

Aktivnost halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem organskih otapala

Čičak, Martina

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:747727>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Martina Čičak

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Martina Čičak

AKTIVNOST HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZE POD UTJECAJEM
ORGANSKIH OTAPALA
ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitne komisije: prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević
doc. dr. sc. Martina Sudar
prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2020.

SAŽETAK

U ovome radu ispitana je aktivnost enzima halogenhidrin-dehalogenaze u prisustvu organskih otapala različitih koncentracija. Aktivnosti enzima su praćene preko produkta *p*-nitrofenilstiren oksida koji je dobiven pretvorbom iz 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanolu uz halogenhidrin-dehalogenazu kao katalizator. Proučavane su relativne aktivnosti enzima budući specifične dosta odstupaju jedna od druge. Na temelju dobivenih podataka, određena je aktivnost enzima u prisustvu pojedinog organskog otapala. Aktivnost enzima opada s porastom koncentracije organskog otapala. Porastom koncentracije organskog otapala, enzimi i dalje zadržavaju aktivnost, ali ne na razini aktivnosti u vodenom mediju. U prisustvu *n*-heksana, cikloheksana i toluena, enzimi zadržavaju vrlo visoku aktivnost čak i u čistom organskom otapalu.

Ključne riječi: halogenhidrin-dehalogenaza, enzim, aktivnost, kataliza, organska otapala

ABSTRACT

This research was focused on the activity of halohydrin dehalogenase enzyme in different concentrations of organic solvents. The assays were monitored via the *p*-nitrophenylstyrene oxide product obtained by conversion from 1-(*p*-nitrophenyl)-2-bromoethanol with halohydrin dehalogenase as catalyst. Relative activities of enzymes were evaluated and compared, since the specific ones deviate a lot from each other. Based on the obtained data, the activity of the enzyme in a particular organic solvent was determined. As concentration of organic solvent increases, enzyme activity decreases. As the concentration of the organic solvent increases, the enzymes remain active, but at lower level than in an aqueous solution. In the presence of *n*-hexane, cyclohexane and toluene, the enzymes retain their activity even in pure organic solvents.

Key-words: halohydrin dehalogenase, enzyme, activity, catalysis, organic solvents



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

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1 ENZIMI	2
2.1.1 Enzimi općenito.....	2
2.1.2 Djelovanje enzima	3
2.1.3 Podjela enzima	5
2.2 ENZIM HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZA (HHDH)	6
2.2.1 Podjela enzima HHDH	6
2.2.2 Strukturne karakteristike HHDH.....	7
2.2.3 Produkti i Industrijska primjena HHDH.....	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1 Aparatura	11
3.1.1 Analitička vaga.....	11
3.1.2 Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)	11
3.1.3 Homogenizator	12
3.1.4 Magnetska miješalica.....	13
3.1.5 Centrifuga.....	13
3.2 ANALITIČKE METODE	14
3.2.1 Mjerenje koncentracije reaktanata i produkata kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC).....	14
3.3 Određivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u prisutnosti različitih organskih otapala	15
3.3.1 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u dimetil-sulfoksidu	17
3.3.2 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u metil tert-butil eteru	17
3.3.3 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u toluenu.....	18
3.3.4 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u <i>n</i> -heksanu.....	18
3.3.5 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u acetonitrilu	19

3.3.6 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u cikloheksanu	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pri različitim udjelima dimetil-sulfoksida u puferu	21
4.2 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pri različitim udjelima metil tert-butil etera	22
4.3 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem toluena	22
4.4 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem n-heksana	23
4.5 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem acetonitrila	24
4.6 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem cikloheksana	24
4.7 Usporedba aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem organskih otapala	25
5. ZAKLJUČAK	26
POPIS SIMBOLA	27
6. LITERATURA	27
7. PRILOG	30

1.UVOD

Primjena biokatalizatora u proizvodnji optički čistih spojeva privlačila je mnogo pažnje tijekom prošlih nekoliko desetljeća (Guo, 2015). Optički čiste komponente vrijedni su prekursori u farmaceutskoj i kemijskoj sintezi. Posljednjih godina, biokatalitička pretvorba neprirodnih supstrata sve više postaje alternativa kemijskoj asimetričnoj sintezi u proizvodnji kiralnih spojeva (Tang, 2012).

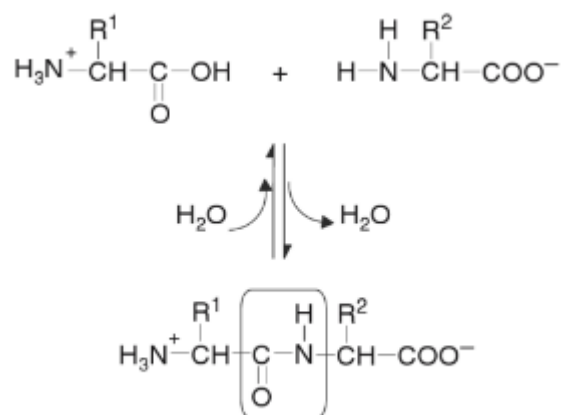
Enantioselektivnost je jedan od ključnih parametara koji definiraju korisnost enzima u odgovarajućoj industrijskoj sintezi sitnih kemikalija. Dakle, identifikacija enzima s visokom enantioselektivnošću vrlo je važna za željenu pretvorbu (Guo, 2015). U posljednje vrijeme raste interes za enzimima halogenhidrin-dehalogenazama zbog njihove sposobnosti za proizvodnjom optički čistih epoksida i halogenhidrina. Zahvaljujući svojoj visokoj enantioselektivnosti i sposobnosti prihvaćanja niza nukleofila (CN^- , N_3^- , NO_2^- , OCN^- , itd.), mogu se koristiti i za pripravu kiralnih β - supstituiranih alkohola (Tang, 2012).

2. OPĆI DIO

2.1 ENZIMI

2.1.1 Enzimi općenito

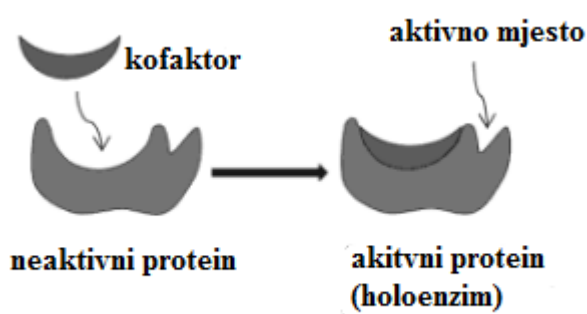
Enzimi, također poznati i kao biokatalizatori, su biološke supstance koje pokreću ili ubrzavaju biokemijsku reakciju u živom organizmu, a da se pri tome ne troše (Kuddus, 2019). Građeni su od aminokiselinskih ostataka čije se brojke kreću od sto pa sve do nekoliko stotina. Aminokiselinski ostatci kovalentno su povezani peptidnim vezama koja se stvara između atoma ugljika karboksilne skupine jedne aminokiseline i dušikovog atoma α -amino skupine sljedeće aminokiseline. Ovisno o prirodi R skupine, aminokiseline mogu biti: nepolarne (hidrofobne) ili polarne (nabijene ili nenabijene) i njihova raspodjela duž proteinske molekule određuje njihovo ponašanje (Illanes, 2008).



Slika 2.1 Shema formiranja peptidne veze između dvije susjedne α -aminokiseline

Iako su enzimi proizvedeni u stanici, mogu biti aktivni i u *in vitro* uvjetima što ih čini poprilično korisnima u industriji. Enzimi su složene proteinske molekule i prirodni su katalizatori proizvedeni od strane živih organizama kako bi katalizirali biokemijske reakcije važne za život. Slično kao i kod ostalih kemijskih katalizatora, enzimi su također visoko učinkoviti u povećanju brzine biokemijskih reakcija koje se odvijaju vrlo sporo ili se uopće ne odvijaju (Kuddus, 2019).

Da bi enzimi mogli katalizirati reakcije, potrebne su im male molekule koje se zovu kofaktori. Kofaktori mogu biti metalni ioni poput Cu^{2+} , Fe^{3+} ili Zn^{2+} . Mogu biti i organske molekule poznatije kao koenzimi (Voet, 2016). Kofaktori su neproteinske kemijske komponente vezane na neaktivni proteinski dio enzima kako bi povećali biološku aktivnost enzima potrebnu za njegovo funkcioniranje. Aktivni kompleks proteinskog dijela enzima zajedno s kofaktorom čini holoenzim (slika 2.1). Kofaktor se također smatra pomoćnom molekulom zbog sudjelovanja u biokemijskim reakcijama (Kuddus, 2019).



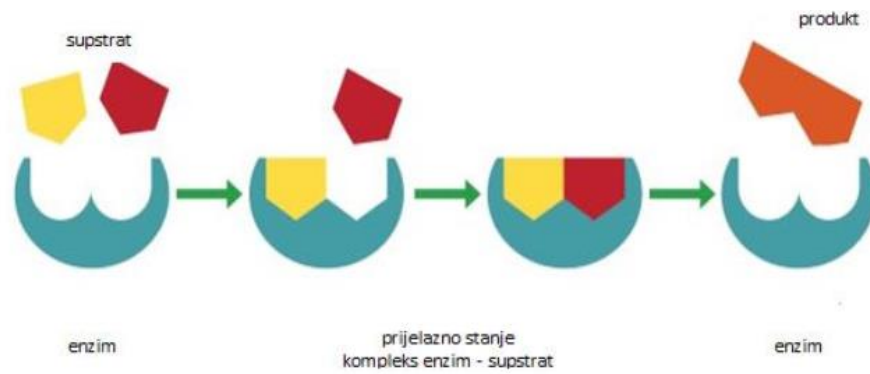
Slika 2.2 Holoenzim

Jedno od važnijih svojstava enzima je specifičnost prema supstratu. To svojstvo znači da se enzimi mogu povezati samo s određenim supstratima, to jest trebaju posjedovati funkcionalne skupine koje će moći učvrstiti supstrat na aktivnom mjestu, kako bi se reakcija mogla odvijati (Illanes, 2008).

2.1.2 Djelovanje enzima

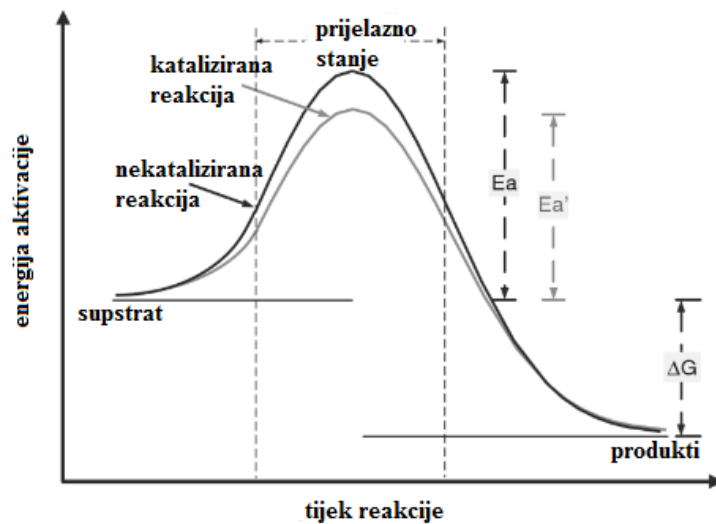
Djelovanje enzima započinje tvorbom kompleksa sa supstratom. U tom je kompleksu enzim vezan uz supstrat Van der Waalsovima i elektrostatskim privlačenjem, vodikovom vezom ili rjeđe, kovalentnom vezom. Kompleksiranje mora biti brzo i reverzibilno, tako da se produkt odvajaju od enzima odmah nakon reakcije i oslobađa enzim za daljnje katalitičko djelovanje. Kompleks nastaje na aktivnom mjestu enzima, dijelu strukture

enzima koje pobuđuje određenu reakciju. Specifičnost odnosa enzim-supstrat opisuje se kao mehanizam ključ-brava enzimske katalize (Pine, 1987).



Slika 2.3 Mehanizam djelovanja enzima na supstrat

Enzim i supstrat tvore kompleks kroz ključ-brava interakciju koja aktivira supstrat čime se dolazi do prijelaznog stanja kako bi se reakcija nastavila (Shoda, 2015).



Slika 2.4 Mehanizam katalize

Kao što se vidi na slici 2.4, katalizator, u ovom slučaju enzim, smanjuje visinu krivulje zahvaljujući svojoj interakciji sa supstratom čime se stvara aktivirani prijelazni kompleks koji stvara produkt i oslobađa katalizator (Illanes, 2008).

2.1.3 Podjela enzima

Enzimi se prema IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) dijele u šest grupa, na temelju vrste kemijske reakcije koju kataliziraju:

1. Oksidoreduktaze – enzimi koji kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije koje uključuju prijenos elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma. Postoje 22 podvrste oksidoreduktaza od kojih su za industriju najznačajnije dehidrogenaze koje oksidiraju supstrat prijenosom vodikovih atoma na koenzim (NAD^+ , NADP^+ , FAD^+ , FMN) koji se ponaša kao akceptor. Zahtijevaju koenzime za rad te su isključivo unutarstanični.
2. Transferaze – enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalne skupine s donora na prihvatljivog akceptora. Postoji 9 podvrsta transferaza, ovisno o kemijskoj prirodi skupine koja se prenosi. Ovi enzimi čine ključnu ulogu u staničnom metabolizmu. Kao i oksidoreduktaze, i ovi enzimi zahtijevaju koenzime za rad te su isključivo unutarstanični.
3. Hidrolaze – enzimi koji kataliziraju reakcije hidrolize. Postoji 12 podvrsta ovisno o tipu prihvatljive veze. Većina enzima koji imaju tehnološku primjenu pripadaju ovoj skupini. Većina za rad ne zahtijeva koenzime.
4. Liaze – enzimi koji kataliziraju reakcije ne-hidrolitičkog i ne-oksidativnog cijepanja kemijskih veza. Postoji 7 podvrsta ovih enzima, ovisno o tipu prihvatljive veze. Većina je unutarstanična, a neke ne zahtijevaju koenzime za rad.
5. Izomeraze – enzimi koji kataliziraju reakcije konverzije supstrata u izomer, to jest spoj sa istim brojem i tipom atoma. Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu izomera koji se proizvodi.
6. Ligaze – enzimi koji kataliziraju reakcije kovalentnog povezivanja dvaju molekula. Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu veze koja se formira (Illanes 2008).

2.2 ENZIM HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZA (HHDH)

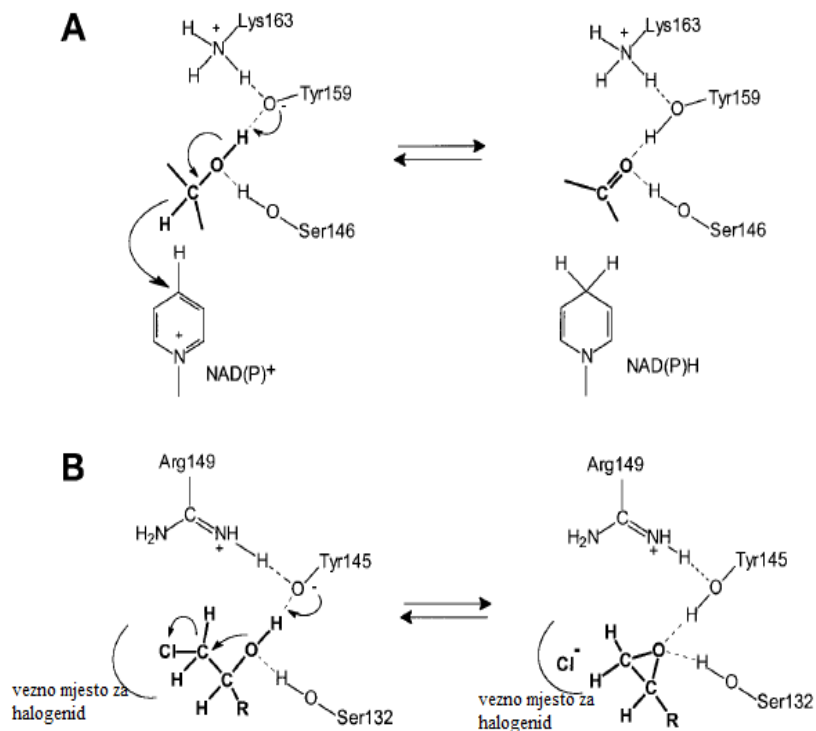
Halogenhidrin-dehalogenaze su bakterijski enzimi koji kataliziraju reverznu reakciju nastajanja epoksida iz vicinalnih halogenhidrina (Lutje Spelberg, 2002). Okrivena su tri ovakva enzima u bakteriji koja raste na halogeniranim spojevima kao izvoru ugljika. Halogenhidrin-dehalogenaze uklanjaju halogene supstituente kako bi se uklonile toksične tvari sa spojeva i omogućuju im ulazak u središnji metabolizam. Oni također kataliziraju reverznu reakciju s alternativnim nukleofilima (N_3^- , CN^- , NO_2^-) (Janssen, 2017).

2.2.1 Podjela enzima HHDH

Unatoč proučavanju halogenhidrin-dehalogenaza posljednjih 40 godina, brojnost i raznolikost ovih enzima je ograničena. Identificirane su samo halogenhidrin-dehalogenaze bakterijskog podrijetla (Drauz, 2002). Podijeljene su u tri različite filogenetske grupe - A, B, C: HheA iz *Arthrobacter* sp. AD2 (van Hylckama Vlieg, 2001), HheA iz *Corynebacterium* sp. N-1074 (Yu, 1994), HheB iz *Mycobacterium* sp. GP1 (van Hylckama Vlieg, 2001), HheB iz *Corynebacterium* sp. N-1074 (Yu, 1994) i dvije identične HheC sekvence iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 (van Hylckama Vlieg, 2001) i *Rhizobium* sp. NHG3 (Higgins, 2005; Effendi, 2000). Od svih nabrojanih, najviše je proučavana HheC iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 zahvaljujući izvanrednoj enantioselektivnosti (Koopmeiners, 2016). Međusobnim sravnivanjem identičnosti aminokselinskog slijeda enzima različitih skupina utvrđena je identičnost između skupina od 24 % do 33 % (Schallmey, 2012). Članovi skupine A međusobno pokazuju 97,1 % identičnosti dok članovi skupine B pokazuju 98,2 % identičnosti, a HheC jedini je predstavnik skupine C (Drauz, 2002).

2.2.2 Strukturne karakteristike HHDH

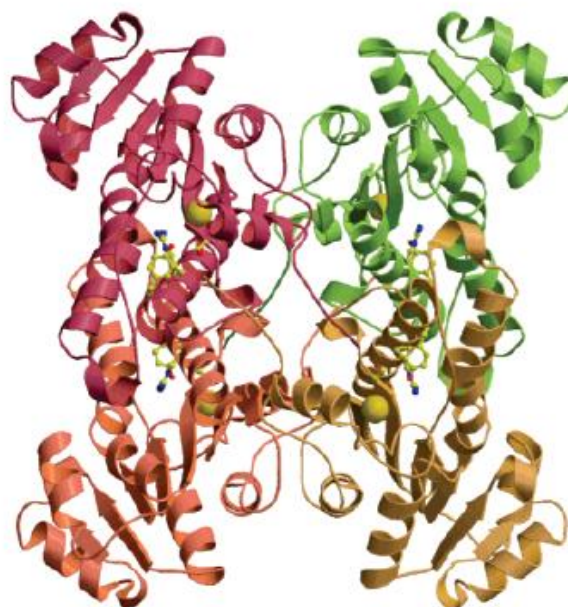
HHDH su strukturno slične proteinima koji pripadaju porodici kratkolančanih dehidrogenaza/reduktaza (SDR) s kojima dijele sličnosti u strukturi, aminokiselinskom slijedu i mehanizmu djelovanja. Strukturno, to su homotetrameri sastavljeni od dva para dimera, a svaki monomer sadrži oko 250 aminokiselina. Katalitička trijada HHDH sastoji se od Ser/Tyr/Arg, dok se kod SDR enzima u katalitičkoj trijadi nalaze Ser/Tyr/Lys. Međutim, za razliku od SDR enzima, HHDH ne posjeduju vezno mjesto za kofaktor nego na tom mjestu imaju vezno mjesto za halogenid što je prikazano na slici 2.5 (van Hylckama Vlieg, 2001).



Slika 2.5 Prikaz aktivnog mjesta SDR enzima i HHDH. A) reakcijski mehanizam i aktivno mjesto SDR enzima 7-hidroksisteroid-dehidrogenaze iz *E. coli*; B) reakcijski mehanizam i aktivno mjesto HheC iz *A. radiobacter* AD1 (van Hylckama Vlieg, 2001)

Dosad su poznate kristalne strukture HheA iz *Arthrobacter* sp. AD2 (de Jong, 2006), HheA iz *Corynebacterium* sp. N-1074 (Watanabe, 2015), HheB iz *Corynebacterium* sp. N-1074 (Watanabe, 2015) i HheC (de Jong, 2003) prema kojima je ustanovljena velika sličnost

u motivima sekundarne strukture. Kod monomera je vidljiv tipičan Rossmannov nabor, karakterističan i za druge SDR enzime, koji se sastoji od šest ili sedam β -nabranih ploča okruženih sa sedam ili osam α -uzvojnica (slika 2.6). Aktivno mjesto pojedinog monomera smješteno je unutar enzima i s okolinom povezano preko utora za vezanje supstrata čiji aminokiselinski ostatci utječu na enzimsku aktivnost i enantioselektivnost (Schallmey, 2013).

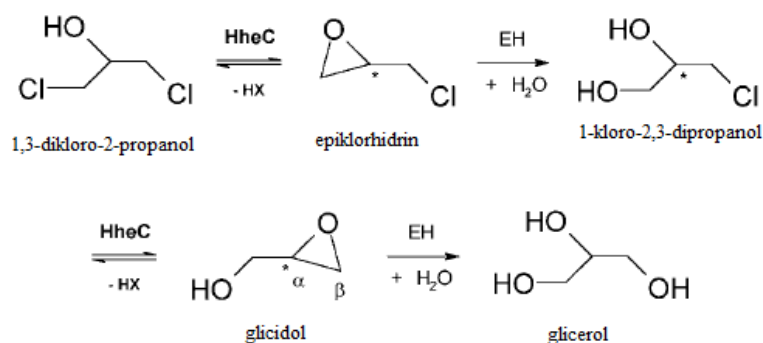


Slika 2.6 Tetramerna struktura HHDH (de Jong, 2003)

Enzim halogenhidrin-dehalogenaza iz bakterije *Agrobacterium radiobacter* AD1 (HheC) pokazuje visoku (*R*)-enantioselektivnost prema različitim alifatskim i aromatskim kratkolančanim supstratima, za koje se vjeruje da su rezultat neproduktivnog vezanja nepovoljnog (*S*)-enantiomera u prostorno ograničenom području za vezanje supstrata (Tang, 2012).

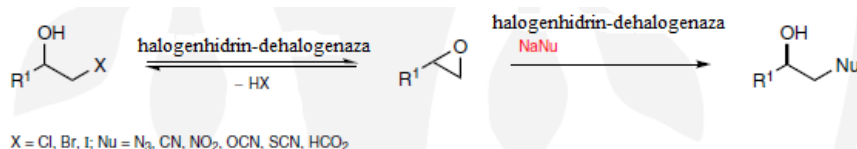
2.2.3 Produkti i industrijska primjena HHDH

Halogenhidrin-dehalogenaze kataliziraju intramolekulsku zamjenu halogena vicinalnom hidroksilnom skupinom u 1,3-dikloro-2-propanolu otpuštajući odgovarajući epoksid, halidni ion i proton (van Hylckama Vlieg, 2001). 1,3-dikloro-2-propanol je dobro poznato onečišćivalo često korišteno u industriji. Mutagen je i genotoksičan za bakterijske i stanice sisavaca zbog spontanog stvaranja reaktivnog epoksida epiklorhidrina (Hahn, 1991). Zajedno s epoksidom hidrolazom, halogenhidrin-dehalogenaza učinkovito pretvara 1,3-dikloro-2-propanol i epiklorhidrin u neotrovne produkte koje bakterija može koristiti kao izvor ugljika i energije (slika 2.7). Reakcije hidrolize epoksida katalizirane su epoksidnom hidrolazom (EH), a reakcije dehalogenacije katalizirane su halogenhidrin-dehalogenazom HheC (de Jong, 2003).



Slika 2.7 Mehanizam pretvorbe 1,3-dikloro-2-propanola iz *A. radiobacter* AD1

Halogenhidrin-dehalogenaze kataliziraju pretvorbu vicinalnih halo alkohola u epoksidge što je prikazano na slici 2.8. Također, učinkovito kataliziraju i povratnu reakciju, enantioselektivno i β -regioselektivno otvaranje epoksidnog prstena od strane nukleofila kao što su cijanid i azid (Nakamura, 1994; Lutje Spelberg, 2001). Zbog ovih karakteristika mogu se koristiti u sintezi alifatskih i aromatskih epoksida i haloalkohola kao i u sintezi azido-, cijano- i ostalih β -supstituiranih alkohola (Lutje Spelberg, 1999, 2002).



Slika 2.8 Reakcije otvaranja i zatvaranja prstena katalizirane halogenhidrin-dehalogenazama (Majerić Elenkov, 2014)

Pri kraju 1970.-ih godina, halogenhidrin-dehalogenaza iz *Flavobacterium* sp. korištena je u industrijskim procesima za proizvodnju propilen oksida iz propilena. Ovaj proces je prvi poznati proces biokonverzije za primjenu u petrokemijskoj industriji (Nagasawa, 1995). Proces je alternativa kemijskim procesima kao što je izravna oksidacija koja koristi skup i otrovan katalizator ili procesu preko halogenhidrina kao intermedijera koji koristi plinoviti halogen i stvara sporedne produkte (Geigert, 1983).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Aparatura

3.1.1 Analitička vaga

U ovom radu, svi uzorci vagani su na analitičkoj vagi proizvođača *Shimadzu* prikazanoj na slici 3.1.



Slika 3.1 Analitička vaga proizvođača *Shimadzu*

3.1.2 Kapljevinska kromatografija visokog učinka (HPLC)

Analiza uzoraka provedena je na HPLC-u s UV detektorom proizvođača *Shimadzu* prikazanom na slici 3.2



Slika 3.2 HPLC

3.1.3 Homogenizator

Svi uzorci su tijekom provedbe eksperimenta bili homogenizirani na uređaju *Biosan Vortex V-1 plus* prikazanom na slici 3.3



Slika 3.3 Uređaj *Biosan Vortex V-1 plus*

3.1.4 Magnetska miješalica

Za miješanje uzoraka korištena je magnetska miješalica *IKA-combimag reo* prikazana na slici 3.4



Slika 3.4 Magnetska miješalica

3.1.5 Centrifuga

Centrifugiranje uzoraka provodilo se na centrifugi *Biosan Combi-Spin FVL-2400N* prikazanoj na slici 3.5



Slika 3.5 Centrifuga

3.2 ANALITIČKE METODE

3.2.1 Mjerenje koncentracije reaktanata i produkata kapljevinskom kromatografijom visokog učinka (HPLC)

Tekućinska kromatografija visokog učinka (HPLC) je metoda koja se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i stacionarne faze u stupcu.

Princip rada HPLC-a je forsiranje prolaska analizirane tvari ili smjese kroz stupac pumpanjem mobilne faze pod visokim tlakom kroz sam stupac. Postupak predviđa unošenje malog volumena uzorka u tok mobilne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija, dolazi do različitog zadržavanja komponenata smjese. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, stacionarnoj fazi i sastavu mobilne faze. Vrijeme u kojem se tvar eluira (dođe do kraja stupca) naziva se retencijsko vrijeme i karakteristično je za određenu tvar (Settle, 1997). Prije mjerenja uzorka nepoznate koncentracije, potrebno je napraviti baždarni pravac. Svaka komponenta se različito vrijeme zadržava u koloni i na temelju toga se radi kvalitativna analiza. Nakon toga se za pojedine komponente rade baždarni pravci gdje je veličina odziva proporcionalna koncentraciji.

Za izradu baždarnog pravca uzima se alikvot od 10 µL otopine uzorka. Otopina uzorka se dobije vaganjem uzorka na analitičkoj vagi, otapanjem u odgovarajućem volumenu acetonitrila i vodi. Otopina uzorka razrijedi se u 190 µL acetonitrila i profiltrira kroz filter Chromafil Xtra H-PTFE 20/13. Takva otopina koristi se za izradu baždarnog pravca za oba uzorka, PNSHH (1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanol) i PNSO (*p*-nitrofenilstiren oksid).

Prilikom mjerenja na HPLC uređaju, kao stacionarna faza koristila se Phenomenex Kinetex kolona C18 dimenzija 250 mm x 4,6 mm. Kao mobilna faza koristili su se eluti A i B. Eluent A je voda s 0,1% trifluorooctene kiseline, a eluent B je acetonitril, voda i trifluorooctena kiselina u omjeru 80:20:0,095. Analiza se provodila sedam minuta uz protok 1,5mL/min. Kromatogrami i baždarni pravci za PNSHH dani su u prilogu 1, a za PNSO u prilogu 2.

3.3 Određivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u prisutnosti različitih organskih otapala

Halogenhidrin-dehalogenaza katalizira reakciju pretvorbe 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanola (PNSHH) u *p*-nitrofenilstiren oksid (PNSO) i aktivnost enzima praćena je preko produkta (PNSO), kapljevinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Primjer kromatografskog praćenja reakcije pretvorbe PNSHH u PNSO dan je u prilogu 3. Ispitivana je aktivnost enzima u sljedećim organskim otapalima: dimetil-sulfoksidu, metil tert-butil eteru, toluenu, *n*-heksanu, acetonitrilu i cikloheksanu. Iz nagiba pravca određena je volumna aktivnost prema formuli (1).

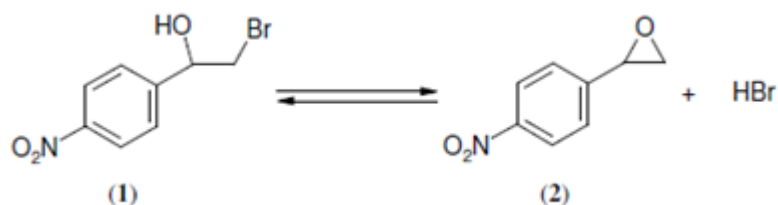
$$V.A. = \frac{dc}{dt} * V_r \quad (1)$$

Iz volumne aktivnosti izračunata je specifična aktivnost prema formuli (2).

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_e} \quad (2)$$

U navedenim jednadžbama, *V.A.* označava volumnu aktivnost enzima, *dc/dt* označava nagib pravca dobivenog HPLC metodom, *V_r* označava volumen reaktora u kojem se nalazi

reakcijska smjesa, V_e je volumen enzima dodanog u reakcijsku smjesu, $S.A.$ je specifična aktivnost enzima, γ_e je masena koncentracija enzima.



Slika 3.6 Reakcija pretvorbe PNSHH (1) u PNSO (2) katalizirana halogenhidrin-dehalogenazama

Kako bi se mogla izmjeriti aktivnost enzima, potrebno je prvo pripremiti otopine uzorka. Odgovarajuća masa uzorka PNSHH otopi se u odgovarajućem volumenu organskog otapala i pufera 500 mM Tris-SO₄ pH 7. Pripreme se Eppendorf epruvete sa 190 μ L acetonitrila. U reaktor se stavi organsko otapalo, uzorak i magneti . Zatim se neposredno prije dodatka enzima doda pufer i zatim 10 μ L enzima. Pokrene se štoperica i mjeri se vrijeme reakcije. Iz reaktora se uzme 10 μ L otopine i stavi u Eppendorf epruvetu s 190 μ L acetonitrila, zapiše se vrijeme i zatim se špricom uzima ta otopina i filtrira preko filtera Chromafil Xtra H-PTFE 20/13 u vijale. Sa svakom koncentracijom organskog otapala se radi po pet otopina i to su otopine pomoću kojih se mjeri aktivnost enzima na HPLC-u, odnosno koncentracije reaktanta i produkta. Uvjeti provedbe postupka potrebni za računanje volumne i specifične aktivnosti enzima prikazani su u tablici 3.1.

Tablica 3.1 Sastav reakcijske smjese u vijali za mjerenje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u prisustvu organskih otapala

$V_r / \mu\text{L}$	$c_{\text{PNSHH}} / \text{mM}$	% uk. org. ot.	$V_e / \mu\text{L}$	$\gamma_e / \text{mg mL}^{-1}$
500	5	5	10	5,46
500	5	10	10	5,46
500	5	20	10	5,46
500	5	35	10	5,46
500	5	50	10	5,46

3.3.1 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u dimetil-sulfoksidu

Ispitivana je aktivnost enzima s udjelima dimetil-sulfoksida od 2% do 50%. Za udio otapala od 2% do 20% potrebna nam je temeljna otopina PNSHH s 4%-tnim organskim otapalom, a za udio otapala 35% i 50% potrebna nam je temeljna otopina PNSHH u 100%-tnom organskom otapalu. Prva temeljna otopina se priređuje tako da se odgovarajuća količina PNSHH otopi u odgovarajućem volumenu organskog otapala i pufera, a druga temeljna otopina se priređuje otapanjem odgovarajuće mase PNSHH u odgovarajućem volumenu organskog otapala. Podaci potrebni za pripremu temeljnih otopina nalaze se u tablici 3.2

Tablica 3.2 Sastav temeljnih otopina u dimetil-sulfoksidu

	PNSHH, TO-1	PNSHH, TO-2
<i>m</i>(PNSHH)/ g	0,0036	0,0049
<i>V</i>(DMSO)/ μL	29,26	935
<i>V</i>(pufer)/ μL	702,24	0
<i>V_{uk}</i>/ μL	731,5	935

3.3.2 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u metil tert-butil eteru

Ispitivana je aktivnost enzima u udjelima otapala od 2% do 50%. Isto kao i kod dimetil-sulfoksida, za udjele otapala od 2% do 20% potrebna nam je temeljna otopina PNSHH s 4%-tnim organskim otapalom, a za udio otapala 35% i 50%, potrebna nam je temeljna otopina PNSHH sa 100%-tnim otapalom. Sastav temeljnih otopina prikazan je u tablici 3.3.

Tablica 3.3 Sastav temeljnih otopina u metil tert-butil eteru

PNSHH, TO-1		PNSHH, TO-2	
<i>m</i>(PNSHH)/ g	0,0043	0,0045	
<i>V</i>(MTBE)/ μL	34,95	914,4	
<i>V</i>(pufer)/ μL	838,82	0	
<i>V_{uk}</i>/ μL	873,77	914,4	

3.3.3 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u toluenu

Ispitivana je aktivnost enzima u toluenu u udjelima otapala od 2% do 100%. Za udjele otapala od 2% do 20% potrebna nam je temeljna otopina PNSHH s 4%-tnim organskim otapalom, a za udio otapala od 35% do 100%, potrebna nam je temeljna otopina PNSHH sa 100%-tnim otapalom. Temeljne otopine se prirede prema sastavu prikazanom u tablici 3.4. Pripremljene su dvije temeljne otopine sa 100%-tnim udjelom organskog otapala zbog nedovoljne količine prvotno pripremljene temeljne otopine.

Tablica 3.4 Sastav temeljnih otopina u toluenu

PNSHH, TO-1		PNSHH, TO-2	
<i>m</i>(PNSHH)/ g	0,0054	0,0044	0,0028
<i>V</i>(toluen)/ μL	43,89	894,09	568,97
<i>V</i>(pufer)/ μL	1053,4	0	0
<i>V_{uk}</i>/ μL	1097,3	894,09	568,97

3.3.4 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u *n*-heksanu

Ispitivana je aktivnost enzima u udjelima otapala od 2% do 100%. Za udjele otapala do 20% potrebna je temeljna otopina s 4%-tnim udjelom organskog otapala, a za udio otapala od 35% do 100% potrebna je temeljna otopina sa 100%-tnim udjelom otapala. Količine

pojedinih komponenata potrebnih za pripremu temeljnih otopina prikazane su u tablici 3.5. Uzorak je potrebno otopiti prvo u toluenu pošto u n-heksanu uzorak nije topljiv.

Tablica 3.5 Sastav temeljnih otopina u *n*-heksanu

PNSHH, TO-1		PNSHH, TO-2
<i>m</i>(PNSHH)/ g	0,0046	0,0050
<i>V</i>(toluen)/ μL	93,47	101,6
<i>V</i>(n-heksan)/ μL	37,39	914,4
<i>V</i>(pufer)/ μL	803,87	0
<i>V_{uk}</i>/ μL	934,73	1016,0

3.3.5 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u acetonitrilu

Ispitivana je aktivnost enzima u udjelima otapala od 2% do 50%. Za ispitivanje aktivnosti enzima u udjelima otapala do 20%, potrebna je temeljna otopina PNSHH s 4%-tnim udjelom organskog otapala, a za udio otapala 35% i 50% potrebna je temeljna otopina sa 100%-tnim udjelom otapala. Sastav temeljnih otopina prikazan je u tablici 3.6.

Tablica 3.6 Sastav temeljnih otopina u acetonitrilu

PNSHH, TO-1		PNSHH, TO-2
<i>m</i>(PNSHH)/ g	0,0046	0,0045
<i>V</i>(ACN)/ μL	37,4	914,41
<i>V</i>(pufer)/ μL	897,6	0
<i>V_{uk}</i>/ μL	935,0	914,41

3.3.6 Ispitivanje aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze u cikloheksanu

Ispitivana je aktivnost enzima pod utjecajem cikloheksana s udjelima od 2% do 100%. Za ispitivanje aktivnosti u udjelima otapala od 2% do 20%, potrebna je temeljna otopina PNSHH s 4%-tnim udjelom organskog otapala, a za udjele otapala od 35% do 100% potrebna je temeljna otopina PNSHH sa 100%-tnim udjelom otapala. Sastavi temeljnih otopina prikazani su u tablici 3.7. Uzorak je najprije potrebno otopiti u toluenu jer u cikloheksanu nije topljiv.

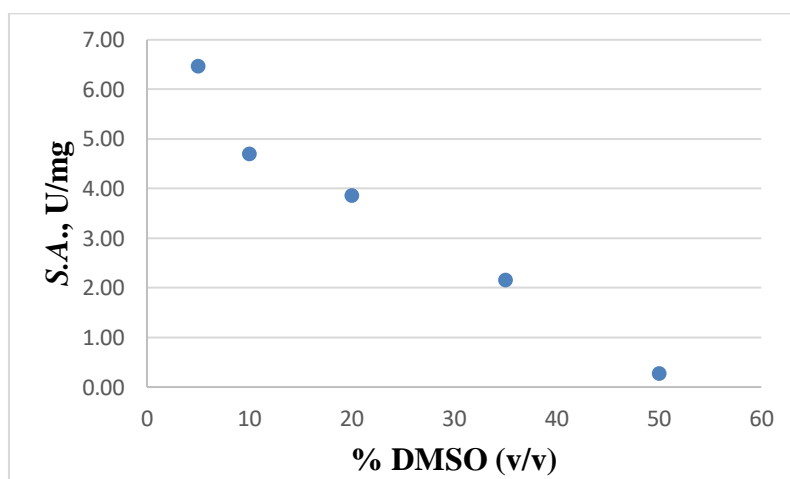
Tablica 3.7 Sastav temeljnih otopina u cikloheksanu

PNSHH,TO-1		PNSHH, TO-2
<i>m</i>(PNSHH)/ g	0,0048	0,0047
<i>V</i>(toluen)/ μL	97,54	95,51
<i>V</i>(cikloheksan)/ μL	39,01	859,55
<i>V</i>(pufer)/ μL	838,82	0
<i>V_{uk}</i>/ μL	975,37	955,05

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovome radu, provedeno je ispitivanje aktivnosti enzima halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem organskih otapala. Ispitivanje je provedeno pomoću reakcije pretvorbe 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanolu u *p*-nitrofenilstiren oksid koju katalizira enzim halogenhidrin-dehalogenaza. Proučavana je aktivnost halogenhidrin-dehalogenaze u šest organskih otapala: dimetil-sulfoksidu, metil tert-butil eteru, toluenu, *n*-heksanu, acetonitrilu i cikloheksanu.

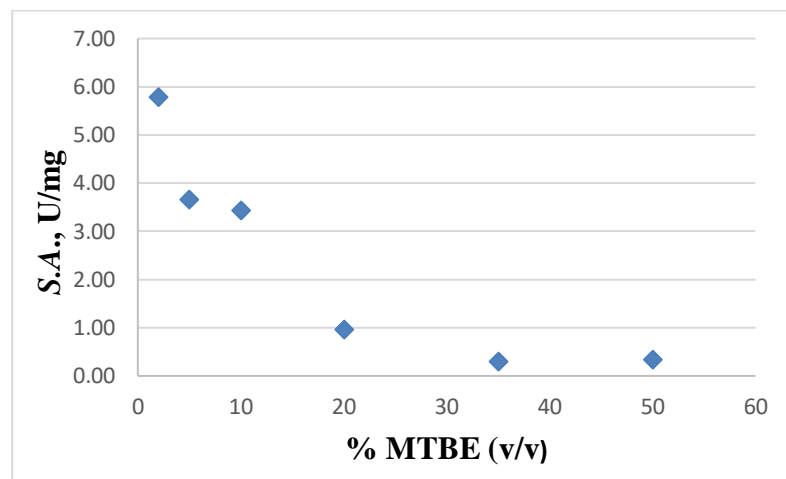
4.1 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pri različitim udjelima dimetil-sulfoksida u puferu



Slika 4.1 Ovisnost specifične aktivnosti o udjelu dimetil-sulfoksida u puferu

Prema slici 4.1, vidljiv je pad specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze s porastom udjela otapala. Što je više organskog otapala u uzorku, enzimu je aktivnost niža, a pri udjelu dimetil-sulfoksida od 50%, enzim gotovo gubi aktivnost.

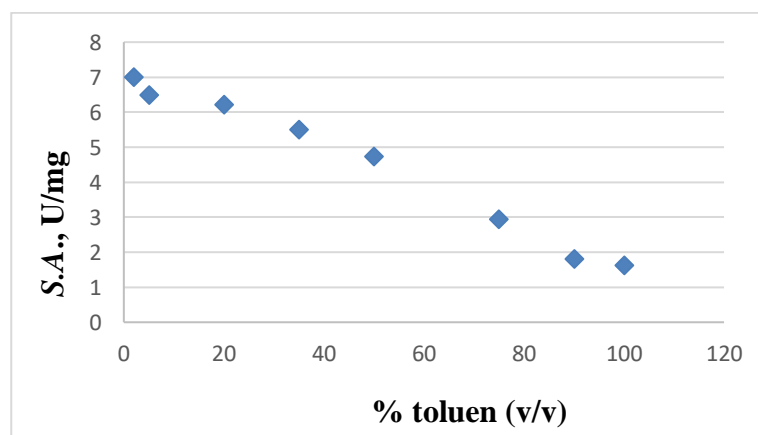
4.2 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pri različitim udjelima metil tert-butil etera



Slika 4.2 Ovisnost specifične aktivnosti o udjelu metil tert-butil etera u puferu

Na slici 4.2 se također vidi opadanje specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze s porastom udjela organskog otapala. Halogenhidrin-dehalogenaza već pod utjecajem 35%-tnog metil tert-butil etera pokazuje aktivnost blizu nuli.

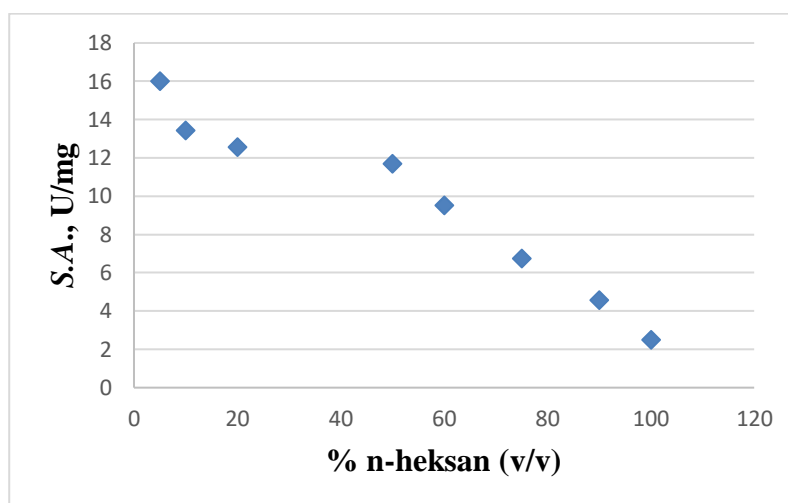
4.3 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem toluena



Slika 4.3 Graf ovisnosti specifične aktivnosti o udjelu toluena u uzorku

Na slici 4.3 je vidljiv pad specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze s porastom udjela toluena u puferu, međutim, halogenhidrin-dehalogenaza čak i pri udjelu otapala od 90% i 100% zadržava dosta visoku aktivnost, što je različito u odnosu na druge do sada prikazane rezultate, gdje je enzim gubio aktivnost na oko 50% udjela organskog otapala.

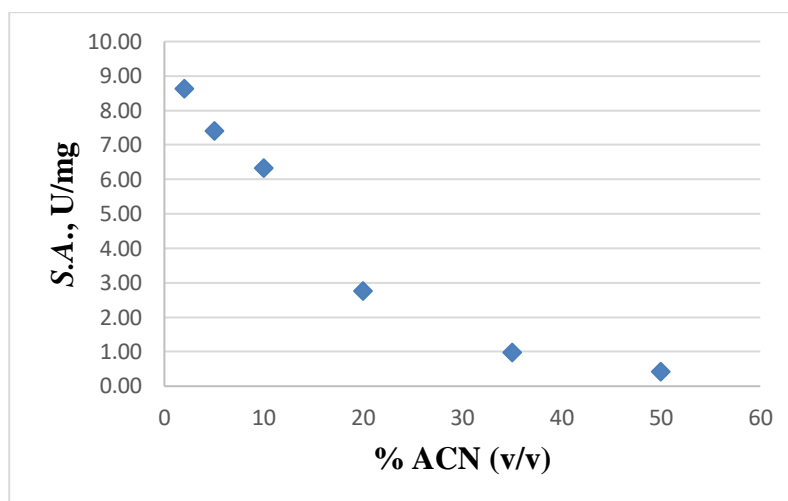
4.4 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem *n*-heksana



Slika 4.4 Ovisnost specifične aktivnosti o udjelu *n*-heksana u puferu

Na slici 4.4 može se uočiti vrlo pravilan trend opadanja specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze s porastom udjela organskog otapala. Ipak, enzim pod utjecajem *n*-heksana pokazuje vrlo visoku aktivnost kako pri malim udjelima otapala, tako i pri visokim udjelima otapala te zadržava aktivnost u čistom *n*-heksanu, baš kao i prethodno u toluenu.

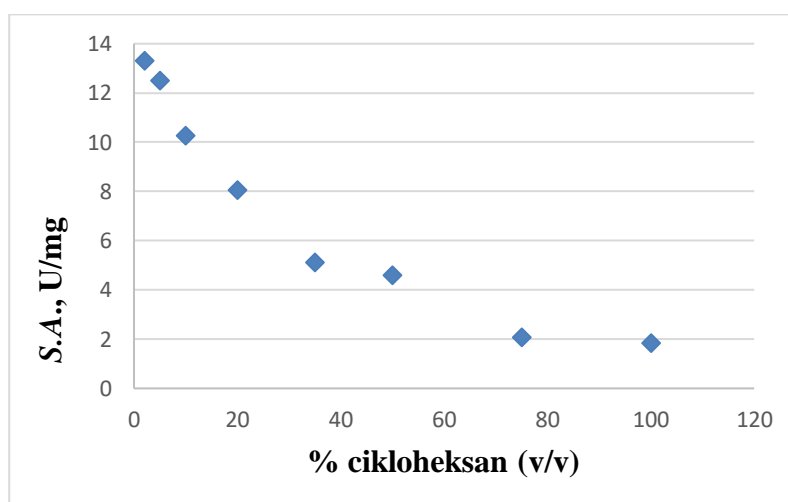
4.5 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem acetonitrila



Slika 4.5 Ovisnost specifične aktivnosti o udjelu acetonitrila u puferu

Graf na slici 4.5 prikazuje opadanje specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze s porastom udjela acetonitrila. Pri udjelu otapala od 50% enzim ima vrlo nisku aktivnost.

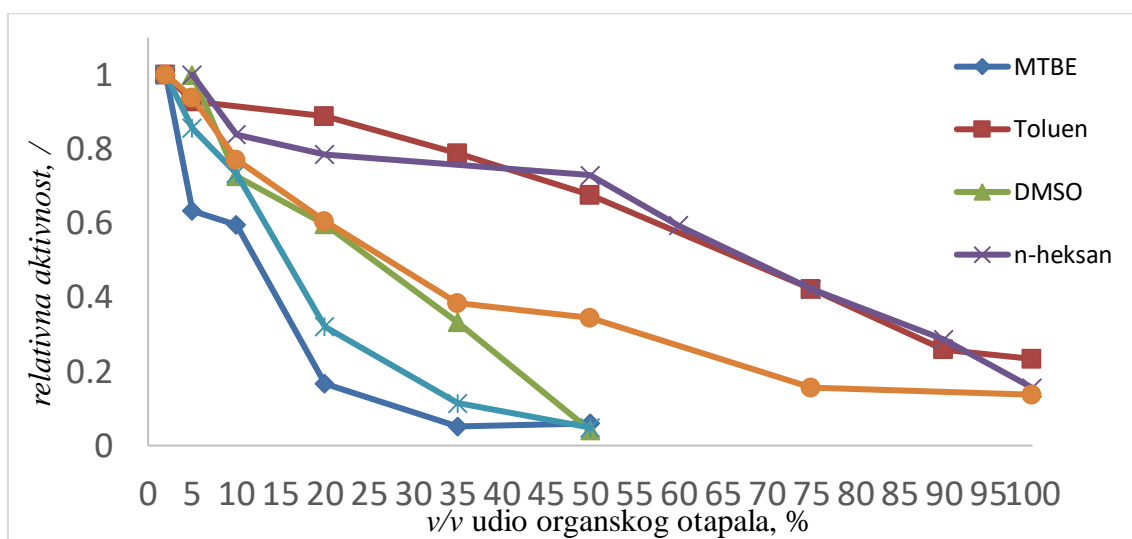
4.6 Specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem cikloheksana



Slika 4.6 Ovisnost specifične aktivnosti o udjelu cikloheksana u puferu

Na slici 4.6 prikan je pad specifične aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pri porastu udjela cikloheksana. Enzim zadržava vrlo visoku aktivnost i pri visokim udjelima otapala do 100%.

4.7 Usporedba aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem organskih otapala



Slika 4.7 Ovisnost relativne aktivnosti halogenhidrin-dehalogenaze o udjelu organskih otapala u puferu

Na slici 4.7 vidi se da se pod utjecajem svih organskih otapala s kojima se radilo relativna aktivnost smanjuje s porastom udjela organskog otapala. Ovaj graf usporedbe prikazuje relativne aktivnosti pošto specifične odstupaju jedne od drugih. Kod toluena, *n*-heksana i cikloheksana, vidljivo je da enzim halogenhidrin-dehalogenaza zadržava vrlo visoku aktivnost pri visokim udjelima tih otapala. Ono što povezuje ova tri otapala je njihova nemješljivost s vodom, odnosno nepolarnost. Time vjerojatno dolazi i do manje mogućnosti negativnog utjecaja na strukturu enzima, koji je izraženiji kod organskih otapala mješljivih s vodom. Aktivnosti enzima pod utjecajem dimetil-sulfoksida, acetonitrila i metil tert-butil etera vrlo su niske u prisutnosti 50%-tnih otapala, što potvrđuje ovu tvrdnju. Svako od navedena tri otapala se barem malo miješa s vodom.

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu provedeno je ispitivanje aktivnosti enzima halogenhidrin-dehalogenaze pod utjecajem organskih otapala. Ukoliko se promatra graf ovisnosti relativne aktivnosti o udjelima organskih otapala vidljivo je da aktivnost enzima pod utjecajem svih otapala opada s porastom njihovih udjela. Što je manja koncentracija otapala, enzim je aktivniji i dobiva se veća promjena koncentracije produkta *p*-nitrofenilstiren oksida (PNSO) u vremenu. Pod utjecajem *n*-heksana, cikloheksana i toluena, enzim halogenhidrin-dehalogenaza čak i pri 100%-tnom otapalu zadržava vrlo visoku aktivnost. Relativna aktivnost pri 100%-tnom toluenu iznosi 0,23, pri 100%-tnom *n*-heksanu iznosi 0,16 dok je pri 100%-tnom cikloheksanu ta aktivnost jednaka 0,14. S druge strane, enzim pokazuje vrlo niske aktivnosti pod utjecajem 50%-tnih dimetilsulfoksida, metil tert-butil etera i acetonitrila. Relativne aktivnosti pri 50%-tnim prethodno navedenim otapalima redom iznose: 0,04, 0,06, 0,05. Zbog vrlo niskih aktivnosti enzima pri 50%-tnim otapalima dimetilsulfoksida, metil tert-butil etera i acetonitrila, mjerenja se nisu provodila pri višim udjelima tih otapala. S porastom koncentracije organskog otapala, enzim ne pokazuje visoku aktivnost kao što bi pokazivao u vodenom mediju.

POPIS SIMBOLA

NAD^+ - nikotinamid adenin dinukleotid

NADP^+ - nikotinamid adenin dinukleotid
fosfat

FAD^+ - flavin adenin dinukleotid

FMN - flavin mononukleotid

N^3 - azid

CN^- - cijanid

NO_2^- - nitrit-ion

OCN^- - cijanat

$V.A.$ - volumna aktivnost

dc/dt - nagib pravca

V_r - volumen reaktora, μL

V_e - volumen enzima, μL

$S.A.$ - specifična aktivnost, U/mg

γ_e - masena koncentracija enzima, mg/mL

C_{PNSHH} - koncentracija 1-(p-nitrofenil)-2-bromoetanol, mM

% uk. org. ot. - udio ukupnog organskog
otapala

TO-1 - temeljna otopina 1

TO-2 - temeljna otopina 2

m - masa, g

V - volumen, μL

V_{uk} - ukupni volumen, μL

MTBE - metil tert-butil eter

DMSO - dimetil sulfoksid

ACN - acetonitril

6. LITERATURA

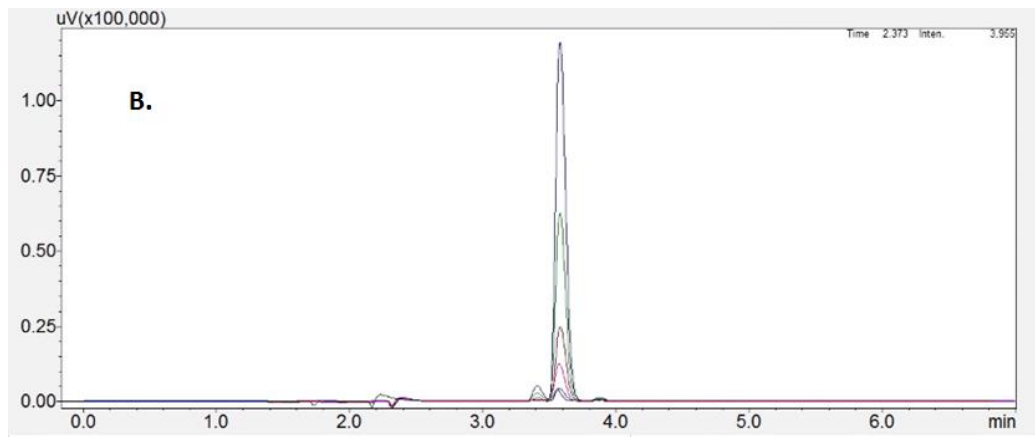
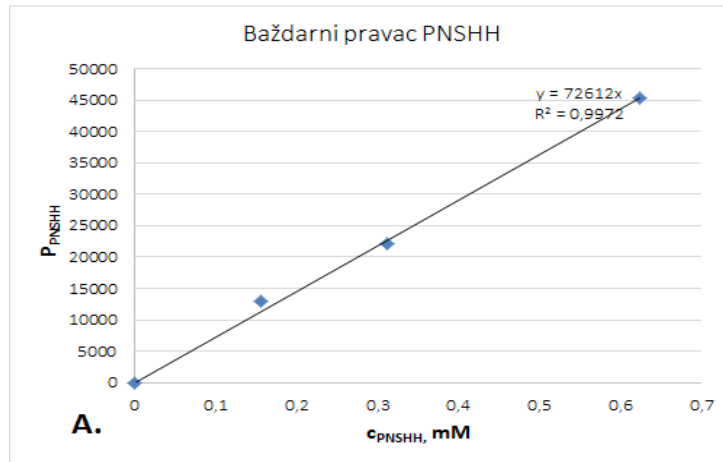
1. R. M. de Jong, K. H. Kalk, L. Tang, D. B. Janssen, B. W. Dijkstra; The X-ray structure of the haloalcohol dehalogenase HheA from *Arthrobacter* sp. strain AD2: Insight into enantioselectivity and halide binding in the haloalcohol dehalogenase family, *Journal of Bacteriology*, **188**, 4051–4056 (2006)
2. R. M. de Jong, J. J. W. Tiesinga, H. J. Rozeboom, K. H. Kalk, L. Tang, D. B. Janssen, B.W. Dijkstra; Structure and mechanism of a bacterial haloalcohol dehalogenase: A new variation of the short-chain dehydrogenase/reductase fold without an NAD(P)H binding site, *EMBO Journal*, **22**, 4933–4944 (2003)
3. K. Drauz, H. Waldmann; *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, Wiley, str. 363-387 (2002)
4. A. J. Effendi, S. D. Greenaway, B. N. Dancer; Isolation and characterization of 2,3-dichloro-1-propanol-degrading rhizobia, *Applied Environmental Microbiology*, **66**, 2882-2887 (2000)
5. J. Geigert, S. L. Neidleman, T. E. Liu, S. K. DeWitt, B. M. Panschar, D. J. Dalietod, E. R. Siegel; Production of Epoxides from alpha,beta-Halohydrins by *Flavobacterium* sp., *Applied Environmental Microbiology*, **45**, 1148-1149 (1983)
6. C. Guo, Y. Chen, Y. Zheng, W. Zhang, Y. Tao, J. Feng, L. Tang; Exploring the enantioselective mechanism of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by iterative saturation mutagenesis, *Applied Environmental Microbiology*, **81**, 2919–2926 (2015)
7. H. Hahn, E. Eder, C. Deininger; Genotoxicity of 1,3-dichloro-2-propanol in SOS chromotest and in the Ames test. Elucidation of genotoxic mechanism, *Chemichobiological Interactions*, **80**, 73-88 (1991)
8. T. P. Higgins, M. Majerić Elenkov, J. H. Lutje Spelberg, D. B. Janssen; Biochemical and molecular characterisation of the 2,3-dichloro-1-propanol dehalogenase and stereospecific haloalkanoic dehalogenases from a versatile *Agrobacterium* sp. *Biodegradation*, **16**, 485–492 (2005)

9. A. Illanes; Enzyme Biocatalysis - Principles and Applications, Springer Verlag, str. 1-29 (2008)
10. D.B. Janssen; Halohydrin dehalogenase; Biotransformation and Biocatalysis, Research, University of Groningen, str.1-6 (2017)
11. J. Koopmeiners, B. Halmschlag, M. Schallmey, A. Schallmey; Biochemical and biocatalytic characterization of 17 novel halohydrin dehalogenases. Applied Microbiology and Biotechnology, **100**, 7517–7527 (2016)
12. M. Kuddus; Enzymes in Food Biotechnology- Production, Applications and Future Prospects, Elsevier, str. 1-10 (2019)
13. J. H. Lutje Spelberg, L. Tang, M. van Gelder, R. M. Kellogg, D. B. Janssen; Exploration of the biocatalytic potential of a halohydrin dehalogenase using chromogenic substrates, Tetrahedron: Asymmetry, **13**, 1083-1079 (2002)
14. J. H. Lutje Spelberg, J. E. T. van Hylckama Vlieg, T. Bosma, R. M. Kellogg, D. B. Janssen; A tandem enzyme reaction to produce optically active halohydrins, epoxides and diols, Tetrahedron: Asymmetry, **10**, 2863-2870 (1999)
15. J. H. Lutje Spelberg, J. E. van Hylckama Vlieg, L. Tang, D. B. Janssen, R. M. Kellogg; Highly enantioselective and regioselective biocatalytic azidolysis of aromatic epoxides, Organic Letters, **3**, 41-43 (2001)
16. M. Majerić Elenkov, W.Szymański, D.B. Janssen; Reactions Catalyzed by Halohydrin Dehalogenases, str. 1-22 (2014)
17. T. Nagasawa, H. Yamada; Microbial Production of Commodity Chemicals, Pure and Applied Chemistry, **67**, 1241-1256 (1995)
18. T. Nakamura, T. Nagasawa, F. Yu, I. Watanabe, H. Yamada; A new enzymatic synthesis of (R)- γ -chloro- β -hydroxynitrile, Tetrahedron, **50**, 11821-11826 (1994)
19. S.H. Pine; Organic Chemistry - Fifth Edition, McGraw-Hill, str. 844-849 (1987)
20. M. Schallmey, R. J. Floor, W. Szymanski, D. B. Janssen; 7.8 Hydrolysis and Reverse Hydrolysis: Halohydrin Dehalogenases, Elsevier , str. 143-155 (2012)

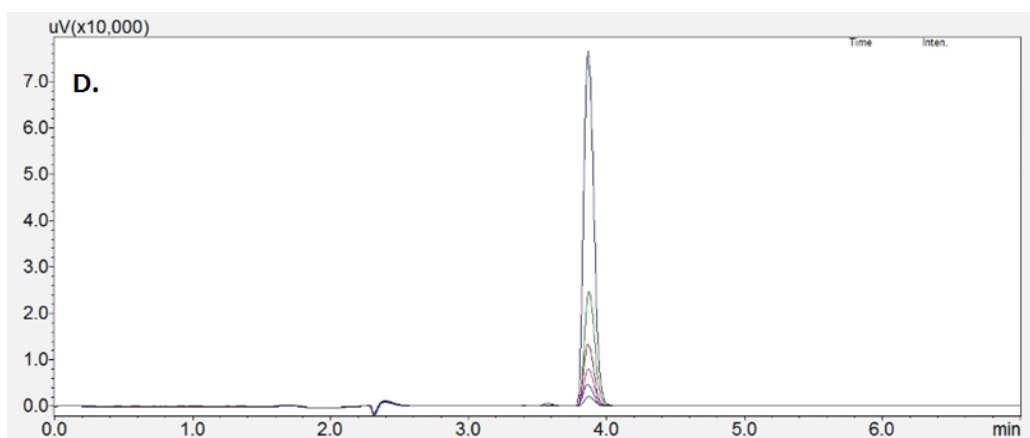
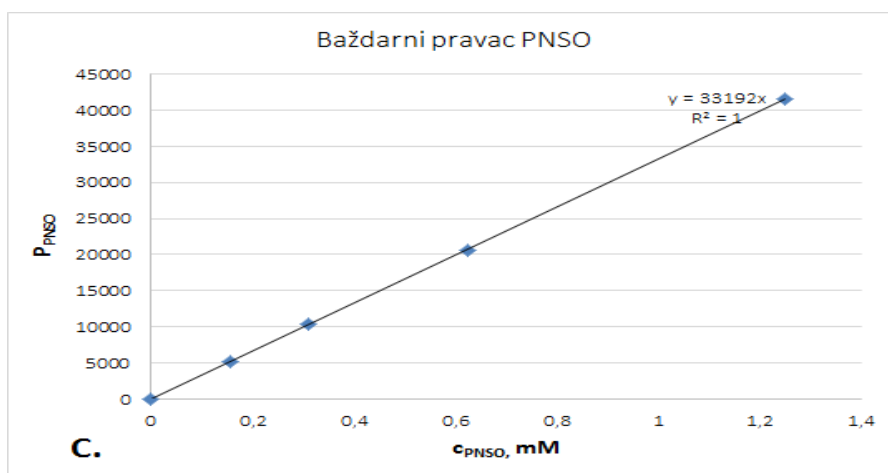
21. M. Schallmeyer, R. J. Floor, B. Hauer, M. Breuer, P. A. Jekel, H. J. Wijma, B. Dijkstra, D. B. Janssen; Biocatalytic and Structural Properties of a Highly Engineered Halohydrin Dehalogenase, *ChemBioChem*, **14**, 870–881 (2013)
22. F. A. Settle; *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, str. 147-165 (1997)
23. S. Shoda, H. Uyama, J. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi; Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis, *Chemical reviews*, **116**, 2307-2413 (2015)
24. L. Tang, X. Zhu, H. Zheng, R. Jiang, M. Majerić Elenkov; Key Residues for Controlling Enantioselectivity of Halohydrin Dehalogenase from *Arthrobacter* sp. Strain AD2, Revealed by Structure-Guided Directed Evolution, *Applied Environmental Microbiology*, **78**, 2631-2637 (2012)
25. J. E. T. van Hylckama Vlieg, L. Tang, J. H. Spelberg, T. Smilda, G. J. Poelarends, T. Bosma, A. E. J. van Merode, M. W. Fraaije, D. B. Janssen; Halohydrin dehalogenases are structurally and mechanistically related to short-chain dehydrogenases/reductases, *Journal of Bacteriology*, **183**, 5058-5066 (2001)
26. D. Voet, J. G. Voet, C.W. Pratt; *Fundamentals of Biochemistry- Life at the molecular level*, Fifth Edition, str. 322-402 (2016)
27. F. Watanabe, F. Yu, A. Ohtaki, Y. Yamanaka, K. Noguchi, M. Yohda, M. Odaka; Crystal structures of halohydrin hydrogen-halide-lyases from *Corynebacterium* sp. N-1074, *From Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, **83**, 2230–2239 (2015)
28. F. Yu, T. Nakamura, W. Mizunashi, I. Watanabe; Cloning of Two Halohydrin Hydrogen-Halide-Lyase Genes of *Corynebacterium* sp. Strain N-1074 and Structural Comparison of the Genes and Gene Products, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **58**, 1451–1457 (1994)

7. PRILOG

PRILOG 1. A. Baždarni pravac i **B.** Kromatogram za PNSHH 0,16 mM – 10 mM



PRILOG 2. C Baždarni pravac i **D.** Kromatogram za PNSO 0,16 mM – 10 mM



PRILOG 3. Primjer kromatografskog praćenja reakcije prevorbe PNSHH u PNSO

