Sinteza oksazolidinona u prisustvu halogenhidrin dehalogenaze

Cvetić, Barbara

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:658169

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-28**

FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Barbara Cvetić

SINTEZA OKSAZOLIDINONA U PRISUSTVU HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZE

ZAVRŠNI RAD

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

Članovi ispitne komisije: prof. dr. sc. Zvjezdana Findrik Blažević
dr. sc. Martina Sudar, zn. sur.
prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, rujan 2018.

SAŽETAK

U ovome radu istraživana je reakcija sinteze oksazolidinona u prisustvu enzima halogenhidrin-dehalogenaze. Reakcija je, radi istraživanja kinetike, promatrana kao višestupnjevita reakcija. Kinetika reakcije određivana je metodom početnih reakcijskih brzina. Na temelju prikupljenih rezultata procijenjeni su kinetički parametri modela koji su služili kao temelj za izradu kinetičkog modela reakcije.

Ključne riječi: cijanati; enzimska kataliza; epoksid; halogenhidrin-dehalogenaza; oksazolidinon

ABSTRACT

This work investigated the reaction of oxazolidinone synthesis in the presence of halogenhydrin-dehalogenase enzyme. The reaction was, for the sake of kinetic research, observed as a multistep reaction. Kinetics of the reaction was determined by the method of initial reaction rates. Based on the collected results, the kinetic parameters of the model used as the basis for the kinetic modeling reaction were estimated.

Keywords: cyanates; enzyme catalysis; epoxides; halohydrindehalogenase; oxazolidinone

Sadržaj

1. UVOD 1
2. OPĆI DIO 2
2.1. Biokataliza 2
2.1.1. Mediji u kojima se provodi biokataliza 2
2.1.2. Mehanizam djelovanja biokatalizatora 3
2.1.3. Biokataliza u industriji 4
2.2. Enzimi 4
2.2.1. Struktura enzima 5
2.2.2. Djelovanje enzima kao biokatalizatora 5
2.2.3. Podjela enzima 6
2.3. Enzim halogenhidrin-dehalogenaza 7
2.4. Primjena matematičkih modela 8
2.4.1. Michaelis-Menteničina kinetika 9
3. EKSPERIMENTALNI DIO 12
3.1. Aparatura 12
3.1.1. Analitička vaga 12
3.1.2. Magnetska miješalica 12
3.1.3. Miješalica 13
3.1.4. Plinski kromatograf 13
3.1.5. Spektrofotometar 14
3.2. Analitičke metode 15
3.2.1. Plinska kromatografija 15
3.2.2. Određivanje proteina po Bradford-u 15
3.3. Određivanje kinetike reakcije 16
3.3.1. Reakcijski sustav 16
3.3.1. Određivanje kinetike pojedinih stupnjeva reakcije 16
3.3.2. Priprema uzoraka za analizu 17
3.4. Validacija modela 18
4. REZULTATI I RASRAVA 19
4.1. Prikaz provedenih reakcija prilikom sinteze oksazolidinona uz prisutan enzim halogenhidrin-dehalogenazu 19
4.2. Kinetika 1. stupnja reakcije (S)-epoksida s cijanatom uz HheC 21
4.3. Kinetika 2. stupnja reakcije (S)-epoksida s NaBr uz HheC 23
4.4. Kinetika 1. stupnja reakcije (R)-epoksida s cijanatom uz HheC 25
4.5. Kinetika 2. stupnja reakcije (R)-epoksida s NaBr uz prisutnost HheC 27
4.6. Kinetika 3. stupnja reakcije s dibromalkoholom 29
5. ZAKLJUČAK 30
6. LITERATURA 31
POPIS SIMBOLA 33
PRILOG 34
7. ŽIVOTOPIS 37

Zahvala

Veliko hvala mojoj mentorici prof. dr. sc. Zvjezdani Findrik-Blažević na predloženoj temi i pomoći oko izrade završnog rada, kao i kolegici Neveni Milčić na pomoći u izradi eksperimentalnog dijela kao i na brojnim savjetima prilikom samog pisanja. Također se zahvaljujem svojoj obitelji na podršci.

1. UVOD

Kataliza je proces koji povećava brzinu kojom reakcija doseže ravnotežu. Budući da brzina reakcije ovisi o slobodnoj energiji aktivacije, katalizator uzrokuje smanjenje energetske barijere i ubrzava katalitičku fazu. Enzimi su molekule koje mogu smanjiti energiju aktivacije reakcije i tako ubrzati biokemijske reakcije koje se odvijaju u stanici. Dakle, funkcionalnost stanice, odnosno njena reprodukcija zahtijeva da se sve reakcije odvijaju u koordiniranoj i kontroliranoj sinergiji (Saibi et al., 2012).

Optički čisti spojevi su vrijedni 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). Među enzimima koji se intenzivno proučavaju je do izražaja došla halogenhidrin-dehalogenaza HheC, opsežno proučavana zbog svoje visoke enzimatske aktivnosti i visoke *R*-enantioselektivnosti prema nekim kratkotrajnim alifatskim i aromatskim supstratima (Guo, 2015). Za razvoj procesa te za postizanje industrijski relevantnih koncentracija produkta inženjerski pristup je vrlo koristan. Posebice je korisno matematičko modeliranje radi optimiranja reakcijskih uvjeta i odabira reaktora (Vasić-Rački i dr., 2011).

2. OPĆI DIO

2.1.Biokataliza

Općenito može biti definirana kao uporaba enzima ili cijelih stanica kao biokatalizatora za industrijsku sintetsku kemiju. Slično kao i drugi katalizatori, biokatalizatori povećavaju brzinu u kojoj se odvija reakcija, ali ne utječu na termodinamiku reakcije (Johannes, 2006).

Biokataliza se može provesti upotrebom cijele stanice ili izoliranih enzima u slobodnom ili imobiliziranom obliku (Nikolova, 1993). U usporedbi s cijelim stanicama, izolirani enzimi nude nekoliko prednosti, uključujući jednostavnije reakcijske aparate, veću produktivnost uslijed veće koncentracije katalizatora i jednostavnije pročišćavanje produkta. Sve donedavno, u industrijske svrhe su se mogli koristiti samo enzimi proizvedeni u stanicama. Cijele stanice se obično koriste kada specifična biotransformacija zahtijeva više enzima ili kad je teško izolirati pojedine enzime. Sustav cijelih stanica ima prednost nad izoliranim enzimima u tome što nije potrebno reciklirati kofaktore (Johannes, 2006).

2.1.1. Mediji u kojima se provodi biokataliza

Povijesno gledano, enzimi su se opsežno koristili u vodenim medijima. Enzimi su prikladni za prirodni vodeni okoliš; međutim, biotransformacije u industrijskoj sintezi često uključuju organske molekule netopive u vodi. Još važnije, zbog visoke točke vrelišta i visoke topline isparavanja, voda je obično najmanje željeno otapalo kao izbor za većinu organskih reakcija. Stoga je poželjno prebacivanje enzimskih reakcija iz vodenog u organski medij (Johannes, 2006).

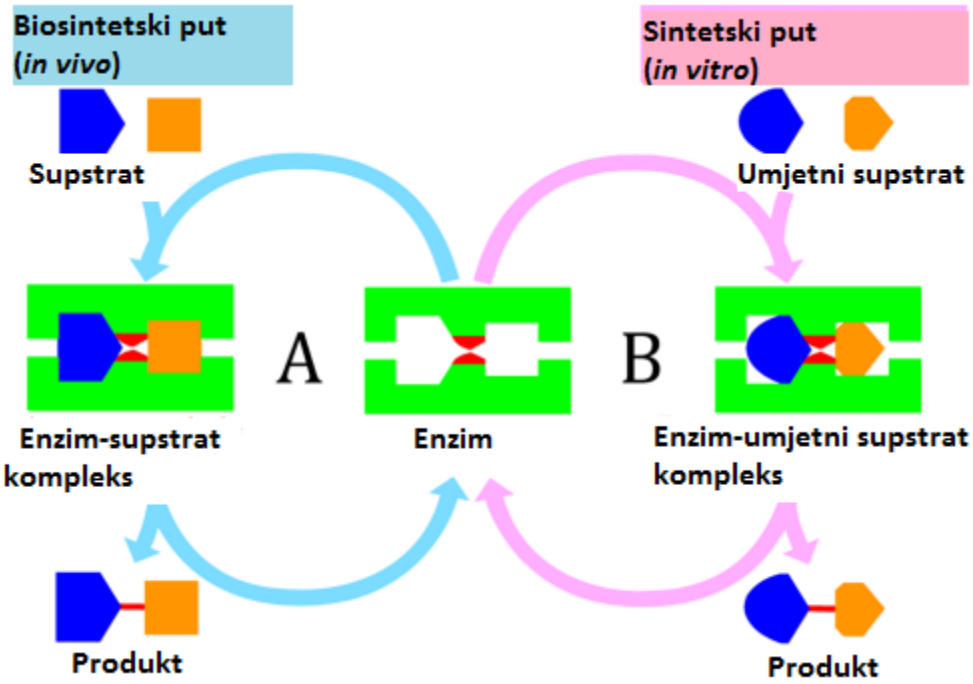
Biokataliza u organskim medijima razvijena je kao posljedica slabe topljivosti mnogih organskih spojeva, koji su od komercijalnog interesa, u vodenim medijima te mogu biti transformirani enzimima ili mikroorganizmima. Prednosti vodenih / nepolarnih medija pri proizvodnji slabo topljivih spojeva u vodi uključuju i održavanje niske koncentracije toksičnih i inhibirajućih spojeva u vodenoj fazi (Leon, 1998).

Uobičajeni je uvjet za industrijski proces postići koncentracije proizvoda usporedive s kemijskim procesima od najmanje 50-100 g/dm^3 (Rozzell, 1999). Biokataliza se često koristi sintezu spojeva koji sadrže jedan ili više kiralnih centara.

Budući da se to može obaviti u blagim uvjetima i selektivno, biokatalitički korak može biti postavljen kasno u sintezi (Woodley et.al., 2006).

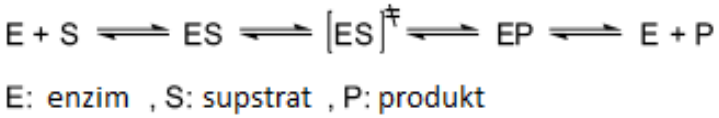
2.1.2. Mehanizam djelovanja biokatalizatora

E. Fischer je 1894. predložio teoriju "ključ i brava", što se odnosi na specifične odnose između enzima i supstrata.



Slika 2.1. Shematski izraz za teoriju "ključ i brava" za in vivo enzimatske reakcije putem biosintetskog puta (ciklus A) i za in vitro enzimatske reakcije putem nebiosintetskih putova (ciklus B)

U reakciji in vivo (ciklus A, slika 2.1.), prirodni supstrat specifično prepoznaje enzim za stvaranje kompleksa enzim-supstrat. Nastajanje kompleksa uzrokovano je supramolekularnom interakcijom i aktivira supstrat koji dovodi do reakcijskog produkta sa savršenom kontrolom selektivnosti. U in vitro reakciji (ciklus B, slika 2.1.), enzim mora prepoznati umjetni supstrat kako bi se stvorio enzimski umjetni supstratni kompleks, a zatim se supstrat aktivira kako bi reakcija nastavila. To dovodi do stvaranja proizvoda sa savršenim kontroliranjem selektivnosti reakcije.



Slika 2.2. Mehanizam enzimske reakcije in vivo

Enzim (E) i supstrat (S) tvore kompleks (ES) kroz ključ – brava interakciju, koja aktivira supstrat čime se dolazi do prijelaznog stanja ([ES] ‡) kako bi se reakcija nastavila. Aktivacijska energija uvelike se snižava djelovanjem enzima (Shoda et.al., 2015).

2.1.3. Biokataliza u industriji

Broj industrijskih procesa sinteze kemikalija, farmaceutskih i agrokemijskih međuprodukata i aktivnih komponenti lijekova koji koriste biološke katalizatore i dalje raste.

Povećanje uporabe biokatalizatora posebno je vidljivo u procesima poput proizvodnje akrilamida, fruktoze, L-jabučne i asparaginske kiseline, pa sve do sinteze visoko-kompleksnih intermedijera i lijekova. Trenutna ekspanzija se u velikoj mjeri može pripisati razvitku molekularne biologije kao i napretku u tehnologiji te uporabi novijih instrumenata koji su doveli do principa usmjerene evolucije biokatalizatora, te njihovog inženjeringa kako bi se povećala i prilagodila njihova aktivnost i selektivnost.

Bolja dostupnost katalizatora s vrhunskim kvalitetama u kombinaciji s novim biomedicinskim alatima značajno je doprinjela razvoju novih industrijskih procesa (Zaks, 2001).

2.2. Enzimi

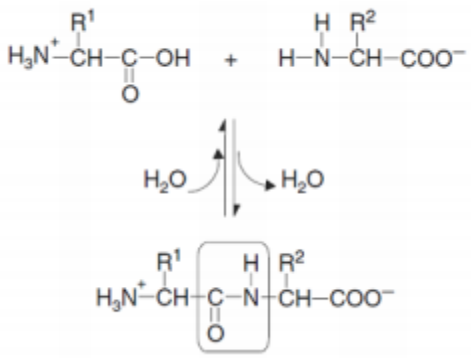
Enzimi su proteini koji se sastoje od brojnih aminokiselinskih ostataka čija se brojčana vrijednost kreće od stotinjak pa do nekoliko stotina. Ovisno o prirodi R skupine, aminokiseline mogu biti nepolarne (hidrofobne) ili polarne (s nabojem ili bez naboja) i njihova raspodjela uzduž proteinske molekule određuje njihovo ponašanje.

Većini enzima potrebne su manje molekule kako bi oni mogli funkcionirati kao katalizatori. Te molekule zovu se koenzimi ili kofaktori. Koenzimi su organske molekule male molekulske mase koje se reverzibilno vežu s enzimima i nisu dio njihove strukture. Koenzimi vezani za enzime sudjeluju u samoj reakciji te se iz tog razloga ponekad nazivaju i kosupstrati.

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

2.2.1. Struktura enzima

Aminokiseline se kovalentno vežu preko peptidne veze koja se formira između ugljikovog atoma karboksilne skupine jedne aminokiseline i atoma dušika α-amino skupine druge aminokiseline što je prikazano na slici 2.3.

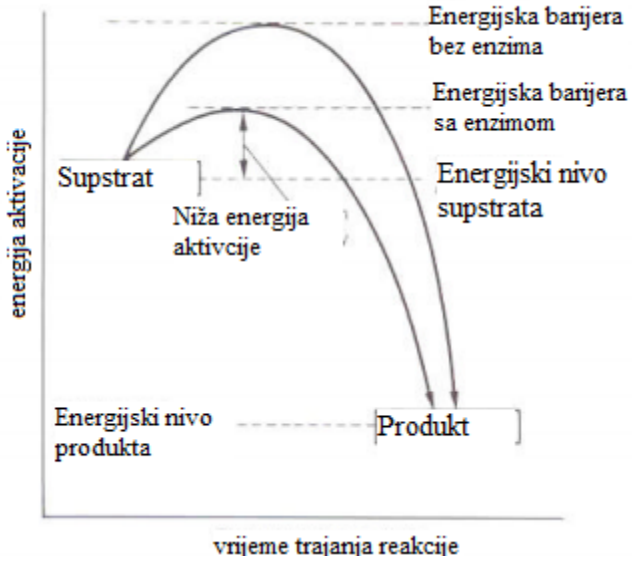


Slika 2.3. Formiranje peptidne veze između dvije α-aminokiseline

Enzimska aktivnost, to jest kapacitet enzima da katalizira kemijsku reakciju, strogo ovisi o njegovoj molekularnoj strukturi. Enzimska aktivnost oslanja se na postojanje pravilne strukture aktivnog mjesta koje se sastoji od manjeg broja aminokiselinskih ostataka koji su bliski trodimenzijskoj strukturi proteina (Ilianes, 2008).

2.2.2. Djelovanje enzima kao biokatalizatora

Enzimski katalizatori odnosno biokatalizatori djeluju tako da smanje energetsku barijeru biokemijske reakcije kao što je prikazano na slici 2.4. Enzimi iz reakcije izlaze nepromijenjeni (Ilianes, 2008).



Slika 2.4. Utjecaj enzima na energiju aktivacije

2.2.3. Podjela enzima

Enzimi se prema IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) dijele u idućih 6 skupina:

1. Oksidoreduktaze – enzimi koji kataliziraju oksidacijsko/redukcijske reakcije koje uključuju prijenos elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma. Postoje 22 podvrste, odkojih su za industriju najznačnije dehidrogenaze koje oksidiraju supstrat prijenosom vodikova atoma na koenzim (NAD^+, $NADP^+$, FAD^+) koji djeluje kao akceptor.
2. Transferaze – enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalne skupine s donora na prihvatljivog akceptora. Postoji 9 podvrsta, ovisno o kemijskoj prirodi skupine koja se prenosi. 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 zahtjevaju koenzime za rad.

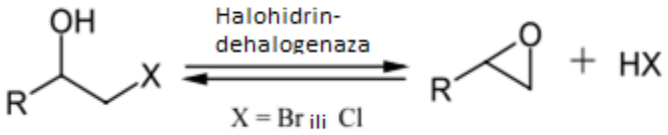
5. Izomeraze – enzimi koji kataliziraju reakcije konverzije supstrata u izomer, tj. spoj s istim brojem i tipom atoma. Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu izomera koji se proizvodi.

6. Ligaze – enzimi koji kataliziraju reakcije kovalentnog povezivanja dvaju molekula. Postoji 6 podvrsta, ovisno o tipu veze koja se formira (Ilianes, 2008).

2.3. Enzim halogenhidrin-dehalogenaza

Halogenhidrin-dehalogenaze su enzimi koji pretvaraju vicinalne halohidrine u epoksid, halidni ion i proton. Oni uklanjaju halogene supstituente kako bi se uklonile toksične tvari sa spojeva i dopuštaju im da uđu u središnji metabolizam. Oni također kataliziraju reverznu reakciju s alternativnim nukleofilima (N_3^- , CN^- , NO_2^-) (Janssen, 2017).

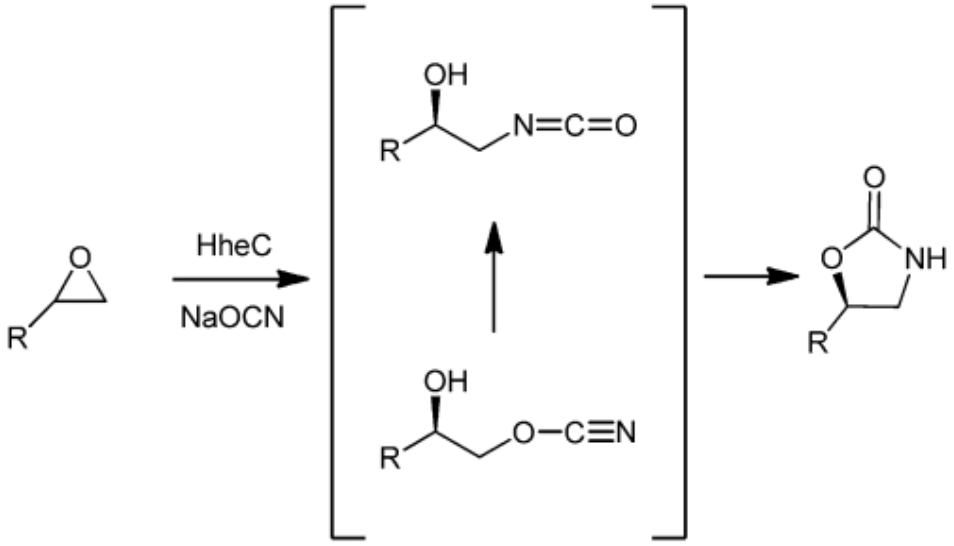
Enzim pokazuje visoku (*R*)-enantioselektivnost prema različitim alifatskim i aromatskim kratkolančanim supstratima, za koje se vjeruje da su rezultat neproduktivnog vezanja nepovoljnog (*S*)-enantiomera u prostorno ograničenom području za vezanje supstrata. Halogenhidrin-dehalogenaze kataliziraju zatvaranje prstena susjednog halogenhidrina i reverznu reakciju, otvaranje prstena epoksidom halidom što je prikazano na slici 2.5.



Slika 2.5. Halogenhidrin-dehalogenaze kataliziraju zatvaranje prstena susjednog halohidrina i reverznu reakciju (Tang, 2012)

Ova klasa enzima može se koristiti za pripremu različitih optički aktivnih epoksida i halogenhidrina.

Dok otvaranje prstena epoksida azidom, nitritom i cijanidom katalizirano enzimom halogenhidrin-dehalogenazom daje beta-supstituirane alkohole, reakcija s cijanatom nastavljena preko izocijanat-cijanat kompleksa uz brzu ciklizaciju daje 2-oksazolidinon kao krajnji produkt što je prikazano na slici 2.4.



Slika 2.6. Transformacija epoksida u oksazolidinon pomoću halogenhidrin-dehalogenaze (Spelberg, 2002)

2.4. Primjena matematičkih modela

Biokatalitički procesi su na mnogo načina slični konvencionalnim kemijskim procesima. Najznačajnija je razlika u tome što biokatalitički procesi moraju uzeti u obzir enzimsku kinetiku i operacijsku stabilnost enzima. Prije nekoliko godina modeliranje nije bilo tako važno za industriju. Mislilo se da je to zanimljivo samo znanstvenicima. No, u današnje vrijeme s potražnjom za brzim razvojem biokatalitičkih procesa, situacija se brzo mijenja.

Sin, Woodley i Gernaey klasificirali su matematičke modele na području biokatalize u sljedeća četiri područja :

- Biokatalizator: modeli koji opisuju katalizu na molekularnoj razini
- Reakcija: modeli kinetike koji opisuju mehanizam i brzinu reakcije.
- Reaktor: modeli koji opisuju promatranu kinetiku reakcije koja uključuje bilancu tvari, kao i hidrodinamičke uvjete u reaktoru.
- Proces: modeli koji uključuju interakciju između različitih operacija jedinica uključenih u tijek procesa.

U literaturi postoji mnogo radova koji opisuju modeliranje enzimske kinetike temeljene na najjednostavnijem enzimskom reakcijskom mehnizmu koji se sastoji od vezivanja i katalitičkog koraka. Svrha takvog istraživanja je stjecanje znanja o mehanizmu reakcije enzima, brzini reakcije i procjena kinetičkih parametara (Vasić-Rački i dr, 2011).

2.4.1. Michaelis-Menteničina kinetika

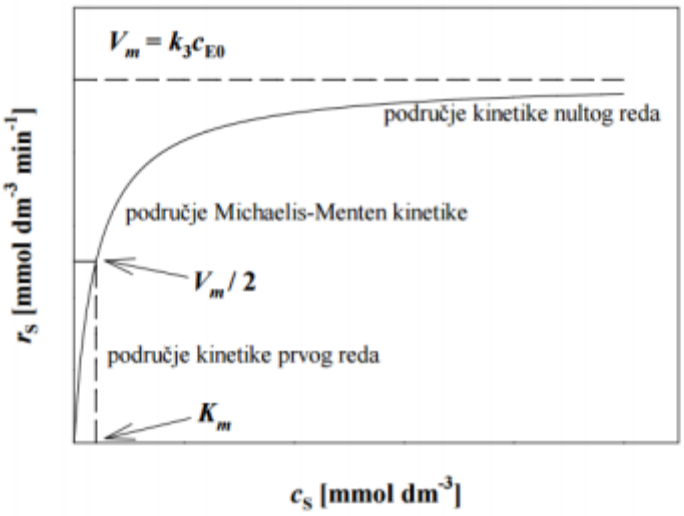
Michaelis-Mentiničin kinetički model razvili su njemački biokemičar Leonor Michaelis i kanadska fizičarka Maud Menten. Ovaj model daje korelaciju između brzine enzimske reakcije i koncentracije supstrata te se može opisati sljedećim izrazom (jed.2.1.):

$$r_s = V_m * \frac{c_s}{K_m^s + c_s} \qquad (2.1.)$$

gdje r_s predstavlja brzinu reakcije (mmol/dm^3 min), *Vm* maksimalnu brzinu reakcije (mmol/dm^3 min), c_s koncentraciju supstrata (mmol/dm^3) i K_m^s koja predstavlja Michaelis-Menteničinu konstantu (mmol/dm^3). Parametar V_m pokazuje ovisnost o koncentraciji enzima i ta ovisnost je dana sljedećim izrazom (jed. 2.2.):

$$V_m = k_3 * c_{E0} \qquad (2.2.)$$

gdje je k_3 katalitička konstanta enzima (min^{-1}) , c_{E0} početna koncentracija enzima (mmol/dm^3). Na slici 2.6. jest prikazan dijagram ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata koja je dana Michaelis-Menteničinim kinetičkim modelom predstavljena hiperbolnom krivuljom.



Slika 2.7. Ovisnost reakcijske brzine o koncentraciji supstrata kod Michaelis-Menteničine kinetike

Iz dijagrama je vidljivo kako Michaelis-Menteničina jednadžba opisuje tri područja brzine reakcije. Područje kinetike prvog reda opisuje linearnu ovisnost reakcijske brzine r_s o koncentraciji supstrata c_s pri niskim koncentracijama te se upravo iz tog razloga može tako i aproksimirati ($c_s << K_m^s$). S druge strane područje viših koncentracija aproksimira se kinetikom nultog reda ($c_s >> K_m^s$). Iz dijagrama je također vidljivo da je Michaelis-Menteničina konstanta K_m^s jednaka koncentraciji supstrata koja je potrebna da bi se postigla polovica maksimalne brzine. Iz toga, dakle, možemo zaključiti da što enzim jače veže svoj supstrat to je upravo manja vrijednost Michaelis-Menteničine konstante.

Osim jednosupstratne Michaelis-Menteničine kinetike, moguće je definirati i dvosupstratnu, koja zapravo čini i većinu svih enzimskih reakcija. Ona se opisuje sljedećim izrazom (jed. 2.3.):

$$r_{S1} = \frac{V_m * c_{s1} * c_{s2}}{(K_m^{s1} + c_{s1}) * (K_m^{s2} + c_{s2})} \qquad (2.3.)$$

gdje c_s^1 i c_s^2 predstavljaju koncentracije supstrata, a K_m^{s1} i K_m^{s2} predstavljaju Michaelis-Menteničine konstante za pojedine supstrate, pri čemu je važno napomenuti da je K_m^{s1} neovisna o c_s^2, a K_m^{s2} neovisna o c_s^1.

Inhibicija kemijske reakcije također čini važan faktor pri određivanju kinetike. Inhibitore neke reakcije možemo definirati kao ireverzibilne ili reverzibilne. Ireverzibilni inhibitori uzrokuju takovu nepovratnu inhibiciju pri čemu dolazi do potpunog gubitka enzimske aktivnosti nakon određenog vremena. Ovakva inhibicija je u potpunosti nepovratna i ne može se povratiti nikakvim fizikalnim putem, dok s druge strane kod reverzibilne inhibicije, uzrokovane reverzibilnim inhibitorima, moguć je povrat enzimske aktivnosti jednostavnim uklanjanjem inhibitora.

S obzirom na reverzibilni inhibitor razlikujemo tri posebne vrste inhibicije:

kompetitivnu (jed. 2.4.), nekompetitivnu (jed. 2.5.) i antikompetitivnu inhibiciju (jed. 2.6.). Pri kompetitivnoj inhibiciji, inhibitor se veže na aktivno mjesto enzima i tako konkurira supstratu pri vezanju na slobodni enzim, kod nekompetitivne inhibicije on se ireverzibilno veže na aktivno mjesto enzima ili čak na neko drugo mjesto pritom mijenjajući oblik samog enzima onemogućavajući vezanje supstrata na aktivno mjesto.

$$r_s = \frac{V_m * c_s}{K_m^s * \left(1 + \frac{c_1}{K_i}\right) + c_s} \qquad (2.4.)$$

$$r_s = \frac{V_m * c_s}{K_m^s + c_s * \left(1 + \frac{c_1}{K_i}\right)} \qquad (2.5.)$$

$$r_s = \frac{V_m * c_s}{\left(1 + \frac{c_1}{K_i}\right) * (K_m^s + c_s)} \qquad (2.6.)$$

Koncentracija inhibitora dana je sa c_1 (može biti produkt ili supstrat), a konstanta inhibicije dana je s K_i (Došen, 2016) .

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1.Aparatura

3.1.1. Analitička vaga

Svi uzorci korišteni za provedbu eksperimenta vagani su na analitičkoj vagi proizvođača Shimadzu prikazanoj na slici 3.1.

Slika 3.1. Analitička vaga AUW120 (Shimadzu, Japan)

3.1.2. Magnetska miješalica

Svi uzorci su tijekom provedbe eksperimenta miješani na magnetskoj miješalici Rotamix 550 MMH prikazanoj na slici 3.2.

Slika 3.2. Magnetska miješalica Rotamix 550 MMH (Tehtnica, Slovenija)

3.1.3. Miješalica

Svi uzorci su tijekom provedbe eksperimenata bili homogenizirani na uređaju MS2 Minishaker IKA prikazanom na slici 3.3.

Slika 3.3. Miješalica MS2 Minishaker IKA

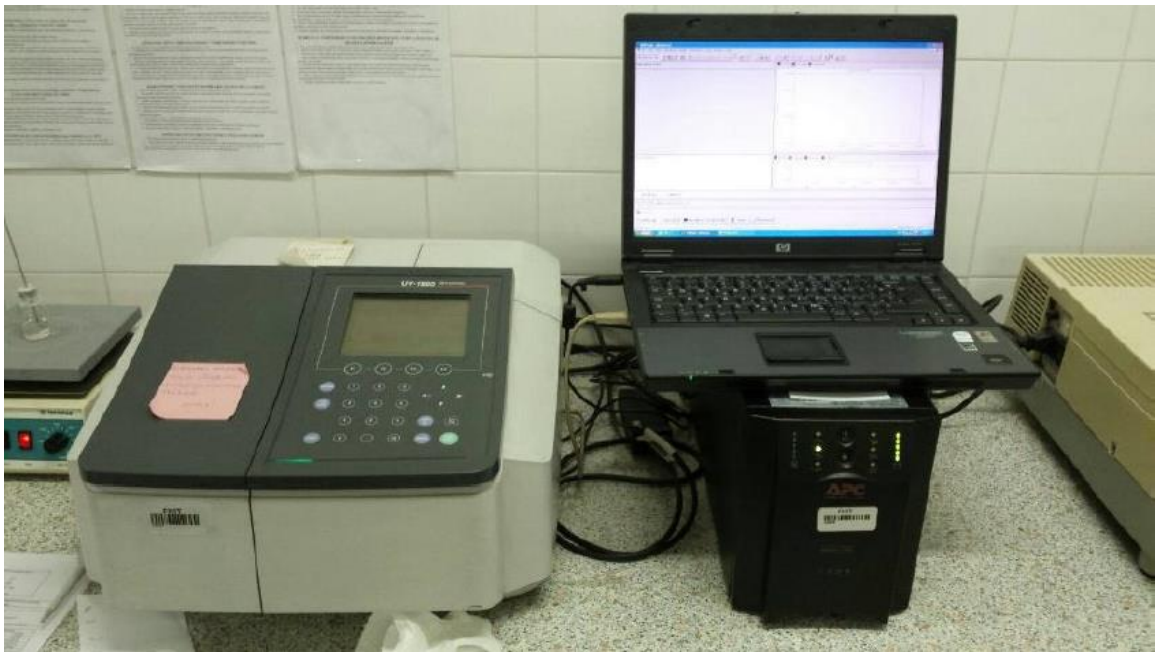
3.1.4. Plinski kromatograf

Analiza uzoraka je provedena na plinskom kromatografu GC-2014 (Shimadzu, Japan) prikazanom na slici 3.4.

Slika 3.4. Plinski kromatograf

3.1.5. Spektrofotometar

Određivanje koncentracije enzima provedeno je pomoću spektrofotometra UV-1601 (Shimadzu, Japan) prikazanog na slici 3.5.



Slika 3.5. Spektrofotometar spojen s računalom

3.2. Analitičke metode

3.2.1. Plinska kromatografija

Plinska kromatografija (GC) je analitička metoda koja služi za kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka. Analitički uređaj koji mjeri sastav različitih komponenti u uzorku naziva se plinski kromatograf.

Načelo plinske kromatografije je injektiranje uzorka u instrument koji ga prenosi do stacionarne faze za odvajanje tzv. kolone. Kao tzv. plin nositelj se koristi helij ili dušik. Detektor mjeri količinu komponenti. Prije mjerenja uzorka nepoznate koncentracije, potrebno je napraviti baždarni pravac. Za svaku komponentu postoji različito vrijeme zadržavanja unutar kolone i na temelju toga se radi kvalitativna analiza. Zatim se za pojedine komponente rade baždarni pravci gdje je veličina odziva, odnosno veličina pika proporcionalna koncentraciji.

Prilikom analize na GC instrumentu korištene su akiralna kolona HP-5 (Agilent Technologies, SAD) i kiralna kolona Alpha DEX^{TM} 120 (SupelcoInc, SAD). U akiralnoj koloni uzorak se održava na 50 ºC 2 minute, a zatim se temperatura mijenja za 15 ºC po minuti sve do 200 ºC. Vrijeme zadržavanja za HP-5 kolonu za epoksid je 3,7 minuta, a za oksazolidinon 10,7 minuta. U kiralnoj koloni uzorak se održava 10 minuta na 70 ºC, a potom se temperatura mijenja za 15 ºC po minuti do 200 ºC. Vrijeme zadržavanja za AlphaDEX kolonu za (*R*)-epoksid je 7,3 minute, a za (*S*)-epoksid 7,6 minuta. Kromatogram i baždarni pravci za Alpha-DEX kolonu za (*R*)-epoksid i (*S*)-epoksid dani su u prilogu 1., za HP-5 kolonu za racemični epoksid dani su u prilogu 2., dok su za oksazolidinon za HP-5 kolonu dani u prilogu 3, a za dibromalkohol u prilogu 4.

3.2.2. Određivanje proteina po Bradford-u

Metoda se bazira na reakciji proteina sa bojom Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. CBB reagira prvenstveno s pobočnim grupama Arg, a u manjoj mjeri i s pobočnim grupama His, Lys, Tyr, Trp i Phe. Boja se na proteine veže hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama što stabilizira boju u anionskom obliku i dovodi do vidljive promjene boje iz smeđe u plavu. Pri tome se apsorpcijski maksimum boje pomiče sa 465 nm na 595 nm što se prati spektrofotometrijski.

Ova metoda je u širokoj upotrebi zbog svoje jednostavnosti, brzine i širokog opsega proprocionalnosti intenziteta obojenja i koncentracije proteina (M. Bradford, 1976).

Za izradu baždarnog pravca korištene su: standardne otopine BSA koncentracija 1 μg cm^{-3}, 2,5 μg cm^{-3}, 5 μg cm^{-3}, 7,5 μg cm^{-3} i 10 μg cm^{-3}, kojima se pomoću spektrofotometra odredi apsorbancija i izradi baždarni pravac. 0,8 cm^3 uzorka proteina i 0,2 cm^3 reagensa Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) pomiješani su u kiveti i dobiveno je plavo obojenje. Uzorak je 5 sekundi miješan na miješalici te je stajao točno 5 minuta prije početka određivanja apsorbancije. Zatim je uzorak stavljen u spektrofotometar i određena je apsorbancija pri zadanoj valnoj duljini, te je iz prethodno određene jednadžbe pravca određena koncentracija proteina u uzorku. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina u uzorku nalazi se u prilogu 5.

3.3. Određivanje kinetike reakcije

3.3.1. Reakcijski sustav

Kinetika reakcije određivana je metodom početnih reakcijskih brzina. Kod te metode uzorkovanje je potrebno provesti u prvih 10% konverzije supstrata. Prilikom jednog eksperimenta na GC instrumentu unutar prvih 10-tak minuta reakcije na grafu se dobije linearna ovisnost koncentracije o vremenu. Ostali eksperimenti analizirani su na isti način i dobivene su linearne ovisnosti na grafu, samo što se mijenjala koncentracija supstrata. U svakom grafu povuče se pravac s pripadajućom jednadžbom. Iz svakog nagiba pravca izračuna se specifična aktivnost enzima prema formuli (3.1.) i nacrta se graf ovisnosti specifične aktivnosti i koncentracije supstrata koja je varirana prilikom provedbe eksperimenta. Dalje se iz tog grafa procjenjuju kinetički parametri.

$$S.A. = \frac{dc_{oks.}}{dt} * \frac{1}{\gamma_{HheC}} \qquad (3.1.)$$

3.3.1. Određivanje kinetike pojedinih stupnjeva reakcije

Priprema uzoraka za analizu kod ispitivanja utjecaja NaOCN, (*S*)-epoksida, (*R*)-epoksida ili NaBr provođena je na isti način samo sa drugačijim koncentracijama.

Primjerice, ukoliko je bio ispitivan utjecaj NaOCN, tada je njegova koncentracija bila mijenjana, dok su koncentracije ostalih komponenata držane konstantnima. Koncentracije su mijenjane od odabranih minimalnih prema maksimalnim koncentracijama.

3.3.2. Priprema uzoraka za analizu

Najprije se u šaržnom rekatoru pripremi reakcijska smjesa na način da se u rekator doda zadani volumen pufera (50 mM Tris-SO4 pH 7,5), zatim NaOCN (ili NaBr, ovisi o tome promatramo li sustav epoksid-NaOCN ili epoksid- NaBr) te epoksid. U reaktor se stavi magnet te se reaktor postavi na magnetsku miješalicu. Nakon toga pripreme se minimalno četiri epruvete s 0,5 mL metil-terc-butiletera (MTBE), te kapalice punjene slojem Na_2SO_4. Svi uzorci sakupljani su i držani na ledu do analize, kako bi se u potpunosti zaustavio tijek reakcije i spriječilo hlapljenje uzoraka. Prvo se uzima nulti uzorak bez enzima kako bismo znali točnu početnu koncentraciju u reaktoru. Zatim se u rekator doda enzim i u tom trenutku počinje se pratiti reakcija. 10 μL reakcijske smjese odnosno uzorka prebacuje se u Eppendorf epruvetu, te se razrijedi u puferu, ukoliko je razrjeđenje potrebno, te se nastavi sa provedbom prema koracima navedenim u nastavku. Razrjeđenje je potrebno zato što je baždarni pravac rađen u rasponu od 0 – 1 mM koncentracija, jer koncentracije veće od 1 mM nisu davale pravilne pikove na GC analizi, već su ti pikovi bili asimetrični. Takva kvantitativna analiza često nije ispravna, pa je stoga bolje raditi pri nižim koncentracijama, gdje je izradom baždarnog pravca ovisnost površine i koncentracije linearna.

Ako se eksperiment provodi bez razrjeđenja onda se 10 μL reakcijske smjese direktno prebaci u epruvetu s 0,5 mL MTBE, zapiše se vrijeme i epruveta se stavi na miješalicu na 20 sekundi kako bi se uzorak ekstrahirao iz vodenog u organski sloj.

Zatim se sadržaj epruvete kapalicom prebaci u kapalicu punjenu slojem Na_2SO_4 koji služi za uklanjanje vode iz uzorka. Uzorak se potisne u vialicu i zatvori čepom. Nakon pripreme potrebnog broja uzorka za analizu vialice se stave u GC uređaj i provodi se analiza. Prilikom uzorkovanja reakcijske smjese potrebno je zabilježiti vrijeme.

3.4.Validacija modela

Validacija je postupak utvrđivanja teorijske ili praktične valjanosti određenog mjernog postupka ili testa. Dakle, validacijom modela provjeravamo i potvrđujemo rezultate dobivene određivanjem kinetike metodom početnih reakcijskih brzina.

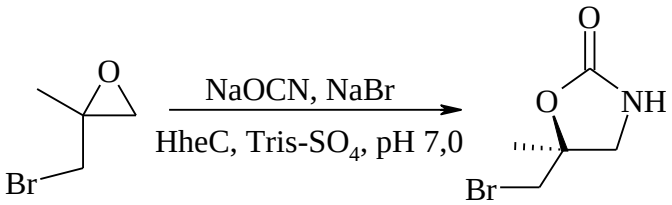
Validacija modela se provodi na eksperimentima u kojima se postiže potpuna ili ravnotežna koncentracija supstrata. Očekuje se da pretpostavljeni model može dobro opisati eksperimentalne podatke.

4. REZULTATI I RASRAVA

U ovome radu istraživana je reakcija sinteze oksazolidinona u prisustvu enzima halogenhidrin-dehalogenaze. Reakcija je, radi istraživanja kinetike, promatrana kao višestupnjevita reakcija, pa su stoga dobiveni rezultati prikazani u zasebnim poglavljima.

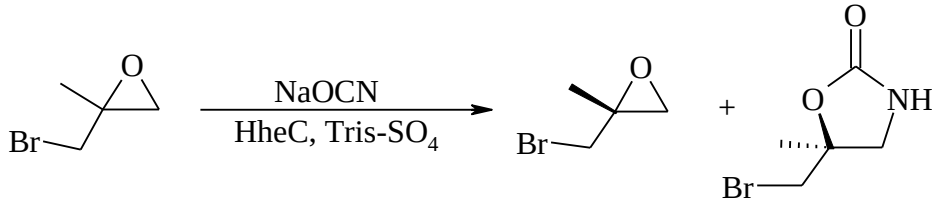
4.1. Prikaz provedenih reakcija prilikom sinteze oksazolidinona uz prisutan enzim halogenhidrin-dehalogenazu

Ukupna rekacija sinteze oksazolidinona uz prisutnost enzima halogenhidrin-dehalogenaze prikazana je reakcijom na slici 4.1.



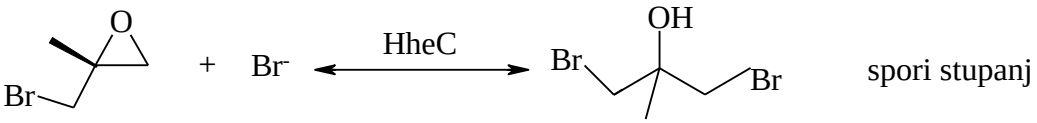
Slika 4.1. Ukupna reakcija sinteze oksazolidinona uz HheC

Reakcija na slici 4.1. je sa stajališta kinetike analizirana kao višestupnjevita kaskadna reakcija kako slijedi prema shemama prikazanim na slikama 4.2.-4.4.



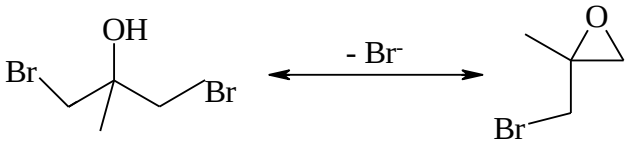
Slika 4.2. Reakcija sinteze oksazolidinona u prisustvu halogenhidrin-dehalogenaze

U reakcijina slici 4.2. nastaje željeni produkt oksazolidinon i ostaje neproreagirali (*R*)-epoksid. Reakcija nije 100% enantioselektivna, te ishod ovisi o odabiru reakcijskih uvjeta što će biti pokazano istraživanjem kinetike reakcije s (*R)* i (*S)*-enantiomerom epoksida.



Slika 4.3. Reakcija između (*R*)-epoksida i broma katalizirana enzimom halogenhidrin-dehalogenazom

U sljedećem stupnju reakcije (*R*)-epoksid u reakciji s bromom kataliziranom halogenhidrin-dehalogenazom daje dibromoalkohol. Ovaj alkohol u vrlo brzoj, kako je eksperimentalno pokazano, kemijskoj reakciji daje kao produkt racemični epoksid, čija je reakcija prikazana na slici 4.4.

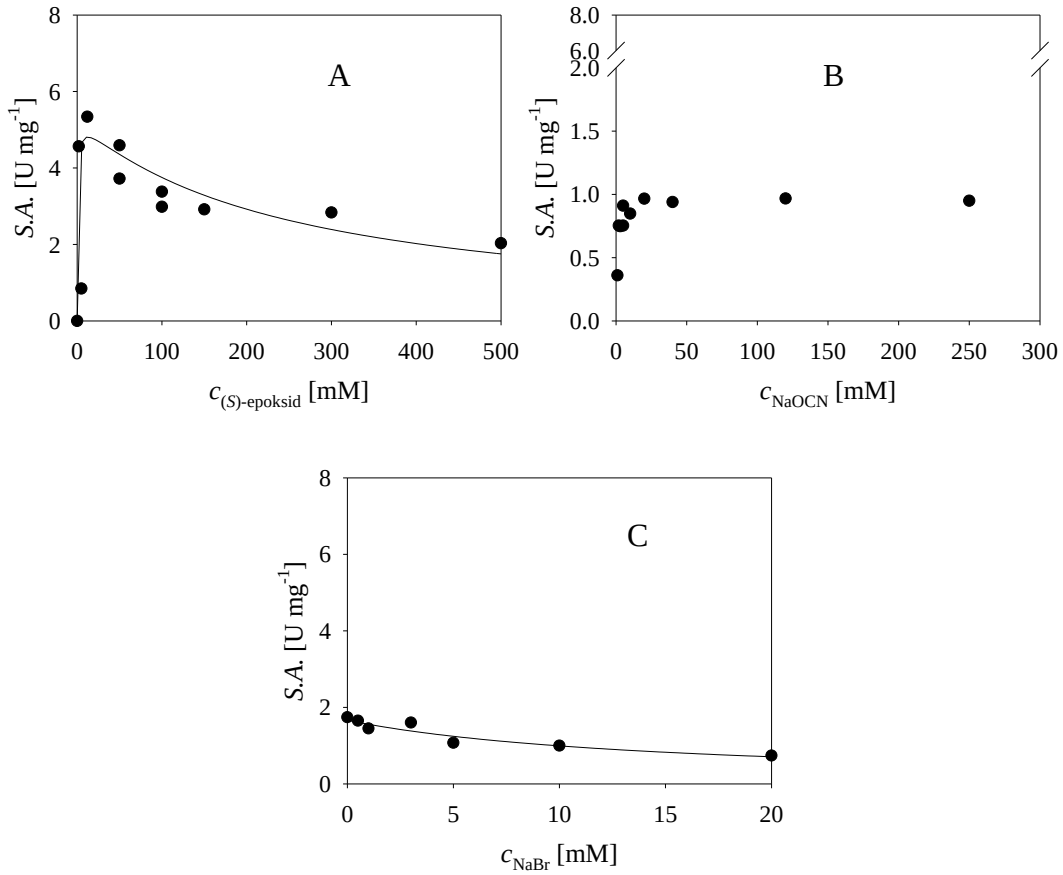


brzi stupanj

Slika 4.4. Pretvorba dibromalkohola u racemični epoksid

Zbog kompleksnosti reakcijskog sustava sa stajališta reakcijskog inženjerstva, svaki je od ovih reakcijskih stupnjeva proučavan posebno i to za (*R*) i (*S*)-epoksid kao supstrate, te su temeljem prikupljenih podataka procijenjeni kinetički parametri za dane reakcije, te je predložen kinetički model procesa.

4.2. Kinetika 1. stupnja reakcije (*S*)-epoksida s cijanatom uz HheC



Slika 4.5. Utjecaj koncentracije **A**. (S)-epoksida (c_{NaOCN} = 150.1 mM), **B**. NaOCN ($c_{(S)\text{-epoksid}}$ = 200 mM), **C**. NaBr (c_{NaOCN} = 50.02 mM, $c_{(S)\text{-epoksid}}$ = 10 mM)na specifičnu aktivnost HheC (500 mM Tris-SO_4 pH 7, 1000 rpm, 0.5 mL, γ_{HheC} = 0.08 mg cm^{-3}).

Iz dobivenih rezultata (slika 4.5.A.) vidljivo je da specifična aktivnost enzima halogenhidrin-dehalogenaze prvo raste, a onda se smanjuje s povećanjem koncentracije (*S*)-epoksida ukoliko je koncentracija NaOCN držana konstantnom. Prema tome, ova se reakcija može opisati Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju supstratom (*S*)-epoksidom. Iz podataka su procijenjeni kinetički parametri V_m, $K_m^{(S)\text{-epoksid}}$ i $K_i^{(S)\text{-epoksid}}$ prikazani u tablici 4.1.

Kod ispitivanja utjecaja koncentracije NaOCN na specifičnu aktivnost enzima (slika 4.5.B.) vidljivo je da specifična aktivnost enzima raste pri nižim koncentracijama NaOCN, a zatim postaje konstantna što je potvrda Michaelis-Menteničine kinetike. U tablici 4.1. prikazane su procijenjene vrijednosti V_m i K_m^{NaOCN}.

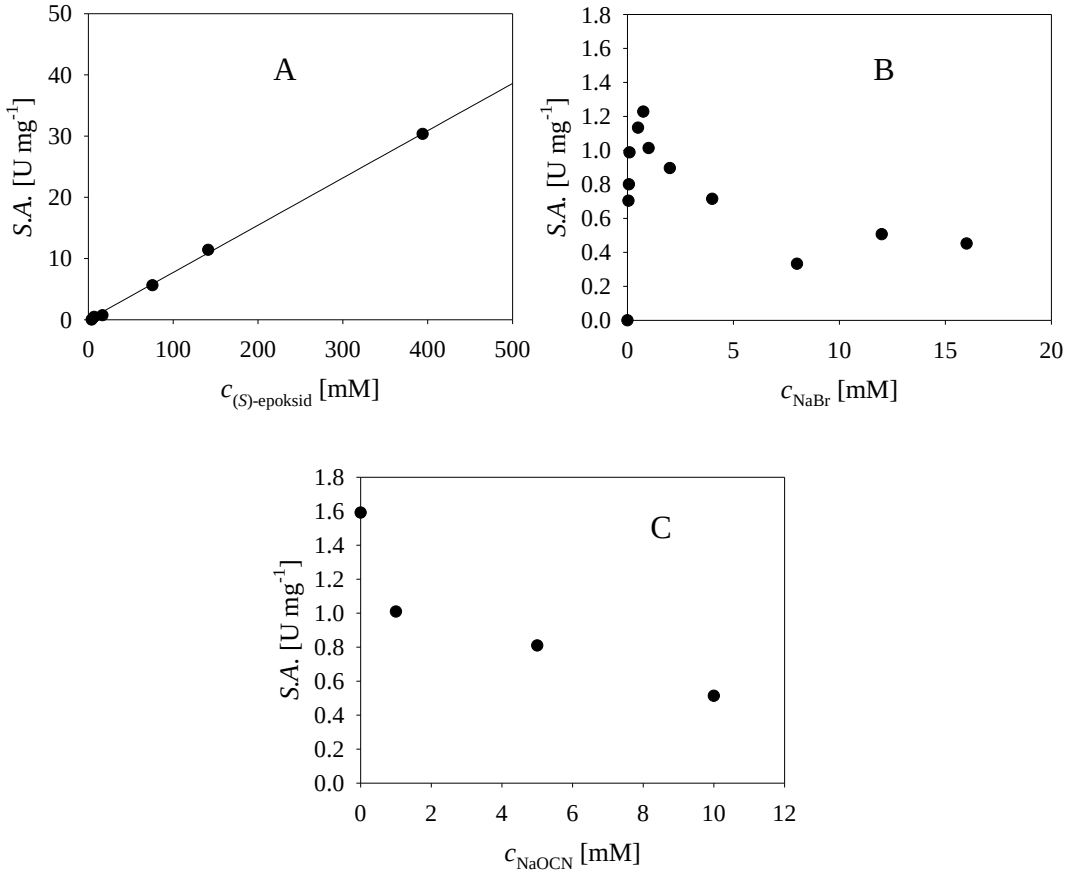
Također se može uočiti blagi pad specifične aktivnosti enzima kod povećanja koncentracije NaBr prilikom držanja koncentracija NaOCN i (*S*)-epoksida konstantnima (slika 4.5.C.). Time je vidljivo da NaBr inhibira enzim, odnosno potvrđena je Michaelis-Menteničina kinetika uz inhibiciju enzima produktom NaBr. To je potvrđeno vrijednostima V_m, K_m^{NaBr} i K_i^{NaBr} tablici 4.1.

Tablica 4.1. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju između (*S*)-epoksida i NaOCN.

Parametar	**Jedinica**	**Vrijednost**
V_m	U mg^{-1}	5.287 ± 1.698
$K_m^{(S)\text{-epoksid}}$	mM	0.611 ± 0.144
K_m^{NaOCN}	mM	1.036 ± 0.235
$K_i^{(S)\text{-epoksid}}$	mM	248.14 ± 28.505
K_i^{NaBr}	mM	0.129± 0.033

Iz procijenjenih kinetičkih parametara se može zaključiti da enzim ima relativno visoku aktivnost u proučavanoj reakciji te dobar afinitet prema supstratima. Konstanta inhibicije s NaBr ukazuje na značajnu inhibiciju bromidnim ionima, dok konstanta inhibicije supstratom (epoksidom) ukazuje na relativno slabu inhibiciju.

4.3. Kinetika 2. stupnja reakcije (*S*)-epoksida s NaBr uz HheC



Slika 4.6. Utjecaj koncentracija **A**. (*S*)-epoksida(c_{NaBr} = 4 mM), **B**. NaBr ($c_{(S)\text{-epoksid}}$ = 20.01 mM) i **C**. NaOCN (c_{NaBr} = 10 mM, $c_{(S)\text{-epoksid}}$ =10.01 mM) na specifičnu aktivnost HheC (500 mM Tris-SO_4 pH 7, 1000 rpm, 0.5 mL, γ_{HheC} = 0.08 mg cm^{-3}).

Iz dobivenih eksperimentalnih podataka na slici 4.6. vidljivo je da specifična aktivnost enzima linearno raste s povećanjem koncentracije (*S*)-epoksida (slika 4.6.A.) pri čemu je koncentracija NaBr držana konstantnom. Stoga su rezultati opisani kinetikom reakcije prvog reda, a konstanta brzine reakcije je prikazana u tablici 4.2.

Slika 4.6.B. pokazuje da se prilikom držanja koncentracije (*S*)-epoksida konstantnom specifična aktivnost enzima povećava pri nižim koncentracijama NaBr dok ne postigne maksimalnu vrijednost, a zatim s povećanjem koncentracije NaBr pada. Ovaj tip reakcije predstavlja Michaelis-Menteničinu kinetiku uz inhibiciju supstratom NaBr, a parametri K_m^{NaBr} i K_i^{NaBr} procijenjeni su i prikazani u tablici 4.2. Na slici 4.6.C. gdje su koncentracija (*S*)-epoksida i koncentracija NaBr držane konstantnima vidiljivo je da s povećanjem koncentracije NaOCN specifična aktivnost enzima pada.

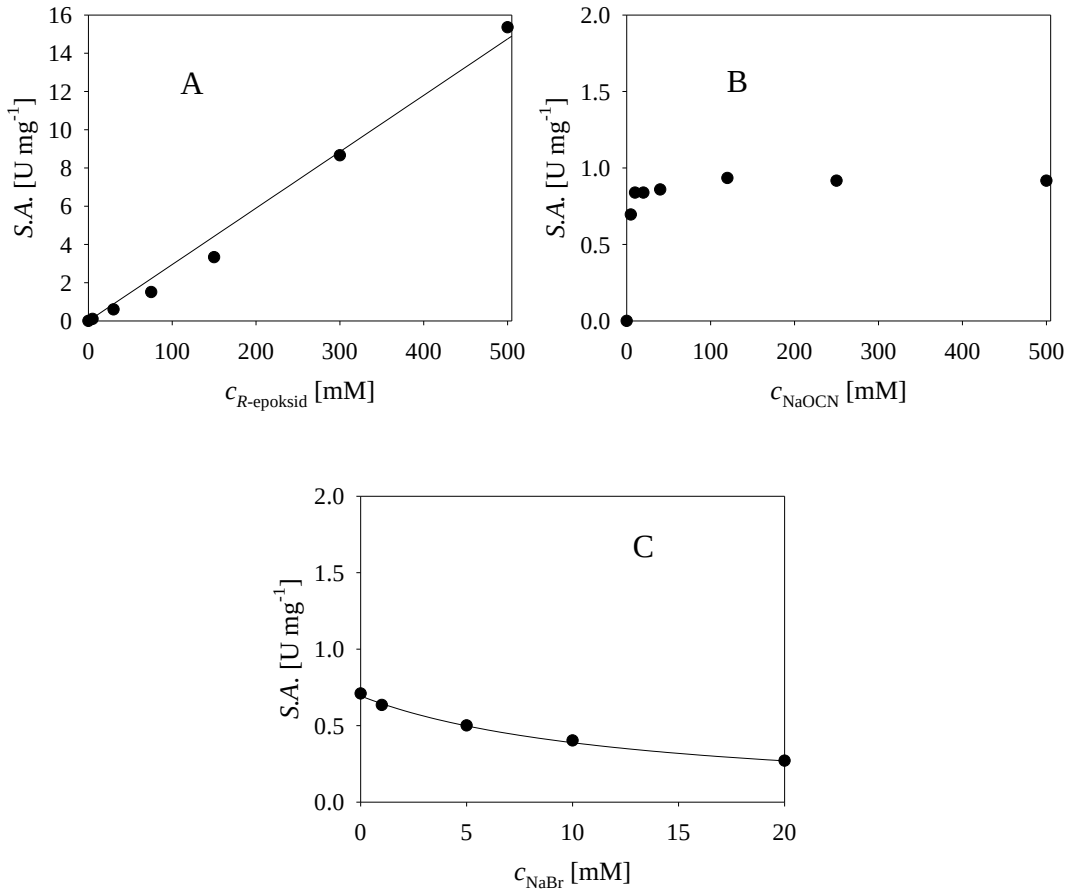
Iz prikazanih eksperimentalnih podataka je procijenjena konstanta inhibicije prikazana u tablici 4.2., parametar (K_i^{NaOCN}).

Tablica 4.2. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju između (*S*)-epoksida i NaBr.

Parametar	**Jedinica**	**Vrijednost**
k	U mg^{-1} min^{-1}	0.0772 ± 0.001
K_m^{NaBr}	mM	0.0376 ± 0.009
K_i^{NaBr}	mM	6.533 ± 1.425
K_i^{NaOCN}	mM	0.0071± 0.00199

Procijenjeni kinetički parametri (tablica 4.2.) ukazuju na vrlo dobar afinitet enzima prema bromidnim ionima, te na loš afinitet enzima prema epoksidu u reakciji s bromidom. Konstanta inhibicije bromidnim ionima upućuje na jaku inhibiciju enzima supstratom. Cijanatni ioni u prvom stupnju reakcije značajno inhibiraju ovaj stupanj reakcije što se vidi prema vrijednosti procijenjene konstante inhibicije cijanatom (K_i^{NaOCN}).

4.4. Kinetika 1. stupnja reakcije (*R*)-epoksida s cijanatom uz HheC



Slika 4.7. Utjecaj koncentracija **A**. (R)-epoksida (c_{NaOCN} = 150 mM, γ_{HheC} = 0.08 mg cm^{-3}), **B**. NaOCN ($c_{(R)\text{-epoksid}}$ = 10 mM, γ_{HheC} = 0.04 mg cm^{-3}) i **C**. NaBr (c_{NaOCN} = 50 mM, $c_{(R)\text{-epoksid}}$ =10 mM, γ_{HheC} = 0.08 mg cm^{-3}) na specifičnu aktivnost HheC (500 mM Tris-SO_4 pH 7, 1000 rpm, 0.5 mL).

Na slici 4.7.A. vidljivo je da uz držanje koncentracije NaOCN konstantnom specifična aktivnost enzima HheC linearno raste s povećanjem koncentracije (*R*)-epoksida. Podaci su opisani modelom kinetike reakcije prvog reda te je u tablici 4.3. procijenjen kinetički parameter *k*.

Na slici 4.7.B. vidljivo je da uz držanje koncentracije (*R*)-epoksida konstantnom specifična aktivnost enzima raste na početku s povećanjem koncentracije NaOCN, a kasnijim povećanjem koncentracije NaOCN specifična aktivnost enzima ostaje konstantna. Ovaj grafički prikaz potvrda je Michaelis-Menteničine kinetike, a u tablici 4.3. procijenjen je kinetički parameter K_m^{NaOCN}.

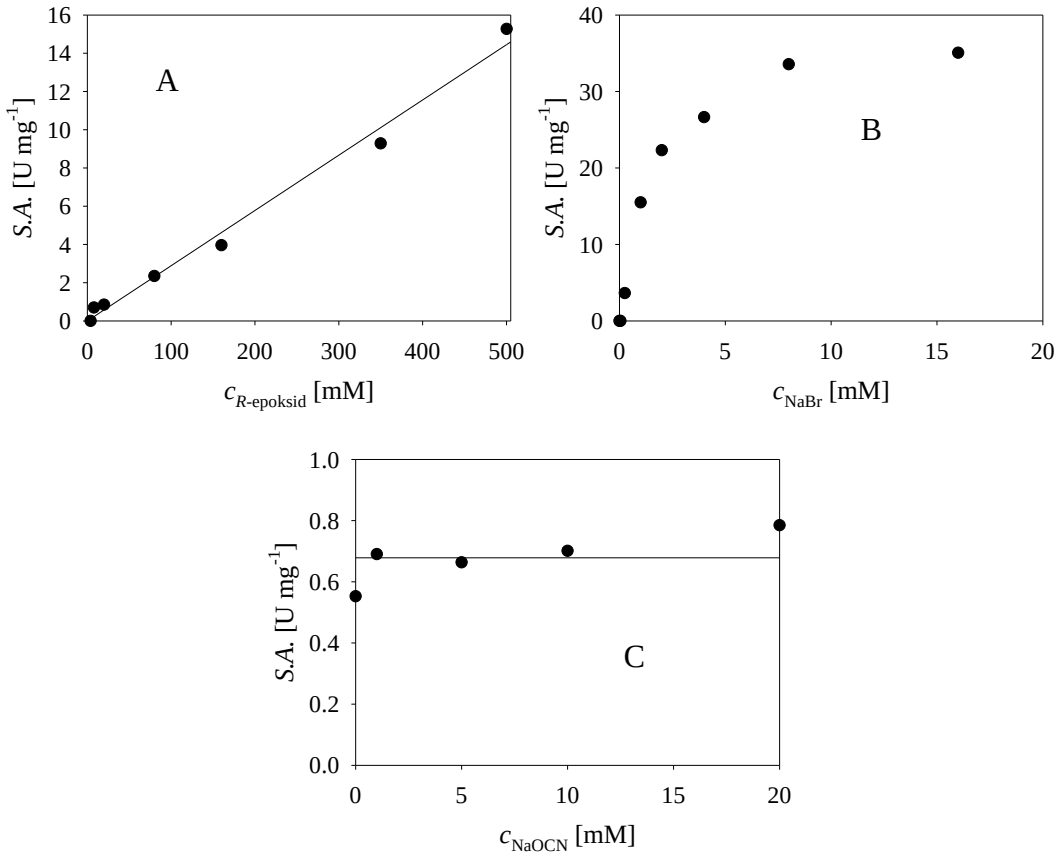
Na slici 4.7.C. vidljivo je da specifična aktivnost enzima pada s povećanjem koncentracije NaBr pri čemu su koncentracije NaOCN i (*R*)-epoksida držane konstantnima. Time je potvrđena Michaelis-Menteničina kinetika uz inhibiciju enzima supstratom NaBr, a u tablici 4.3. procijenjen je kinetički parametar K_i^{NaBr}.

Procijenjeni kinetički parametri prikazani u tablici 4.3. ukazuju na slabiji afinitet enzima prema cijanatu u ovom stupnju reakcije, te još slabiji prema (*R*)-epoksidu.

Tablica 4.3. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju između (*R*)-epoksida i NaOCN.

Parametar	**Jedinica**	**Vrijednost**
k	U mg^{-1} min^{-1}	0.041 ± 0.001
K_m^{NaOCN}	mM	29.03 ± 0.224
K_i^{NaBr}	mM	0.371 ± 0.022

4.5. Kinetika 2. stupnja reakcije (*R*)-epoksida s NaBr uz prisutnost HheC



Slika 4.8. Utjecaj koncentracija **A**. (*R*)-epoksida (c_{NaBr} = 4 mM), **B**. NaBr ($c_{(R)\text{-epoksid}}$ = 200.1 mM) i **C**. NaOCN (c_{NaBr} = 10 mM, $c_{(R)\text{-epoksid}}$ =10.01 mM) na specifičnu aktivnost HheC (500 mM Tris-SO_4 pH 7, 1000 rpm, 0.5 mL, γ_{HheC} = 0.08 mg cm^{-3}).

Na slici 4.8.A. vidljivo je da uz držanje koncentracije NaBr konstantnom specifična aktivnost enzima HheC linearno raste s povećanjem koncentracije (*R*)-epoksida. Podaci su potvrda kinetike reakcije prvog reda te je u tablici 4.4. procijenjena konstanta brzine reakcije prvog reda, *k*.

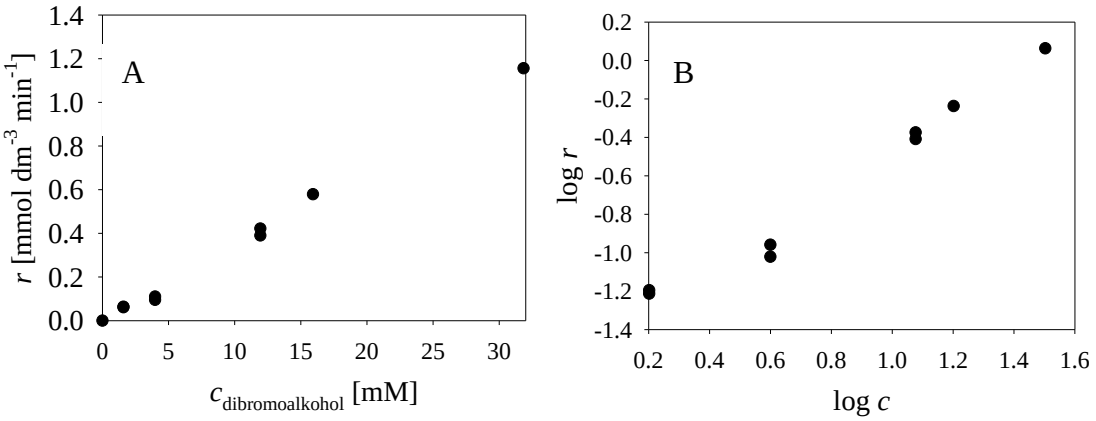
Na slici 4.8.B. vidljivo je da uz držanje koncentracije (*R*)-epoksida konstantnom specifična aktivnost enzima raste na početku s povećanjem koncentracije NaBr, a onda stagnira. Time je potvrđena Michaelis-Menteničina kinetika reakcije, a parameter K_m^{NaBr} je procijenjen i prikazan u tablici 4.4. Na slici 4.8.C. vidljivo je da se specifična aktivnost enzima ne mijenja s promjenom koncentracije NaOCN pri čemu su koncentracije NaBr i (*R*)-epoksida držane konstantnima. Iz toga je vidljivo da NaOCN ne inhibira enzim u ovoj reakciji.

Tablica 4. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju između (*R*)-epoksida i NaBr.

Parametar	**Jedinica**	**Vrijednost**
k	U mg^{-1} min^{-1}	0.0300 ± 0.0004
K_m^{NaBr}	mM	1.630 ± 0.183

Procijenjeni kinetički parametri prikazani u tablici 4.4. ukazuju na slab afinitet enzima prema (*R*)-epoksidu, te dobar afinitet prema bromidnom ionu u ovom stupnju reakcije.

4.6. Kinetika 3. stupnja reakcije s dibromalkoholom



Slika 4.9.A. Utjecaj koncentracije dibromoalkohola nabrzinu reakcije, **B**. utvrđivanje reda reakcije (500 mM Tris-SO_4 pH 7, 1000 rpm, 0.5 mL, γ_{HheC} = 0.08 mg cm^{-3}).

Iz slike 4.9.A. vidljivo je da je ovisnost brzine reakcije i koncentracije dibromoalkohola linearna, odnosno da povećanjem koncentracije dibromoalkohola raste i brzina reakcije. Podaci su opisani kinetikom reakcije 1. reda, a procijenjena je konstanta brzine reakcije prvog reda, *k*.

Na slici 4.9.B. prikazana je ovisnost logaritamske vrijednosti brzine reakcije o logaritamskoj vrijednosti koncentracije dibromoalkohola te je dobivena linearna ovisnost čiji nagib iznosi 1. Dakle, može se zaključiti da je reakcija s dibromalkoholom reakcija prvog reda.

Tablica 5. Procijenjeni kinetički parametri za reakciju s dibromoalkoholom.

Parametar	**Jedinica**	**Vrijednost**
k	min^{-1}	0.0357 ± 0.0011
n	-	1

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu reakcija sinteze oksazolidinona uz prisutnost enzima halogenhidrin dehalogenaze. Zbog kompleksnosti reakcijskog sustava sa stajališta reakcijskog inženjerstva, svaki je od ovih reakcijskih stupnjeva proučavan posebno i to za (*R*) i (*S*)-epoksid kao supstrate, te su temeljem prikupljenih podataka procijenjeni kinetički parametri, te je predložen model za svaku pojedinu reakciju. Ukoliko se promatra kinetika reakcije 1. stupnja između (*S*)-epoksida i NaOCN vidljivo je da specifična aktivnost enzima halogenhidrin-dehalogenaze prvo raste, a onda se smanjuje s povećanjem koncentracije (S)-epoksida ukoliko je koncentracija NaOCN držana konstantnom. Prema tome, ova se reakcija može opisati Michaelis-Menteničinom kinetikom uz inhibiciju supstratom (S)-epoksidom. Kod ispitivanja utjecaja koncentracije NaOCN na specifičnu aktivnost enzima vidljivo je da specifična aktivnost enzima raste pri nižim koncentracijama NaOCN, a zatim postaje konstantna što je potvrda Michaelis-Menteničine kinetike. Također se može uočiti blagi pad specifične aktivnosti enzima kod povećanja koncentracije NaBr prilikom držanja koncentracija NaOCN i (S)-epoksida konstantnima. Time je vidljivo da NaBr inhibira enzim, odnosno potvrđena je Michaelis-Menteničina kinetika uz inhibiciju enzima produktom NaBr. Na ovaj način opisan je svaki od stupnjeva reakcije sinteze oksazolidinona uz prisutnost enzima halogenhidrin-dehalogenaze.

6. LITERATURA

1. W. Saibi, S. Abdeljalil, K. Masmoudi, A. Gargouri; Biocatalysts: Beautiful creatures, Biochemical and Biophysical Research Communications, 426(3):289-293 (2012)
2. 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(8):2631-2637 (2012)
3. 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(8):2919 –2926 (2015)
4. Đ. Vasić-Rački, Z. Findrik, A. Vrsalović Presečki; Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, Applied Microbiology Biotechnology, 91:845-857 (2011)
5. T. Johannes, M. R. Simurdia, H. Zhao; Biocatalysis, Encyclopedia of Chemical Processing, Taylor and Francis, str. 101-109 (2006)
6. P. Nikolova, O. P. Ward; Whole cell biocatalysis in nonconventional media; Journal of Industrial Microbiology, 12(2):76-86 (1993)
7. R. Leon, P. Fernandes, H. M. Pinheiro, J. M. S. Cabral; Whole-cell biocatalysis in organic media, Enzyme and Microbial Tehnology, 23:283-500 (1998)
8. J.D. Rozzell; Commercial scale biocatalysis: myths and realities, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 10(7):2253–2261 (1999)
9. D. J. Pollard, J. M. Woodley; Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now, Trends in Biotechnology, 25(2):67-73 (2006)
10. S. Shoda, H. Uyama, J. Kadokawa, S. Kimura, S. Kobayashi; Enzymes as Green Catalysts for Precision Macromolecular Synthesis, Chemical rewievs, 116(4):2307-2413 (2016)
11. A. Zaks; Industrial biocatalysis, Current opinion in chemical biology, 5:130-136 (2001)

12. A. Illanes; Enzyme Biocatalysis - Principles and Applications, Springer Verlag, str. 1-29 (2008)
13. D.B. Janssen; Halohydrin dehalogenase; Biotransformation and Biocatalysis, Research, University of Groningen, str.1-6 (2017)
14. J. H. L. 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(10):1083-1089 (2002)
15. M. Došen; Proizvodnja optički aktivnog diola korištenjem višeenzimskog sustava, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2016)
16. M. M. Bradford; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Analytical Biochemistry, 72:248-254 (1976)

POPIS SIMBOLA

r_S – brzina reakcije, mmol/(dm^3 min)

V_m– maksimalna brzina reakcije, mmol/(dm^3 min)

c_S – koncentracija supstrata, mmol/dm^3

K_m- Michaelis-Mentiničina konstanta, mmol/dm^3

K_i – konstanta inhibicije, mmol/dm^3

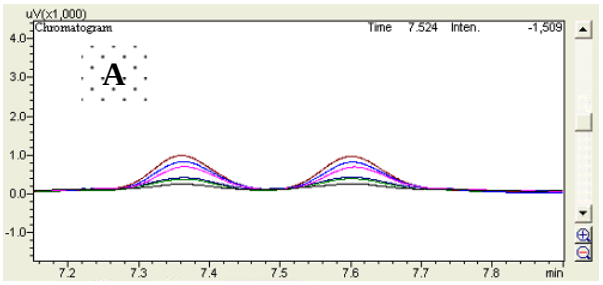
HheC- enzimhalogenhidrin-dehalogenaza

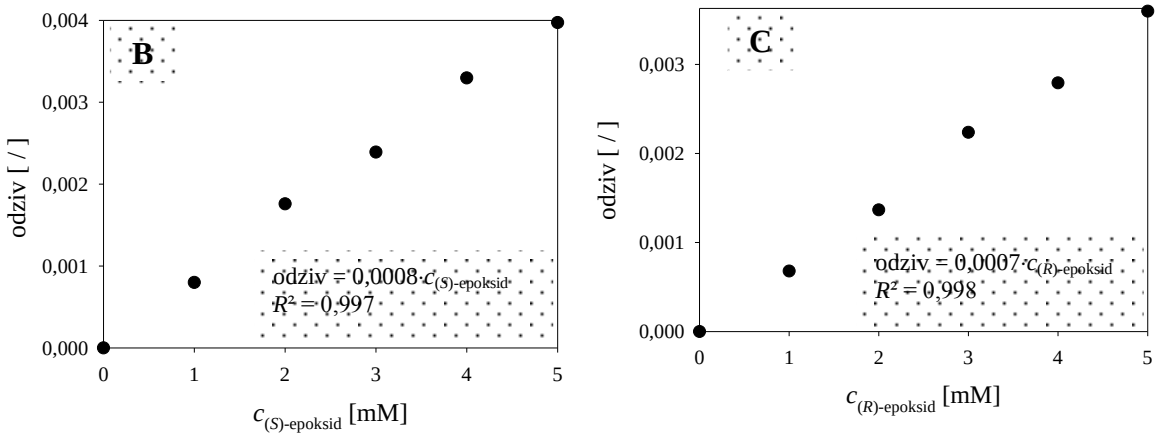
k- konstanta brzine reakcije 1. reda, min^{-1}

MTBE- metli-terc-butileter

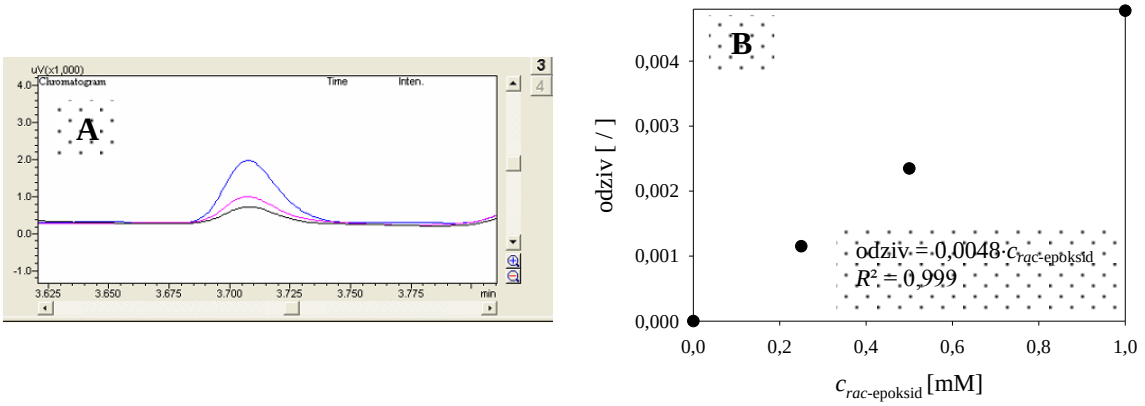
PRILOG

PRILOG 1. A. Kromatogram i baždarni pravci za GC analizu **B.** *(S)*-epoksida i **C.** (*R*)-epoksida na Alpha-DEX koloni



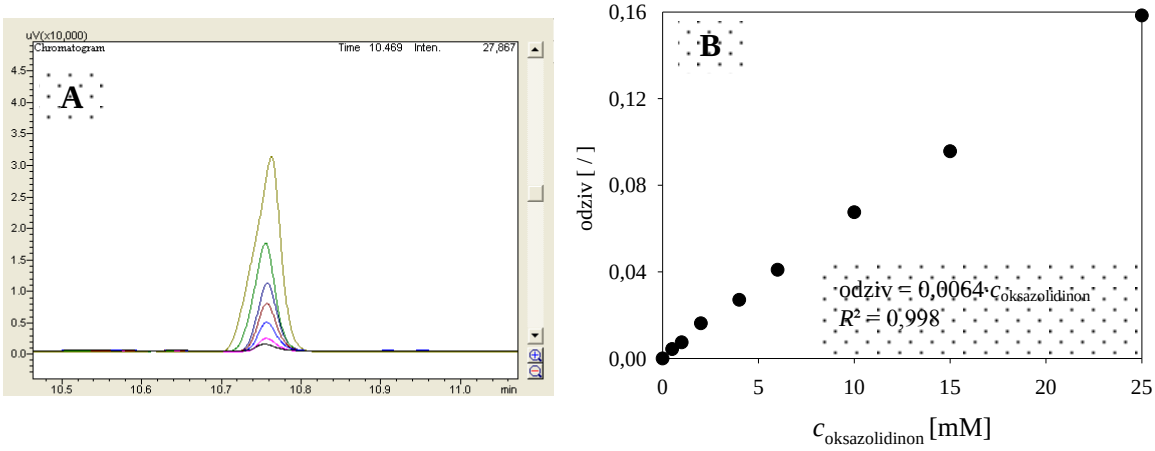


PRILOG 2. A. Kromatogram i **B.** baždarni pravac za GC analizu *rac*-epoksida na HP-5 koloni

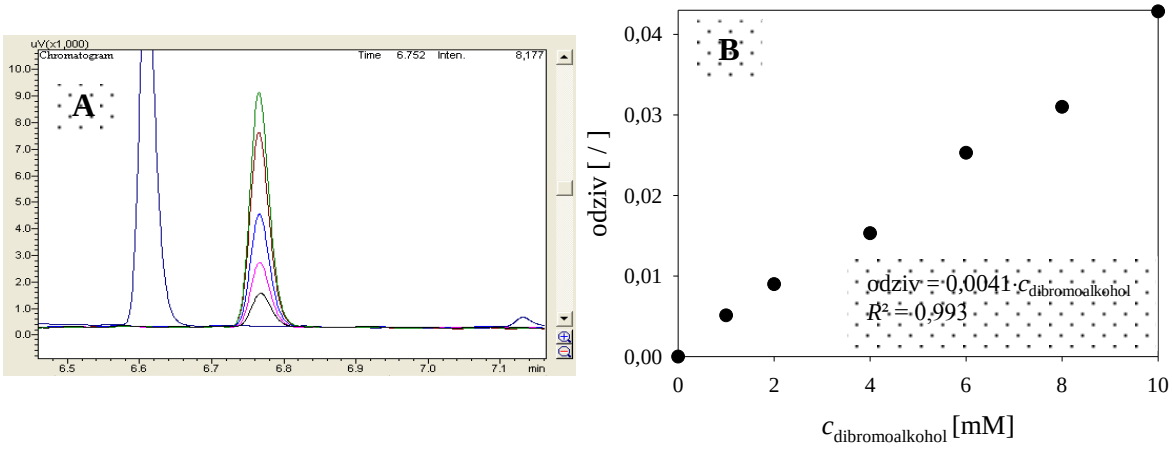


***Napomena*:** pikovi za *rac*-epoksid pri višim koncentracijama pokazuju povlačenje (engl. *peak tailing*) stoga je baždarni pravac napravljen u rasponu koncentracija 0 – 1 mM, a uzorci iz reakcijske smjese razrjeđivani su kako bi upadali u mjerno područje pravca.

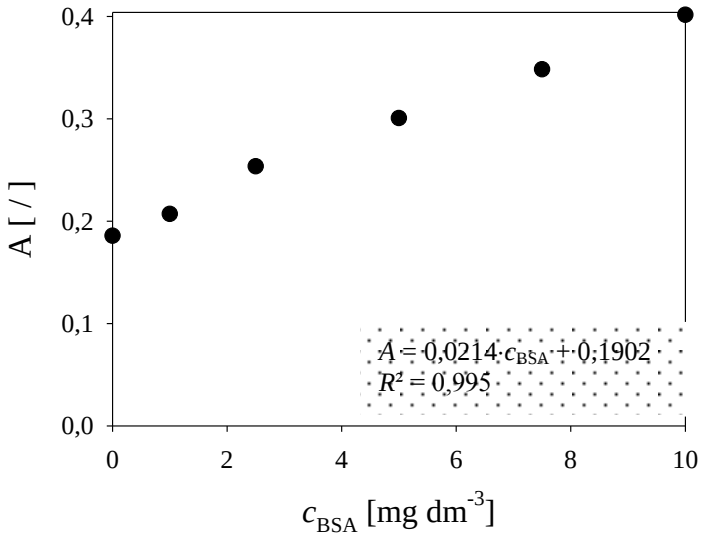
PRILOG 3. A. Kromatogram i **B.** baždarni pravac za GC analizu oksazolidinona na HP-5 koloni



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



PRILOG 5. Baždarni pravac metode po Bradfordu



7. ŽIVOTOPIS

[redacted] Nakon završene osnovne škole u Jastrebarskom upisala sam Opću gimnaziju u Srednjoj školi Jastrebarsko. Maturirala sam 2015. godine. Iste sam godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Primijenjena kemija u Zagrebu.