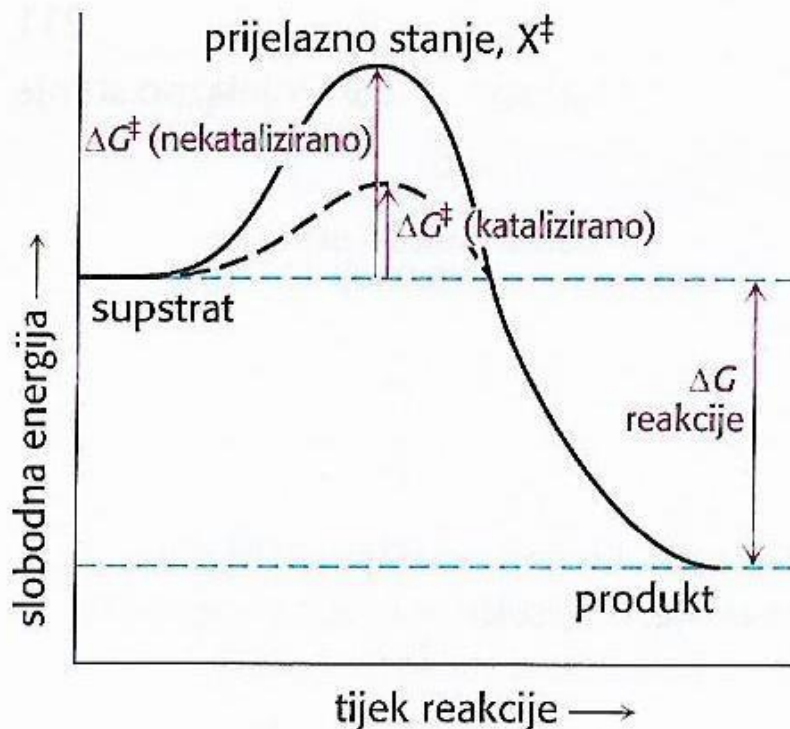
## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Enzimi

Enzimi ili biokatalizatori su tvari koje ubrzavaju biokemijske procese u živim organizmima. Osim što postoje i djeluju u živim organizmima, enzimi djeluju i izvan njih, stoga se industrijski proizvode i koriste kao iznimno učinkoviti katalizatori. Enzimi su neophodni za život kakav poznajemo jer su mnogobrojne reakcije koje se odvijaju u živim stanicama organizama prespore, a nastali produkti bili bi znatno drugačiji od organizmu potrebnih.<sup>13</sup> Enzimi sudjeluju u metaboličkim putevima, respiraciji, digestiji, održavanju homeostaze<sup>14</sup> i drugim neophodnim životnim priocesima. Dokazano je da „pogreška“ samo jednog enzima može imati loše, pa i fatalne posljedice za organizam. Zajedničko svojstvo svih enzima jest velika molekulska masa.<sup>13</sup> Razvoju enzima je pridonijela činjenica da se mogu pronaći, ali i proizvesti u brojnim mikroorganizmima te da su podložni genetskim izmjenama u svrhu poboljšanja svojstava.<sup>15</sup> 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.<sup>16</sup> Otkriće enzima prethodilo je otkrivanju njihove uloge. Naime, 1833. godine otkrivena je amilaza, a 1836. godine izoliran je pepsin. Pojašnjenje procesa vrenja (Louis Pasteur, 1857. godina) bilo je ključno za razumijevanje enzima i njihovog djelovanja. U Njemačkoj je 1897. godine otkriveno da se fermentacija šećera može odvijati i u odsutnosti živih stanica kvasca, a enzim koji je doveo do fermentacije saharoze nazvan je zimaza.<sup>13</sup>

#### 2.1.1. Djelovanje enzima

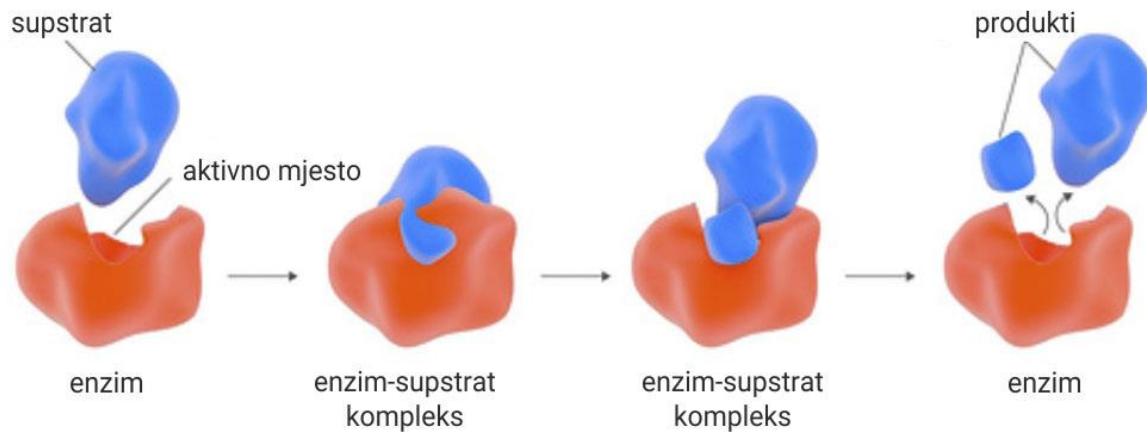
Kao i kod svih katalizatora i enzimi ubrzavaju kemijske reakcije snižavajući njihove energije aktivacije ( $E_a$ ) (slika 1.).<sup>17</sup> Naravno, uvjet za katalizu pojedine reakcije jest njezina spontanost, odnosno vrijednost Gibbsove energije mora biti negativna ( $\Delta G < 0$ ). Bez prisutnosti enzima reakcije se kreću u istom smijeru kao i s enzimom, no mnogo manjom brzinom.<sup>2</sup> Enzimi su se pokazali kao djelotvorniji od većine anorganskih katalizatora te pokazuju visoku specifičnost katalizirajući samo određenu vrstu kemijske reakcije. Kao i ostali katalizatori, enzimi u reakciju ulaze i iz nje izlaze nepromijenjeni.<sup>18</sup>



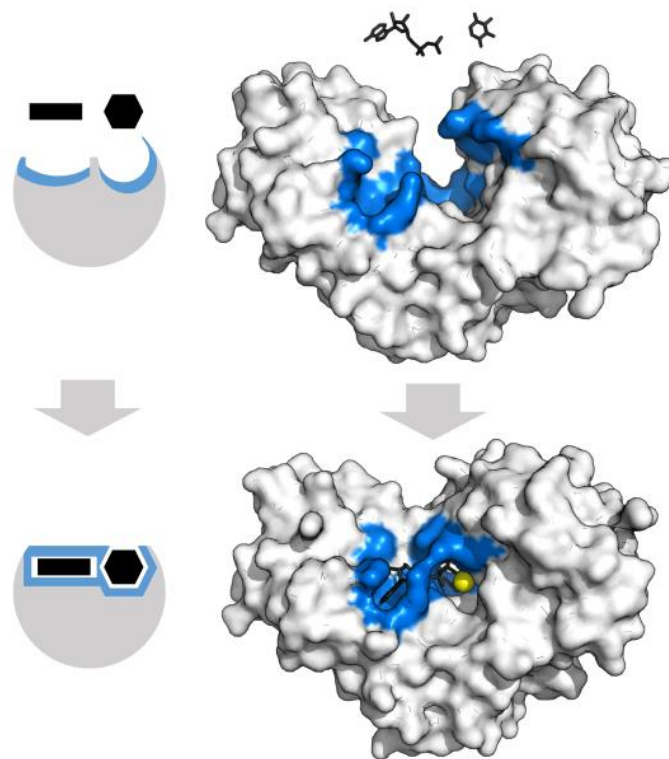
**Slika 1.** Enzimi ubrzavaju reakciju snižavanjem slobodne energije aktivacije<sup>19</sup>

### 2.1.2. Mehanizam djelovanja enzima

Enzimom katalizirana reakcija se odvija na aktivnom mjestu enzima.<sup>21</sup> Pošto su enzimi mnogo veće molekule od molekula supstrata, samo dio molekule enzima dolazi u kontakt s molekulom supstrata.<sup>22</sup> Tamo dolazi do vezanja supstrata na enzim prilikom čega nastaje enzim-supstrat kompleks niže energije. Nastankom kompleksa supstrat lakše i brže prelazi u produkt.<sup>21</sup> Nakon nastanka produkta, kompleks se raspada na produkt i enzim koji iz reakcije izlazi nepromijenjen.<sup>23</sup> Vezanje supstrata na aktivno mjesto događa se jer aktivno mjesto geometrijski odgovara obliku supstrata. Taj princip se može usporediti s mehanizmom ključa koji ulazi u bravu. Zato je E. Fischer nazvao tu teoriju ključ-brava (slika 2.). Kasnije je teoriju nadgradio D. E. Koshland i napomenuo kako si enzim i supstrat ne moraju u potpunosti geometrijski odgovarati, već da supstrat uzrokuje promjenu aktivnog mjesta enzima prilikom vezanja na enzim. Često se ova teorija uspoređuje s rukom i rukavicom (slika 3.). Naime, ruka i rukavica su geometrijski komplementarne oblikom, no kada se rukavica navuče na ruku ona modificira svoj oblik prilagođavajući se obliku ruke.<sup>24</sup> Iz toga proizlazi svojstvo visoke selektivnosti enzima.<sup>25</sup> Veze kojima se supstrat može vezati na enzim su vodikove, van der Waalsove, hidrofobne ili kovalentne. Formiranje i raspad kompleksa enzim-supstrat moraju biti iznimno brzi, jer bi u protivnom došlo do smanjenja aktivnosti enzima.<sup>23</sup>



**Slika 2.** Djelovanje enzima teorijom ključ-brava<sup>20</sup>



**Slika 3.** Djelovanje enzima teorijom ruka-rukavica<sup>27</sup>

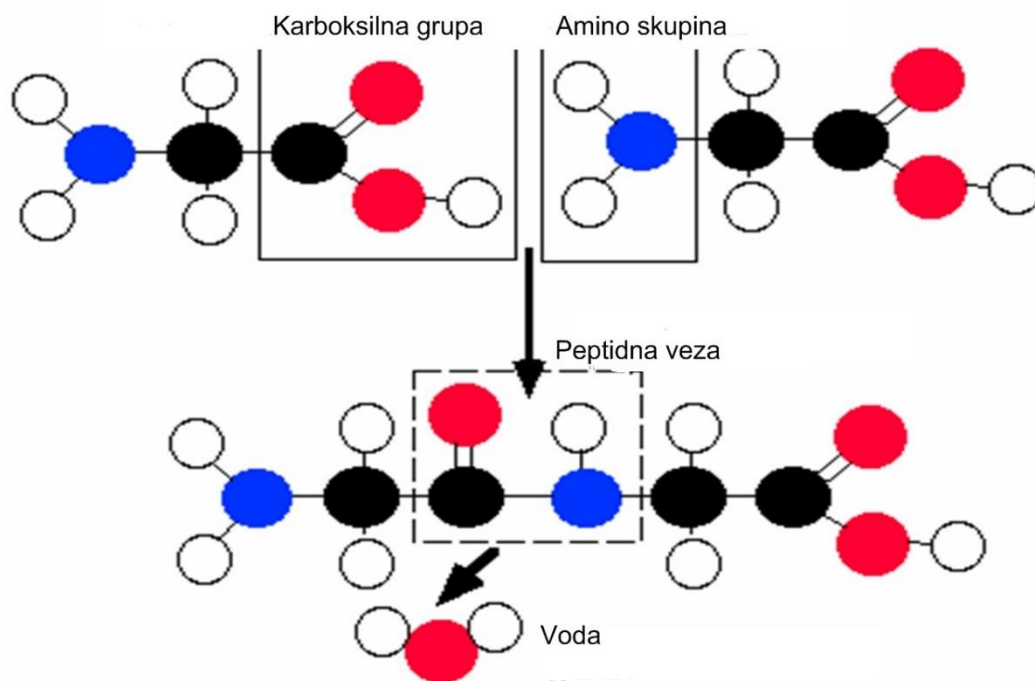
Neki enzimi su kao samostalne jedinice sami sebi dovoljni da bi bili aktivni. No, kod određenih enzima su potrebne molekule koje bi pripomogle njihovoj aktivaciji. Takve molekule se nazivaju kofaktori. Kofaktori mogu biti organskog podrijetla u kojem slučaju se nazivaju koenzimi ili anorganskog podrijetla, konkretnije ioni metala. Većina kofaktora se ili regeneriraju ili ostaju kemijski nepromijenjeni tijekom i nakon reakcije u kojoj sudjeluju.<sup>13</sup>

### 2.1.3. Svojstva enzima

Kako je već spomenuto, uloga enzima u živom svijetu je nezamjenjiva. Industrijski enzimski procesi su vrlo održivi, stoga je uloga enzima vrlo bitna i u biotehnologiji. Velika prednost enzima je mogućnost rada izvan stanica u kojima nastaju.<sup>29</sup> Svojstva enzima uključuju stabilnost, selektivnost i aktivnost. Stabilnost govori o očuvanju aktivnosti nakon određenog vremena. Ukoliko je enzim stabilan njegova aktivnost sporo opada u vremenu. Na enzimsku stabilnost mogu znatno utjecati procesni uvjeti (temperatura, tlak, pH i slično). Bitno je reći da su enzimi stabilniji pri blagim uvjetima.<sup>30</sup> Naravno, svakom enzimu najbolje odgovaraju uvjeti s kojima se susreće organizam u kojem djeluju (20 – 50 °C).<sup>33</sup> Osim navedene temperature na svojstva enzima može utjecati i pH vrijednost. Okvirno vrijedi da enzimi preferiraju neutralni pH. Promjene pH vrijednosti mogu utjecati na strukturu enzima, njegovu stabilnost i aktivnost.<sup>34</sup> Selektivnost je svojstvo enzima da reagira samo s jednim supstratom ili jednom grupom supstrata. Za razliku od anorganskih katalizatora, kod selektivnih enzima ne nastaju neželjeni nusprodukti.<sup>31</sup> No, selektivnost ipak nije karakteristično svojstvo svih enzima. Neki enzimi pokazuju svojstvo promiskuitetnosti (svojstvo suprotno od selektivnosti). Promiskuitetni enzimi kataliziraju reakcije iz više različitih skupina. Svojstvo promiskuitetnosti nikako ne treba uzeti kao nedostatak, već kao drugu vrstu prednosti jer se u tom slučaju enzimi iz iste grupe mogu koristiti za različite procese u industriji.<sup>35,36</sup> Aktivnost je pokazatelj katalitičke moći enzima. Aktivniji enzimi će pretvoriti veću količinu supstrata u produkt u istom vremenskom periodu. Dakle, što je enzim aktivniji to ga je manje potrebno za nastanak iste količine produkta.<sup>32</sup> Važno je i to da su enzimi netoksični i biorazgradivi, što nije slučaj kod većine anorganskih katalizatora. Za industrijsku primjenu nije potrebna velika količina enzima jer su vrlo djelotvorni i pri malim koncentracijama.<sup>29</sup>

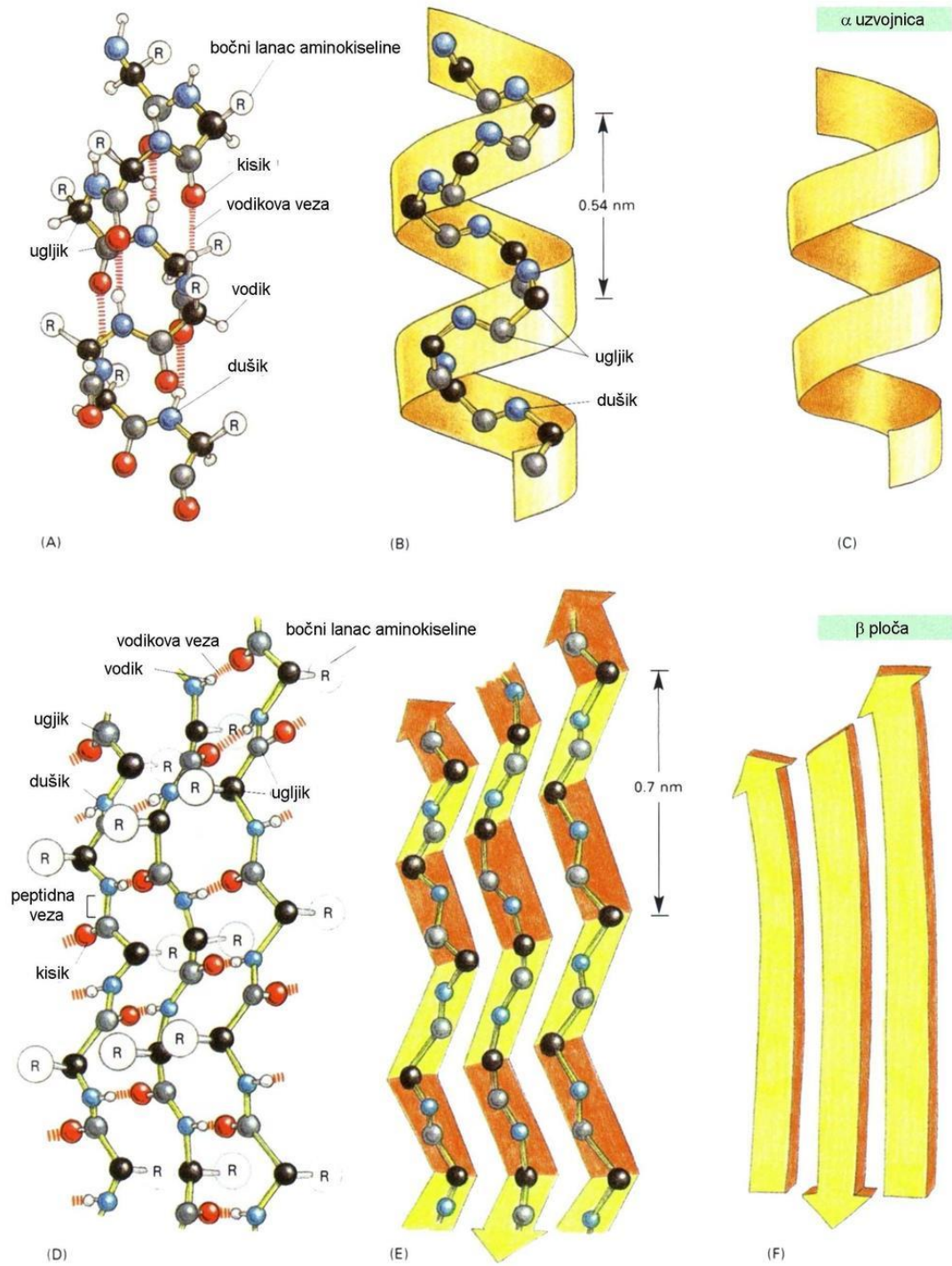
### 2.1.4. Struktura enzima

Svi enzimi su proteinske molekule, a osnovna građevna jedinica im je aminokiselina. Aminokiseline se međusobno povezuju stvarajući molekulu velike molarne mase, tzv. makromolekulu. Struktura enzima se dijeli na četiri stupnja: primarni, sekundarni, tercijarni i kvartarni.<sup>37</sup> Primarnu strukturu čine molekule aminokiselina koje se međusobno povezuju peptidnom vezom (slika 4.). Peptidna veza stvara se između karboksilne grupe jedne aminokiseline i amino grupe susjedne aminokiseline u nizu. Kada se u niz poveže više stotina aminokiselina dobiva se tzv. polipeptidni lanac.<sup>23</sup> Redoslijed vezanja aminokiselina u polipeptidnom lancu određen je sekvencom gena koji kodira taj enzim.<sup>38</sup>

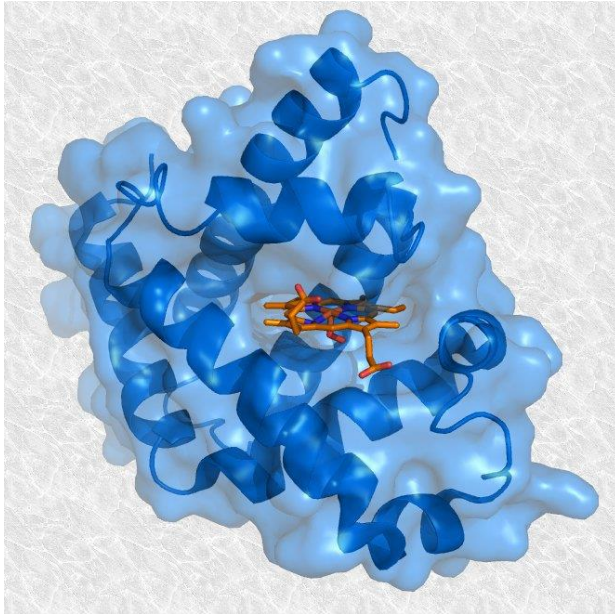


**Slika 4.** Nastajanje peptidne veze između dvije aminokiseline<sup>39</sup>

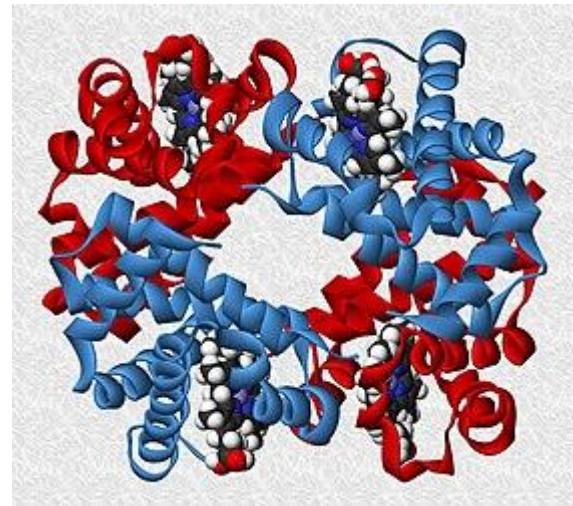
Velika molekulska masa polipeptidnih lanaca ukazuje na velik broj aminokiselina povezanih u lance (od par stotina do par tisuća).<sup>40</sup> Spomenuti polipeptidni lanac je slobodan u prostoru što rezultira fleksibilnom strukturom i težnjom stabilizaciji.<sup>23</sup> Lanci se stabiliziraju stvaranjem vodikovih veza između vodika u amino grupi i kisika u karboksilnoj grupi.<sup>42</sup> Na taj način nastaje sekundarna struktura proteina koja može biti u obliku heliksa ( $\alpha$  uzvojnice) ili ploče ( $\beta$  ploče) (slika 5.). Nakon formiranja sekundarne strukture dolazi do dodatnog savijanja, uvijanja i zbijanja  $\alpha$  ili  $\beta$  proteinske strukture čime nastaje kompaktna trodimenzionalna struktura (slika 6.) koja dodatno stabilizira makromolekulu formirajući vodikove veze, dipol-dipol veze ili Londonove veze. Moguć je nastanak i disulfidne veze (kovalentne veze) koja snažno povezuje dijelove polipeptidnog lanca.<sup>23,43</sup> Enzimi s tercijskom strukturom mogu biti aktivni katalizatori.<sup>42</sup> Kwartarna struktura (slika 7.) je najstabilnija i najkompleksnija, a nastaje kada se poveže više polipeptidnih lanaca.<sup>23</sup> To je kompletna trodimenzionalna struktura koja uključuje sva međudjelovanja između polipeptidnih lanaca.<sup>44</sup>



**Slika 5.** Nastajanje sekundarne strukture enzima (proteina) (A→B→C – heliks ili  $\alpha$  uzvojnica ; D→E→F –  $\beta$  ploča)<sup>41</sup>



**Slika 6.** Tercijarna struktura enzima (proteina)<sup>45</sup>



**Slika 7.** Kvartarna struktura enzima (proteina)<sup>46</sup>

### 2.1.5. Podjela enzima

Enzime možemo podijeliti u 6 osnovnih skupina i to prema vrsti reakcija koje kataliziraju. U 6 osnovnih grupa spadaju: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze i ligaze.<sup>47</sup> Oksidoreduktaze imaju uloge katalize reakcije oksidacije ili redukcije u metaboličkim procesima, pri čemu je jedan od supstrata najčešće koenzim. Transferaze prenose skupine (amino ili alkilne skupine) između molekula donora i molekula akceptora.<sup>48</sup> Hidrolaze (hidrolitički enzimi) kataliziraju reakcije hidrolize kemijskih veza (najčešće C-C, C-O i C-N), a liaze su enzimi koji kataliziraju kidanje kovalentnih veza (najčešće C-C, C-O i C-N) reakcijama eliminacije funkcionalnih skupina uz nastanak dvostruke veze, odn. adicije funkcionalnih skupina na dvostruku vezu.<sup>49</sup> Izomeraze kataliziraju reakcije izomerizacije u okviru jedne molekule. Kod izomeraza djeluje mnoštvo različitih enzimskih mehanizama, a povezuje ih to da su supstrat i produkt reakcije izomerni spojevi.<sup>50,51</sup> Ligaze su enzimi koji kataliziraju stvaranje kovalentne veze (C-C, C-O, C-N ili C-S). Ligaze istovremeno hidroliziraju i pirofosfatnu vezu u adenzin-trifosfatu (ATP).<sup>50</sup>

### 2.1.6. Nomenklatura enzima

Prepoznavanje enzima u literaturi je vrlo jednostavno jer je predloženo već davne 1833. godine da svi enzimi dobivaju sufiks *-aza*. Osnova naziva enzima odnosi se na prirodu supstrata kojeg enzim katalizira.<sup>52</sup> Tradicijski je ostalo da neki enzimi imaju trivijalna imena (npr. pepsin ili tripsin).<sup>53</sup> Danas se enzimi klasificiraju prema supstratima i prirodi reakcije koju kataliziraju.



Ime enzima daje neku informaciju o enzimskom sustavu, radilo se o supstratu, produktu ili o reakciji u kojoj sudjeluju. Npr. reduktaza katalizira reakciju redukcije.<sup>54</sup> Osim tivijalnih imena enzimi dobivaju nazive prema sustavu imenovanja koji je predložio IUBMB (Internacionalna unija za biokemiju i molekularnu biologiju) prema kojem se svakom enzimu daje diskriptivno ime i broj koji omogućava identifikaciju.<sup>55</sup> Npr. tripeptid-aminopeptidaza ima kod EC 3.4.11.4 čije komponente upućuju na slijedeće skupine enzima: EC (Enzyme Commission Number); EC 3 – hidrolaze; EC 3.4 – hidrolaze koje djeluju na peptidne veze; EC 3.4.11 – hidrolaze koje odnose amino-terminal aminokiseline iz polipeptida; EC 3.4.11.4 – hidrolaze koje skidaju amino-terminal tripeptida.<sup>56</sup> Šest osnovnih grupa ima slijedeće pripadajuće oznake: EC 1 – oksidoreduktaze, EC 2 – transferaze, EC 3 – hidrolaze, EC 4 – liaze, EC 5 – izomeraze, EC 6 – ligaze.<sup>57</sup>

### **2.1.7. Primjena enzima**

Kako je već spomenuto velika prednost enzima je njihova stabilnost, aktivnost i posebice selektivnost (kemoselektivnost, regioselektivnost i stereoselektivnost) što pomaže zaobilazanju kompliciranih sintetskih puteva. Zbog tih svojstava enzimi pronalaze odlične mogućnosti za primjenu u industriji za provođenje reakcija visoke učinkovitosti, ekonomičnosti kao i ekolozičnosti.<sup>58</sup> Enzime možemo podijeliti prema njihovoj primjeni u industriji. Postoje enzimi koji se primjenjuju u prehrambenoj industriji, enzimi kao industrijski biokatalizatori, enzimi za genetsko inženjerstvo, enzimi za obradu i enzimi koji se primjenjuju u kozmetičkoj industriji.<sup>47</sup> Primjena enzima u industrijske ili druge komercijalne svrhe naziva se biotehnologija. Biotehnologija pronalazi ulogu u farmaceutskoj industriji (proizvodnja lijekova), agroindustriji, kemijskoj industriji (organski produkti, sredstva za čišćenje), zaštiti okoliša, tekstilnoj industriji i drugima.<sup>59,60,62</sup> Glavni izvor enzima su mikroorganizmi koji zbog velike brzine rasta, široke dostupnosti i mogućnosti genetskih modifikacija mogu dati enzime željene kvalitete i svojstava. Tako se za potrebe industrije proizvode u velikim količinama iz uzgoja mikroorganizama. Najveći doprinos daju plijesni i kvasci te bakterije.<sup>61</sup>

## **2.2. Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH)**

Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH) su bakterijski enzimi koji se mogu pronaći u nekoliko bakterija koje koriste ugljik kao tvar neophodnu za rast, a nalaze ga u halogeniranim alkoholima ili drugim spojevima koji nastaju raspadom halohidrina.<sup>63,64</sup> HHDH spadaju u grupu liaza, a vrlo su važni enzimi koji imaju ulogu katalize reverzibilne reakcije dehalogenacije haloalkohola uz stvaranje epoksida što se može zaključiti već iz naziva enzima. Alternativni

nazivi koji se mogu susresti u literaturi kojima se imenuje HHDH jesu i haloalkohol-dehalogenaze, halogenhidrin-epoksidaze, halogenhidrin-vodik-halid-liaze.<sup>65</sup> HHDH pokazuju izuzetno svojstvo stabilnosti, velik potencijal primjene kao industrijski katalizatori te katalitičku raznolikost, a dodatna prednost leži u činjenici da se mogu jednostavno pripremiti rekombinacijom u stanicama *Escherichia coli*.<sup>64,66</sup> HHDH pokazuju i svojstvo visoke enantioselektivnosti i regioselektivnosti zbog čega su odlični kandidati za sintezu optički čistih alifatskih i aromatskih epoksida i haloalkohola.<sup>67</sup>

### **2.2.1. Struktura i katalitički reakcijski mehanizam djelovanja halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH)**

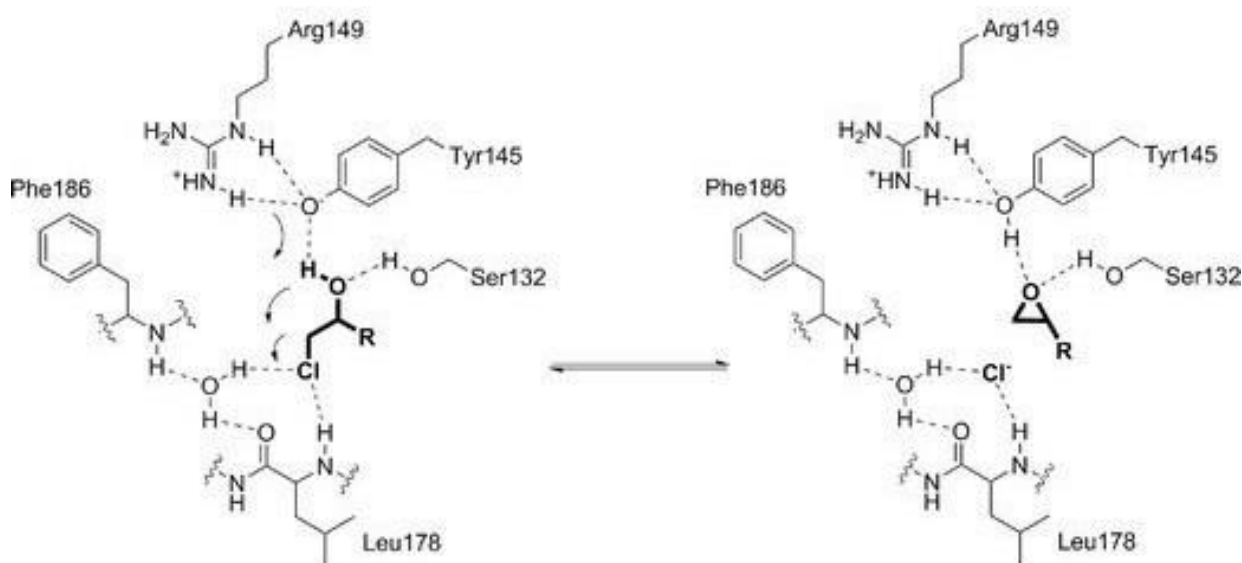
Kako je već rečeno, halogenhidrin-dehalogenaze pripadaju grupi liaza, a mogu se povezati sa superobitelji kratkolančanih enzima dehidrogenaza s kojima dijele sekvence i strukturne sličnosti. Po strukturi su homotetrameri sastavljeni od dva dimera.<sup>68</sup> Razlike u strukturi su male no ovise o tipu enzima.<sup>69</sup> Identificirane su 22 različite halogenhidrin-dehalogenaze, a podjeljene su u 7 filogenetičkih grupa. Svaka od grupa pokazuje različita katalitička svojstva (aktivnost, enantioselektivnost).<sup>70</sup> Ono što razlikuje dehidrogenaze od halogenhidrin-dehalogenaza je činjenica da halogenhidrin-dehalogenaze nisu u mogućnosti katalizirati redoks reakcije i ne mogu vezati nikotinamidni kofaktor što znači da njihova aktivnost neće ovisiti o prisutnosti kofaktora.<sup>64,71</sup> Sličnost leži u činjenici da posjeduju katalitičku triadu aminokiselina koja je zaslužna za njihovu katalitičku aktivnost. Kod halogenhidrin-dehalogenaza katalitička triada je sastavljena od serina, tirozina i arginina (Ser-Tyr-Arg), a kod dehidrogenaza od serina, tirozina i lizina (Ser-Tyr-Lys).<sup>64</sup> Aktivno mjesto na halogenhidrin-dehalogenazama se nalazi u šupljini okruženoj petljama koja sadrži katalitičku trijadu.<sup>72</sup> Na mjestima gdje se kod dehidrogenaza nalazi mjesto za vezanje kofaktora kod halogenhidrin-dehalogenaza se nalazi prostrani džep za vezanje nukleofila.<sup>64</sup>

Halogenhidrin-dehalogenaza katalizira reverzibilnu reakciju dehalogenacije vicinalnih haloalkohola prilikom čega nastaju epoksid i halid kao produkti. Halogenhidrin-dehalogenaza katalizira i reverzibilnu reakciju prilikom koje dolazi do otvaranja epoksidnog prstena u pristunosti pojedinog nukleofila.<sup>73</sup>

#### **2.2.1.1. Reakcije nastajanja epoksida djelovanjem halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH)**

Tijekom reakcije zatvaranja epoksidnog prstena dolazi do formiranja vodikove veze između serina (Syr) i hidroksilne skupine supstrata. Arginin (Arg) ima ulogu smanjenja vrijednosti ravnotežne konstante ( $pK_a$ ) tako da stabilizira parcijalni negativni naboj na kisiku

hidroksilne skupine, dok tirozin (Tyr) ima ulogu deprotoniranja hidroksilne skupine na vicinalnom haloalkoholu kako bi proizveo nukleofil koji reagira s ugljikom i zamijenjuje halogen čime nastaju produkti, epoksid i halid ion.<sup>74,75</sup> Katalitički mehanizam dehalogenacije prikazan je na slici 8. a). Spomenuto je da je reakcija nastajanja epoksida reverzibilna što je nepoželjna pojava jer to znači da konverzija vicinalnog haloalkohola u epoksid opada. Na to se može utjecati pomicanjem ravnoteže prema produktima odvođenjem produkata ili uklanjanjem nusprodukta dehalogenacije, halida, primjenom anionskih smola s hidroksilnim ionima.<sup>63,64</sup> Mehanizam djelovanja halogenhidrin-dehalogenaze (C-tip) prilikom reakcije nastajanja epoksida prikazan je na slici 8.

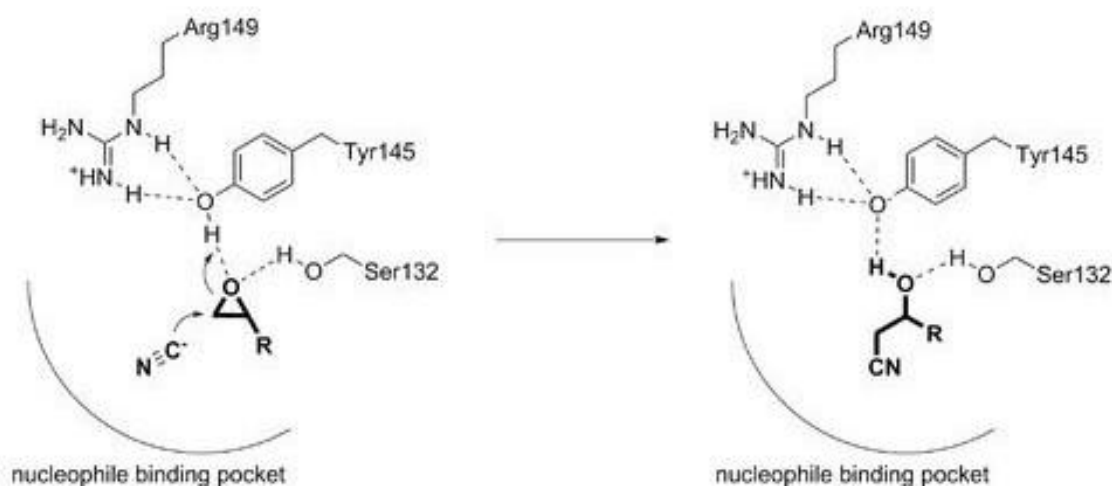


**Slika 8.** Mehanizam djelovanja halogenhidrin-dehalogenaze (C-tip) prilikom reakcije dehalogenacije<sup>76</sup>

### 2.2.1.2. Reakcije otvaranja epoksidnog prstena djelovanjem halogenhidrin-dehalogenaze (HDDH)

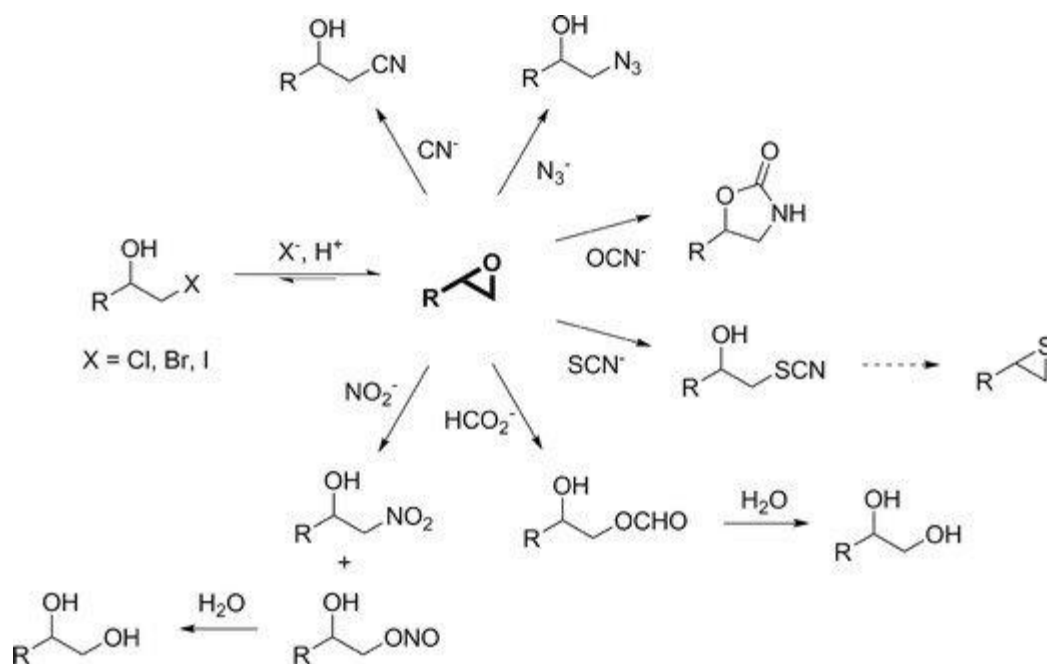
Mehanizam otvaranja epoksidnog prstena je obrnut od mehanizma zatvaranja epoksidnog prstena. Epoksidi su reaktivni spojevi te napadom nukleofila (azida, cijanida, nitrita) dolazi do otvaranja njegovog prstena. U ovoj reakciji serin (Ser) veže kisikov atom epoksida, odnosno pozicionira OH prema tirozinu, tirozin (Tyr) donira proton kisiku iz epoksidnog prstena, dok je arginin (Arg) u interakciji s tirozinom prilikom napada nukleofila na epoksidni prsten, a ima ulogu polarizacije OH grupe tirozina i ubrzava prijenos protona.<sup>67,78</sup> Nukleofilni napad uz protoniranje kisika dovodi do nastanka veze ugljik-halogenid. Anionsko vezno mjesto na halogenhidrin-dehalogenazi se dakle aktivira uz prisutnost ne samo halida već i malih anionskih nukleofila.<sup>68</sup> Kao produkt nastaje odgovarajući  $\beta$ -supstituirani alkohol. Ioni azida, cijanida, nitrita, cijanata, tiocijanata i sličnih mogu zamijeniti halidne ione u reverznoj

reakciji otvaranja epoksidnog prstena s visokom enantioselektivnosti i regioselektivnosti.<sup>77</sup> Reakcije s navedenim nukleofilima dovode do stvaranja novih C-C, C-O, C-S i C-N veza. Prisutnost vode u sustavu uglavnom je nepoželjna jer će se voda ponašati kao nukleofil i doći će do nastajanja diola.<sup>63,73</sup> Kemijski procesi za otvaranje epoksidnog prstena koji postoje imaju nisku regioselektivnost te zahtijevaju prisutnost kiseline kao katalizatora, reakcijska temperatura je visoka i takvi procesi zahtijevaju uporabu različitih organskih otapala. S druge strane, biokatalitički procesi pokazuju visoku regioselektivnost i enantioselektivnost i odvijaju se pri blagim reakcijskim uvjetima.<sup>71</sup> Zbog navedenog, halogenhidrin-dehalogenaza može pronaći široku primjenu u proizvodnji enantiomerno čistih  $\beta$ -alkohola iz epoksida.<sup>79</sup> Mehanizam djelovanja halogenhidrin-dehalogenaze (C-tip) prilikom reakcije otvaranja epoksidnog prstena prikazan je na slici 9.



**Slika 9.** Mehanizam djelovanja halogenhidrin-dehalogenaze (C-tip) prilikom reakcije otvaranja epoksidnog prstena<sup>76</sup>

Spomenuto je da kao nukleofil mogu djelovati mnogobrojne male anionske molekule. Na slici 10. prikazano je katalitičko područje djelovanja halogenhidrin-dehalogenaze.



Slika 10. Katalitičko područje djelovanja HHDH<sup>76</sup>

### 2.2.2. Podjela halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH)

Halogenhidrin-dehalogenaze se dijele na tipove s obzirom na katalitičku trijadu, odnosno aminokiselinsku sekvencu i aktivnost koju pokazuju. Donedavno su halogenhidrin-dehalogenaze klasificirane u tri tipa: A, B, i C, no kako je naglo rastao interes dodana su još četiri podtipa: D, E, F i G.<sup>65,80</sup> Primjer enzima iz grupe halogenhidrin-dehalogenaza je HheB5. Hhe označava da se radi o halogenhidri-dehalogenazi, B označava tip, a broj 5 označava da postoji više od jednog enzima unutar tipa. Konkretno, tipova HheB postoji 7. Unutar skupine podtipa svi članovi dijele većinu identiteta aminokiselinske sekvence, a sličnosti između različitih skupina podtipova su značajno manje.<sup>65</sup> Sve halogenhidrin-dehalogenaze su u prirodi pronađene u bakterijama. Najznačajniji je C-tip, odnosno HheC, porijeklom iz bakterija *Agrobacterium radiobacter* i *Rhizobium sp.* Zadnjih godina raste interes za upotrebom ovih enzima, a posebice navedenog C-tipa zbog izvanredne enantioselektivnosti i mogućnosti dobivanja optički čistih epoksida i supstituiranih haloalkohola.<sup>81,82</sup>

### 2.2.3. Primjena halogenhidrin-dehalogenaza (HHDH)

Kako je već rečeno prirodna uloga halogenhidrin-dehalogenaza je kataliza reakcije konverzije vicinalnih halohidrina u epoksidi (dehalogenacija), odnosno reakcija zatvaranja epoksidnog prstena pri čemu se otpuštaju halogeni ioni.<sup>79</sup> U metabolizmu imaju ulogu zaštite, odnosno preživljavanja od vicinalnih halohidrina koji su toksični. Konverzijom u epoksidi mikroorganizmi dobivaju izvor ugljika i energije, a iz organizma uklanjaju halogeni atom.<sup>83</sup>

Halogenhidrin-dehalogenaze su pokazale ogroman potencijal za primjenu u industrijskoj proizvodnji čime se izbjegavaju nepoželjni produkti i pojednostavljuje se inače prijeko potrebno razdvajanje produkata.<sup>84</sup> Sposobnost djelovanja u blagim uvjetima s vodom, proizvodnja iz obnovljivih materijala te netoksičnost i biorazgradivost pokazala su se kao izvrsna svojstva sa stajališta zelene industrije.<sup>85</sup> Biotehnološki procesi teže oponašanju prirodnih procesa pa se tako koriste i halogenhidrin-dehalogenaze za biorazgradnju već spomenutih halogeniranih onečišćenja u prirodnim vodama i tlu koja su tamo prisutna zbog široke upotrebe u industriji papira, polimernoj industriji te kemijskoj industriji.<sup>86</sup> Prilikom primjene halogenhidrin-dehalogenaza važna je i mogućnost provođenja mutacija radi modifikacije, odnosno poboljšavanja svojstva, posebice enantioselektivnosti. Zbog sposobnosti da proizvede optički čiste epoksidge i halohidrine halogenhidrin-dehalogenaza pronalazi sve veću primjenu u biokatalizi. Halogenhidrin-dehalogenaza je primjenjena u proizvodnji optički čistih epoksidge i *R*-enantiomera supstituiranih alkohola zbog visoke enzimatske aktivnosti i visoke *R*-enantioselektivnosti prema alifatskim i aromatskim supstratima.<sup>87</sup> Značajan halohidrin koji se proizvodi je epiklorohidrin koji se primjenjuje u farmaceutskoj industriji, proizvodnji agrokemikalija, epoksi smola, površinski aktivnih tvari i slično.<sup>88</sup> Prilikom prerade hrane u pojedinim slučajevima dolazi do nastajanja toksičnih spojeva koje je neophodno ukloniti kako bi ona bila sigurna za konzumaciju. Kao primjer mogu poslužiti monoklorirani i diklorirani propanoli te esteri masnih kiselina koji se uklanjaju primjenom halogenhidrin-dehalogenaza. Mogu se primijeniti kao čisti enzimi ili unutar cijelih stanica. Halogenhidrin-dehalogenaza se treba kombinirati s hidrolazama i lipazama za postizanje učinkovitog procesa.<sup>89,90</sup> Halogenhidrin-dehalogenaze kataliziraju i reakcije supstitucije halogenidnih iona, a kasnije je otkriveno da se mogu koristiti i za supstituciju halogenidnih supstituenata s brojnim nukleofilima (slika 10.).<sup>91</sup> Prilikom proizvodnje finih kemikalija široku upotrebu pronalaze azidni i cijanidni nukleofili. Oni su opasni za organizme jer inhibiraju metaboličke puteve te je zbog toga potrebno pratiti njihovu koncentraciju u okolišu. Halogenhidrin-dehalogenaze se mogu koristiti za njihovu identifikaciju i kvantifikaciju. Metoda je brza, jednostavna, jeftina, ekološki prihvatljiva i selektivna, a temelji se na reakciji epoksidge s nukleofilom uz halogenhidrin-dehalogenazu kao katalizator.<sup>92</sup> Reakcijom otvaranja epoksidnog prstena uz halogenhidrin-dehalogenazu kao katalizator i azid kao nukleofil mogu se proizvesti β-azidoalkoholi koji imaju važnu ulogu prekursora u farmaceutskoj industriji.<sup>93</sup> Jedna od najvažnijih primjena halogenhidrin-dehalogenaze leži u proizvodnji prekursora za sintezu Lipitora. Lipitor je najprodavaniji lijek u svijetu, a spada u grupu lijekova za snižavanje kolesterola.<sup>94</sup> Prekursor, (*S*)-4-kloro-3-hidroksibutirat, se dobiva reakcijom dehalogenacije (*S*)-

4-kloro-3-hidroksibutirata te otvaranja epoksidnog prstena s cijanidima kao nukleofilima.<sup>93,95</sup> Halogenhidrin-dehalogenaza se koristi prilikom sinteze kiralnih epoksida koji su vrijedni spojevi u farmaceutskoj i kemijskoj industriji.<sup>96,97</sup>

#### 2.2.4. C-tip halogenhidrin-dehalogenaze (HheC)

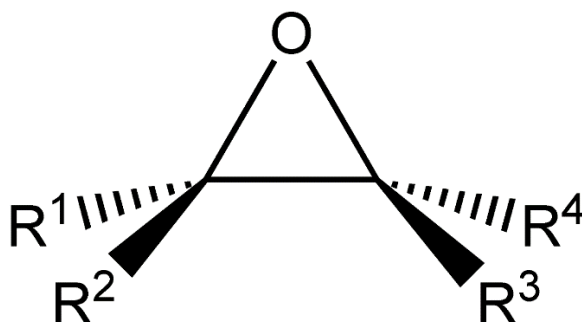
C-tip halogenhidrin-dehalogenaze (HheC) je najbolje istražena grupa halogenhidrin-dehalogenaza zbog definirane kristalne strukture i definiranog katalitičkog mehanizma, a bitno je i napomenuti da je prisutan u velikom broju organizama poput bakterija, biljaka, gljivica i slično.<sup>63,98</sup> Iz skupine halogenhidrin-dehalogenaza se pokazao kao podtip najbolje selektivnosti. Pokazuje visoku selektivnost u reakcijama otvaranja alifatskih i aromatskih epoksida uz prisutnost nukleofila poput azida, cijanida, nitrita i drugih. Najpogodniji supstrati za HheC su 2,2-disupstituirani epoksidi zbog najveće enantioselektivnosti i zbog najvećih prinosa optički obogaćenih produkata.<sup>5</sup> Reakcije katalizirane HheC su najsporije u koraku otpuštanja halogenidnog iona s aktivnog mjesta.<sup>1</sup> Katalitička svojstva halogenhidrin-dehalogenaza po grupama se znatno razlikuju. HheC enzim se ponaša kao (*R*)-selektivni enzim, a HheA i HheB se ponašaju kao (*S*)-selektivni enzimi. HheC ima značajno veći stupanj enantioselektivnosti od preostalih halogenhidrin-dehalogenaza.<sup>63</sup> Bitno je i svojstvo HheC da može podnijeti zamjenu više od 13% aminokiselinske sekvence bez gubitka strukture i aktivnosti što ga čini izvrsnim kandidatom za daljnju biokatalitičku evoluciju. Evolucija je usmjerena na povećanje temperaturnog intervala stabilnosti, povećanje reakcijskih brzina, bolju otpornost na visoke koncentracije supstrata i dobivanje produkata željenih svojstava.<sup>1,68</sup> Osim navedenog svojstva (*R*)-selektivnosti, HheC pokazuje svojstvo i  $\beta$ -regioselektivnosti pri provođenju reakcija otvaranja epoksidnog prstena u prisutnosti raznovrsnih nukleofilnih supstituenata.<sup>99</sup> Pri proizvodnji  $\beta$ -azido i  $\beta$ -cijano tercijarnih alkohola HheC je poželjan i atraktivan biokatalizator zbog činjenice da je optički čiste tercijarne alkohole jako teško proizvesti prema do sada poznatim metodama.<sup>5</sup> Na slici 11. je prikazana 3D struktura C podtipa halogenhidrin dehalogenaze (HheC).



Slika 11. 3D struktura HheC<sup>76</sup>

### 2.3. Epoksidi

Epoksidi ili oksirani su tročlani ciklički eteri. Troatomni prsten sadrži jedan atom kisika. Epoksidi spadaju u vrlo reaktivne spojeve zbog napetosti i polarnosti troatomnog prstena. Karakteristična reakcija za epokside je otvaranje prstena. Velik je broj reagensa s kojima epoksid može reagirati, a kao posljedica može nastati velik broj različitih produkata. Do otvaranja prstena dolazi u prisutnosti pojedinog reagensa koji može biti nukleofil, elektrofil, kiselina, baza, reducens ili oksidans. Reakcije se mogu provoditi u kiselim, lužnatim ili neutralnim uvjetima, ali su najbrže u kiselim uvjetima. Zbog visoke reaktivnosti i jednostavne pripreme iz brojnih polaznih kemikalija, epoksidi su izvrsni intermedijeri u organskim sintezama.<sup>100</sup> Halogenhidrin-dehalogenaze su pokazale povećanu aktivnost u prisutnosti monosupstituiranih i disupstituiranih epoksida.<sup>101</sup> Na slici 12. prikazana je općenita struktura epoksidnog prstena.



Slika 12. Općenita struktura epoksidnog prstena

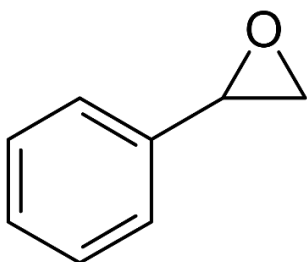
Hidrolizom u kiselim uvjetima dolazi do otvaranja epoksidnog prstena i formiranja diola. Ako se reakcija odvija u vodenom mediju voda djeluje kao nukleofil i napada protonirani epoksid sa suprotne strane od epoksidne skupine.<sup>101,102</sup> Kako je već rečeno, epoksidi su jako



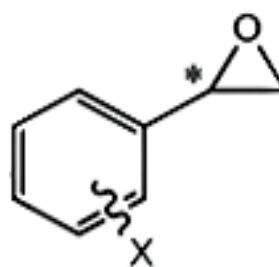
vrijedni spojevi u organskoj sintezi zbog mogućnosti transformacije epoksidnog prstena u sintetski korisne intermedijere. Važan industrijski izazov predstavlja proizvodnja takvih molekula u enantiomerno čistoj formi zbog činjenice da je često samo jedan enantiomer aktivan, a drugi često zna pokazivati svojstvo toksičnosti.<sup>103,104</sup> Za dobivanje enantiomerno čistih formi razvijene su razne metode. Najznačajnije su: asimetrična epoksidacija olefina i kinetička rezolucija epoksida. S druge strane, sve su bitnije biokatalitičke metode dobivanja epoksida poput epoksidacije uz monooksigenaze i kinetička rezolucije racemičnih epoksida uz epoksid hidrolaze. Kinetička rezolucija racemičnih epoksida se smatra jeftinom, blagom, jednostavnom i ekološki prihvatljivom metodom.<sup>104</sup>

### 2.3.1. Stiren oksid i njegovi derivati

Stiren oksid ili 2-feniloksiran je aromatski epoksid koji se dobiva iz stirena, a prikazan je na slici 13. Dobiva se epoksidacijom stirena s peroksibenzojevom kiselinom u Prilezhaevovoj reakciji.<sup>105</sup> Stiren oksid je slabo topljiv u vodi. Spada u epokside i vrlo je reaktivan spoj. Sadrži aromatsku skupinu i kiralni centar na benzilnom ugljikovom atomu.<sup>105</sup> Primjenjuje se za sintezu derivata stiren oksida koji zahtijevaju visoku enantiočistoću. Tada postaju zanimljivi biokatalitički načini proizvodnje takvih enantiočistih derivata u reakcijama kinetičke rezolucije koje su katalizirane halogenhidrin-dehalogenazama. Prilikom tih reakcija dolazi do deprotonacije i supstitucije vodikovih atoma fluorovim, bromovim, klorovim ili sličnim atomom. Primjer takve molekule prikazan je na slici 14.<sup>106,107</sup>



Slika 13. Struktura stiren oksida



Slika 14. Struktura derivata stiren oksida (X = F, Br, Cl)

### 2.4. Kotlasti reaktor

Kotlasti reaktor je zatvoreni sustav što znači da se za vrijeme reakcije s okolinom ne razmjenjuje reakcijska masa, dakle sva reakcijska smjesa se na početku unese u kotlasti reaktor,

reakcija započinje i traje određeno vrijeme i na kraju, kada je reakcija završena, reaktor se prazni. U reaktoru se ostvaruje približno idealno miješanje, što znači da su vrijednosti svih parametara približno iste u svakoj točki reaktorskog prostora. Kotlasti reaktor je uvijek u nestacionarnom radu zbog kemijske reakcije koja je vremenski proces. Toplina se može izmjenjivati s okolinom, a temperatura se može lako održavati na željenoj vrijednosti zbog dobrog miješanja koje poboljšava prijenos topline kroz reakcijski medij i kroz stijenke uređaja.<sup>110</sup> Kotlasti reaktor je često korišten u industriji, uglavnom za reakcije u kapljevitom fazi, za proizvodnju malih količina produkata pri uvjetima umjerenog tlaka i temperature. U stručnoj literaturi kotlasti se reaktor naziva i šaržni reaktor ili eng. *batch reactor*. Konstruktivno je najčešće izveden kao kotao s plaštem za grijanje ili hlađenje iznad kojeg je miješalica.<sup>108</sup> Kotlasti reaktori mogu biti različitih volumena, od manje od 1 L do više od 15000 L. Materijali od kojih su izrađeni su: nehrđajući čelik, staklo, keramika, cement, plastika i slični. Kotlasti reaktori imaju svestranu primjenu i mogu se primijeniti za mnogobrojne procese poput miješanja, kristalizacije, otapanja, polimerizacije i ekstrakcije kapljevitina-kapljevitina.<sup>109</sup> Primjenjuju se za proizvodnju lijekova, organskih bojila i drugih kemikalija. Kotlasti reaktori su nezamjenjive procesne jedinice u mnogobrojnim kemijskim industrijama zbog svoje ekonomičnosti, jednostavne izvedbe i prilagodljivosti prilikom promjene uvjeta.<sup>110</sup> Za modeliranje procesa u kotlastom reaktoru uvode se neka pojednostavljena. Pretpostavlja se da je kotlasti reaktor, kako je već rečeno, zatvoreni sustav. Slijedeće što se pretpostavlja je da je reakcijska smjesa homogena (sastav i temperatura su u svakoj točki reaktora jednake), odnosno da je miješanje idealno. Kao posljedica idealnog miješanja pretpostavlja se i izotermnost, dakle toplina dovedena u reaktor je jednaka onoj odvedenoj iz reaktora. Pretpostavlja se i to da je volumen reakcijske smjese stalan i neovisan o vremenu. Reaktorski model kotlastog reaktora se sastoji od bilance tvari i bilance topline.<sup>111</sup> U najjednostavnijem slučaju pretpostavimo da se u reaktoru odvija samo jedna reakcija. Tada je model sastavljen od jedne bilance tvari i jedne bilance topline. Promjena koncentracije, odnosno brzina reakcije se može opisati diferencijalnom jednačinom 1.

$$r_A = -\frac{dc_A}{dt} \quad (1)$$

Ovo je osnovna matematička interpretacija modela „idealnog“ kotlastog reaktora. Treba napomenuti da brzina reakcije,  $r_A$  nije stalna veličina. Ovisnost brzine reakcije o reakcijskim parametrima se naziva kinetički model. Konverzija, pojam koji se često koristi kao veličina umjesto koncentracije, je definirana jednačinom 2.

$$X_A = \frac{n_{A_0} - n_A}{n_{A_0}} = \frac{c_{A_0} - c_A}{c_{A_0}} \quad (2)$$

Bilanca topline se postavlja za cijeli reaktorski volumen, a definirana je diferencijalnom jednačbom 3.

$$G_t c_p \frac{dT}{dt} = \Delta H_r V r_A + U A_p (T - T_p) \quad (3)$$

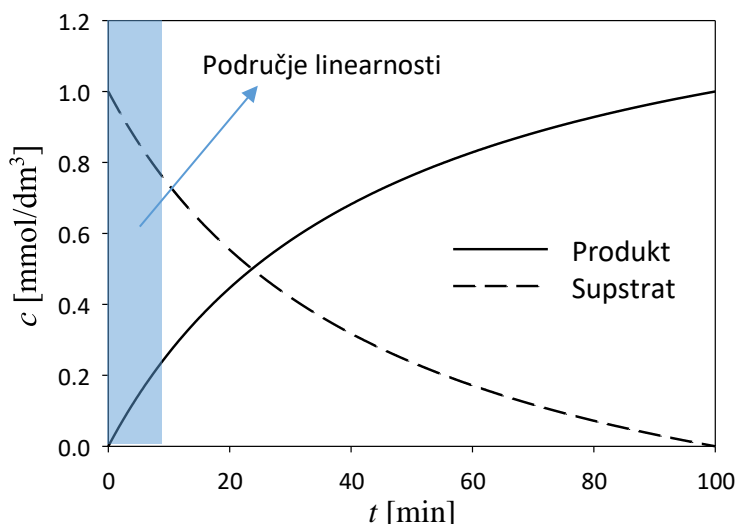
Uz prepostavku da reaktor radi izotermno, odnosno da nema vremenskih promjena temperature, član za akumulaciju topline ne postoji. Također, toplina se u kotlasti reaktor ne unosi reakcijskom smjesom, niti se njome iznosi. Zbog mogućnosti da reakcija bude egzotermna ili endotermna potrebno je toplinu odvoditi (ili dovoditi) u okolinu hlađenjem (ili grijanjem) reaktora zbog zahtjeva izoternosti. Zbog toga jednačba 3. poprima oblik naveden u jednačbi 4.

$$\Delta H_r V r_A = U A_p (T - T_p) \quad (4)$$

$U$  označava ukupni koeficijent prijenosa topline, a  $A_p$  ukupnu površinu izmjene topline.  $T - T_p$  je temperaturni gradijent koji predstavlja razliku između temperature u reaktoru i temperature medija u plaštu za hlađenje (ili grijanje) reakcijske smjese s ciljem očuvanja izoternih uvjeta.  $\Delta H_r$  označava standardnu reakcijsku entalpiju. Desni član u jednačbi 4 je izraz za prijenos topline kroz stijenku na medij u plaštu reaktora koji se idealno miješa pa je i temperatura unutar plašta uvijek ista ( $T_p$ ). Bilanca množine tvari (jednačba 1.) i bilanca topline (jednačba 4.) zajedno čine osnovni reaktorski model idealnog kotlastog reaktora.<sup>108</sup>

## 2.5. Kinetički model enzimske reakcije

Određivanje kinetike enzimske reakcije odnosi se na proučavanje brzine reakcija kataliziranih enzimima. Do kinetičkih modela dolazi se provođenjem testova kojima se određuje aktivnost enzima u ovisnosti o koncentraciji supstrata. Često se koristi metoda početnih brzina u kojoj se pomiješa poznata količina enzima i supstrata te se prati nastajanje produkta odnosno nestajanje supstrata. Brzina reakcije se mjeri pri niskoj konverziji supstrata (<10%) zbog čega se povratne reakcije i potencijalne inhibicije mogu zanemariti.<sup>111</sup> Pri niskim konverzijama promjena koncentracije supstrata ili produkta u vremenu je linearna i veća od perioda koji slijedi gdje promjena koncentracije u vremenu opada što je vidljivo na slici 15.

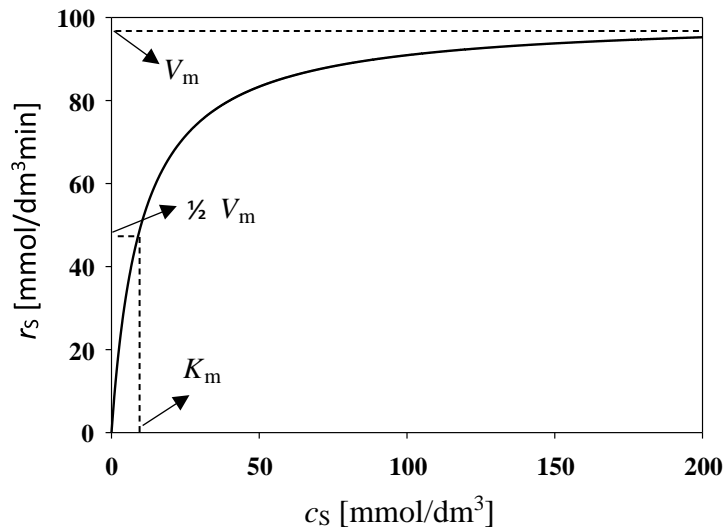


**Slika 15.** Primjer promjene koncentracije supstrata i koncentracije produkta u enzimskom sustavu

Do toga dolazi zbog činjenice da je supstrat na početku reakcije u velikom suvišku u usporedbi s aktivnim mjestima na enzimu. Također, na početku reakcije je koncentracija produkta minimalna, stoga se može zanemariti djelovanje inhibicije produktom, ukoliko ono postoji. Postoji i mogućnost denaturiranja enzima tokom reakcije. Mnogi su efekti koji mogu utjecati na brzinu enzimatske reakcije stoga se ona mjeri na početku reakcije u linearnom području pri niskim konverzijama (npr. već spomenuta metoda početnih brzina). Ta brzina se naziva početna brzina ( $r_{s,0}$ ), a određuje se grafički iz linearnog područja na grafu povlačeći tangentu na točku u trenutku  $t = 0$  ili računski prema jednadžbi 5.<sup>26,40</sup>

$$r_{s,0} = \frac{\Delta c_s}{\Delta t} \quad (5)$$

Dobivena vrijednost  $r_{s,0}$  [mmol/dm<sup>3</sup>min] je pri određenoj početnoj koncentraciji supstrata,  $c_{s,0}$  [mmol/dm<sup>3</sup>]. Provodi se niz takvih mjerenja s različitim početnim koncentracijama supstrata i dobivaju se parovi vrijednosti  $r_{s,0}$  i  $c_{s,0}$  koji se prikazuju na grafičkom prikazu. Općeniti primjer enzimatske reakcije prikazan je na slici 16. čija krivulja poprima hiperboličan oblik.<sup>40</sup>



**Slika 16.** Primjer ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata

Enzimska kinetika se opisuje Michaelis-Menteničinim modelom. U području malih početnih koncentracija supstrata već i mala promjena koncentracije rezultira velikom promjenom početne brzine reakcije, dok se u području velikih početnih koncentracija supstrata trend promjene početne brzine reakcije značajno smanjuje.<sup>112</sup> Razlog tome leži u činjenici da enzim ima određen broj aktivnih mjesta koja se zasite pri visokim početnim koncentracijama supstrata. Maksimalna brzina reakcije se označava s  $V_m$  i jedan je od parametara Michaelis-Menteničina modela. Drugi parametar je Michaelisova konstanta  $K_m$  [mmol/dm<sup>3</sup>]. Definirana je kao koncentracija supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovici maksimalne brzine reakcije ( $1/2 V_m$ ), a označava se s  $K_m$  [mmol/dm<sup>3</sup>]. Pri niskoj vrijednosti Michaelisove konstante enzimu je potrebna manja količina supstrata da on bude njime zasićen, odnosno, ako se gleda na Michaelisovu konstantu kao indikator afiniteta supstrata prema enzimu, enzim ima visoki afinitet prema supstratu. U tom slučaju se maksimalna brzina reakcije postiže pri niskim koncentracijama supstrata. Za visoke Michaelisove konstante vrijedi suprotno.<sup>73</sup> Michaelis-Menteničina jednadžba je prikazana jednadžbom 6.

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s} \quad (6)$$

Jednadžbom 7. prikazan je reakcijski mehanizam enzimski katalizirane reakcije na kojem se temelji Michaelis-Menteničina kinetika koji se bazira na nastajanju prijelaznog stanja (ES) između enzima i supstrata kinetikom za koju je karakteristična konstanta brzine reakcije  $k_1$ . Kompleks ES se može reverzibilnom reakcijom raspasti na enzim (E) i supstrat (S) što je opisano konstantom brzine reakcije  $k_2$  ili može dati produkt (P) i enzim (E) što je opisano

konstantom brzine reakcije  $k_3$ . Neovisno o tome nastaje li iz kompleksa ES supstrat ili produkt enzim iz reakcije izlazi nepromijenjen.<sup>113</sup>



Parametri modela,  $V_m$  i  $K_m$ , matematički su definirani jednadžbama 8. i 9. Maksimalna brzina reakcije ( $V_m$ ) je umnožak konstante brzine reakcije  $k_3$  i koncentracije enzima  $c_{E,0}$  (jednadžba 8.). Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) predstavlja omjer zbroja konstanti brzine reakcije  $k_1$  i  $k_3$  i konstante brzine reakcije  $k_2$  (jednadžba 9.).<sup>40</sup>

$$V_m = k_3 \cdot c_{E,0} \quad (8)$$

$$K_m = \frac{k_1 + k_3}{k_2} \quad (9)$$

Krivulja prikazana na slici 16. je hiperboličnog oblika koji je svojstven Michaelis-Menteničinoj kinetici. Početno, linearno područje, odnosno područje malih početnih koncentracija supstrata definirano je kinetikom prvog reda, dok je područje visokih koncentracija definirano kinetikom nultog reda. Između ta dva područja vrijedi Michaelis-Menteničina jednadžba.<sup>114</sup> Jednadžba 6. vrijedi za jednostupstratnu enzimatsku reakciju. Kod dvosupstratne enzimatske reakcije jednadžba 6. poprima slijedeći oblik:

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_{m,S1} + c_{S1}) \cdot (K_{m,S2} + c_{S2})} \quad (10)$$

gdje je  $c_{S1}$  koncentracija prvog supstrata,  $c_{S2}$  koncentracija drugog supstrata,  $K_{m,S1}$  Michaelisova konstanta za prvi supstrat, a  $K_{m,S2}$  Michaelisova konstanta za drugi supstrat.

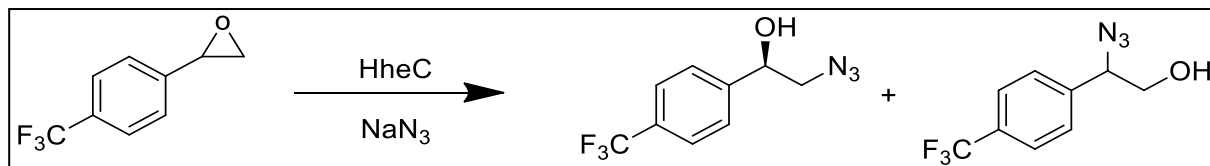
Michaelisova konstanta ( $K_m$ ) je karakteristična za svaki enzimski sustav, a njena se vrijednost mijenja s promjenom supstrata. Na taj način se može testirati afinitet različitih supstrata prema enzimu. Na promjenu Michaelisove konstante mogu utjecati i promjene pH i temperature u sustavu stoga se ti uvjeti moraju održavati stalnima pri provođenju mjerenja.<sup>40</sup>

Osnovna Michaelis-Menteničina jednadžba (jednadžba 6.), može se proširivati i na druge načine, a ne samo ako postoji više od jednog supstrata. Jedan od načina je potencijalan inhibirajući učinak na enzim. Do inhibicije enzima može doći putem supstrata ili produkta. Ako navedene inhibicije postoje, ugrađuju se u Michaelis-Menteničin model s pripadajućom

konstantom inhibicije ( $K_i$ ). Inhibitori smanjuju enzimsku aktivnost. Molekule inhibitora zauzimaju aktivno mjesto enzima na koji način mu smanjuju aktivnost.<sup>115</sup> U enzimskim reakcijama se pojavljuju kompetitivni i nekompetitivni inhibitori. U slučaju kompetitivnih inhibitora supstrat i inhibitor se oba vezuju na aktivno mjesto enzima. Inhibitori se vezuju na aktivna mjesta enzima i smanjuju broj slobodnih aktivnih mjesta. Nekompetitivni inhibitori se ne vezuju na aktivno mjesto enzima već reagiraju na obližnjem mjestu na enzimu te na taj način otežavaju vezanje supstrata na aktivno mjesto.<sup>40,116</sup>

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Cilj ovog rada je validirati model biokatalitičke sinteze (R)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola u šaržnom reaktoru. Na slici 17. prikazana je shema reakcije.



**Slika 17.** Shema reakcije otvaranja epoksidnog prstena uz prisutnost natrijevog azida (NaN<sub>3</sub>) kao nukleofila i C-tip halogenhidrin-dehalogenaze (HheC) kao enzima

Reakcija je katalizirana C-tipom halogenhidrin-dehalogenaze, HheC-W249P i provedena je u kotlastom reaktoru. Na reakcijskoj shemi su vidljiva dva produkta. Željeni produkt nastaje kao većinski produkt reakcije (na shemi lijevo), no javlja se i neželjeni kemijski nusprodukt (na shemi desno) s vrlo malim udjelima u smjesi produkata. Koncentracija preostalog, odnosno utrošenog epoksida je praćena na tekućinskom kromatogramu visoke djelotvornosti (HPLC), a aktivnost enzima tokom provođenja reakcije je praćena na spektrofotometru.

#### 3.1. Aparatura i kemikalije

##### 3.1.1. Reakcijski sustav

Reakcije su provedene u kotlastom reaktoru (KR), a u ovom slučaju kotlasti reaktor je predstavljala Eppendorf epruveta na tresilici ThermoMixerC (Eppendorf) pri 1100 okretaja u minuti. Tresilica ThermoMixerC (Eppendorf) je prikazana na slici 18.



**Slika 18.** Tresilica ThermoMixerC (Eppendorf)



### 3.1.2. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)

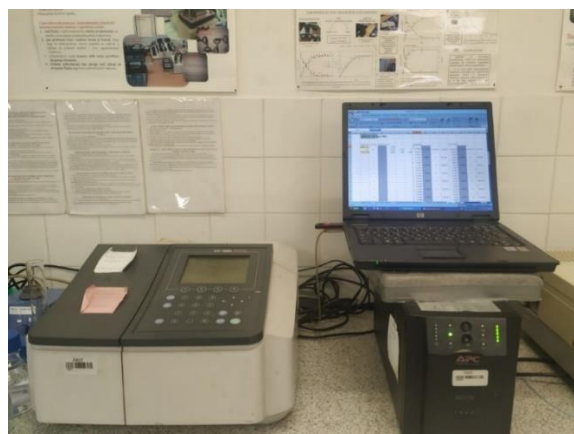
Uzorci su analizirani na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (HPLC) gdje je određena koncentracija supstrata i produkata u uzorcima. Korišten je HPLC s UV detektorom, Shimadzu (Japan) koji je prikazan je na slici 19.



Slika 19. HPLC s UV detektorom, Shimadzu (Japan)

### 3.1.3. Spektrofotometar

Aktivnost enzima se mijenja u vremenu i prati se spektrofotometrijski na UV-1800 spektrofotometru (Shimadzu, Japan) koji je prikazan na slici 20. Eksperimentalni podaci su obrađivani u programskom paketu na računalu uz programsku podršku UV Probe (Shimadzu, Japan).



Slika 20. Spektrofotometar UV-1800

### 3.1.4. Ostala aparatura

Za vaganje pojedinih uzoraka korištena je AUW120 analitička vaga (Shimadzu, Japan) prikazana na slici 21.



**Slika 21.** AUW120 vaga (Shimadzu, Japan)

Ekstrakcija uzoraka provedena je na Vortex miješalici V-1 (bioSan) prikazanoj na slici 22.



**Slika 22.** Vortex V-1 (bioSan)

Centrifugiranje uzoraka provedeno je na centrifugi Universal 320R (Hettich Zentrifugen), prikazanoj na slici 23.



**Slika 23.** Centrifuga Universal 320R (Hettich Zentrifugen)

Korišten je i digestor zbog provođenja reakcije s azidima koji je prikazan na slici 24.



**Slika 24.** Digestor

### 3.1.5. Kemikalije

U tablici 1. prikazane su sve kemikalije korištene pri provođenju eksperimenata zajedno s pripadajućim kemijskim simbolom ili pokratom i proizvođačem. HheC-W249P je izoliran na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Vrijedi napomenuti da su sve kemikalije komercijalno dostupne osim epoksida, 2-(4-trifluorometil)-fenil oksirana, koji je sintetiziran u Zavodu za organsku kemiju Instituta „Ruđer Bošković“ (IRB) u Zagrebu. Za pripremu temeljne otopine natrijevog azida ( $\text{NaN}_3$ ), koncentracije 200 mM, 0,13 g čvrstog  $\text{NaN}_3$  je otopljeno u 10 mL pufera, dok je za pripremu temeljne otopine epoksida, 2-(4-trifluorometil)-fenil oksirana, koncentracije 500 mM, 0,0115 g čvrstog epoksida je otopljeno u 0,12 mL dimetil sulfoksida (DMSO). Obije temeljne otopine su skladištene u hladnjaku pri temperaturi od +4 °C do trenutka korištenja. Sirovi enzimski ekstrakt, HheC-W249P, koncentracije 6,52 mg/mL skladišten je u zamrzivaču pri temperaturi od -20 °C do trenutka korištenja kada je odmrznut.

**Tablica 1.** Popis kemikalija korištenih pri provođenju eksperimenata s pripadajućim kemijskim simbolom ili pokratom i proizvođačem

NAZIV KEMIKALIJE	KEMIJSKI SIMBOL ILI POKRATA	PROIZVOĐAČ
2-(4-trifluorometil)-fenil oksiran	<i>rac</i> -epoksid	Sigma Aldrich Corporations, SAD
Natrijev azid	$\text{NaN}_3$	Sigma Aldrich Corporations, SAD
2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer	Tris- $\text{SO}_4$	Sigma Aldrich Corporations, SAD
Natrijev sulfat	$\text{NaSO}_4$	Kemika d.d., Hrvatska
Dimetil sulfoksid	DMSO	Sigma Aldrich Corporations, SAD
Metil <i>terc</i> -butil eter	MTBE	Sigma Aldrich Corporations, SAD
1-( <i>p</i> -nitrofenil)-2-bromoetanol	PNSHH	Sigma Aldrich Corporations, SAD
C-tip halogenhidrin-dehalogenaze	HheC-W249P	Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatska

## 3.2. Analitičke metode

### 3.2.1. Analiza uzoraka na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (HPLC)

Uzorci su analizirani na HPLC uređaju s UV detektorom metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Analize su provedene metodom gradijentnog eluiranja pri temperaturi od 30 °C. Temperatura u sustavu je održavana stalnom pomoću termostata za

kolonu. Korištena stacionarna faza je bila Kinetex Reversed Phase C18 kolona. Detaljnije informacije o stacionarnoj fazi su navedene u tablici 2. Mobilnu fazu činila je smjesa acetonitrila (CH<sub>3</sub>CN) i ultračiste vode. Jedan dio mobilne faze, odnosno prvi eluent je sadržavao 90 % acetonitrila i 10 % ultračiste vode. Drugi dio mobilne faze, odnosno drugi eluent bio je 100 % ultračista voda. Metoda je započela s udjelom od 60 % drugog eluenta (100 % ultračista voda), dok je ostatak bio prvi eluent (90 % acetonitril i 10 % ultračista voda). Nakon 15 minuta analize udio drugog eluenta (100 % ultračista voda) se smanjio na 40 %. Do petnaeste minute iz kolone su izašle sve komponente koje je bilo potrebno analizirati. Do dvadesete minute analize udio drugog eluenta (100 % ultračista voda) se vratio na početnu vrijednost od 60 % i takav je ostao do završetka metode još dvije minute. Protok mobilne faze bio je 1 mL/min. Volumen injektiranja uzorka po analizi bio je 10 µL. Pri izlasku iz kolone, uzorci su detektirani spektroskopom pri valnoj duljini od 254 nm. Ukupno trajanje metode je 22 minute. Za uzorak su određena retencijska vremena pojedinih komponenti. Retencijsko vrijeme azido alkohola, (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola (slika 17. – lijevi produkt) je 10,83 minute, kemijskog nusprodukta (slika 17. – desni produkt) je 10,35 minuta, a epoksida, 2-(4-trifluorometil)-fenil oksiran (slika 17. – supstrat) je 12,85 minuta. Kao rezultat analize na HPLC uređaju dobiva se kromatogram koji je prikazan u priložima (prilog 1.). Može se napomenuti da kao dodatni nusprodukt reakcije nastaje i pripadajući diol, no količine u kojima se pojavljuje se zanemarive stoga nije prikazan na reakcijskoj shemi.

**Tablica 2.** Karakteristike Kinetex Reversed Phase C18 kolone

Naziv	Kinetex Reversed Phase C18
Literaturni izvor	<a href="https://www.phenomenex.com/Kinetex">https://www.phenomenex.com/Kinetex</a>
Aktivna skupina stacionarne faze	C18 (ugljik)
Endcapping	tetrametilsilan
Duljina, mm	250
Unutarnji promjer, mm	4,6
Veličina čestica, µm	5
Veličina pora (Å)	100

Prije same analize uzoraka iste je bilo potrebno pripremiti. Uzorci su za analizu na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti pripremljeni tako da se 10 µL alikvota automatskom pipetom prebacilo u Eppendorf epruvetu (primjer je prikazan na slici 25.) koja je sadržavala 250 µL metil-*tert*-butil etera (MTBE). Sadržaj Eppendorf epruvete se miješao na Vortex miješalici (slika 22.) 20 sekundi radi što bolje ekstrakcije uzorka u organsko otapalo (MTBE). Uslijed miješanja dolazi do razdvajanja organskog i vodenog sloja. Gornji, organski sloj sadrži otopljeni, neizreagirani epoksid, produkt i nusprodukte reakcije, dok donji, vodeni sloj sadrži

puffer i neizreagirane azidne ione. Izdvajanje vodenog sloja je bitno prije analize jer on može oštetiti dijelove HPLC uređaja. Radi dodatnog sušenja uzorka od vodenog medija, isti se provlači kroz kapalicu u kojoj je sloj higroskopskog natrijevog sulfata ( $\text{NaSO}_4$ ). Uzorak je prije analize prebačen u vijalicu (primjer prikazan na slici 26.) koja je prikladna za analizu na HPLC uređaju. Tako priređeni uzorci su lako hlapljivi stoga su, kako bi se spriječilo hlapljenje, čuvani na ledu sve do trenutka analize.



**Slika 25.** Eppendorf epruveta – proizvođač:  
AMEX Lab



**Slika 26.** HPLC vijalica – proizvođač: AIJIREN

### 3.2.2. Izrada baždarnih dijagrama

Za izradu baždarnih dijagrama ovisnosti koncentracije epoksida ili azidoalkohola o visini pika na kromatogramu bilo je potrebno ponoviti mjerenja veći broj puta s različitim udjelima epoksida. Temeljne otopine su pripravljene prema tablici 3. na temelju kojih su analizom na HPLC uređaju dobiveni kromatogram prikazan u priložima (prilog 2.) i baždarni dijagrami prikazani u priložima (prilog 3. a) i b)). Ukupni volumen temeljne otopine je iznosio 20  $\mu\text{L}$ . Priprema temeljnih otopina je ista kao što je opisano u prethodnom poglavlju (poglavlje 3.2.1.).

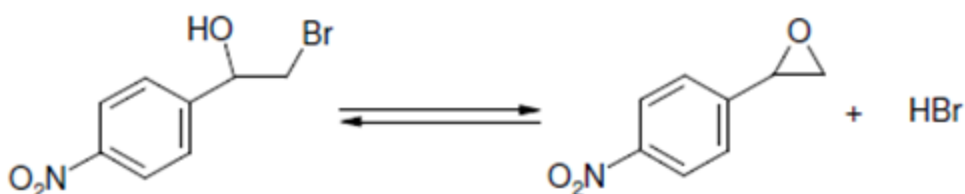
Na baždarnim su dijagramima određene točke zanemarene da bi se dobila viša vrijednost koeficijenta determinacije ( $R^2$ ). Koeficijent determinacije baždarnog dijagrama za azidoalkohol iznosi  $R^2 = 0,9996$ , dok za epoksid iznosi  $R^2 = 0,9998$ . Izrađeni baždarni dijagrami su poslužili za određivanje koncentracije neizreagirano epoksida i nastalog azidoalkohola.

**Tablica 3.** Volumeni i koncentracije epoksida i azidoalkohola dodani u temeljne otopine za analizu na HPLC uređaju i izradu baždarnih dijagrama

Broj temeljne otopine	V <sub>epoksid</sub> [μL]	V <sub>azidoalkohol</sub> [μL]	V <sub>DMSO</sub> [μL]	c <sub>epoksid</sub> [mM]	c <sub>azidoalkohol</sub> [mM]
1	0,5	0,5	19	0,5	0,63
2	1	1	18	1	1,27
3	2	2	16	2	2,53
4	2,5	2,5	15	2,5	3,16
5	5	5	10	5	6,33
6	7,5	7,5	5	7,5	9,49
7	10	10	0	10	12,66

### 3.2.3. Određivanje aktivnosti enzima spektrofotometrijskim testom s PNSHH

Za određivanje aktivnosti enzima nakon određenog vremena proveden je spektrofotometrijski test s 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanolom, odnosno PNSHH pri valnoj duljini  $\lambda = 310$  nm. Za spektrofotometrijski test je korišten UV-1800 spektrofotometar (Shimadzu, Japan) uz programsku podršku UV probe (Shimadzu, Japan). Shema reakcije je prikazana na slici 27.



**Slika 27.** Shema reakcije za spektrofotometrijski test s PNSHH

Test se provodi na spektrofotometru, a temelji se na razlici apsorbancije između halohidrina, 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanolom (PNSHH) i epoksida, *p*-nitrostiren oksida (PNSO), pri  $\lambda = 310$  nm. Prije provedbe testa pripravljena je 19 mM otopina PNSHH u dimetil sulfoksidu (DMSO). Takva otopina je stabilna pri temperaturi od +4 °C u hladnjaku. 19 mM otopina je pripravljena otapanjem 0,0234 g PNSHH u 100 %-tnom DMSO. Uzorak za analizu se priprema u kiveri od kvarcnog stakla u koju se dodaje 990 μL Tris-SO<sub>4</sub> pufera koncentracije 100 mM i pH vrijednosti 7,5 i 10 μL temeljne otopine PNSHH. Za homogenizaciju, otopina se treba promiješati na Vortex miješalici. Otopine su pripravljene prema tablici 4.

**Tablica 4.** Početni sastav reakcijskih smjesa za praćenje stabilnosti enzima

Broj eksp.	$V_R$ [ $\mu\text{L}$ ]	$c_{\text{epoksid}}$ [ $\text{mM}$ ]	$V_{\text{TO-epoksid}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$c_{\text{NaN}_3}$ [ $\text{mM}$ ]	$V_{\text{TO-NaN}_3}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$V_{\text{DMSO}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$V_{\text{enzim}}$ [ $\mu\text{L}$ ]	$\gamma_{\text{enzim}}$ [ $\text{mg/mL}$ ]	$V_{\text{pufer}}$ [ $\mu\text{L}$ ]
1	1000	5	10,00	5	25	90,0	46	0,2999	829,0
2	1000	5	10,00	5	25	90,0	31	0,2021	844,0
3	1600	10	32,00	10	80	128,0	60	0,2445	1300,0
4	1600	25	80,00	25	200	80,0	80	0,3260	1160,0
5	1600	50	160,00	50	400	0,0	100	0,4075	940,0

Početna apsorbancija otopine na spektrofotometru treba biti između 0,6 i 0,7. Potom se dodaje enzim koji je prethodno izoliran iz uzorkovane reakcijske smjese. 15  $\mu\text{L}$  uzorka iz reaktora je pomiješano sa 100  $\mu\text{L}$  Tris- $\text{SO}_4$  pufera i prebačeno u filter koji ne propušta enzim, a propušta sve ostale komponente. Uzorak je centrifugiran u centrifugi Universal 320R (Hettich Zentrifugen) (slika 23.) pri temperaturi od +4  $^\circ\text{C}$  i 14.000 okretaja u minuti na 5 minuta. Centrifugiranje je bitno za izdvajanje enzima, ali i za odbacivanje neizreagirano natrijevog azida koji je iznimno opasan i otrovan. Nakon što je enzim izoliran iz reakcijske smjese, 10  $\mu\text{L}$  enzima se dodaje u kivetu nakon čega se vrlo kratko miješa i stavlja u spektrofotometar na analizu. Ukupni dodani volumen u kiveti je 1010  $\mu\text{L}$ . Mjerenje se provodi 100 sekundi. Za svaki uzorak enzima spektrofotometrijsko mjerenje je ponovljeno tri puta da bi se za izračun volumne aktivnosti enzima uzela srednja vrijednost. Reakcijska smjesa je uzorkovana prije dodatka enzima, odnosno prije početka reakcije i 30 minuta, 1 sat, 2 sata, 3 sata, 4 sata, 5 sati, 6 sati, 24 sata i 48 sati nakon početka reakcije (nakon dodatka enzima). Nakon dodavanja enzima neophodno je biti brz zbog važnosti „hvatanja“ linearnog dijela krivulje promjene apsorbancije u vremenu. Iz linearnog dijela krivulje određen je nagib pravca  $dA/dt$ . Iz određenog nagiba pravca (promjene apsorbancije u vremenu) moguće je bilo izračunati volumnu aktivnost enzima (V.A.) prema jednadžbi 11.

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (11)$$

V.A. – volumna aktivnost enzima [ $\text{U/mL}$ ],  $V_r$  – volumen uzorka [ $\text{mL}$ ],  $\varepsilon$  - ekstinkcijski koeficijent [ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ],  $d$  – širina kivete [ $\text{cm}$ ],  $V_E$  – volumen enzima [ $\text{mL}$ ],  $\Delta A/\Delta t$  – promjena apsorbancije u vremenu [ $\text{min}^{-1}$ ].

Širina kivete  $d$  jednaka je 1 cm, a ekstinkcijski koeficijenti iznose 3,05  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  i 4,289  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . U je mjerna jedinica enzimatske aktivnosti i predstavlja promjenu količine supstrata u vremenu [ $\mu\text{mol/min}$ ]. Iz izračunate volumne aktivnosti enzima izračunava se specifična



aktivnost enzima (*S.A.*) prema jednadžbi 12. Specifična aktivnost enzima se izračunava da bi se mogle uspoređivati aktivnosti različitih enzima, a njena mjerna jedinica je U/mg.

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma} \quad (12)$$

*S.A.* – specifična aktivnost [U/mg],  $\gamma$  – masena koncentracija [mg/dm<sup>3</sup>].

### 3.3. Eksperimenti u kotlastim reaktorima

Reakcijski sustav u kotlastom reaktoru se sastojao od Eppendorf epruvete na tresilici. Reakcija se provodila pri 1100 okretaja u minuti. Iz sigurnosnih razloga, eksperimenti su vođeni u digestoru zbog prisutnosti azida. Reakcije su vođene u Tris-SO<sub>4</sub> puferu, pH vrijednosti 7,5. Provodilo se pet različitih eksperimenata čiji su početni sastavi navedeni u tablici 5.

**Tablica 5.** Početni sastav reakcijskih smjesa za pet eksperimenata

Broj eksp.	$V_R$ [μL]	$c_{\text{epoksid}}$ [mM]	$V_{\text{TO-epoksid}}$ [μL]	$c_{\text{NaN}_3}$ [mM]	$V_{\text{TO-NaN}_3}$ [μL]	$V_{\text{DMSO}}$ [μL]	$V_{\text{enzim}}$ [μL]	$\gamma_{\text{enzim}}$ [mg/mL]	$V_{\text{pufer}}$ [μL]
1	1000	5	10,00	5	25	90,0	46	0,1288	829,0
2	1000	5	10,00	5	25	90,0	31	0,0868	844,0
3	1600	10	32,00	10	80	128,0	60	0,1050	1300,0
4	1600	25	80,00	25	200	80,0	80	0,1400	1160,0
5	1600	50	160,00	50	400	0,0	100	0,1750	940,0

Otopina epoksida željene koncentracije dobivena je razrjeđivanjem temeljne otopine epoksida,  $c_{\text{TO,epoksid}} = 500$  mM u DMSO. Ukupni volumen reakcijske smjese ( $V_R$  – volumen reaktora) za prva dva eksperimenta iznosi 1000 μL, a za preostala tri iznosi 1600 μL. Otopina natrijevog azida željene koncentracije također je dobivena razrjeđivanjem temeljne otopine natrijevog azida,  $c_{\text{NaN}_3} = 200$  mM u Tris-SO<sub>4</sub> puferu. Važno je napomenuti da je epoksid korišten u prvom eksperimentu bio čisti *R*-epoksid, dok je u preostala četiri eksperimenta korištena racemična smjesa epoksida. U reakcijsku smjesu su redom dodavani zadani volumeni (tablica 4.) dimetil sulfoksida, temeljne otopine epoksida (čistog *R*-enantiomera ili racemata), Tris-SO<sub>4</sub> pufera, temeljne otopine natrijevog azida i na kraju enzima. Volumen dodanog pufera se mijenjao ovisno o dodanom volumenu ostalih komponenti, s ciljem ostvarenja željenog ukupnog volumena reakcijske smjese. Za analizu uzoraka na HPLC uređaju, (postupak opisan u poglavlju 3.2.1.) metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, reakcijska smjesa je uzorkovana prije dodatka enzima, odnosno prije početka reakcije i 30 minuta, 1 sat, 2 sata, 3 sata, 4 sata, 5 sati, 6 sati i 24 sata nakon početka reakcije (dodatka enzima). Retencijska vremena

komponenta su poznata iz analize na HPLC uređaju, a njihove koncentracije mogle su se iščitati iz prethodno priređenih baždarnih dijagrama (poglavlje 3.2.2.). Na slici 28. je prikazana aparatura korištena za provođenje reakcije u kotlastom reaktoru.



**Slika 28.** Korištena aparatura za provođenje reakcije u kotlastom reaktoru

### 3.4. Matematički model procesa

U prethodnim istraživanjima razvijen je matematički model koji je u ovom radu validiran. Matematički model procesa se sastoji od kinetičkog i reaktorskog modela. Kinetički model procesa određen je procjenom brzine reakcije metodom početnih reakcijskih brzina u kotlastom reaktoru. Iz rezultata su procijenjeni kinetički parametri za reakciju dobivanja azidoalkohola. Reaktorski model se sastoji od bilanci tvari za supstrate i produkte.

Utvrđeno je da je dvosupstratni Michaelis-Menteničin model s inhibicijom supstratom i produktom prikladan za opis provedene reakcije. Vrijednosti Michaelisovih konstanti i konstanti inhibicije za tvari u reakcijskoj smjesi su navedene u tablici 6.

**Tablica 6.** Popis vrijednosti Michaelisovih konstanti i konstanti inhibicije za tvari u reakcijskoj smjesi

Tvar	$K_m$ [mM]	$K_i$ [mM]
<i>R</i> -epoksid	2,1201	51,252
<i>S</i> -epoksid	-	2,6339
azid	1,9417	-
azidoalkohol	-	10,6982

Vrijednost parametra  $K_m^{R\text{-epoksid}}$  iznosi 2,1201 mM što ukazuje na velik afinitet enzima prema supstratu. Kao produkt reakcije nastaje azidoalkohol koji je iznimno vrijedan kao prekursor u farmaceutskoj industriji, no pokazuje inhibicijski učinak na enzim. Konstanta inhibicije  $K_i^{\text{azidoalkohol}}$  iznosi 10,6982 mM što je visoka vrijednost i znači da se pri relativno visokim koncentracijama pojavljuje inhibicija produktom. Inhibicija supstratom je prisutna za oba enantiomera epoksida, no konstanta inhibicije *R*-enantiomera  $K_i^{R\text{-epoksid}}$  iznosi 51,2520 mM, a *S*-enantiomera  $K_i^{S\text{-epoksid}}$  iznosi 2,6339 mM. *R*-enantiomer ne pokazuje svojstvo inhibicije do vrlo visokih koncentracija od preko 50 mM, dok *S*-enantiomer pokazuje inhibiciju pri relativno niskim koncentracijama od oko 2,5 mM. Vrijednost parametra  $K_m^{\text{azid}}$  iznosi 1,9417 mM što također ukazuje na velik afinitet enzima prema nukleofilu.

### 3.4.1. Kinetički model procesa

Sinteza (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola se odvijala uz prisutnost enzima HheC-W249P. Supstrati reakcije su 2-(4-trifluorometil)-fenil oksiran i natrijev azid. Reakcija je opisana dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom. Prilikom reakcije dolazi do inhibicije supstratima i produktom. Opisani kinetički model prikazan je jednadžbom 13.

$$r = \frac{V_m \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{R\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{azid}} \cdot \gamma_{\text{HHDH}}}{\left( K_m^{\text{azid}} + c_{\text{azid}} \right) \left[ K_m^{R\text{-epoksid}} \cdot \left( 1 + \frac{c_{\text{azidoalkohol}}}{K_i^{\text{azidoalkohol}}} + \frac{c_{S\text{-epoksid}}}{K_i^{S\text{-epoksid}}} \right) + c_{R\text{-epoksid}} + \frac{c_{R\text{-epoksid}}^2}{K_i^{R\text{-epoksid}}} \right]} \quad (13)$$

gdje je  $r$  – brzina reakcije,  $k_d$  – konstanta deaktivacije enzima [ $\text{min}^{-1}$ ],  $V_m$  – maksimalna brzina reakcije [ $\text{mmol}/\text{dm}^3 \text{ min}$ ],  $t$  – vrijeme [s],  $c_{R\text{-epoksid}}$  – množinska koncentracija *R*-enantiomera epoksida [mM],  $c_{\text{azid}}$  – množinska koncentracija azida [mM],  $\gamma_{\text{HHDH}}$  – masena koncentracija enzima [mg/mL],  $K_m^{\text{azid}}$  – Michaelisova konstanta za azid [ $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ],  $K_m^{R\text{-epoksid}}$  – Michaelisova konstanta za *R*-enantiomer epoksida [ $\text{mmol}/\text{dm}^3$ ],  $c_{\text{azidoalkohol}}$  – množinska koncentracija azidoalkohola [mM],  $K_i^{\text{azidoalkohol}}$  – konstanta inhibicije azidoalkohola

[mmol/dm<sup>3</sup>],  $c_{S\text{-epoksid}}$  – množinska koncentracija *S*-enantiomera epoksida [mM],  $K_i^{S\text{-epoksid}}$  – konstanta inhibicije *S*-enantiomera epoksida [mmol/dm<sup>3</sup>],  $K_i^{R\text{-epoksid}}$  – konstanta inhibicije *R*-enantiomera epoksida [mmol/dm<sup>3</sup>].

Prilikom odvijanja reakcije, u puferu koji sadrži vodu može doći do reakcije hidrolize epoksida prilikom čega dolazi do nastajanja diola. Reakcija je nepoželjna, no produkt nastaje u iznimno malim količinama. Jednadžbama 14. i 15. u kinetički je model uključena mogućnost nastajanja diola.

$$r_{\text{hidroliza}}^{R\text{-epoksid}} = k_{\text{hidroliza}} \cdot c_{R\text{-epoksid}} \quad (14)$$

$$r_{\text{hidroliza}}^{S\text{-epoksid}} = k_{\text{hidroliza}} \cdot c_{S\text{-epoksid}} \quad (15)$$

gdje je  $r_{\text{hidroliza}}^{R\text{-epoksid}}$  – brzina reakcije hidrolize *R*-enantiomera epoksida,  $r_{\text{hidroliza}}^{S\text{-epoksid}}$  – brzina reakcije hidrolize *S*-enantiomera epoksida,  $k_{\text{hidroliza}}$  – konstanta hidrolize.

### 3.4.2. Reaktorski model procesa

Reaktorski model za kotlasti reaktor (KR) sastoji se od bilanci tvari supstrata i produkata koji sudjeluju u reakciji. Balance tvari navedene su u jednadžbama 16. – 20.

$$\frac{dc_{R\text{-epoksid}}}{dt} = -r - r_{\text{hidroliza}}^{R\text{-epoksid}} \quad (16)$$

$$\frac{dc_{S\text{-epoksid}}}{dt} = -r_{\text{hidroliza}}^{S\text{-epoksid}} \quad (17)$$

$$c_{\text{epoksid}} = c_{R\text{-epoksid}} + c_{S\text{-epoksid}} \quad (18)$$

$$\frac{dc_{\text{azid}}}{dt} = -r \quad (19)$$

$$\frac{dc_{\text{azidoalkohol}}}{dt} = r \quad (20)$$

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je validirati matematički model biokatalitičke sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola u šaržnom reaktoru. Validacija je postupak u kojem se provode eksperimenti izvan uvjeta koji su korišteni za razvoj samog modela kako bi se vidjelo u kojim je uvjetima model valjan. Za validaciju je proveden niz eksperimenata pri različitim početnim uvjetima koncentracije biokatalizatora i supstrata prilikom čega se prati promjena koncentracije u vremenu. Eksperimenti su provedeni u kotlastom reaktoru (KR). Dobiveni eksperimentalni rezultati uspoređuju se s rezultatima simulacije u istim uvjetima. Ukoliko se eksperimentalni rezultati i rezultati procijenjeni modelom podudaraju uz prihvatljivo odstupanje, odnosno pogrešku, model je validiran. Ukoliko je odstupanje preveliko potrebno je ponovo promotriti razvijeni model te ga adaptirati.<sup>117</sup> Nakon uspješne validacije model se može upotrebljavati za pronalazak koncentracija biokatalizatora i supstrata u različitim reaktorima čime će se ispuniti zahtjevi koje za proizvodni proces postavlja industrija.<sup>118</sup>

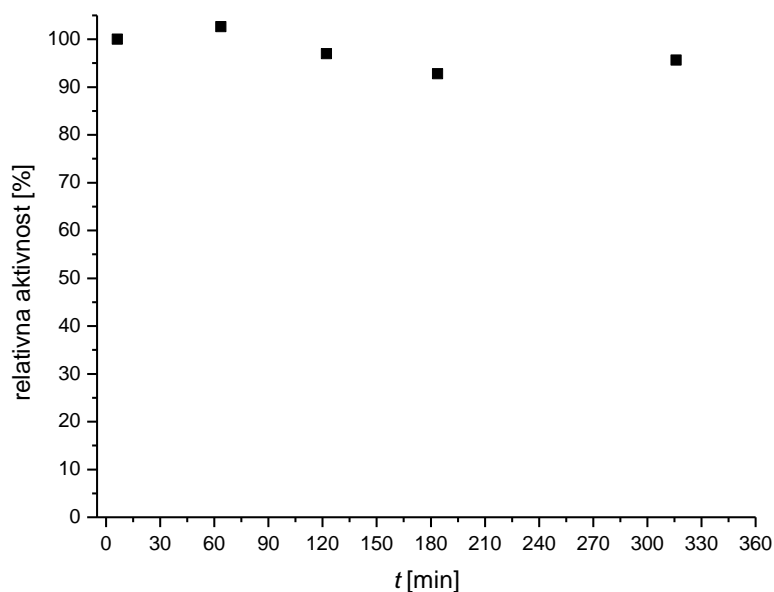
Analizom otopina supstrata i produkta različitih poznatih početnih koncentracija dobiveni su baždarni dijagrami ovisnosti površine ispod krivulje o koncentraciji supstrata ili produkta. Mjerenja su provedena na kapljevinskom kromatografu visoke djelotvornosti (HPLC). Spektrofotometrijskom metodom praćen je pad aktivnosti enzima u vremenu. Prilikom provedbe mjerenja u kotlastom reaktoru uzorci su analizirani na HPLC uređaju, a koncentracije supstrata i produkta su određene iz izrađenih baždarnih dijagrama pomoću dobivene površine ispod krivulje.

### 4.1. Ispitivanje stabilnosti HheC-W249P pri provođenju reakcija

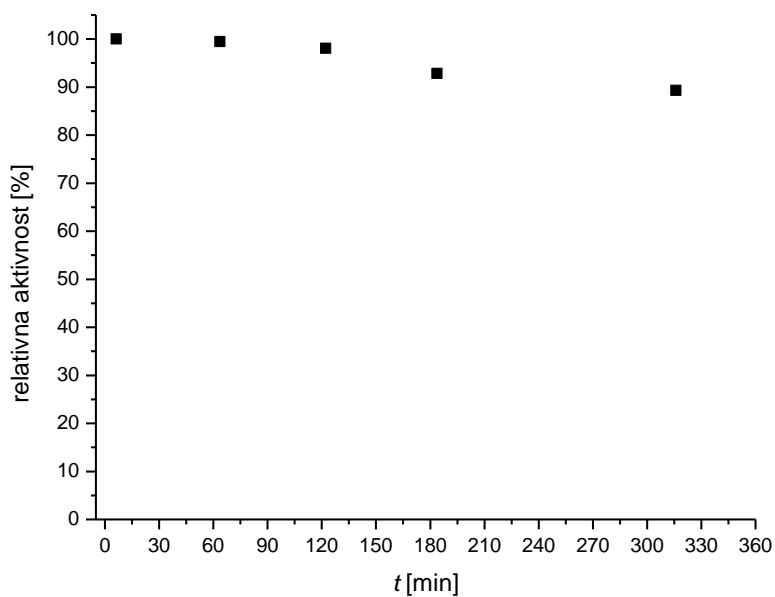
Praćenjem aktivnosti HheC-W249P u vremenu kroz pet različitih reaktora na spektrofotometru su dobivene specifične aktivnosti postupkom opisanom u poglavlju 3.2.3. Radi mogućnosti uspoređivanja vrijednosti specifičnih aktivnosti one su preračunate u relativne aktivnosti koje su izražene postotkom (%). Na slikama 29. a) – e) su prikazane relativne aktivnosti enzima u pet reaktora s različitim početnim uvjetima u reaktoru. Na slici 30. prikazani su grupirani rezultati relativne aktivnosti u pet reaktora. Pravac predstavlja modelom (prilog 5.) opisane eksperimentalne podatke prema jednadžbi 21. U svakom od reaktora vidljiv je sličan trend laganog pada aktivnosti enzima u vremenu neovisno o početnim koncentracijama tvari u reaktoru (tablica 4.) iz čega se može zaključiti da početni uvjeti u reaktoru, koji se mijenjaju kroz pet reaktora, ne utječu na pad aktivnosti enzima. Na temelju eksperimentalnih podataka

prikazanih na slici 30. proračunom u programskom paketu SCIENTIST određena je konstanta deaktivacije enzima koja iznosi  $k_d = 0,0001568 \text{ min}^{-1}$ . Konstanta deaktivacije enzima je procijenjena prema jednadžbi 21. Ispis koda izrađenog u programskom paketu SCIENTIST nalazi se u prilogima (prilog 5.).

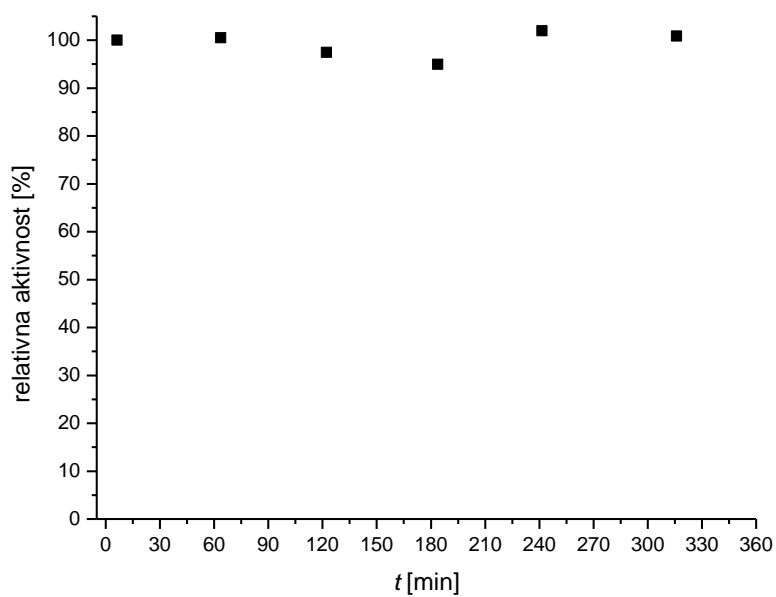
$$\frac{dA}{dt} = -k_d \cdot A \quad (21)$$



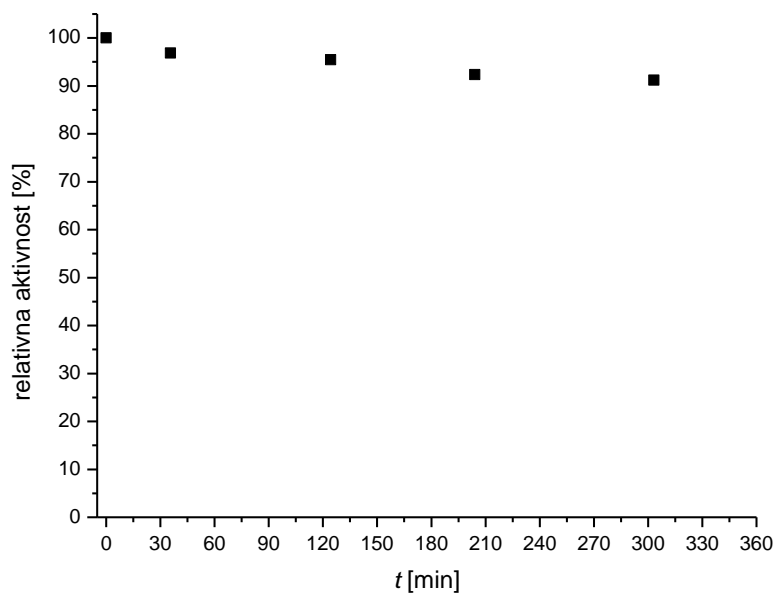
**Slika 29. a)** Relativne aktivnosti enzima u reaktoru 1 u kojem je korišten čisti *R*-enantiomer epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) i početnoj koncentraciji enzima,  $\gamma_{enzim} = 0,2999 \text{ mg/mL}$ , nukleofila,  $c_{azid} = 5 \text{ mM}$  i epoksida,  $c_{epoksid} = 5 \text{ mM}$



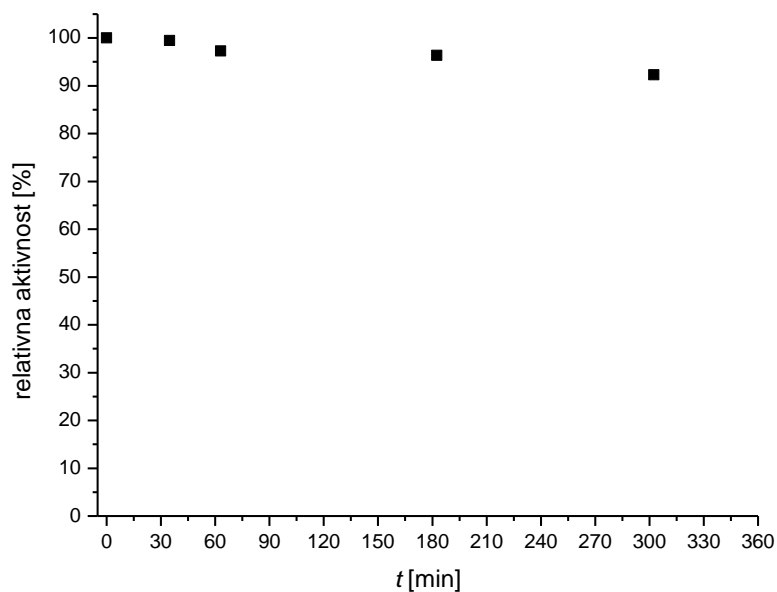
**Slika 29. b)** Relativne aktivnosti enzima u reaktoru 2 u kojem je korišten racemat epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) i početnoj koncentraciji enzima,  $\gamma_{enzim} = 0,2021$  mg/mL, nukleofila,  $c_{azid} = 5$  mM i epoksida,  $c_{epoksid} = 5$  mM



**Slika 29. c)** Relativne aktivnosti enzima u reaktoru 3 u kojem je korišten racemat epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) i početnoj koncentraciji enzima,  $\gamma_{enzim} = 0,2445$  mg/mL, nukleofila,  $c_{azid} = 10$  mM i epoksida,  $c_{epoksid} = 10$  mM

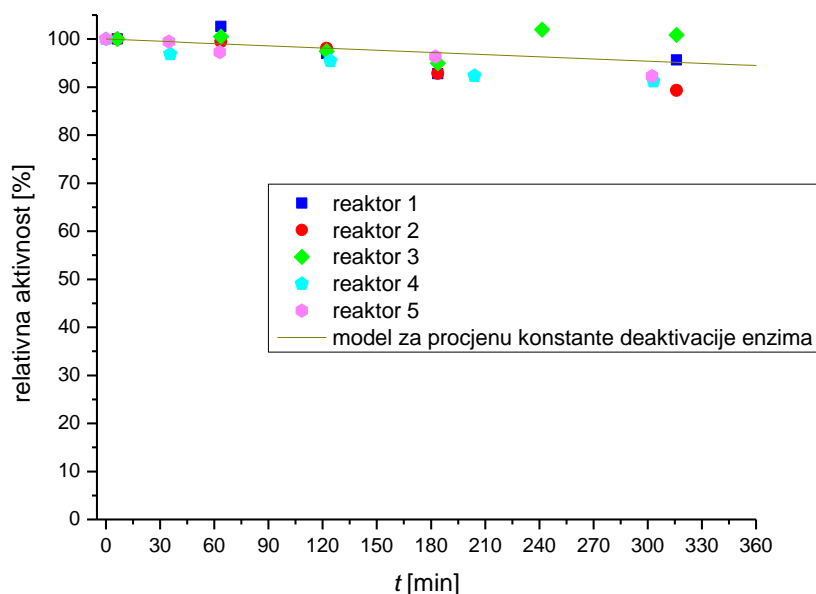


**Slika 29. d)** Relativne aktivnosti enzima u reaktoru 4 u kojem je korišten racemat epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) i početnoj koncentraciji enzima,  $\gamma_{enzim} = 0,3260$  mg/mL, nukleofila,  $c_{azid} = 25$  mM i epoksida,  $c_{epoksid} = 25$  mM



**Slika 29. e)** Relativne aktivnosti enzima u reaktoru 5 u kojem je korišten racemat epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) i početnoj koncentraciji enzima,  $\gamma_{enzim} = 0,4075$  mg/mL, nukleofila,  $c_{azid} = 50$  mM i epoksida,  $c_{epoksid} = 50$  mM



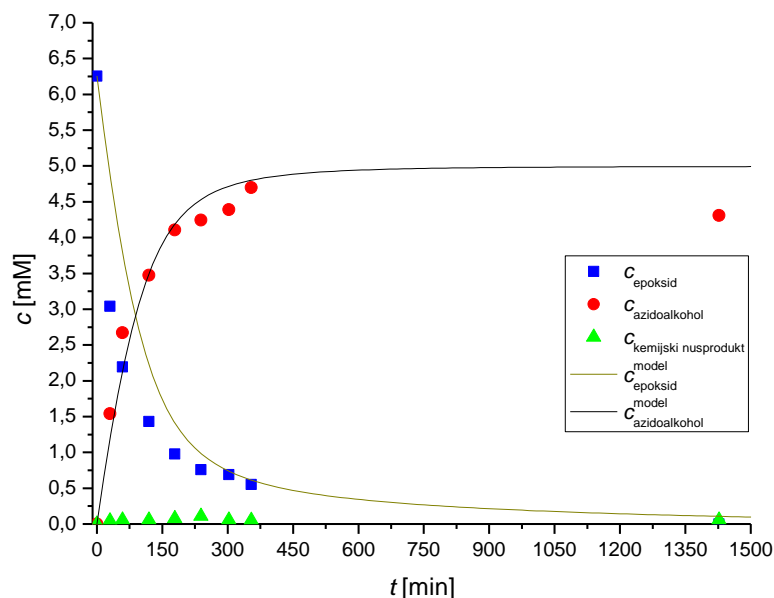


**Slika 30.** Usporedni prikaz relativnih aktivnosti enzima u svih pet reaktora uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) ; u reaktoru 1 je korišten isključivo *R*-enantiomer epoksida, dok je ostalima korišten racemat uz početne koncentracije enzima,  $\gamma_{enzim}^1 = 0,2999$  mg/mL,  $\gamma_{enzim}^2 = 0,2021$  mg/mL,  $\gamma_{enzim}^3 = 0,2445$  mg/mL,  $\gamma_{enzim}^4 = 0,3260$  mg/mL i  $\gamma_{enzim}^5 = 0,4075$  i ekvimolarne koncentracije nukleofila i epoksida,  $c_{azid}^1 = c_{epoksid}^1 = 5$  mM,  $c_{azid}^2 = c_{epoksid}^2 = 5$  mM,  $c_{azid}^3 = c_{epoksid}^3 = 10$  mM,  $c_{azid}^4 = c_{epoksid}^4 = 25$  mM,  $c_{azid}^5 = c_{epoksid}^5 = 50$  mM

#### 4.2. Biokatalitička sinteza (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola u kotlastom reaktoru

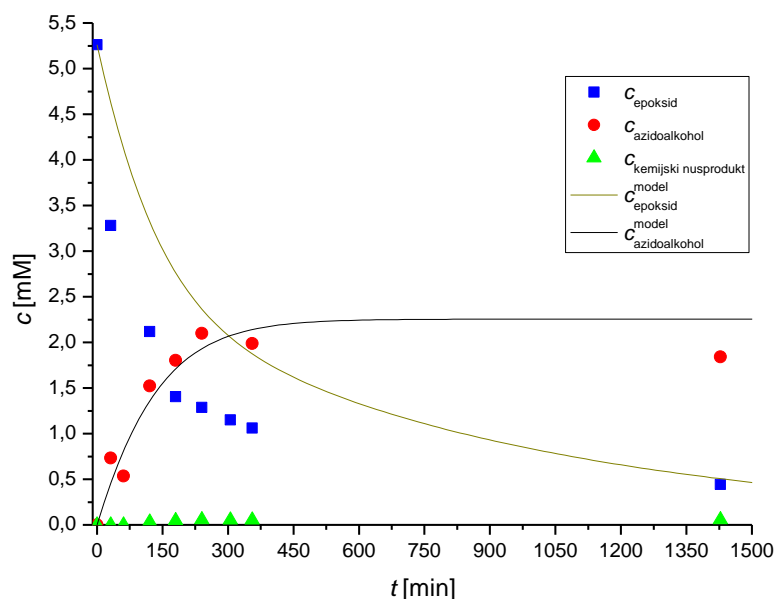
Eksperiment je proveden u pet različitih kotlastih reaktora s različitim početnim udjelima komponenata reakcijske smjese (tablica 4.). Reakcija se u svakom od reaktora vodila 24 sata, a uzorci su analizirani u istim vremenskim periodima nakon početka odvijanja reakcije. Na slici 31. prikazani su eksperimentalni rezultati biosinteze azidoalkohola u kotlastom reaktoru 1. Vidljivo je da matematički model dobro opisuje eksperimentalne podatke za uvjete u reaktoru 1. Koncentracija produkta se povećava s trajanjem reakcije, a model je izvrsno opisao koncentracije produkta u vremenu od 24 sata. Mjerenje nakon 24 sata upućuje na eksperimentalnu pogrešku jer se koncentracija azidoalkohola nakon duljeg provođenja reakcije ne smanjuje. Koncentracija supstrata se, očekivano, smanjuje u vremenu, no matematički model ne opisuje eksperimentale podatke za supstrat najbolje. Razlog tome leži u činjenici da se prilikom reakcije velika količina supstrata veže na enzimsko aktivno mjesto i tamo se zadržava dulji vremenski period stoga se analizom na HPLC uređaju u rezultatima pojavljuju niže koncentracije supstrata nego što to uistinu jest slučaj. Zbog toga je kao mjerodavan faktor za validaciju matematičkog modela uzet opis koncentracija nastalog produkta. Na slici 31.

prikazan je i kemijski nusprodukt čije su koncentracije na vrlo niskim vrijednostima tijekom cijelog perioda provođenja reakcije. Konverzija epoksida u kotlastom reaktoru 1 iznosi  $X_{\text{epoksid}} = 100\%$  što je idealan rezultat eksperimenta.



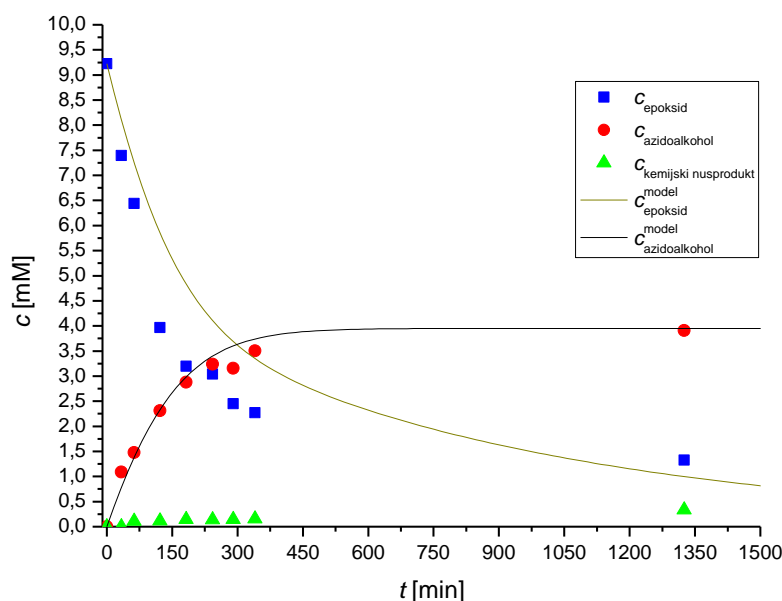
**Slika 31.** Enzimaska reakcija sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola katalizirana HheC-W249P te provedena u kotlastom reaktoru 1 u kojem je korišten čisti *R*-enantiomer epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) s ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila,  $c_{\text{azid}} = c_{\text{epoksid}} = 5 \text{ mM}$  i početnom koncentracijom enzima  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1288 \text{ mg/mL}$

Na slici 32. prikazani su eksperimentalni rezultati za biosintezu u kotlastom reaktoru 2. Matematički model nešto lošije opisuje eksperimentalne podatke, no i dalje relativno dobro. U reaktoru 2 vidljiv je isti trend naglijeg pada koncentracije supstrata nego što je to opisano matematičkim modelom iz istog razloga kao prethodno navedenog. Koncentracije produkta su dobro opisane. Konverzija epoksida u kotlastom reaktoru 2 iznosi  $X_{\text{epoksid}} = 91,64\%$ .



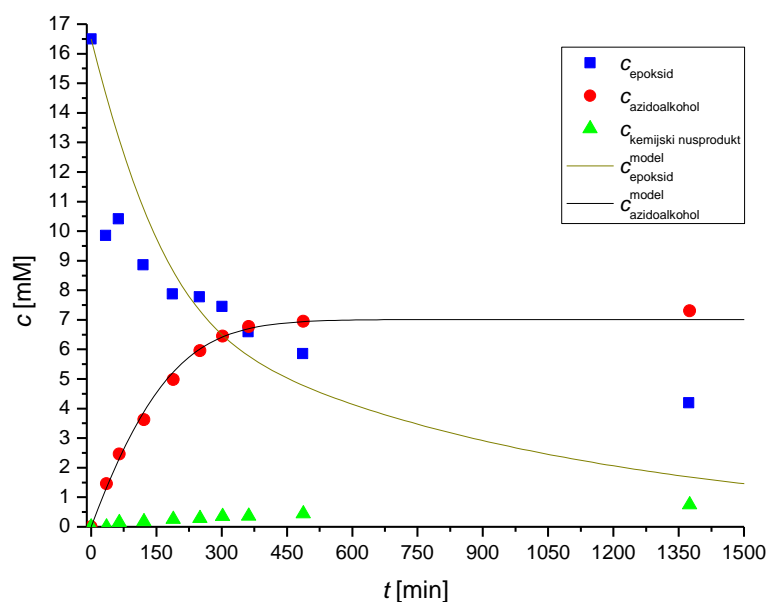
**Slika 32.** Enzimaska reakcija sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola katalizirana HheC-W249P te provedena u kotlastom reaktoru 2 u kojem je korišten racemat epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) s ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila,  $c_{\text{azid}} = c_{\text{epoksid}} = 5 \text{ mM}$  i početnom koncentracijom enzima  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,0868 \text{ mg/mL}$

Na slici 33. vidljivi su eksperimentalni rezultati za biosintezu u reaktoru 3. Matematički model izvrsno opisuje eksperimentalne podatke. U reaktoru 3 vidljiv je isti trend naglijed pada koncentracije supstrata nego što je opisano matematičkim modelom kao i u prethodna 2 reaktora. Koncentracije produkta su izvrsno opisane bez odstupanja i nakon 24 sata od početka reakcije. Vidljive su nešto više koncentracije kemijskog nusprodukta nakon 24 sata, no i dalje je riječ o vrlo niskim koncentracijama. Konverzija epoksida u kotlastom reaktoru 3 iznosi  $X_{\text{epoksid}} = 85,59 \%$ .



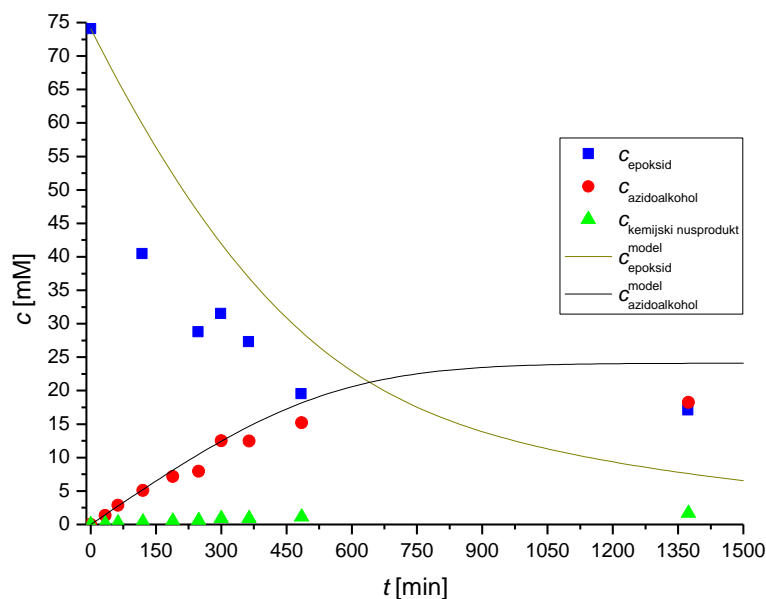
**Slika 33.** Enzimaska reakcija sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola katalizirana HheC-W249P te provedena u kotlastom reaktoru 3 u kojem je korišten racemat epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) s ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila,  $c_{azid} = c_{epoksid} = 10 \text{ mM}$  i početnom koncentracijom enzima  $\gamma_{enzim} = 0,1050 \text{ mg/mL}$

Na slici 34. vidljivi su eksperimentalni rezultati za biosintezu u reaktoru 4. Matematički model ponovo izvrsno opisuje eksperimentalne podatke. Trend naglijeg pada koncentracije supstrata vidljiv je u prvih 3 sata od početka provođenja reakcije. Potom se matematički model i eksperimentalni podaci približavaju vrijednostima. Koncentracije produkta su gotovo idealno opisane matematičkim modelom u reaktoru 4 s minimalnim odstupanjima nakon 24 sata. Očekivano je da koncentracija kemijskog nusprodukta raste s porastom koncentracije azidoalkohola što je vidljivo na slici 34. Konverzija epoksida u kotlastom reaktoru 4 iznosi  $X_{epoksid} = 74,61 \%$ .



**Slika 34.** Enzimaska reakcija sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola katalizirana HheC-W249P te provedena u kotlastom reaktoru 4 u kojem je korišten racemat epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> puffer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) s ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila,  $c_{\text{azid}} = c_{\text{epoksid}} = 25 \text{ mM}$  i početnom koncentracijom enzima  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1400 \text{ mg/mL}$

Na slici 35. vidljivi su eksperimentalni rezultati za biosintezu u reaktoru 5. Matematički model dobro opisuje eksperimentalne podatke, nešto lošije nego u prethodna dva reaktora. U reaktoru 5 ponovo je vidljiv trend naglijed pada koncentracije supstrata nego što je opisano matematičkim modelom. Koncentracije produkta su dobro opisane s malim odstupanjima zbog eksperimentalnih pogrešaka. U malim koncentracijama je prisutan kemijski nusprodukt. Konverzija epoksida u kotlastom reaktoru 5 iznosi  $X_{\text{epoksid}} = 76,90 \%$ .



**Slika 35.** Enzimaska reakcija sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola katalizirana HheC-W249P te provedena u kotlastom reaktoru 5 u kojem je korišten racemat epoksida uz Tris-SO<sub>4</sub> pufer (pH = 7,5) pri sobnoj temperaturi (cca. 25 °C) s ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila,  $c_{\text{azid}} = c_{\text{epoksid}} = 50 \text{ mM}$  i početnom koncentracijom enzima  $\gamma_{\text{enzim}} = 0,1750 \text{ mg/mL}$

U svih 5 reaktora vidljivo je da je došlo do reakcije otvaranja epoksidnog prstena i nastanka produkta (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola. Koncentracija 2-(4-trifluorometil)-fenil oksirana se smanjuje s vremenom provođenja reakcije. Najveći pad koncentracije epoksida je odmah na početku reakcije. Produkt također počinje nastajati odmah nakon pokretanja reakcije. Njegova koncentracija raste s vremenom, a maksimalnu vrijednost postiže oko šestog sata od početka provođenja reakcije. Koncentracija nastalog produkta na kraju mjerenja (nakon 24 sata) ne razlikuje se od koncentracije nastale nakon 6 sati. Iz toga se može zaključiti da većinu produkta možemo dobiti u trajanju reakcije od 6 sati te da reakciju nije potrebno provoditi dulje vremena. Konverzije epoksida po reaktorima iznose  $X_1^{\text{epoksid}} = 100 \%$ ,  $X_2^{\text{epoksid}} = 91,64 \%$ ,  $X_3^{\text{epoksid}} = 85,59 \%$ ,  $X_4^{\text{epoksid}} = 74,61 \%$ ,  $X_5^{\text{epoksid}} = 76,90 \%$ . U reaktoru 1 je postignuta 100 %-tna konverzija epoksida što je zavidan rezultat. Najbolji uvjeti za provedbu reakcije su oni u reaktoru 1. U reaktoru 1 utrošeno je 6,26 mM epoksida da bi se dobilo 4,31 mM azidoalkohola. U ostalim reaktorima konverzije supstrata nemaju niske vrijednosti, no iskorištenje reakcije je značajno niže od iskorištenja u reaktoru 1. Vrijednosti početnih koncentracija supstrata, dobivenih koncentracija produkta (željenog i neželjenog) kao i pripadajuće konverzije, iskorištenja i selektivnosti prikazani su u tablici 7. Konverzija (*X*), iskorištenje (*I*) i selektivnost (*S*) su određeni prema jednadžbama 22. – 24.

$$X = \frac{c_{\text{epoksid početno}} - c_{\text{epoksid konačno}}}{c_{\text{epoksid početno}}} \quad (22)$$

$$S = \frac{c_{\text{azidoalkohol konačno}}}{c_{\text{kemijski nusprodukt konačno}}} \quad (23)$$

$$I = \frac{c_{\text{stvarno nastalo konačno}}}{c_{\text{teorijski nastalo konačno}}} \quad (24)$$

**Tablica 7.** Početne koncentracije supstrata, dobivene koncentracije produkta (željenog i neželjenog) kao i pripadajuće konverzije, iskorištenja i selektivnosti za eksperimente u reaktorima 1 – 5

Broj eksperimenta	$c_{\text{epoksid}}$ [mM]	$c_{\text{azidoalkohol}}$ [mM]	$c_{\text{kemijski nusprodukt}}$ [mM]	$X$ [%]	$S$ [-]	$I$ [%]
1	6,26	4,70	0,06	100,00	78,33	75,08
2	5,26	2,10	0,06	91,64	35,00	39,92
3	9,23	3,91	0,34	85,59	11,50	42,36
4	16,50	7,30	0,75	74,61	9,73	44,24
5	74,10	20,21	2,73	76,90	7,40	27,27

Iz rezultata u tablici 5. se vidi da s većom početnom koncentracijom epoksida nastaje više azidoalkohola kao i kemijskog nusprodukta. S povećanjem koncentracije epoksida smanjuje se konverzija i opada selektivnost enzima. To ima smisla jer je u reakciji prisutna inhibicija supstratom i produktom. Iskorištenje također opada s povećanjem koncentracije supstrata. Trend za svaku fizikalnu veličinu postoji, no postoje i povremene iznimke. Naime, treba uzeti u obzir da nisu u svakom od reaktora isti početni uvjeti. Osim početnih koncentracija supstrata, različite su i koncentracije dodanog enzima. U prvom reaktoru imamo isključivo *R*-enantiomer epoksida što je uzrok visoke vrijednosti konverzije. Mogući je zaključak da se iz *R*-enantiomera lakše sintetizira željeni azidoalkohol. *S*-enantiomer je nepoželjan jer se inhibicija enzima *S*-enantiomerom epoksida pojavljuje pri relativno niskim koncentracijama, stoga je količina nastalog azidoalkohola značajno manja. Osim toga, *S*-enantiomer epoksida neće postati željeni produkt, već ulazi u reakciju nastajanja diola. Konverzija u drugom reaktoru neznajno opada, no treba zamijetiti da je koncentracija dodanog enzima manja nego u prvom reaktoru, stoga je moguće da je konverzija manja zbog manjka enzima. Konverzija je u reaktoru 5 malo viša od konverzije u reaktoru 4 što možemo pripisati činjenici da je koncentracija dodanog enzima u reaktor 5 veća od koncentracije enzima dodane u reaktor 4. Selektivnost ima padajući trend kroz reaktore što bi značilo da s obzirom na nastalu količinu željenog azidoalkohola nastaje sve više neželjenog kemijskog nusprodukta. Iskorištenje ima padajući trend, ali pojavljuju se iznimke iz reaktora 2 u reaktor 3. Konverzija je manja što upućuje na manje izreagirano

supstrata, no izreagirani supstrat je u većem udjelu postao željeni kemijski produkt. Isto vrijedi i za reaktore 3 i 4. To se pripisuje činjenici da je dodana veća koncentracija enzima. Kao najbolji slučaj od provedenih eksperimenata se pokazao eksperiment broj 1 s najvećom konverzijom, selektivnošću i iskorištenjem. Matematički model se pokazao kao vrlo uspješan za opisivanje reakcije sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola iz 2-(4-trifluorometil)-fenil oksirana uz natrijev azid kao nukleofil i enzim HheC-W249P.



## 5. ZAKLJČAK

Cilj ovog rada bio je validirati matematički model za reakciju sinteze (*R*)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanola u prisutnosti enzima HheC-W249P. Matematički model je validiran provođenjem 5 eksperimenata u 5 kotlastih reaktora. Tijekom trajanja reakcije pratila se operacijska stabilnost enzima u različitim uvjetima. Enzim se pokazao kao vrlo stabilan s niskom konstantom deaktivacije neovisno o početnim uvjetima u reaktoru.

Od 5 kotlastih reaktora najbolji uvjeti su u kotlastom reaktoru 1 u kojem je konverzija čistog *R*-enantiomera epoksida 100 %. Iskorištenje je najveće i selektivnost enzima je najbolja. U ostalim je reaktorima prisutan *S*-enantiomer koji ne daje željeni produkt nego može reagirati s vodom i dati diol, a dodatno, pri nižim koncentracijama inhibira enzim. Dakle, idealni uvjeti za provođenje reakcije bili bi s čistim *R*-enantiomerom pri početnim koncentracijama manjim od otprilike 50 mM. Reakcije u kotlastim reaktorima su prihvatljive, no ukoliko želimo izbjeći pojavu inhibicije enzima produktom reakciju bi trebalo provoditi uz odvođenje produkta prije postizanja koncentracija od 10 mM.

Matematički model se sastoji od kinetičkog modela i reaktorskog modela. Polazni matematički model validiran je u kotlastim reaktorima te se pokazao kao vrlo uspješan za opis procesa. Konstanta deaktivacije enzima je neovisna o početnim koncentracijama tvari u reaktoru. Matematički model sadržava članove koji opisuju inhibiciju *R*-enantiomerom i *S*-enantiomerom epoksida te azidoalkoholom.

## 6. POPIS SIMBOLA

$A$	[-]	apsorbancija
$A_p$	[m <sup>2</sup> ]	ukupna površina izmjene topline
$Arg$	[-]	arginin
$c_A$	[mM]	množinska koncentracija tvari A
$c_{A0}$	[mM]	početna množinska koncentracija tvari A
$c_E, c_{E,0}$	[mM]	množinska koncentracije enzima
$c_p$	[J/kgK]	specifični toplinski kapacitet
$c_{S,0}$	[mM]	početna množinska koncentracija supstrata
$c_{S1}$	[mM]	množinska koncentracija supstrata 1
$c_{S2}$	[mM]	množinska koncentracija supstrata 2
$dA$	[-]	promjena apsorbancije
$dc_A$	[mM]	promjena množinske koncentracije tvari A
$d$	[cm]	širina kivete
DMSO	[-]	dimetil sulfoksid
$dt$	[s]	promjena vremena
$dT$	[K]	promjena temperature
$E$	[-]	enzim
$e$	[-]	baza prirodnog logaritma
$E_a$	[J/mol]	energija aktivacije
ES	[-]	prijelazno stanja, kompleks enzim-supstrat
$G_t$	[J]	slobodna energija
HHDH	[-]	halogenhidrin-dehalogenaza
HheC-W249P	[-]	C-tip halogenhidrin-dehalogenaze
HPLC	[-]	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
$I$	[%]	iskorištenje
IRB	[-]	Institut Ruđer Bošković
$k_1, k_2, k_3$	[min <sup>-1</sup> ]	konstanta brzine reakcije
$k_d$	[min <sup>-1</sup> ]	konstanta deaktivacije enzima

$k_{\text{hidroliza}}$	[min <sup>-1</sup> ]	konstanta hidrolize
$K_i$	[mM]	konstanta inhibicije
$K_m$	[mM]	Michaelisova konstanta
$K_{m,S1}$	[mM]	Michaelisova konstanta za supstrat 1
$K_{m,S2}$	[mM]	Michaelisova konstanta za supstrat 2
KR	[-]	kotlasti reaktor
Lys	[-]	lizin
MTBE	[-]	Metil <i>terc</i> -butil eter
$n_A$	[mol]	množina tvari A
$n_{A0}$	[mol]	početna množina tvari A
$pK_a$	[mM <sup>x</sup> ]	ravnotežna konstanta
PNSHH	[-]	1-( <i>p</i> -nitrofenil)-2-bromoetanol
$R^2$	[-]	koeficijent determinacije
$r, r_A$	[mM]	brzina reakcije
$r_{\text{hidroliza}}$	[mM]	brzina reakcije hidrolize
$r_{S,0}$	[mM]	početna brzina reakcije
$S$	[-]	selektivnost
S	[-]	supstrat
$S.A.$	[U/mg]	specifična aktivnost enzima
Ser	[-]	serin
$T$	[K]	temperatura
$T_p$	[K]	temperatura plašta
Tris-SO <sub>4</sub>	[-]	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer
Tyr	[-]	tirozin
$U$	[W/m <sup>2</sup> K]	ukupni koeficijent prijenosa topline
UV	[-]	ultraljubičasto
$V$	[m <sup>3</sup> ]	volumen
$V.A.$	[U/mL]	volumna aktivnost enzima
$V_m$	[mM]	maksimalna brzina reakcije

$V_R$	[mL]	volumen reaktora
$V_r$	[ $\mu$ L]	volumen uzorka
$X_A$	[%]	konverzija tvari A
$\Delta c_s$	[mM]	promjena množinske koncentracije supstrata
$\Delta G$	[J]	Gibbsova energija
$\Delta H_r$	[kJ/mol]	standardna reakcijska entalpija
$\gamma$	[mg/mL]	masena koncentracija
$\varepsilon$	[ $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ]	ekstinkcijski koeficijent

## 7. LITERATURA

1. Janssen, 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, Biocatalysis* 34, part 2 (2006), 291-295.
2. Pellis, A., Cantone, S., Ebert, C., Gardossi, L.: Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities, *New Biotechnology* 40 (2018) 154-169.
3. Lutje Spelberg, J. H., Tang, L., van Gelder, M., Kellogg, R. M., Janssen, D. B.: *Tetrahedron: Asymmetry* 13 (2002) 1083-1089.
4. Lutje Spelberg, J. H., van Hylekama Vlieg, J. E. T., Tang, L., Janssen, D. B., Kellogg, R. M.: *Organic Letters* 3 (2000) 41-43.
5. 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.
6. Hasnaoui, G., Lutje Spelberg, J. H., de Vries, E., Janssen, D. B.: *Tetrahedron: Asymmetry* 16 (2005) 1685-1692.
7. 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.
8. Jeschke, P.: The unique role of fluorine in the design of active ingredients for modern crop protection. *ChemBioChem* 5 (2004) 570-589.
9. Pastores, G. M.: Metabolism of Fluorine-Containing Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41 (2001) 1761-1783.
10. Resnick, R.P.: Practical uses of fluorinated heterocycles u: Petrov, V.A. *Fluorinated Heterocyclic Compounds, Synthesis, Chemistry, and Applications* (2009) 493-506.
11. Harper, D. B., O'Hagan, O.: The fluorinated natural products. *Natural Product Reports* 11 (1994) 123-133.
12. Gerstenberger, M. R. C., Haas, A.: *Methods of Fluorination in Organic Chemistry. Angewandte Chemie International Edition English* 20 (1981) 647-667.

13. Bošković, M., Podhorsky, R.: ENZIMI. Tehnička enciklopedija 5 (1976) 334-345.
14. Weber, G., Banerjee, G., Bixler, D., Ashmore, J.: Role of Enzymes in Metabolic Homeostasis. *Journal of Nutrition* 74 (1961) 157-160.
15. Brahmachari, G.: *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, 1st Edition, Academic Press, New York 1, 2, 6, 7, 11, 16 (2016).
16. Findrik Blažević, Z., *Bioreakcijska tehnika I*, interna skripta, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu 1-15 (2013) 37-52.
17. Patel, A. K., Singhanian, R. R., Pandey, A.: *Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes*, *Biotechnology of Microbial Enzymes*, Academic Press (2016) 14-41.
18. Blanco, A., Blanco, G.: *Medical Biochemistry*, Chapter 8. *Enzymes* 1 (2017) 153-175.
19. Berg, J.M.: *Biokemija*; 1. hrvatsko izdanje. Školska knjiga: Zagreb, 2013.
20. Čimbenici koji utječu na brzinu kemijske reakcije – *Kemija 2*. (n.d.). E-Skole. Preuzeto: 3.6.2021., <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/15cf791a-4c97-4f29-84d9-17c1b47ceccc/kemija-2/m03/j02/index.html>.
21. Patel, A. K., Singhanian, R. R., Pandey, A.: *Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes*, u: G. Brahmachari, *Biotechnology of Microbial Enzymes*, New York, Elsevier (2016) 13-41.
22. Kirby, A. J.: *Enzyme Mechanisms, Models, and Mimics*. *Angew. Chemie (International Edition English)* 35 (1996) 706-724.
23. Suzuki, H.: *How Enzymes Work: From Structure to Function* 17-31 (2015) 53-71.
24. Koshland, D. E.: *The Key - Lock Theory and the Induced Fit Theory* *Angew. Chemie* 106 (1994) 2468–2472.
25. Hedstrom, L.: *Enzyme Specificity and Selectivity*. *Encyclopedia of Life Sciences* 1-7 (2001).
26. Suzuki, H.: *How Enzymes Work: From Structure to Function* 1-46 (2015).

27. Shafee, T.: Vlastiti rad (CC BY 4.0) putem Commons Wikimedia. Preuzeto: 3.6.2021., <https://hr.weblogographic.com/what-is-active-site-an-enzyme>.
28. Cornils, B., Herrmann, W. A., Zanthoff, H. W., Wong, C. H.: Catalysis from A to Z: A Concise Encyclopedia, Volume 1, Fourth Edition Catalysis from A to Z (2013) 357-636.
29. Saurabh, B.: Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Enzymes, proteins and bioinformatics, IOP Publishing Ltd 2 (2018) 1-29.
30. Iyer, P. V. & Ananthanarayan, L.: Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* 43 (2008) 1019-1032.
31. Hedstrom, L.: Enzyme Specificity and Selectivity. *Encyclopedic of Life Sciences* 1-7 (2001).
32. Palmer, T., Bonner, P. L.: *Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry: Second Edition.* 2-11 (2007).
33. Arcus V. L., van der Kamp M. W., Pudney C.R., Mulholland A.J.: Enzyme evolution and the temperature dependence of enzyme catalysis. *Current Opinion in Structural Biology* 65 (2020) 96-101.
34. Krishnaraj R.N., David A., Sani R.: *Fundamentals of Enzymatic Processes. Extremophilic Enzymatic Processing of Lignocellulosic Feedstocks to Bioenergy*, Springer International Publishing AG 1-29 (2017).
35. Pandya C., Farelli J. D., Dunaway-Mariano D., Allen, K. N.: Enzyme Promiscuity: Engine od Evolutionary Innovation. *Journal of Biological Chemistry* 289 (44) (2014) 30229-30236.
36. Kapoor, M., Gupta, M. N.: Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* 47 (2012) 555–569.
37. Branden, C. Tooze, J.: *Introduction to Protein Structure* 1-12 (1999).
38. Bugg, T. D. H.: *Enzymes: General Properties*, *Encyclopedia of life sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. (2001).
39. Jašić, M.: Peptidi i proteini | Tehnologija hrane. Preuzeto 4.6.2021., <https://www.tehnologijahrane.com/enciklopedija/peptidi-proteini>.

40. Robinson P.K.: Enzymes: principles and biotechnological applications, Essays Biochemistry 59 (2015) 1-41.
41. BIOLOGIJA 1. Građa i kemijski sastav prokariotske i eukariotske stanice - PDF Free Download. (n.d.). Docplayer. Preuzeto: 4.6.2021., <https://docplayer.gr/76268980-Biologija-1-grada-i-kemijski-sastav-prokariotske-i-eukariotske-stanice.html>.
42. 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.
43. Wong, D. W. S.: Structures of Proteins. The ABCs of Gene Cloning, 21-28 (2018).
44. Palmer, T., Bonner, P. L.: The Structure of Proteins. Enzymes, 14-43 (2011).
45. Wikipedia contributors. (2020, December 30). Tercijarna struktura proteina. Wikipedia. [https://bs.wikipedia.org/wiki/Tercijarna\\_struktura\\_proteina#/media/Datoteka:Myoglobine\\_and\\_heme.jpg](https://bs.wikipedia.org/wiki/Tercijarna_struktura_proteina#/media/Datoteka:Myoglobine_and_heme.jpg).
46. Wikipedia contributors. (2020a, October 24). Kvaternarna struktura proteina. Wikipedia. [https://bs.wikipedia.org/wiki/Kvaternarna\\_struktura\\_proteina#/media/Datoteka:Haemoglobin-3D-ribbons-es.jpg](https://bs.wikipedia.org/wiki/Kvaternarna_struktura_proteina#/media/Datoteka:Haemoglobin-3D-ribbons-es.jpg).
47. Brahmachari, G.: Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications, 1st Edition, Academic Press, New York 1, 2, 6, 7, 11, 16 (2016).
48. Ako, H., & Nip, W. K.: Enzyme Classification and Nomenclature. Food Biochemistry and Food Processing Second edition, John Wiley & Sons (2012) 107-124.
49. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno: 4.6.2021., <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=36334>.
50. Palmer T., Bonner P. L.: Enzymes, Elsevier, New York (2011) 2 – 13.
51. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021. Pristupljeno: 4.6.2021., <http://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=28337>.
52. Blanco, A., & Blanco, G.: Enzymes. Medical Biochemistry, Elsevier Ltd 5 (2017) 153-175.



53. Bhagavan, N. V., & Ha, C.-E.: Enzymes and Enzyme Regulation. Essentials of Medical Biochemistry, Elsevier Ltd. (2011) 47-58.
54. McDonald, A. G., Tipton, K. F.: Fifty-five years of enzyme classification: Advances and difficulties 281 (2014) 583-592.
55. Blanco, A., Blanco, G.: Medical Biochemistry, Chapter 8 – Enzymes, Academic press, 1st edition (2017) 153-175.
56. Webb E. C. (1992); Enzyme nomenclature 1992: recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes. Published for the International Union of Biochemistry and Molecular Biology by Academic Press. San Diego, ISBN 0-12-227164-5.
57. Apweiler R., Bairoch A., Wu C. H., Barker W. C., Boeckmann B., Ferro S., Gasteiger E., Huang H., Lopez R., Magrane M., Martin M. J., Natale D. A., O'Donovan C., Redaschi N., Yeh L. S.: UniProt: the Universal Protein knowledgebase: Nucleic Acids Research. 32 (2004) D115-9.
58. Van Beilen, J. B., Li, Z.: Enzyme technology: an overview, Current Opinion in Biotechnology 13 (2002) 338-344.
59. Evans, G. M., Furlong, J. C.: Environmental Biotechnology: Theory and Application: Second Edition. Environmental Biotechnology: Theory and Application: Second Edition (2010). doi:10.1002/9780470975152.
60. Tang, W. L., Zhao, H.: Industrial biotechnology: Tools and applications. Biotechnol. J. 4 (2009) 1725-1739.
61. Thapa S., Li H., Ohair J., Bhatti S., Chen F.C., Nasr K.A., Johnson T., Zhou S.: Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives, Molecular Biotechnology, Springer 61 (2019) 579-601.
62. Schmid A., Hollmann F., Park J. B., Bühler B.: The use of enzymes in the chemical industry in Europe, Current Opinion in Biotechnology, Elsevier 13 (4) (2002) 359-366.
63. Janssen, 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 (2) (2006) 291-295.

64. Majerić Elenkov, M.; Szymanski, W.; Janssen D. B.: Reactions Catalyzed by Halohydrin Dehalogenases, *Science of Synthesis; Biocatalysis in Organic Synthesis 2*, Faber, K.; Fessner, W.-D. ; Turner, N. (Eds.), Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG (2014) 507-527.
65. Schallmey, M., Koopmeiners, J., Wells, E., Wardenga, R., Schallmey, A.: Expanding the halohydrin dehalogenase enzyme family: Identification of novel enzymes by database mining. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (2014) 7303-7315.
66. 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.
67. De Jong R. M., Tiesinga J. J. W., Rozeboom H. J., Kalk K. H., Tang L., Janssen D. B., Dijkstra B. W.: Structure and mechanism of bacterial haloalcohol dehalogenase: a new variation of the short-chain dehydrogenase/reductase fold without an NAD(P)H binding site, *The EMBO Journal* 22 (19) (2003) 4933-4944.
68. 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) 143-155.
69. Watanabe, F., Yu, F., Ohtaki, A., Yamanaka, Y., Noguchi, K., Yohda, M., & Odaka, M.: Crystal structures of halohydrin hydrogen-halide-lyases from *Corynebacterium* sp. N-1074. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 83(12) (2015) 2230-2239.
70. Calderini, E., Wessel, J., Suss, P., Schrepfer, P., Wardenga, R., Schallmey, A.: Selective Ringopening of Di-substituted Epoxides Catalysed by Halohydrin Dehalogenases, *ChemCatChem* 11 (2019) 2099-2106.
71. Majerić Elenkov, M., Tang, L., Hauser, B., Janssen, D.B.: Sequential kinetic resolution catalyzed by halohydrin dehalogenase, *Organic Letters* 19 (2006) 4227-4229.
72. Tang, L., Torres Pazmin, D. E., Fraaije, M. W., de Jong, R. M., Dijkstra, B. W., Janssen, D. B.: Improved Catalytic Properties of Halohydrin Dehalogenase by Modification of the Halide-Binding Site, *Biochemistry* 44 (2005) 6609-6618.
73. Buchholz, K. Kasche, V. Bornscheuer, U.T.: *Biocatalysts and Enzyme Technology* (2012) 1-29.

74. Poelarends, G. J., Whitman, C. P.: Mechanistic and Structural Studies of Microbial Dehalogenases: How Nature Cleaves a Carbon–Halogen Bond. *Comprehensive Natural Products II* (2010) 89-123.
75. De Jong, R. M., Tiesinga, J. J. W., Villa, A., Tang, L., Janssen, D. B., Dijkstra, B. W.: Structural Basis for the Enantioselectivity of an Epoxide Ring Opening Reaction Catalyzed by Halo Alcohol Dehalogenase HheC, *Journal of American Chemical Society* 127 (2005) 13338-13343.
76. Schallmey, A., Schallmey, M.: Recent advances on halohydrin dehalogenases—from enzyme identification to novel biocatalytic applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (18) (2016) 7827-7839.
77. Hu D., Ye H. H., Wu M. C., Feng F., Zhu L. J., Yin X., Li J. F., Hu D.: Chemoenzymatic preparation of (S)-p-nitrostyrene oxide from p-nitrophenacyl bromide by recombinant *Escherichia coli* cells expressing a novel halohydrin dehalogenase, *Catalysis Communications* 69 (2015) 72-75.
78. You, Z. Y., Liu, Z. Q., Zheng, Y. G.: Properties and biotechnological applications of halohydrin dehalogenases: Current state and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 9-21.
79. Hasnaoui-Dijoux, G., Majerić Elenkov, M., Lutje Spelberg, J. H., Hauer, B., Janssen, D. B.: Catalytic Promiscuity of Halohydrin Dehalogenase and its Application in Enantioselective Epoxide Ring Opening. *ChemBioChem* 9(7) (2008) 1048-1051.
80. Campbell-Verduyn L. S., Szymański W. S., Postema C. P., Dierckx R. A., Elsinga P. H., Janssen D. B., Feringa B. L.: One pot ‘click’ reactions: tandem enantioselective biocatalytic epoxide ring opening and [3+2] azide alkyne cycloaddition, *Chemical Community* 46 (2010) 898-900.
81. Jin, H. X., Hu, Z. C., Liu, Z. Q., & Zheng, Y. G.: Nitrite-mediated synthesis of chiral epichlorohydrin using halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 59(3) (2012) 170-177.
82. Liao, Q., Du, X., Jiang, W., Tong, Y., Zhao, Z., Fang, R., Feng, J., Tang, L.: Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter*

AD1: Preparation, characterization and application as a biocatalyst. *J. Biotechnology* 272-273 (2018) 48-55.

83. Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Tang, L., Lutje Spelberg, J. H., Smilda, T., Poelarends, G. J., Bosma, T., van Merode, A. E. J., Fraaije, M. W., Janssen, D. B.: Halohydrin Dehalogenases Are Structurally and Mechanistically Related to Short-Chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal of Bacteriology* 183(17) (2001) 5058-5066.

84. De Jong, R.M., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Tang, L., Janssen, D.B., Dijkstraa, B.W.: Crystallization and preliminary X-ray analysis of an enantioselective halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1, *Acta Crystal D58* 176-178 (2002).

85. Ma, S. K., Gruber, J., Davis, C., Newman, L., Gray, D., Wang, A., Grate, J., Huisman, G. W., Sheldon, R. A.: A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chemistry* 12(1) (2010) 81-86.

86. Dvorak, P., Bidmanova, S., Damborsky, J., Prokop, Z.: Immobilized synthetic pathway for biodegradation of toxic recalcitrant pollutant 1,2,3-trichloropropane. *Environmental Scientific Technology* 48 (2014) 6859-6866.

87. Guo C., Chen Y., Zhen Y., Zhang W., Tao Y., Feng J., Tang L., Exploring the Enantioselective Mechanism of Halohydrin Dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by Iterative Saturation Mutagenesis, *Applied and Environmental Microbiology*, *Journals ASM* 81(5) (2015) 2919-2926.

88. Findrik Blažević, Z., Milčić, N., Sudar, M., Majerić Elenkov, M., Halogenhydrin Dehalogenases and Their Potential in Industrial Application – a Viewpoint of Enzyme Reaction Engineering, *Advanced Synthesis Catalysts* 363(2) (2020) 388-410.

89. Kasai, N., Suzuki, T. & Idogaki, H.: Enzymatic degradation of esters of dichloropropanols: Removal of chlorinated glycerides from processed foods. *LWT - Food Scientific Technology* 39 (2006) 86-90.

90. Bornscheuer, U. T., Hesseler, M.: Enzymatic removal of 3-monochloro-1,2-propanediol(3-MCPD) and its esters from oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 112 (2010) 552-556.

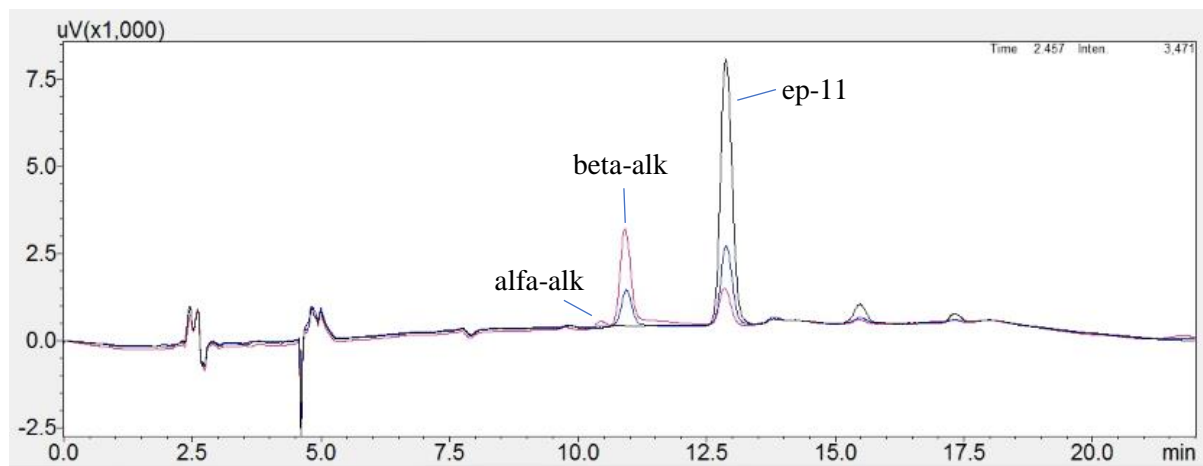
91. Castro, C. E., Bartnički, E. W.: Biodehalogenation. Epoxidation of Halohydrins, Epoxide Opening and Transhalogenation by a Flavobacterium species, *Biochemistry* 7 (1986) 3213-3218.
92. Wan, N. W., Liu, Z. Q., Xue, F., Zheng, Y. G.: An enzymatic method for determination of azide and cyanide in aqueous phase. *Journal of Biotechnology* 214 (2015) 27-32.
93. Koopmeiners J., Halmschlag B., Schallmey M., Schallmey A.: Biochemical and biocatalytic characterization of 17 novel halohydrin dehalogenases, *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (2016) 7517-7527.
94. Ma, S. K., Gruber, J., Davis, C., Newman, L., Gray, D., Wang, A., Grate, J., Huisman, G. W., Sheldon, R. A.: A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate, *Green Chemistry* 12(1) (2010) 81-86.
95. Koopmeiners J., Diederich C., Solarczek, Voß H., Mayer J., Blankenfeldt W., Schallmey A.: HheG, a Halohydrin Dehalogenase with Activity on Cyclic Epoxides, *ACS Catalyst* 7 (2017) 6877-6886.
96. Assis, H. M. S., Bull, A. T., Hardman, D. J.: Synthesis of chiral epihalohydrins using haloalcohol dehalogenase A from *Arthrobacter erithii* H10a. *Enzyme Microbiological Technology* 22 (1998) 545-551.
97. Seisser, B., Lavandera, I., Faber, K., Spelberg, J. H. L., Kroutil, W.: Stereo-complementary two-step cascades using a two-enzyme system leading to enantiopure epoxides. *Advanced Synthesis Catalysts* 349 (2007) 1399-1404.
98. 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.
99. 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.
100. Gorzynski, S. J.: Syntehtically useful reactions of epoxides, *Synthesis* 8 (1984) 629-656.

101. McMurry, J.: Fundamentals of Organic Chemistry, 7th Edition. Cornell University, Brooks/Cole, Cengage Learning, USA (2011) 277-283.
102. Solomons, T.W.G., Fryhle, C.B., Snyder, S.A.: Organic Chemistry, 10th Edition, John Wiley & Sons (2011) 502-548.
103. Waldmann, H., Drauz, K., Groger, H., May, O.: Enzyme catalysis in Organic Synthesis, 3rd Edition 1 (2012) 417.
104. 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.
105. Palucki, M., Pospisil, P. J., Zhang, W.: Highly Enantioselective, Low-Temperature Epoxidation of Styrene. *Journal of American Chemical Society* 116 (1994) 9333-9334.
106. Monterde, M. I.: Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent bihydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase. *Tetrahedron Asymmetry* 15 (2004) 2801-2805.
107. Yildirim, D., Tükel, S. S., Alagöz, D. & Alptekin, Ö.: Preparative-scale kinetic resolution of racemic styrene oxide by immobilized epoxide hydrolase. *Enzyme Microbiological Technology* 49 (2011) 555-559.
108. Kosar, V.: Kemijsko reakcijsko inženjerstvo, interna skripta, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu (2017) 5-6.
109. Liu, S.: Batch reactor. *Bioprocess Engineering* (2020) 109-140.
110. Tomašić, V.: Kemijski reaktori, interna skripta, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zavod za reakcijsko inženjerstvo i katalizu (2016) 5-6.
111. Gomzi, Z.: Kemijski reaktori, Zagreb: HINUS, udžbenik (2009).
112. Bisswanger, H.: *Enzyme Kinetics: Principles and Methods* (2008) 59-74.
113. Roskoski, R.: Michaelis-Menten Kinetics, Reference Module in Biomedical Sciences (2015).

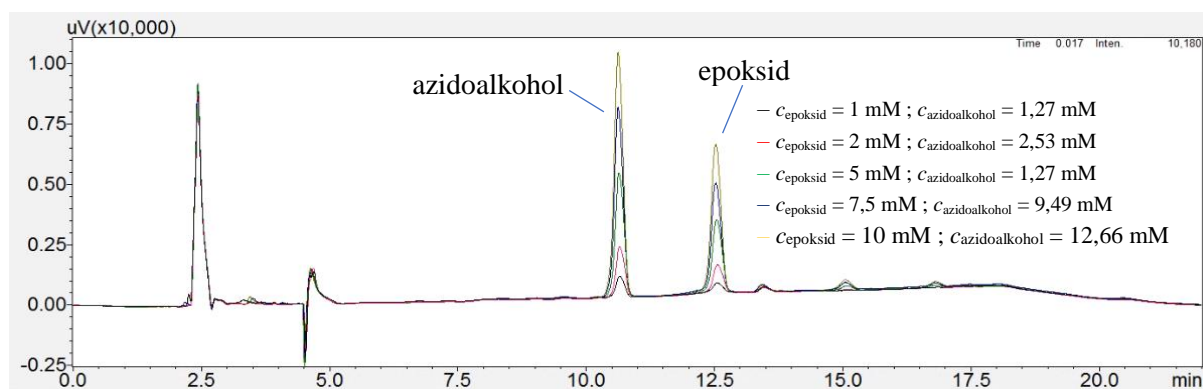
114. Hegyi G., Kardos J., Kovács M., Málnási-Csizmadia A., Nyitray L., Pál G., Radnai L., Reményi A., Venekei I.: Introduction to Practical Biochemistry, ELTE TTK (2013) 121-139.
115. Najafpour, G.: Enzyme Technology. Biochemical Engineering and Biotechnology, Elsevier B.V. (2015) 19-49.
116. Biaglow, A., Erickson, K., McMurrin, S.: Enzyme Kinetics and the Michaelis-Menten Equation. PRIMUS 20(2) (2010) 148-168.
117. Bechtold, M., Panke, S.: Reaction engineering and Biontransformation u Carreira, E.M. Yamamoto, H. Comprehensive Chirality (2012) 72-98.
118. Česnik, M.: Model-based optimization of the enzymatic aldol addition of propanal to formaldehyde: A first step towards enzymatic synthesis of 3-hydroxybutyric acid. Chemical Engineering Research and Design 150 (2019) 140-152.

## 8. PRILOZI

**Prilog 1.** Prikaz rezultata analize na HPLC uređaju na kromatogramu (alfa-alk predstavlja neželjeni kemijski nusprodukt, beta-alk predstavlja (R)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanol, dok ep-11 predstavlja 2-(4-trifluorometil)-fenil oksiran)

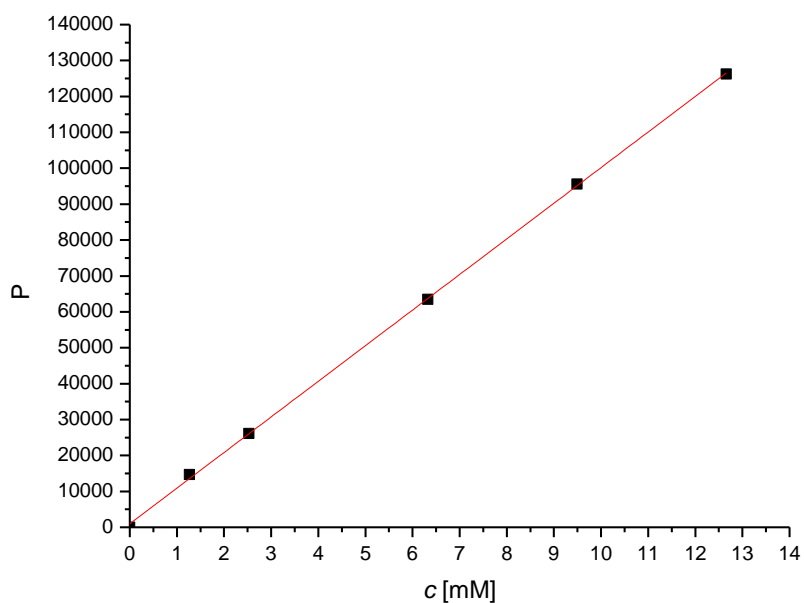


**Prilog 2.** Kromatogram dobiven analizom temeljnih otopina različitih koncentracija epoksida i azidoalkohola

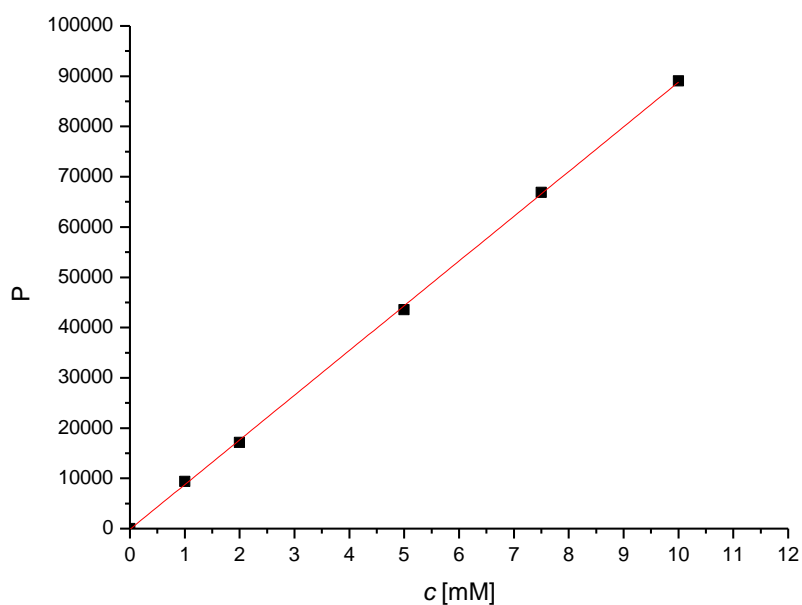




**Prilog 3. a)** Baždarni dijagram dobiven na temelju kromatograma (prilog 2.) za azidoalkohol, (R)-2-azido-1-(4-trifluorometil-fenil)-etanol



**Prilog 3. b)** Baždarni dijagram dobiven na temelju kromatograma (prilog 2.) za epoksid, *p*-trifluorofenil-stiren oksida



**Prilog 4.** Ispis koda izrađenoga u programskom paketu SCIENTIST za proračun parametra  $k_d$  (konstanta deaktivacije) za enzim HheC-W249P

**Model**

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t
DepVars: a
Params: kd
a'=-kd*a
t=0
a=100
kd=0.1
***
```

**Parametar**

Confidence Intervals:

Parameter Name :	KD
Estimate Value =	0.00016
Standard Deviation =	1.54E-05
95% Range (Univar) =	0.00013
95% Range (S-Plane) =	0.00013

**Prilog 5.** Ispis koda izrađenoga u programskom paketu SCIENTIST za validaciju dvosupstratnog Michaelis-Menteničinog modela s inhibicijom supstratom i produktom

**Model**

```
// MicroMath Scientist Model File
IndVars: t
DepVars: E,R, S, AZ, ALK
Params: Vm, KmR, Kmaz, KiR, KiS, Kialk, k, kd
//Kineticki model
x=Vm*(exp(-kd*t))*R*AZ*HHDH/((Kmaz+AZ)*(KmR*(1+ALK/Kialk+S/KiS)+R+R*R/KiR))
rhidrol1=k*R
rhidrol2=k*S
//Reaktorski model
R'=-x-rhidrol1
S'=-rhidrol2
E=R+S
AZ'=-x
ALK'=x
//Parametri
k=0.001155
kd=0.0001568
Vm=0.67525
```

KmR=2.1201  
KiR=51.252  
Kmaz=1.9417  
KiS=2.6339  
Kialk=10.6982  
//Pocetni uvjeti  
t=0  
HHDH=0.1750  
alk=0  
R=37.05  
S=37.05  
AZ=50  
\*\*\*