

Provjera valjanosti kinetičkog modela biokatalitičke sinteze fluoriranog cijanoalkohola u različitim tipovima reaktora

Marić, Ana-Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:149:638536>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-02**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana-Katarina Marić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
PRIMIENJENA KEMIJA

Ana-Katarina Marić

PROVJERA VALJANOSTI KINETIČKOG MODELA
BIOKATALITIČKE SINTEZE FLUORIRANOG
CIJANOALKOHOLA U RAZLIČITIM TIPOVIMA
REAKTORA

DIPLOMSKI RAD

Mentorica: 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 2022.

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na susretljivosti i ljubaznosti zbog kojih je bilo vrlo jednostavno odabrati gdje raditi diplomski rad. Hvala Vam na stručnom vodstvu i zalaganju tijekom izrade i pisanja rada. Također, hvala za konstruktivne savjete kojima ste mi omogućili produbljivanje znanja o temi, ali i poboljšali način na koji prenosim vlastito znanje drugima.

Veliko hvala mag. ing. oecoing. Neveni Milčić na strpljenju i ukazanom povjerenju prilikom rada u laboratoriju, kao i na odgovorima na moja pitanja, savjetima i uputama danim tijekom pisanja ovoga rada. Hvala za topli pristup zbog kojeg je sav posao bio znatno olakšan.

Neizmjerne hvala mojoj obitelji što me uvijek usmjeravala na pravi put. Hvala za kontinuiranu podršku, ohrabrivanje i razumijevanje tijekom svih godina studija. Hvala što ste bili uz mene na svakom koraku i omogućili mi sve potrebno kako bih mogla položiti sve ispite i postati ono što želim.

SAŽETAK

Optički čisti spojevi od velike su važnosti u farmaceutskoj industriji, uz sve veći interes za fluorirane spojeve. Za sintezu kiralnih gradivnih elemenata često se koriste enzimi halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH), koje mogu primiti brojne anionske nukleofile, od cijanida, cijanata, tiocijanata do azida i nitrita. U njihovoj prisutnosti dolazi do reakcije otvaranja epoksidnog prstena, što dovodi do stvaranja β -substituiranog alkohola.

Osnova ovog rada je biokatalitička reakcija, točnije HHDH-katalizirana reakcija otvaranja epoksidnog prstena *rac*-2-(4-fluorofenil)oksidirana cijanidnim ionima. Uz željeni produkt (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitril, ovom reakcijom stvara se i neželjeni (*R*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitril te *rac*-2-(4-fluorofenil)-1,2-etandiol. Prethodno je razvijen matematički model ove sinteze kombinacijom kinetičkih jednadžbi i reaktorskog modela.

U svrhu validacije modela, provedena je serija eksperimenata u kotlastom reaktoru s različitim početnim koncentracijama epoksida, NaCN i HHDH. U eksperimentima inkubacije uočena je deaktivacija enzima ovisna o početnoj koncentraciji epoksida. Operacijska stabilnost matematički je opisana i uključena u model. Nadalje, porastom koncentracije epoksida, stabilnost enzima opada, dok cijanidni nukleofil nema značajan utjecaj na stabilnost enzima.

Eksperimentalni podaci pokazuju zadovoljavajuće slaganje s ranije razvijenim matematičkim modelom. Također, matematičko modeliranje pokazalo je kako je sinteza u kotlastom reaktoru/kotlastom reaktoru s ponavljajućim dodatkom epoksida (repetitivnom šaržnom reaktoru) optimalan način proizvodnje danog spoja.

KLJUČNE RIJEČI: biokataliza; enzimska kinetika; halogenhidrin-dehalogenaze; optički čisti spoj; matematičko modeliranje

SUMMARY

Optically pure compounds are of great significance in the pharmaceutical industry, with the increasing interest in fluorinated compounds. One important enzyme group often employed in synthesizing various chiral building blocks are halohydrin dehalogenases (HHDHs) that can accept numerous anionic nucleophiles from cyanide, cyanate, thiocyanate to azide and nitrite. In their presence the ring-opening reaction of epoxide occurs, leading to β -substituted alcohol formation.

The foundation of this work lies in a biocatalytic reaction, precisely HHDH-catalysed *rac*-2-(4-fluorophenyl)oxirane ring-opening reaction mediated by cyanide ions. Besides the desired (*S*)-3-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanenitrile, this reaction yields an undesired (*R*)-3-(4-fluorophenyl)-3-hydroxypropanenitrile and *rac*-2-(4-fluorophenyl)-1,2-ethanediol. Mathematical model was earlier developed by coupling kinetic equations with reactor model.

A series of different batch experiments varying in initial concentrations of epoxide, NaCN and HHDH were conducted with aim of model validation. Enzyme deactivation influenced by the initial epoxide concentration was observed within incubation experiments. Operational stability decay was mathematically described and included in the model. Furthermore, with the increase in the epoxide concentration, enzyme stability decreased, while the cyanide nucleophile did not have a significant effect on the stability of the enzyme.

Experimental data has shown a satisfactory match with an earlier developed mathematical model. Moreover, mathematical modeling has shown that synthesis in batch/repetitive batch reactor is the optimal pathway for production of this compound.

KEY WORDS: biocatalysis; enzyme kinetics; halohydrin dehalogenases; optically pure compound; mathematical modeling



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. Biokataliza	2
2.1.1. Zelena kemija i biokataliza	2
2.1.2. Princip biokatalize	3
2.1.3. Prednosti biokatalize	4
2.1.4. Nedostaci biokatalize	5
2.2. Biokatalizatori.....	6
2.2.1. Klasifikacija	6
2.2.2. Struktura.....	7
2.2.3. Svojstva.....	8
2.2.4. Prednosti	8
2.2.5. Nedostaci	9
2.2.6. HHDH enzimi	9
2.2.6.1. Otkriće i važnost danas.....	9
2.2.6.2. Klasifikacija, strukturne karakteristike i daljnji razvoj	10
2.2.6.3. Reakcije katalizirane HHDH enzimima	12
2.3. Optički aktivne tvari	14
2.3.1. Kiralnost.....	14
2.3.2. Dobivanje optički aktivnih tvari	15
2.3.3. Epoksidi	16
2.3.4. Cijanolkoholi	17
2.3.5. Fluorirane molekule	17
2.4. Modeliranje biotransformacija	18
2.4.1. Koraci modeliranja.....	18
2.4.2. Prednosti modeliranja	19
2.4.4. Matematički modeli	20
2.4.5. Kinetički modeli	20
2.4.4. Reaktorski modeli	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO	26
3.1. Aparatura	26
3.1.1. Reakcijski sustav.....	26

3.1.2. Kromatografski sustavi	26
3.1.2.1. Plinski kromatograf	27
3.1.2.2. HPLC uređaj	28
3.1.4. Ostala aparatura	28
3.2. Priprava kemikalija.....	30
3.2.1. Popis kemikalija.....	30
3.3. Analitičke metode	31
3.3.1. Analiza plinskom kromatografijom	31
3.3.2. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	31
3.4. Ispitivanje stabilnosti enzima tijekom inkubacije te operacijske stabilnosti enzima	33
3.5. Eksperimenti validacije matematičkog modela	34
4. MATEMATIČKI MODEL BIOKATALITIČKE SINTEZE FLUORIRANOG CIJANOALKOHOLA.....	37
4.1. Kinetički model.....	37
4.1.1. Kinetika biokatalitičke reakcije	38
4.2. Reaktorski model.....	39
5. REZULTATI I RASPRAVA	41
5.1. Stabilnost enzima prilikom inkubacije sa supstratima	41
5.2. Konstanta deaktivacije enzima.....	42
5.3. Validacija modela	44
6. ZAKLJUČAK.....	48
7. POPIS SIMBOLA I POKRATA.....	49
8. LITERATURA	52
9. PRILOZI.....	57

1. UVOD

Novija literaturna izdanja ističu važnost zelene kemije, stoga je uspostavljanje procesa s reduciranom upotrebom otapala, reagensa i energije postalo fokus razvoja u znanosti. Za bolji odnos kemije i okoliša nije dovoljno samo eliminirati najtoksičniji reagens, već je potrebno smanjiti sav otpad te povećati učinkovitost upotrebe svakog resursa u procesu. Također, zelena kemija obuhvaća dizajniranje procesa s obnovljivim izvorima početnih resursa. Dodatno, blagi uvjeti odvijanja procesa igraju veliku ulogu u prevenciji nesreća. Navedeni ciljevi često uz sebe vežu manji ekonomski trošak te povećanu energetska efikasnost procesa. Proces koji ispunjava sve prethodno navedene zahtjeve je biokataliza. (Whittall et al., 2012.) Biokataliza je definirana kao proces kroz koji izolirani i pročišćeni enzimi, cijele stanice ili drugi biološki katalizatori pokreću, usmjeravaju i ubrzavaju kemijske reakcije. Ovi katalizatori ne ulaze u konačne produkte reakcije i tijekom procesa se ne mijenjaju u stehiometrijskim omjerima s reaktantima i produktima. (Sheldon et al., 2018.; Zrnčević, 2005.) Primjenom moderne biotehnologije omogućena je proizvodnja sintetskih i modificiranih enzima te biokataliza više nije strogo vezana za prirodne enzime. (Faber, 2018.)

Značaj biokatalize s vremenom postaje sve veći obzirom da biokatalizatori unose specifičnost u molekule dobivene organskom sintezom. Ova specifičnost manifestira se kao kiralnost molekula koje su važni prekursori u proizvodnji farmaceutika. Ključ razvitka biokatalize leži u integraciji znanja kemije, molekularne biologije i procesnog inženjerstva unutar načela zelene kemije. Trenutno postoje brojne industrijske biotransformacije za proizvodnju farmaceutika. (Findrik Blažević et al., 2020.) Predanost industrije implementaciji enzimskih sintetskih puteva već u ranim razvojnim fazama, postavlja dobru podlogu za nova istraživanja te motivira daljnji razvoj ekološki prihvatljivijih procesa. (Whittall et al., 2012.)

Primjer biokatalitičkog procesa je proces kataliziran halogenhidrin-dehalogenazom (HHDH). Često se u literaturi umjesto HHDH može naći nazive kao što su haloalkohol-dehalogenaze i halohidrin-epoksidaze, no sve su ovo sinonimi za skupinu enzima otkrivenu još 1968. g. Iako se HHDH-katalizirane reakcije pretvorbe halogenhidrina i epoksida intenzivno proučavaju, broj i raznolikost ovih enzima je ograničena. Detaljne studije usmjerene prema razumijevanju katalitičkog mehanizma, kinetike i stabilnosti, dale su pristup mutiranim varijantama HHDH s poboljšanim svojstvima i tako proširile raspon upotrebe ovih enzima u organskoj preparativnoj kemiji. (Lutje Spelberg et al., 2012.)

2. OPĆI DIO

2.1. Biokataliza

U svijetu se 85 – 90 % procesa provodi katalitički, dok se biokatalitički procesi javljaju u preko 300 raznih industrijskih postrojenja. Zbog kompleksnosti biokatalitičkih reakcija, u usporedbi s klasičnim organskim, brojne su ispitane samo teorijski. Usprkos tomu, nedostatak detaljnog razumijevanja biokatalitičkih procesa ne odvraća znanstvenike od njihove upotrebe. (Faber, 2018.) U samo nekoliko grana znanosti su tehnološki napredci imali toliko značajan utjecaj kao napredci u području biokatalize i biotransformacija. S početka, vizija biokatalize nije sezala dalje od upotrebe nekoliko jednostavnih hidrolaza za esterifikaciju. Provođena su brojna istraživanja s nizom katalizatora, no industrijska upotreba istih često nije bila moguća zbog nedostupnosti enzima. Kako je sve više enzima postajalo dostupno u većim količinama i s većom raznolikošću, tako se značaj biokatalize povećavao. Danas biokatalitički procesi imaju široki spektar primjene, posebno u farmaceutskoj industriji zbog potrebe za optički čistim spojevima. Kao odličan posrednik u proizvodnji kiralnih spojeva, biokataliza se natječe s brojnim alternativnim tehnologijama pripreme, kao što su asimetrična kemijska kataliza i kiralna preparativna kromatografija. (Whittall et al., 2012.)

2.1.1. Zelena kemija i biokataliza

Već se sredinom 1980.-ih pojavila zabrinutost vezana uz količinu otpada koju proizvodi kemijska industrija. Stoga je bilo potrebno tradicionalne koncepte kemijske efikasnosti i selektivnosti, fokusirane na iskorištenje reakcije, zamijeniti s konceptima koji maksimiziraju upotrebu sirovih materijala, eliminiraju otpad i izbjegavaju korištenje toksičnih supstanci. Tu se u priču uključuje pojam zelene kemije i održivosti. Kako bi se proces smatrao održivim treba ispunjavati slijedeće uvjete:

- Prirodne resurse bi trebalo koristiti brzinom koja dugoročno neće iscrpiti zalihe.
- Procesni ostaci bi se trebali stvarati brzinom koja nije veća od one koju prirodno okruženje može lako asimilirati.

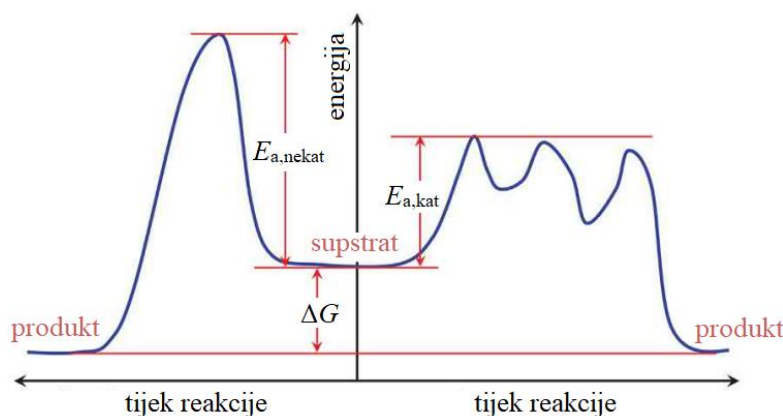
Zelena kemija može se sumirati u dvanaest načela, a biokataliza se slaže s njih deset, navedenih u tablici 2.1. Principi 4. i 10. nisu relevantni obzirom da se odnose na produkt, a ne na dizajn procesa. Ukratko, biokataliza je zaista zelena i održiva tehnologija, ne samo ekološki korisna, već i najviše isplativa. (Sheldon et al., 2018.)

TABLICA 2.1. Zelena kemija i biokataliza

PRINCIP ZELENE KEMIJE	BIOKATALIZA
1. Prevencija otpada	Značajno smanjena količina otpada.
2. Atomska ekonomija	Često omogućava efikasnije sintetske puteve.
3. Manje opasna sinteza	Generalno niska toksičnost.
4. Dizajniranje sigurnijih produkata	Nije relevantno (produkt, ne proces).
5. Sigurnija otapala i pomoćne tvari	Obično se provodi u vodi.
6. Energetska efikasnost	Blagi uvjeti provođenja/energetski efikasni.
7. Korištenje obnovljivih izvora	Enzimi su obnovljivi.
8. Smanjena derivatizacija	Izbjegava korištenje zaštitnih grupa.
9. Kataliza	Enzimi su katalizatori.
10. Dizajn za degradaciju	Nije relevantno (produkt, ne proces).
11. “Real-time“ analiza	Primjenjiva na biokatalitičke procese.
12. Sigurniji proces	Blagi i sigurni uvjeti provođenja.

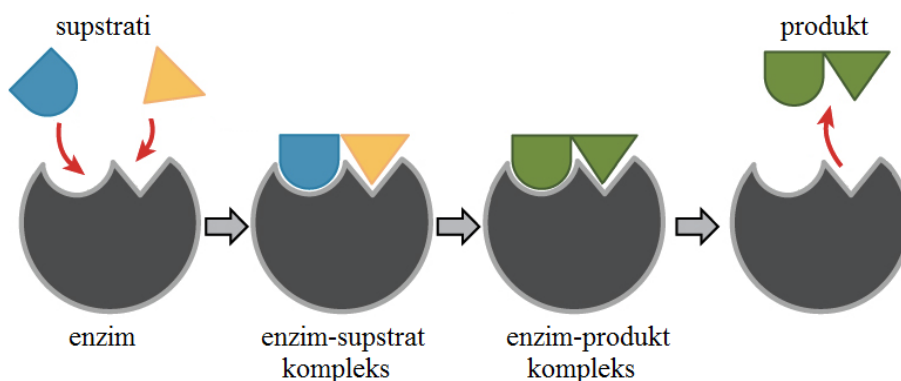
2.1.2. Princip biokatalize

Prvi korak pri biokatalizi je stvaranje kompleksa enzim-supstrat. Vežanje supstrata uvjetovano je precizno određenim rasporedom atoma na aktivnom mjestu enzima. Jačina vežanja ovisi o jačini međusobnih interakcija supstrata i biokatalizatora. (Liu, 2020.) Enzim-supstrat kompleks siromašniji je energijom te je za nastanak potrebna manja energija aktivacije (E_a). Slika 2.1. prikazuje razlike u mehanizmima nekatalizirane i katalizirane reakcije. Smanjena energija aktivacije potiče brže formiranje produkta, no reakcijski put katalizirane reakcije kompliciraniji je od mehanizma iste nekatalizirane reakcije. (Zrnčević, 2005.) Enzimi ne utječu na promjenu Gibbsove energije (ΔG), odnosno slobodnu energiju reakcije niti na konstantu ravnoteže. (Liu, 2020.)

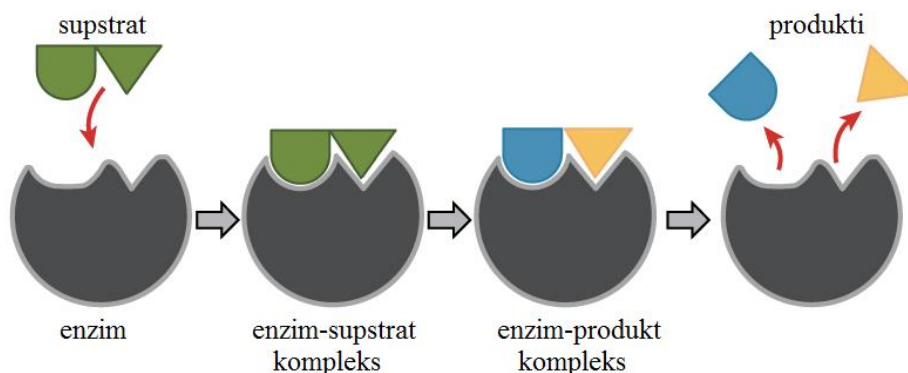


SLIKA 2.1. Shematski prikaz energijskih stanja nekatalizirane (lijevo) i katalizirane reakcije (desno) (Liu, 2020.)

Svojstvo enzima da prepozna supstrat uočeno je još krajem 19. stoljeća, kada je postavljena teorija ključ-brava (slika 2.2.). Po ovom modelu supstrat se veže na aktivno mjesto enzima, koje ima strukturu komplementarnu strukturi supstrata. (Gröger et al., 2012.) Razvojem znanja o enzimskom djelovanju utemeljena je teorija izazvanog pristajanja (slika 2.3.). U ovom slučaju, formiranje enzim-supstrat kompleksa uzrokuje promjene u trodimenzionalnoj strukturi enzima. Ova promjena strukture pridonosi boljoj katalitičkoj aktivnosti enzima. Postojanje enzim-supstrat kompleksa, na kojem se temelji moć biokatalize, dokazano je metodama kristalografije, rendgenske analize te Ramanove spektroskopije. (Liu, 2020.)



SLIKA 2.2. Shematski prikaz enzimskog djelovanja po modelu ključ-brava (modificirano prema slici 2.3.)



SLIKA 2.3. Shematski prikaz enzimskog djelovanja po modelu izazvanog pristajanja (<https://www.khanacademy.org/>)

2.1.3. Prednosti biokatalize

Biokataliza omogućuje kraće i učinkovitije sintetske puteve dobivanja aktivnih farmaceutskih sastojaka (eng. *active pharmaceutical ingredient*, API) te smanjuje količinu toksičnog otpada koji nastaje tijekom proizvodnje farmaceutika. Često su ovi procesi jedini način dobivanja željenog API-a. (Whittall et al., 2012.)

Biokataliza se implementira u slučajevima kada bi kemijska kataliza bila puno kompliciranija. Tipične brzine enzimski kataliziranih procesa su $10^8 - 10^{10}$ puta veće od nekataliziranih te su visoko iznad vrijednosti koje dostižu kemijski katalizirani procesi. Biokatalitički procesi se odvijaju pri blagim uvjetima, temperaturama u rasponu 20 – 40 °C i pH vrijednostima 5 – 8. Navedeni reakcijski uvjeti minimiziraju nepoželjne sporedne reakcije, kao što su raspad produkta, izomerizacija i racemizacija, koje smanjuju ukupno iskorištenje procesa. (Faber, 2018.)

Obzirom da biokatalizatori djeluju pri istim ili sličnim uvjetima, moguće je nekoliko biokatalitičkih reakcija ukomponirati u kaskade. Kaskadni enzimski sustavi od velike su koristi kada se radi s nestabilnim intermedijima. Također, slijednim enzimskim koracima moguće je u velikoj mjeri pomaknuti ravnotežu prema željenom produktu. (Faber, 2018.) Kaskadne reakcije oponašaju stanične metaboličke puteve te se javlja mogućnost upotrebe supstrata i enzima koji u prirodi možda i ne postoje. Brojne su prednosti kaskadnih sustava, od pojednostavljenja dodatnih procesa obrade bez izolacije međuprodukata, ekonomski isplativijih i jednostavnijih reakcijskih sustava, do manje potrošnje kemikalija i smanjenog štetnog utjecaja na okoliš. (Milčić et al., 2019.)

2.1.4. Nedostaci biokatalize

Prednost rada pri blagim uvjetima može biti i nedostatak. Ukoliko se reakcija odvija sporo, postoji uzak raspon temperatura i pH vrijednosti koji se može izmijeniti radi postizanja bolje učinkovitosti reakcije. Povišene temperature i pH vrijednosti mogu prouzrokovati denaturaciju proteina i gubitak aktivnosti. U svrhe povećanja selektivnosti obično se smanjuje reakcijska temperatura, no kod biokatalitičkih reakcija i taj je korak limitiran. (Faber, 2018.)

Većina biokatalitičkih procesa odvija se u vodenom mediju. Organski supstrati su u najvećem broju umjereno topljivi u vodi, dok se neke reakcije ne mogu ni provoditi zbog prevladavajućeg efekta hidrolize. Javlja se potreba za izolacijom produkta nakon reakcije i uklanjanjem tragova organskih tvari prije ispuštanja vode iz reakcijskog sustava. Također, kako bi se limitirala količina vode, koriste se visoke koncentracije supstrata. Sve navedeno povećava troškove biokatalize. Primamljive alternative su biokatalitički procesi u organskim otapalima, superkritičnom CO₂ te u ionskim tekućinama. No, svaki medij ima svoje prednosti i nedostatke, a sam odabir ovisi brojnim faktorima što razvoj određenog biokatalitičkog procesa čini dugotrajnim. (Sheldon et al., 2018.)

2.2. Biokatalizatori

Biokatalizatori, odnosno enzimi, su katalitički proteini. Čine najveću klasu proteina, s preko 2000 poznatih vrsta. (Liu, 2020.) Utječu na brzinu i/ili smjer reakcije, no ne troše se u samom procesu. Mogu ubrzati, ali i usporiti reakciju te se u tom slučaju nazivaju inhibitori. (Gomzi, 2009.) Najbogatiji izvor biokatalizatora su mikroorganizmi, a nekolicina se može izolirati iz biljaka, kao što su voće i povrće. (Faber, 2018.) U prošlosti, organski kemičari nisu koristili enzime zbog njihove limitirane stabilnosti u organskim otapalima, slabe efikasnosti pri korištenju divljih tipova enzima te sveukupno malog iskorištenja reakcija. Međutim, dosadašnji napreci u enzimskom inženjerstvu i razvoju procesa, omogućili su modifikacije enzima zbog kojih su navedeni nedostaci pali u zaborav. Biokatalizatori se danas koriste u izoliranom obliku ili kao cijele stanice, a brojni sintetički proizvedeni ili modificirani biokatalizatori primjenjivi su i na industrijskoj skali. (Gröger et al., 2012.)

2.2.1. Klasifikacija

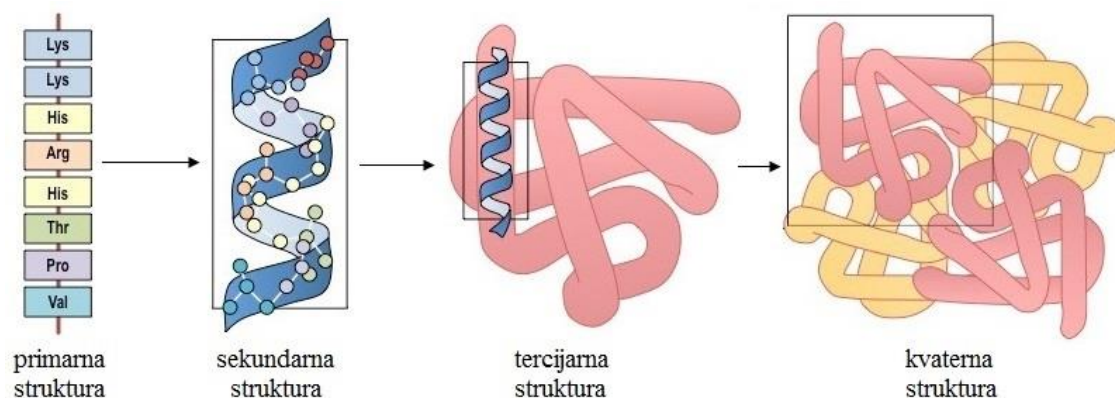
Imenovanje enzima se sastoji od dodavanja nastavka –aza na supstrat (npr. ureaza) ili reakcije koju kataliziraju (npr. alkohol dehidrogenaza). Klasifikacija se provodi prema prirodi reakcija koje enzimi kataliziraju te se dijele u šest glavnih skupina. Svaki enzim ima odgovarajući komisijski broj (engl. *enzyme commission number*, EC). Komisijski broj se sastoji od četiri znamenke, a prva u nizu omogućava razlikovanje enzimskih skupina. (Liu, 2020.) Skupine s odgovarajućim komisijskim brojevima te vrste reakcija koje se kataliziraju, navedene su u tablici 2.2. Enzimi su se pokazali vrlo učinkovitim katalizatorima za širok raspon organskih transformacija koje su prikladne i za industrijsku primjenu. Najviše su korištene hidrolaze. Nasuprot tomu, ligaze imaju limitiranu upotrebu, budući da su ovisne o adenzin-trifosfatu (ATP) čija *in situ* regeneracija predstavlja problem. (Gröger et al., 2012.)

TABLICA 2.2. Skupine enzima i karakteristične reakcije

SKUPINA ENZIMA	EC	VRSTA REAKCIJE KOJU KATALIZIRA
oksidoreduktaze	1	oksidacija-redukcija
transferaze	2	prijenos funkcionalnih grupa ili atoma
hidrolaze	3	prijenos funkcionalne skupine na vodu (hidroliza)
liaze	4	adicija i eliminacija skupina radi stvaranja dvostruke veze
izomeraze	5	izomerizacija
ligaze	6	formiranje kompleksnih spojeva (analogno liazama), enzimski aktivne samo u kombinaciji s adenzin-trifosfatom

2.2.2. Struktura

Većina enzima pripada globularnim proteinima. Osnovna gradivna jedinica proteina su aminokiseline koje su optički aktivne i javljaju se u dva kiralna izomerna oblika kao D- i L-aminokiseline. U proteinima se nalaze samo L-aminokiseline. (Liu, 2020.) Povezivanjem $-\text{COO}^-$ skupine jedne, sa $-\text{NH}_3^+$ skupinom druge aminokiseline nastaje peptidna veza, uz izdvajanje vode. Razine strukturne organizacije enzima prikazane su na slici 2.4. Strogo definiranim linearnim redoslijedom aminokiselina nastaje primarna struktura. Uvijanjem lanca aminokiselina nastaje druga razina strukturne organizacije – sekundarna struktura. Stabilna sekundarna struktura javlja se u dvije konformacije – α -uzvojnica te β -lanci povezani u β -nabrane plohe. Protein duž svojega lanca ne mora imati jednaku sekundarnu strukturu. Neki dijelovi mogu tvoriti α -uzvojnice, dok se drugi mogu povezati u nabrane plohe. Također, ne moraju svi dijelovi lanca imati strogo uređenu strukturu. Takva područja se nazivaju nasumično klupko. Većina globularnih proteina sadrži sva tri navedena segmenta. (Wade, 2017.)



SLIKA 2.4. Razine strukturne organizacije proteina (Marić, 2020.)

Daljnje svijanje i uvijanje lanca rezultat je interakcija između $-\text{R}$ grupa aminokiselina te određuje tercijarnu strukturu. Interakcije mogu biti kovalentne prirode, disulfidne ili vodikove veze, a prisutne su i hidrofobne te hidrofilne interakcije. (Liu, 2020.) Tercijarna struktura predstavlja trodimenzijsku konformaciju proteina. Uvijanjem enzima nastaje aktivno mjesto odgovorno za katalitičko djelovanje enzima. Posljednja strukturna razina je kvaterna, koja nastaje združivanjem više polipeptidnih lanaca. (Wade, 2017.) Točna masa enzima se rijetko poznaje obzirom da sadrži veliku količinu katalitički neaktivnog proteina. (Liu, 2020.)

Osobit broj enzima u svojoj strukturi mora sadržavati neproteinske grupe, kofaktore, kako bi se postigla katalitička aktivnost. Kofaktor može biti metalni ion Mg^{2+} , Zn^{2+} , a ukoliko je organska molekula, vitamini, CoA, NAD^+ ili FAD, tada se naziva koenzim. (Liu, 2020.) Kofaktor čini vrlo mali udio mase cijelog enzima. (Faber, 2018.)

2.2.3. Svojstva

Pri izboru adekvatnog biokatalizatora za određeni proces potrebno je proučiti njegova svojstva. Svojstva ovise o kemijskom sastavu i fizičkim značajkama biokatalizatora, kao i o uvjetima provedbe procesa, pH vrijednosti medija, temperaturi, vrsti reaktora i stupnju miješanja. Selektivnost je najvažnije svojstvo i najčešće osnova za izbor industrijskih biokatalizatora, zatim slijedi stabilnost i na posljetku aktivnost.

Aktivnost biokatalizatora iskazuje se kao mjera ubrzanja reakcije. Veća aktivnost omogućava bolje iskorištenje supstrata, enzima i samog reakcijskog prostora. (Zrnčević, 2005.) Najčešće se iskazuje kao maksimalna brzina reakcije. (Gröger et al., 2012.) Operacijska stabilnost biokatalizatora utječe na volumnu produktivnost procesa. Definirana je kao vrijeme potrebno da aktivnost padne na polovinu početne vrijednosti, a često se izražava i konstantom deaktivacije. Osim operacijske, važno je poznavati i stabilnost u uvjetima skladištenja. (Findrik Blažević, 2013.) Kada supstrati mogu reagirati na različite načine, uporabom prikladnog biokatalizatora moguće je ubrzati samo jednu od reakcija i na taj način smanjiti nastajanje nepoželjnih produkata. Ovo svojstvo biokatalizatora naziva se selektivnost. (Zrnčević, 2005.) Biokatalizatori pokazuju tri glavna tipa selektivnosti, prikazana u tablici 2.3. (Faber, 2018.)

TABLICA 2.3. Tri glavna tipa selektivnosti biokatalizatora

TIP SELEKTIVNOSTI	NAČIN DJELOVANJA
kemoselektivnost	Biokatalizatori djeluju samo na određenu funkcionalnu grupu, ostavljajući druge netaknutima.
regioselektivnost	Zbog kompleksne trodimenzionalne strukture, biokatalizatori mogu razlikovati funkcionalne grupe koje su kemijski identične, ali se nalaze na drukčijim pozicijama unutar supstrata.
enantioselektivnost	Biokatalizatori mogu, pri stvaranju enzim-supstrat kompleksa, prepoznati kiralnost prisutnu u supstratu te transformirati supstrat u optički aktivan produkt.

2.2.4. Prednosti

Obzirom da ne utječu na termodinamičku ravnotežu reakcije, mogu katalizirati reakcije u oba smjera. Najveću katalitičku moć pokazuju u vodi, no mogu funkcionirati i u nevodenim medijima kao što su organska otapala, ionske i superkritične tekućine. Iako je katalitička aktivnost slabija, brojne druge prednosti postižu se upotrebom alternativnih otapala. (Faber, 2018.)

Visoka kemoselektivnost, regioselektivnost i enantioselektivnost biokatalizatora otklanjaju potrebu za zaštitnim grupama, što smanjuje količinu derivata u procesu. (Whittall et al., 2012.)

Zbog ubrzanog unapređenja u molekularnoj biologiji, trošak proizvodnje enzima se stalno smanjuje. Nadalje, biokatalizatori su obnovljivi te ih je moguće ponovo koristiti ukoliko su imobilizirani, što također smanjuje proizvodni trošak. (Faber, 2018.) Prednosti korištenja biokatalizatora očituju se i u njihovoj sposobnosti razgradnje toksičnih i za okoliš opasnih tvari. (Whittall et al., 2012.)

2.2.5. Nedostaci

Neki enzimi su podložni fenomenu inhibicije pri višim koncentracijama supstrata i/ili produkta, što posljedično uzrokuje pad reakcijske brzine. Uklanjanje inhibitora obično je zahtjevno i može zakomplicirati proces.

Nadalje, biokatalizatori se u prirodi javljaju u samo jednom enantiomernom obliku. Stoga je u svrhe dobivanja produkta s drugim enantiomernim karakteristikama potrebno pronaći enzim sa suprotnim stereokemijskim obilježjima. Naposljetku, enzimi su vezani za prirodne kofaktore, koji se ne mogu zamijeniti s ekonomski isplativijim kemijskim supstratima. Ovisno o reakcijskom mediju u kojem se biokataliza odvija, može doći do raspada kofaktora čime se gubi aktivnost enzima. Neke metode regeneracije kofaktora su primjenjive na industrijskoj skali, dok su druge i dalje problematične. (Faber, 2018.)

2.2.6. HDDH enzimi

2.2.6.1. Otkriće i važnost danas

Halogenhidrin-dehalogenaze (HDDH) su vrlo rijetki enzimi, otkriveni u samo nekoliko bakterijskih sojeva (vidjeti poglavlje 2.2.6.2.) gdje sudjeluju u biodegradaciji halogeniranih ksenobiotika. Reakcije dehalogenacije prvi puta su opisane 1968. g. kada su Castro i Bartnicki proučavali reakciju degradacije 2,3-dibromo-1-propanola pomoću djelomično pročišćenog enzima izoliranog iz *Flavobacterium* sp. Uočeno je kako enzim može ukloniti bromidne i kloridne ione iz vicinalnih halogenhidrina uz formiranje odgovarajućih epoksida. Također je otkriveno da enzim može katalizirati otvaranje epoksida napadom bromidnih i kloridnih nukleofila na terminalnom ugljikovom atomu. Kasnijim otkrićem utvrđeno je da jod također

može biti nukleofil u reakciji otvaranja prstena. Daljnjim istraživanjima izolirano je nekoliko novih enzima iz različitih bakterijskih sojeva te se pokazala su mogućnost primjene neprirodnih nukleofila, kao što su cijanid, azid i nitrit, pri otvaranju epoksidnog prstena. (Schallmey et al., 2012.)

Širok raspon reakcija kataliziranih halogenhidrin-dehalogenazama pruža mogućnost korištenja u raznim procesima. Primjerice otklanjanje halogenih spojeva iz polimernih gradivnih komponenti, kao i uklanjanje halogeniranih alkohola u prehrambenoj i papirnoj industriji. Koriste se za stereoselektivne biotransformacije farmaceutske industrije u kojima nastaju optički aktivni C3 i C4 kiralni prekursori. Također, od velikog su značaja za industrijsku pripremu važnog intermedijera u proizvodnji atorvastatina. Od posebnog interesa su HHDH-katalizirane reakcije otvaranja epoksidnih prstena u prisutnosti cijanida. Dodatni supstituent na epoksidnom prstenu uzrokuje veliku enantioselektivnost, koja se može koristiti pri proizvodnji optički čistih tercijarnih alkohola. Pretvorbe 2,2-disupstituiranih epoksida omogućuju dobivanje optički čistih tercijarnih β -hidroksinitrila, β -azidoalkohola i diola, koje je teško dobiti nekatalitičkim metodama. Koncept enzimskih kaskadnih reakcija s halogenhidrin-dehalogenazama primjenjuje se u proizvodnji optički čistih kemijskih prekursora s enantiomernim suviškom većim od 99 %. (Schallmey et al., 2012.)

2.2.6.2. Klasifikacija, strukturne karakteristike i daljnji razvoj

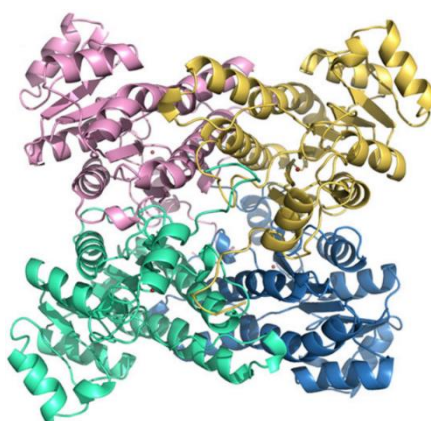
Brojna istraživanja posvećena su mikroorganizama koji pokazuju HHDH aktivnost te izolaciji i pročišćavanju istih. Unatoč tomu, do nedavno je klonirano samo nekoliko kodirajućih gena halogenhidrin-dehalogenaze, podijeljenih u tri filogenetska podtipa A, B i C kojima pripadaju:

- HheA iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074
- HheA2 iz *Arthrobacter* sp. soj AD2
- HheB iz *Corynebacterium* sp. soj N-1074
- HheB2 iz *Mycobacterium* sp. soj GP1
- dva identična HheC iz *Agrobacterium radiobacter* soj AD1 i *Rhizobium* sp. soj NHG3

Filogenetski, HHDH pripadaju kratkolančanim dehidrogenazama/reduktazama (engl. *short-chain dehydrogenase/reductase*, SDR) s kojima dijele strukturne, sekvencijske i mehanističke značajke. Ove sličnosti otežavaju identifikaciju novih HHDH, stoga su dugo vremena prethodno navedeni enzimi bili jedini predstavnici HHDH enzimske obitelji. Nedavne

karakterizacije olakšale su identifikaciju novih sekvenci halogenhidrin-dehalogenaza te uvelike povećale broj rekombinantno dostupnih enzima. Novootkrivene HHDH nije bilo moguće uvrstiti u već postojeće podtipove, stoga se klasifikacija povećala za četiri filogenetska podtipa D, E, F i G. (Schallmey et al., 2016.)

Do sada određene kristalne strukture HheA i HheA2 pokazuju 97,1 % sekvencijskih sličnosti, dok se unutar B filogenetskog podtipa javlja 98,2 % sličnosti sekvenci. (Lutje Spelberg et al., 2012.) HHDH-enzimi posjeduju aminokiseline serin (Ser), tirozin (Tyr) i arginin (Arg), odnosno Ser-Tyr-Arg katalitičku trijadu, sličnu serin-tirozin-lizin (Ser-Tyr-Lys) trijadi brojnih SDR-enzima. Također sadrže prostrani džep za vezanje nukleofila umjesto nikotinamidnog kofaktora. HHDH su homotetrameri, sastavljeni od para dimera kako je prikazano na slici 2.5. Monomeri sadrže Rossmannov nabor, koji se može pronaći i u drugim kratkolančanim dehidrogenazama/reduktazama. Tipičan Rossmannov nabor se sastoji od šest ili sedam paralelnih β -listova okruženih sa sedam ili osam α -uzvojnica. Aktivno mjesto monomera nalazi se duboko u unutrašnjosti enzima te je s okolinom povezano tunelom za ulazak supstrata koji određuje aktivnost i enantioselektivnost enzima. Smještaj katalitičkih ostataka, Ser, Tyr i Arg, točno je određen unutar aktivnog mjesta te utječe na aktivnost i enantioselektivnost enzima. Jedino HheC sadrži C-terminalni produžetak koji se proteže u aktivno mjesto suprotstavljenog monomera u strukturi. Produžetak sadrži triptofan (Trp) kiselinški ostatak koji značajno utječe na stereoselektivnost HheC. (Schallmey et al., 2016.) Također, HHDH su kofaktor-nezavisni enzimi, zbog čega je njihova priprema pojednostavljena. (Dokli et al., 2021.)



SLIKA 2.5. Struktura HheC (You et al., 2013.)

Inženjerska ispitivanja sa halogenhidrin-dehalogenazama provode se u svrhe povećanja njihove stabilnosti, modificiranja stereoselektivnosti i povećanja katalitičke brzine. HheC je podvrgnuta temeljitim studijima kako bi se biokatalizator prilagodio zahtjevima industrijskih

proizvodnih procesa. (Schallmey et al., 2012.) Pri razvoju biotransformacija, jedno od ključnih svojstava enzima je termostabilnost. Visoka temperatura je favorizirani uvjet u brojnim industrijskim biotransformacijama jer je preduvjet za povećanu enzimsku aktivnost, topljivost supstrata i smanjenu mikrobnu kontaminaciju. Međutim, termostabilni enzimi nisu uvijek dostupni iz prirodnih izvora te je njihov razvoj od velikog interesa za biokatalizu.

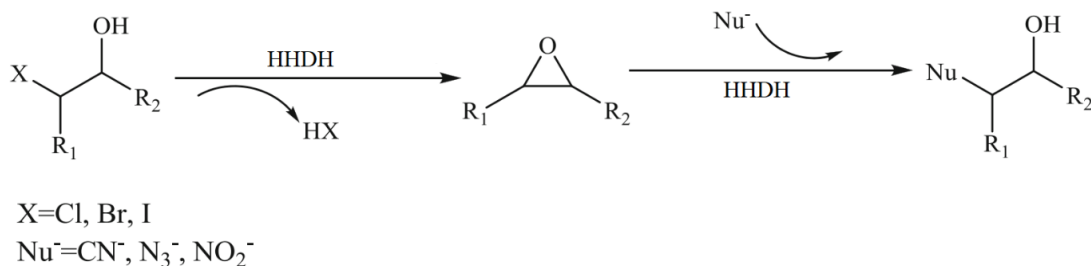
U usporedbi s ostalim tipovima halogenhidrin-dehalogenaza, najviše je proučavan C-tip HHDH iz *Agrobacterium radiobacter* AD1 (HheC). Usprkos važnosti termostabilnosti u biokatalizi objavljeno je tek nekoliko publikacija vezanih uz modifikaciju HheC enzima. Primjer je istraživanje Wu i suradnika (Wu et al., 2017.), koji su iterativnom mutagenezom zasićenja (engl. *iterative saturation mutagenesis*, ISM) razvili ISM-4 varijantu. Mutacije aminokiselina smještene na površini enzima nisu prouzrokovale negativne efekte na njegovu katalitičku aktivnost. Termostabilna ISM-4 varijanta pokazala je poboljšanje od 3400 puta u odnosu na poluživot matičnog enzima, povećanje temperature inaktivacije na 65 °C te povećanje optimalne radne temperature sa 50 °C na 70 °C. Poboljšana svojstva pripisuju se novim intramolekularnim interakcijama, uglavnom vodikovim vezama i elektrostatskim interakcijama. (Wu et al., 2017.)

2.2.6.3. Reakcije katalizirane HHDH enzimima

HHDH djeluje na C2 i C3 vicinalne halogenhidrine, a veću aktivnost pokazuje prema α -supstituiranim halogenhidrinima u odnosu na β -supstituirane derivate. Ovi enzimi mogu bez prisutnosti kofaktora rastaviti halogenhidrine na odgovarajuće epoksidge. Također mogu katalizirati i suprotnu reakciju otvaranja epoksidnog prstena u prisutnosti brojnih nukleofila. Na aktivnost halogenhidrin-dehalogenaza uvelike utječe temperatura, pH vrijednost, kao i prisutnost drugih elemenata. Teški metali kao što su Ag^+ , Hg^+ te Cu^+ pokazuju inhibitorско djelovanje prema HHDH. (You et al., 2013.)

Prilikom dehalogenacije serinski (Ser) kiselinski ostatak formira vodikovu vezu s hidroksilnom skupinom supstrata i tako omogućuje ulazak supstrata na aktivno mjesto enzima. argininski (Arg) ostatak ne reagira sa supstratom, već stvaranjem vodikovih veza smanjuje pK_a vrijednost tirozin-OH. Na taj način aktivira tirozinski (Tyr) ostatak za izdvajanje protona iz hidroksilne skupine. (Schallmey et al., 2016) U blizini površine enzima nalazi se aspargininski (Asp) ostatak koji, pomoću vodikovih veza u mreži sporednih lanaca i molekula vode, sudjeluje u transferu protona u otapalo. Stvara se negativni naboj koji serinski (Ser) ostatak stabilizira.

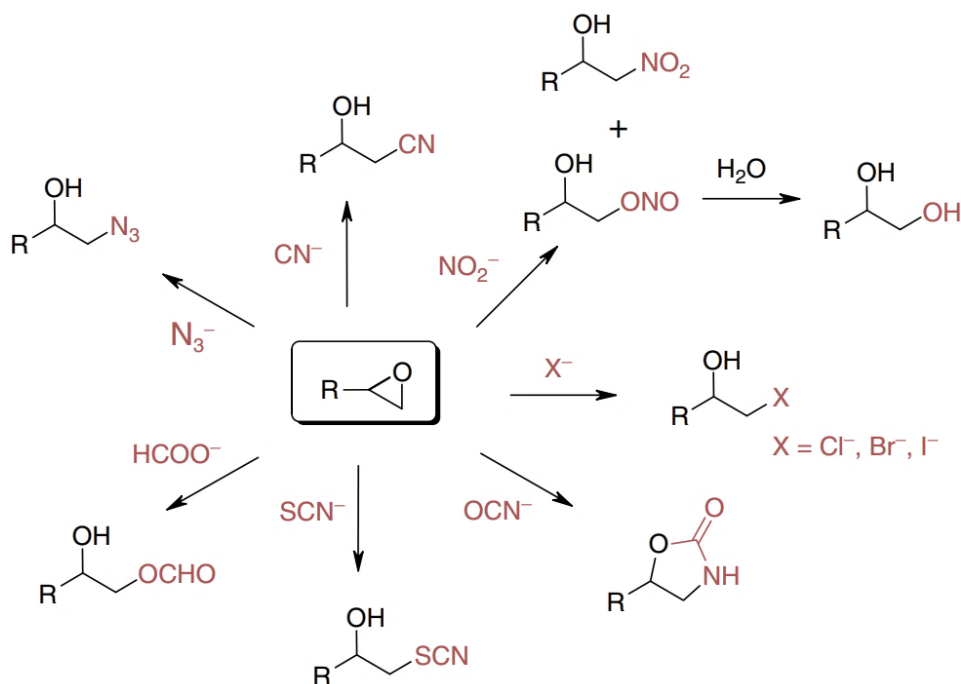
Slijedeći korak je nukleofilni napad susjednog ugljikovog atoma, što uzrokuje pucanje halogen-ugljik veze. (Schallmey et al., 2012) U reakciji otvaranja epoksidnog prstena tirozin (Tyr) donira proton formirajući kisikov anion nakon nukleofilnog napada na jedan od epoksidnih ugljika. (Schallmey et al., 2016) Katalitički mehanizam halogenhidrin-dehalogenaze prikazan je na slici 2.6.



SLIKA 2.6. Mehanizam HHDH katalizirane reakcije dehalogenacije i otvaranja epoksida (You et al., 2013.)

Prilikom otvaranja epoksida, HHDH može koristiti niz anionskih nukleofila, uključujući azid, nitrit, cijanid, cijanat, tiocijanat i formijat. Prilikom reakcija s azidom ili nitritom stvaraju se C-N veze, sa cijanidom C-C veze, u slučaju nitrita i formijata C-O veze te C-S veze u reakciji s tiocijanatom. (Schallmey et al., 2012.) Katalitičko područje djelovanja HHDH prikazano je na slici 2.7. U reakcijama s azidom nastaju vicinalni azido alkoholi. Ukoliko je nukleofil cijanid dolazi do formiranja β -hidroksinitrila, dok u reakciji s cjanatom nastaju oksazolidinoni. Reakcije s halogenim anionima, nitritom, tiocijanatom i formijatom imaju nedostatke u odnosu na prethodno navedene reakcije. Reverzibilnost reakcije u slučaju halogenih iona, formiranje nepoznatih nusprodukata u reakciji s tiocijanatom, manjak selektivnosti pri upotrebi formijata te kompleksnost smjese produkata u reakciji s nitritom, glavni su razlozi zašto ove reakcije nisu dovoljno istražene u preparativnoj kemiji. (Majerić Elenkov et al., 2014.)

Većina nukleofila prihvaćena u reakcijama otvaranja epoksidnog prstena inhibira reakcije zatvaranja prstena. (Lutje Spelberg et al., 2012.) U prisutnosti nenabijenih nukleofila, kao što su amonijak i voda, HHDH ne pokazuje aktivnost, zbog čega se lako mogu razlikovati od epoksidnih hidrolaza. Također, odabir supstrata limitiran je na terminalne epoksidge. Reakcije sa 2,2-disupstituiranim epoksidnim prstenom se teško provode. (Majerić Elenkov et al., 2014.) HHDH ne pokazuje osobitu aktivnost prema aromatskim supstratima obzirom da otvaranje prstena zahtjeva simultano vezanje epoksidge i nukleofila na aktivno mjesto enzima. (Lutje Spelberg et al., 2012.)



SLIKA 2.7. Reakcije otvaranja epoksidnog prstena djelovanjem halogenhidrin-dehalogenaze (Schallmeyer et al., 2012.)

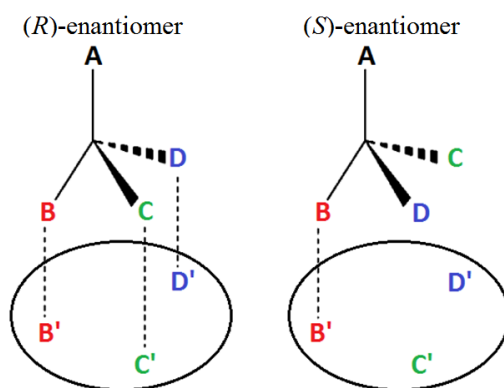
Upotreba HHDH je vrlo korisna u reakcijskim procesima koji koriste visoke koncentracije supstrata, kao i u kaskadnim reakcijama. Velika regioselektivnost i enantioselektivnost HHDH omogućava pristup samo jednom stereoisomeru produkta, što se ponekad može smatrati i nedostatkom upotrebe ovoga enzima. (Majerić Elenkov et al., 2014.)

2.3. Optički aktivne tvari

2.3.1. Kiralnost

Kiralnost je fundamentalna karakteristika prirode koja proizlazi iz asimetrije na centralnom ugljikovom atomu molekule. Javlja se kod proteina, enzima i brojnih drugih organskih molekula. Kiralni centar najčešće je ugljik, no ne nužno. Sumpor, fosfor i dušik također mogu biti centri kiralnosti. Spojevi koji posjeduju kiralni centar imaju nepreklopljivu zrcalnu sliku, odnosno enantiomerni oblik. Enantiomeri dijele gotovo ista fizikalna i kemijska svojstva, no razlikuju se prema zakretanju ravnine polariziranog svjetla. Zakretanje ravnine naziva se optička aktivnost, a tvari koje je uzrokuju optički aktivne tvari. Ukoliko kiralni spoj zakreće ravninu polariziranog svjetla u desno, tada je taj spoj (*R*)-enantiomer. Suprotno, (*S*)-enantiomer zakreće ravninu za isti iznos kuta u lijevo. Smjesa koja sadrži oba enantiomera u jednakim količinama naziva se racemična te pri se imenovanju koristi prefiks „*rac*-“.

Racemična smjesa ne posjeduje optičku aktivnost. (Kumar et al., 2020.) Osim racemičnih, smjese spojeva mogu biti optički čiste, odnosno sadržavati samo jedan enantiomer. Međutim, kada se smjesa ne može svrstati u jedan od navedenih tipova, navodi se optička čistoća smjese koja se definira omjerom zakretanja smjese i zakretanja čistog enantiomera te izražava kao postotak. (Wade, 2017.) Uz optički aktivne tvari veže se pojam enantioselektivnosti koja je očitovana u biološkoj aktivnosti tvari kako je prikazano na slici 2.8. Dostupnost (*S*)-selektivnih biokatalizatora je vrlo mala, a do danas su najbolje okarakterizirani (*R*)-selektivni biokatalizatori. (Majerić Elenkov et al., 2014.)



SLIKA 2.8. Djelovanje (*R*)-selektivnog biokatalizatora (modificirano iz Burke et al., 2002.)

2.3.2. Dobivanje optički aktivnih tvari

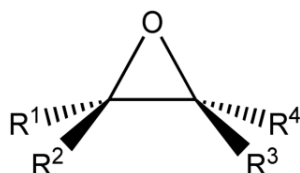
Enantiomeri zbog stereospecifičnosti vezanja na površinu receptora imaju različita farmakološka svojstva. Prethodno su u farmaceutskoj industriji dominirali racemati, no s vremenom je uočena potreba za proizvodnjom optički čistih farmaceutika. Razvitak enantioselektivnih biotransformacija od izrazite je važnosti za sintezu kiralnih molekula čiji samo jedan enantiomer pokazuje aktivnost.

Jedna metoda proizvodnje optički čistih farmaceutika je asimetrična sinteza, kojom se početnu akiralnu molekulu prevodi u određeni izomer spoja s kiralnim centrom. Druga metoda je separacija izomera, koja uključuje separaciju kromatografijom, kristalizaciju te enzimsku rezoluciju (biotransformaciju). Obzirom da enzim reagira samo s jednim izomerom, moguće je u proizvodni postupak uključiti korak enzimске rezolucije kako bi se izolirao željeni enantiomer. Raznolikost poznatih biotransformacija omogućuje i drukčiji pristup gdje se cijeli proizvodni postupak konstruira oko transformacije koja rezultira traženom kiralnom molekulom. (Burke et al., 2002.) Nadalje, kao korisna metoda dobivanja optički čistih spojeva predstavlja se kinetička rezolucija. Metoda se zasniva na bržem reagiranju jednog enantiomera

racemične smjese u odnosu na drugi. Uz kinetičku rezoluciju se veže potreba za zahtjevnom separacijom supstrata i željenog optički aktivnog produkta, kao i maksimalna konverzija početne sirovine od 50 %. Navedenim nedostacima može se doskočiti dinamičkom kinetičkom rezolucijom (DKR). DKR se temelji na kinetičkoj rezoluciji u kombinaciji s *in situ* racemizacijom sporo reagirajućeg enantiomera te je teoretski moguće postići stopostotno iskorištenje. Za uspješnu DKR potrebna je velika brzina reakcije racemizacije te ireverzibilnost enantioselektivne reakcije. (Lutje Spelberg et al., 2004.)

2.3.3. Epoksidi

Epoksidi, također poznati kao oksirani ili oksociklopropani, su zasićeni tročlani heterociklički spojevi čija su oba ugljika *sp*³ hibridizirana. Opća formula epoksida prikazana je na slici 2.9. Epoksidni prsten je zbog veličine kutova koje zatvara podložan otvaranju cijepanjem ugljik-kisik veze u prisutnosti brojnih elektrofila, nukleofila i neutralnih reagensa. Stereokemija reakcije otvaranja vođena je strukturom epoksida, reagensa i reakcijskim uvjetima, kao što su temperatura, polarnost otapala te korišteni katalizator. Oksirani su bezbojni, izuzetno otrovni plinovi slatkoga mirisa topivi u vodi i organskim otapalima. (Ram et al., 2017.)



SLIKA 2.9. Opća formula epoksida (Ram et al., 2017.)

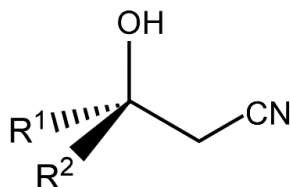
Zbog velike reaktivnosti često nisu produkti reakcija, već intermedijeri. Stoga se često koriste u farmaceutskoj i kozmetičkoj industriji pri sintezi stabilnijih, enantioselektivnih konačnih produkata. Prisutni su proizvodnji detergenata, sapuna, surfaktanata i razrjeđivača boje. Brojni prirodni produkti koji pokazuju antibakterijsku aktivnost prema sojevima otpornima na lijekove sadrže epoksidni prsten. (Ram et al., 2017.)

Najopćenitiji put za sintezu epoksida je epoksidacija alkena, a podložni su reakcijama oksidacije, redukcije, izomerizacije te dimerizacije. (Ram et al., 2017.) Optički čiste epoksidge moguće je dobiti i dehalogenacijom halogenalkohola kataliziranom halogenhidrin-dehalogenazom. Visoko enantioselektivna kinetička rezolucija daje epoksid velike optičke čistoće. Ukoliko se reakcija zaustavi nakon što je brže reagirajući enantiomer potpuno potrošen,

preostali enantiomer se metodama izolacije i pročišćavanja prevodi u drugi epoksidni enantiomer. Na ovaj način dostupna su oba enantiomera epoksida te ova strategija ima prednost kada enzim nema traženu enantioselektivnost. (Lutje Spelberg et al., 2012.)

2.3.4. Cijanolkoholi

Cijanoalkoholi, također poznati kao cijanohidri ili hidrosinitrili, su organski spojevi koji u svojoj strukturi sadrže hidroksi i nitrilnu skupinu. Ovisno jesu li funkcionalne skupine vezane na isti ili susjedni ugljikov atom razlikuju se α - i β -hidrosinitrili. Opća formula β -hidrosinitrila prikazana je na slici 2.10. Budući da se nitrilna skupina može transformirati u amino, amidnu, karboksi i karbonilnu skupinu, optički čisti β -hidrosinitrili služe kao svestrani spojevi u procesima sinteze bioaktivnih kiralnih molekula farmaceutske industrije. (Majerić Elenkov et al., 2006.)



SLIKA 2.10. Opća formula β -hidrosinitrila (Majerić Elenkov et al., 2006.)

Postoji nekoliko biokatalitičkih pristupa za njihovu pripremu. Učinkovita metoda je HHDH katalizirano otvaranje epoksidnog prstena u prisutnosti cijanidnog nukleofila, no potencijal korištenja halogenhidrin-dehalogenaza za sintezu β -hidrosinitrila nije naročito istražen. Ovisno koji se tip HHDH upotrebljava, formira se β -hidrosinitril različite aktivnosti, enantioselektivnosti i optičke čistoće. HHDH nadopunjuju biokatalitički opseg hidrosinitril liaza, budući da oba enzima kataliziraju dobivanje proizvoda sa nitrilnom i hidroksi skupinom. Bifunkcionalna priroda ovih enzima je jednaka, s razlikom da HHDH daju β -hidrosinitrile, dok hidrosinitril liaze kataliziraju stvaranje α -hidrosinitrila. (Majerić Elenkov et al., 2006.)

2.3.5. Fluorirane molekule

Farmaceutska se industrija tijekom prošlih desetljeća rapidno mijenjala te se fokus s malih organskih molekula pomaknuo prema biofarmaceuticima. Međutim, situacija s fluoriranim farmaceuticima, odnosno malim organskim farmaceuticima, je drukčija. Posljednjih godina oko 20 % komercijalno dostupnih farmaceutika su fluorirani spojevi. Svake godine u posljednja tri desetljeća registrirano je pet do deset fluorofarmaceutika. (Inoue et al., 2020.)

Visoka zainteresiranost za fluorirane molekule pripisuje se svojstvima fluora. Kako je fluor drugi najmanji element, odmah iza vodika, zamjena vodika s fluorom ne mijenja drastično strukturu molekule. Nadalje, ugljik-fluor veza, najjača je veza koju ugljikov atom može stvoriti te stvaranje ove veze često rezultira povećanjem metaboličke stabilnosti fluorofarmaceutika. Elektronegativnost fluora utječe na liofilnost i hidrofилnost spoja. Kombinacija ovih svojstava utječe na absorpciju, distribuciju i metaboličke puteve fluoriranog farmaceutika. Generalno se koriste u liječenju kožnih bolesti, kao antitumorski i protuupalni lijekovi. (Inoue et al., 2020.)

Porastom interesa za fluorirane farmaceutike, raste i važnost metoda sinteze istih. Jedan pristup sintezi podrazumijeva fluorinaciju raznim fluoriranim agensima, dok se drugi pak sastoji od modifikacije jednostavnih, komercijalno dostupnih spojeva koji sadrže fluor. Fluorirane spojeve moguće je enantioselektivno modificirati kako bi se dobili optički aktivni intermedijeri. Međutim, preparativne transformacije potrebno je poboljšati kako bi se smanjila mogućnost sporednih reakcija te povećala učinkovitost. (Dokli et al., 2021.)

2.4. Modeliranje biotransformacija

Modeliranje biotransformacija igra ključnu ulogu u traženju optimalnih reakcijskih uvjeta, dizajniranju i razvijanju procesa te identificiranju troškova prevođenja procesa na industrijsku skalu. Također, dovodi do boljeg razumijevanja i kvantifikacije procesa. Modeliranje je moguće provesti integracijom znanja o relevantnim biokemijskim i fizikalnim mehanizmima. Tako dobiveni modeli su generalno primjenjivi, no zahtijevaju opsežna istraživanja za sveobuhvatni opis. Temelje se na poznavanju prijenosa i bilanci tvari te reakcijskoj kinetici. Međutim, ukoliko se modeliranje temelji na mjerenju parametara reakcijskog sustava, nije potrebno detaljno poznavanje sustava. Adekvatni modeli trebaju biti što jednostavniji i imati dobra interpolacijska i ekstrapolacijska svojstva kako bi se postavili procesni uvjeti i predvidjelo ponašanje sustava izvan optimalnih uvjeta rada. (Vrsalović Presečki et al., 2006.)

2.4.1. Koraci modeliranja

Postupak modeliranja dijeli se na nekoliko koraka. Na početku je potrebno definirati svrhu postavljanja novog modela. Slijedi karakterizacija reakcijskog mehanizma prikupljanjem eksperimentalnih podataka. Važno je ispitati utjecaj supstrata i ostalih komponenti sustava, prijenosa mase, temperature i pH vrijednosti na karakteristike biokatalizatora. U ovom koraku,

prethodno definirana svrha određuje opseg i smjer potrebnog eksperimentalnog istraživanja. Treći korak je strukturiranje modela pomoću reakcijske kinetike i reaktorskog modela. Zatim se procjenjuju parametri modela pomoću eksperimentalnih podataka i/ili relevantne literature, nakon čega se provodi ispitivanje podudarnosti parametara i mjerne nesigurnosti. (Sin et al., 2009.) Procjena kinetičkih parametara s visokom preciznošću oslonac je za uspješnu validaciju modela. Parametri se mogu procijeniti nelinearnom regresijom i optimizirati koristeći pojedine optimizacijske algoritme. Nadalje, provodi se evaluacija numeričkih vrijednosti parametara uklapanjem modela u eksperimentalne podatke. Rezultat ovog koraka je empirijski kinetički model. (Vasić-Rački et al., 2011.) Na posljetku se provodi validacija modela uz pomoć odvojenog seta podataka pri različitim reakcijskim uvjetima. (Sin et al., 2009.) Razvijeni kinetički model kombinira se s reaktorskim, te kao takav mora biti eksperimentalno potvrđen u kotlastom reaktoru pri različitim koncentracijama supstrata i/ili enzima. Validacija se provodi usporedbom dobivenih eksperimentalnih podataka sa simulacijom pri istim reakcijskim uvjetima. (Vasić-Rački et al., 2011.)

2.4.2. Prednosti modeliranja

Pomoću razvijenog modela, moguće je provesti optimizaciju procesa koja uključuje potrošnju biokatalizatora, pretvorbu supstrata i iskorištenje na produktu te produktivnost procesa. (Vasić-Rački et al., 2011.) Optimizacija modelom može se provoditi tek nakon što su sve međuovisnosti procesnih varijabli poznate, a model eksperimentalno validiran.

Prednost modeliranja očituje se u smanjenoj potrebi za eksperimentalnim radom te manjim troškovima razvoja procesa. Primjenom modeliranja moguće je pojednostaviti složene sustave i uravnotežiti procesne varijable, kao što su aktivnost enzima, koncentracija supstrata, brzina protoka i brojne druge. Nadalje, modeliranje se u biokatalizi primjenjuje i za procjenu utjecaja na okoliš, kao i u integraciji biokatalitičkih procesa u industrijska postrojenja. Još jedna prednost leži u mogućnosti kombiniranja matematičkog modeliranja s proteinskim inženjerstvom s ciljem poboljšanja katalitičkog djelovanja enzima. Odabir najboljeg enzima za promatranu reakciju olakšan je provedbom simulacija. Ukoliko se reakcije provode s više biokatalizatora, model omogućava uvid u njihove međusobne interakcije i olakšava postavljanje najboljeg omjera biokatalitičkih aktivnosti u reaktoru. Simulirani modeli omogućavaju uvid u optimalne radne uvjete kojima bi se pozitivno utjecalo na stabilnost biokatalizatora, skratilo vrijeme trajanja reakcije, minimiziralo nastajanje nusprodukata i

optimiziralo brojne druge procesne značajke. Također je moguće ispitati strategije dotoka supstrata i/ili enzima i njihov utjecaj na procesne značajke te ekonomičnost procesa. Moguće je odrediti kako ponovljeni dodatak biokatalizatora utječe na reakciju, kao i ekonomsku opravdanost takvog postupka. Modeliranjem se mogu simulirati reakcijski profili u različitim tipovima reaktora pri različitim procesnim uvjetima te odrediti koji je tip reaktora najpogodniji za reakciju od interesa. No, može se primjenjivati i obrnuto, tako sa se odabere željeni reaktor te na temelju odabira pronađu adekvatni početni reakcijski uvjeti s kojima se se postiže željeni reakcijski profil. (Milčić et al., 2019.) Iako se modeliranje biokatalitičkih procesa rijetko koristi u industriji, literaturni izvori pokazuju povećani interes za ovu temu. (Vasić-Rački et al., 2011.)

2.4.4. Matematički modeli

Matematički modeli, pogotovo kada se kombiniraju s modernim računalnim tehnikama, pokazali su se vrlo učinkovitima u traženju optimalnih radnih uvjeta. Isto tako, korisni su u stvaranju optimalnog okruženja za biokatalizator kako bi se postigla najbolja produktivnost. (Vasić-Rački et al., 2003.)

U biokatalizi, matematički se modeli dijele na četiri područja, a svaki model ima točno definirano područje djelovanja. Biokatalitički molekularni model opisuje katalizu na molekularnoj razini, interakcije između enzima i supstrata te omogućava predviđanje selektivnosti reakcije. Reakcijski i reaktorski modeli su kinetički matematički modeli. Reakcijski opisuje reakcijski mehanizam u ovisnosti o parametrima kao što su temperatura, pH i koncentracija, dok reaktorski model opisuje reakciju u reaktoru pomoću bilance base i hidrodinamičkih uvjeta. Informacije za konstruiranje ovih modela mogu se prikupiti eksperimentima početne brzine reakcije. Krećući od molekularne razine, svaki slijedeći model nadograđuje se na prethodni, što u konačnici dovodi do procesnog modela. Procesni modeli analiziraju performansu procesa uzimajući u obzir interakcije između stupnjeva procesa. (Sin et al., 2009.)

2.4.5. Kinetički modeli

Brojni literaturni radovi opisuju modeliranje kinetike enzima na temelju najjednostavnijeg reakcijskog mehanizma koji se sastoji od koraka vezanja enzima i supstrata te katalitičkog koraka. Najzastupljenije metode određivanja kinetičkih parametara su metoda

početnih brzina te integralna metoda. (Vasić-Rački et al., 2011.) Svrha kinetičkih istraživanja ostvaruje se kroz odabir najbolje matematičke ovisnosti brzine enzimske reakcije o veličinama stanja reakcijskog sustava te kroz numeričko određivanje konstanti kinetičkih modela. Kinetički model je matematički izraz kojim se opisuje veza između brzine enzimske reakcije i reakcijskih veličina stanja. Pretpostavljanje kinetičkog modela može se provesti na temelju poznatog mehanizma reakcije i tada se takav model naziva mehanistički. Međutim, moguće je i postaviti određenu matematičku funkciju kojom se dobro opisuje eksperiment i u tom slučaju dobiveni model se naziva empirijski. Model temeljen na poznavanju mehanizma reakcije ima prednost pred empirijskim. Također, ukoliko postoji više predloženih modela koji podjednako dobro opisuju kinetiku enzimske reakcije, odabire se jednostavniji s manje parametara. (Gomzi, 2009.)

Pri modeliranju enzimske kinetike najčešće se zbog jednostavnosti koriste jednosupstratne reakcije pretvorbe reaktanta u produkt. Reakcije se sastoje od ravnotežnog vezanja supstrata (S) i enzima (E) uz formiranje enzim-supstrat kompleksa (ES). Tokom reakcije enzim postaje nestabilan te slijedi ireverzibilni raspad enzim-supstrat kompleksa do produkta (P) i slobodnog enzima (2.1). (Marangoni, 2002.)



Većinom je vezanje supstrata brže od raspada kompleksa, a akumulacijom produkta reverzibilna reakcija nastanka kompleksa postaje predominantna. Također, produkt reakcije može inhibirati djelovanje enzima. Zbog navedenog, katalitičko djelovanje enzima nemoguće je opisati standardnim modelima homogene i/ili heterogene kemijske analize. Stoga je postavljena Michaelis-Menteničina jednadžba (2.2) kao fundamentalna jednadžba enzimske kinetike. Pretpostavke Michaelis-Menteničine kinetike temelje se na stabilnosti enzima tijekom kinetičkih ispitivanja, korištenju početnih brzina kao brzina reakcije te izravnoj proporcionalnosti brzine reakcije s ukupnom koncentracijom enzima, a glase:

- Koraci vezanja supstrata i formiranja enzim-supstrat kompleksa su brzi u odnosu na brzinu raspada kompleksa.
- Koncentracija supstrata ostaje konstantna tijekom cijele reakcije.
- Pretvorba produkta u supstrat je neznatna obzirom da se vrlo malo produkta formira za vrijeme reakcije. (Marangoni, 2002.)

Brzina enzimske reakcije r [$\text{mmol dm}^3 \text{ min}^{-1}$], ovisi o koncentraciji supstrata c_s [mmol dm^{-3}]. Također, za Michaelis-Menteničinu kinetiku karakteristične su dvije konstante, maksimalna brzina enzimske reakcije V_m [$\text{mmol dm}^3 \text{ min}^{-1}$] te Michaelisova konstanta K_m [mmol dm^{-3}]. (Marangoni, 2002.) K_m odgovara koncentraciji supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne vrijednosti. Pri određenim uvjetima pH i temperature, K_m ima vrijednost karakterističnu svakom enzimu, što omogućava karakterizaciju enzima. Michaelisova konstanta je kod većine enzima obrnuto proporcionalna afinitetu enzima prema supstratu. Dakle, veći afinitet prema supstratu rezultira nižom K_m vrijednosti. (Blanco et al., 2017.) Matematički zapisi maksimalne brzine enzimske reakcije i Michaelisove konstante prikazani su izrazima (2.3) i (2.4), gdje k_1 , k_{-1} , k_2 predstavljaju konstante brzine reakcija formiranja i disocijacije enzim-supstrat kompleksa te nastajanja produkta, a $c(E_T)$ ukupnu koncentraciju enzima. (Marangoni, 2002.)

$$r = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s} \quad (2.2)$$

$$V_m = k_2 \cdot c(E_T) \quad (2.3)$$

$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (2.4)$$

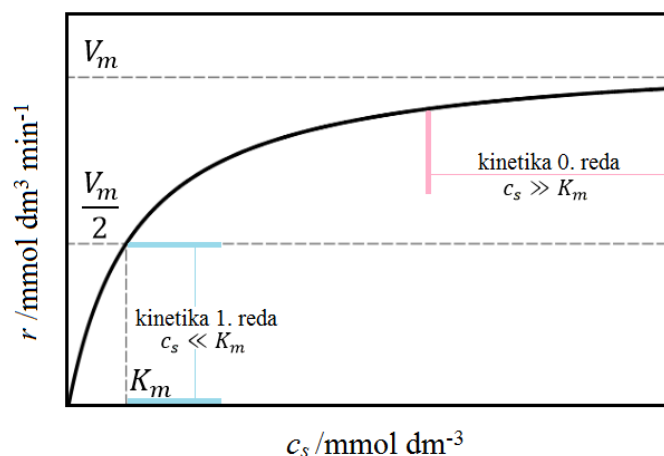
Međutim, brojni enzimi kataliziraju reakcije između dva ili više supstrata, stoga su ovi mehanizmi kompliciraniji od jednosupstratnih. Vezanje supstrata može biti slijedno uređeno ili slučajno. Za dvosupstratne sustave također je primjenjiva Michaelis-Menteničina kinetika, no tada izraz (2.2) poprima oblik (2.5). (Marangoni, 2002.)

$$r = \frac{V_m \cdot c_{s1} \cdot c_{s2}}{(K_{m,s1} + c_{s1}) \cdot (K_{m,s2} + c_{s2})} \quad (2.5)$$

Ovisnost brzine reakcije r o koncentraciji supstrata c_s grafički se može prikazati hiperboličkom krivuljom zasićenosti na slici 2.11. Pri niskim koncentracijama supstrata, brzina enzimske reakcije linearno je ovisna o koncentraciji supstrata. Za ovo područje vrijedi kinetika 1. reda opisana izrazom (2.6). Suprotno, pri visokim koncentracijama supstrata, reakcijska brzina ostaje približno konstantna te nije osjetljiva na promjenu koncentracije supstrata. U ovom slučaju vrijedi kinetika 0. reda te je brzina reakcije definirana izrazom (2.7). Između dva krajnja slučaja je područje Michaelis-Menteničine kinetike. (Marangoni, 2002.)

$$r = \frac{V_m}{K_m} \cdot c_s \quad (2.6)$$

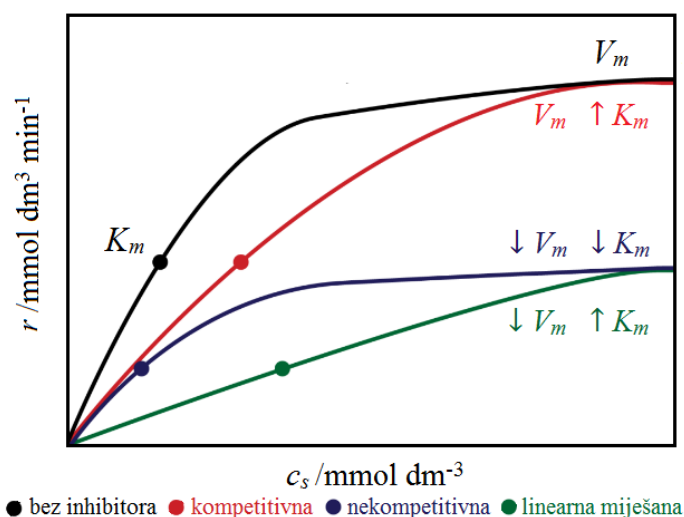
$$r = V_m \quad (2.7)$$



SLIKA 2.11. Grafički prikaz Michaelis-Menteničine kinetike (modificirano iz Marangoni, 2002.)

Detaljnije informacije o mehanizmu biokatalitičke reakcije moguće je prikupiti istraživanjem inhibitorskog utjecaja na enzim. Naime, na aktivno mjesto enzima, osim supstrata, mogu se vezati i druge molekule koje onemogućavaju vezanje supstrata te smanjuju ili u potpunosti zaustavljaju aktivnost enzima. Enzimski inhibitori se dijele na povratne i nepovratne. Nepovratni inhibitori vežu se trajno na enzim kovalentnim vezama, dok povratni ne stvaraju kovalentne veze. Povratni inhibitori se ovisno o interakciji s enzimom dijele na kompetitivne, nekompetitivne i antikompetitivne. (Balnco et al, 2017.)

Svaka inhibicija na specifičan način utječe na vrijednosti konstante disocijacije enzim-supstrat kompleksa, K_m te V_m . Na slici 2.11. grafički je prikazana promjena navedenih veličina obzirom na vrstu inhibicije koja se javlja. Kod kompetitivne inhibicije, inhibitor se natječe sa supstratom za prednost pri vezanju na aktivno mjesto enzima. Rezultat je povećanje konstante disocijacije enzim-supstrat kompleksa i smanjenje afiniteta enzima prema supstratu, dok maksimalna brzina reakcije ostaje nepromijenjena. Ukoliko se inhibitor veže na enzim-supstrat kompleks, javlja se nekompetitivna inhibicija. Za ovaj tip inhibicije karakteristično je smanjenje K_m i V_m vrijednosti. Prividno povećanje afiniteta enzima prema supstratu, odnosno smanjenje konstante disocijacije kompleksa, rezultat je neproduktivnog vezanja supstrata te smanjenja koncentracije slobodnih enzima. Nadalje, inhibitor se može vezati za slobodni enzim i enzim-supstrat kompleks na mjestima izuzev aktivnog mjesta enzima te se takva inhibicija naziva linearna miješana inhibicija. Vezanje inhibitora uzrokuje porast vrijednosti konstante disocijacije kompleksa i pad maksimalne brzine reakcije. Poseban slučaj linearne miješane inhibicije je antikompetitivna inhibicija prilikom koje se K_m vrijednost ne mijenja, a V_m se smanjuje. (Marangoni, 2002.)



SLIKA 2.12. Grafički prikaz povratne enzimске inhibicije (Marić, 2020.)

Povećanje koncentracije supstrata smanjuje inhibicijski učinak kompetitivnih inhibitora, no isto ne vrijedi za nekompetitivnu i antikompetitivnu inhibiciju. (Blanco et al., 2017.) No, pri visokim koncentracijama supstrata često se javlja inhibicija supstratom. Najjednostavnije objašnjenje inhibicije supstratom podrazumijeva vezanje dvije molekule supstrata na enzim na aktivnim mjestima i nekatalitičkim inhibicijskim mjestima. Krivulja reakcijske brzine s povećanjem koncentracije supstrata raste do maksimuma, a zatim opada na nulu i u tom slučaju je inhibicija supstratom potpuna. S druge strane, krivulja može pasti na asimptotu koja je različita od nule i tada se govori o parcijalnoj inhibiciji supstratom. (Yoshino et al., 2015.)

Matematički izrazi povratnih inhibicija prikazani su jednadžbama (2.8) – (2.10). Pri čemu c_s [mmol dm⁻³] predstavlja koncentraciju supstrata, c_i [mmol dm⁻³] koncentraciju inhibitora, K_i [mmol dm⁻³] konstantu inhibicije, dok su značenja V_m i K_m već prethodno pojašnjena. (Marangoni, 2002.) Inhibicija supstratom prikazana je izrazom (2.11). (Yoshino et al., 2015.)

$$r = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s} \quad (2.8)$$

$$r = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.9)$$

$$r = \frac{V_m \cdot c_s}{(K_m + c_s) \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (2.10)$$

$$r = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s + \frac{c_s^2}{K_i}} \quad (2.11)$$

2.4.4. Reaktorski modeli

Reaktori su prostori u kojima se provode reakcije s ciljem dobivanja željenog produkta. Osnovni tipovi idealnih reaktora su su kotlasti (KR), protočno-kotlasti (PKR) te cijevni reaktor (CR). Kotlasti, odnosno šaržni reaktori, su zatvoreni reaktorski sustavi koji djeluju u nestacionarnom stanju. Veličine stanja reaktora koji rade u nestacionarnom stanju ovise o vremenu. Nasuprot tomu, protočno-kotlasti i cijevni reaktori su otvoreni reaktorski sustavi koje karakterizira rad u stacionarnom stanju. Kod stacionarnog rada veličine stanja nezavisne su o vremenu. Odvijanjem reakcije određena količina reakcijske smjese izmjenjuje se s okolinom, reaktanti se kontinuirano dovode, a produkti odvođe kroz reaktor. Od navedenih, kotlasti reaktor ima najučestaliju primjenu, a za postavljanje matematičkog modela (2.12) koji opisuje rad ovog reaktora pretpostavljaju se idealizirana stanja:

- Idealno miješanje i prijenos topline osigurava homogenost reakcijske smjese.
- Volumen reakcijske smjese je stalan i neovisan o vremenu. Ne dolazi do izmjene reakcijske smjese s okolinom.
- Izotermnost sustava pretpostavlja da je toplina dovedena u reaktor jednaka odvedenoj. Radna temperatura sustava je poznata, ne mijenja se s vremenom i jednaka je u svim točkama reaktorskog prostora. (Gomzi, 2009.)

$$r = -\frac{dc_s}{dt} \quad (2.12)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Aparatura

3.1.1. Reakcijski sustav

Aparatura u kojoj su provedene reakcije prikazana je na slici 3.1., a sastoji se od kotlastog reaktora i tresilice Thermomixer C (Eppendorf, Njemačka). Tresilica omogućava istovremeno miješanje i homogenizaciju uzoraka te kontrolu temperature u temperaturnom rasponu od 15 do 100 °C. Brzine miješanja kreću se od 300 do 3000 okr min⁻¹. Kao reaktorski prostor korištene su Eppendorf epruvete volumena 2 mL. Aparatura je bila smještena u digestoru. Za uzorkovanje reakcijske smjese korištena je Research plus pipeta (Eppendorf, Njemačka) varijabilnog volumena u rasponu 10 – 100 µL.



SLIKA 3.1. Reakcijski sustav

3.1.2. Kromatografski sustavi

Kromatografija je metoda razdvajanja komponenti iz smjese temeljena na razlici u vremenu potrebnom komponenti da nošena mobilnom fazom prođe kroz stacionarnu fazu. Komponenta s većom distribucijom u mobilnoj fazi brže prolazi kroz stacionarnu fazu. Vrijeme zadržavanja (engl. *retention time*, t_R) definira se kao suma vremena provedenog u stacionarnoj i mobilnoj fazi. Rezultat kromatografske analize je kromatogram. Informacije dobivene kromatografijom mogu biti kvalitativne (indicirati koje se komponente nalaze u uzorku) ili kvantitativne (ukazivati na količinu komponenti u uzorku). Obzirom na vrstu mobilne faze razlikuju se plinska i tekućinska kromatografija.

Plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*, GC) je kvantitativna metoda analize lako hlapljivih i termički stabilnih uzoraka. Prednosti se očituju u brzini provođenja analize, nedestruktivnosti i efikasnosti analize. Ova metoda koristi male količine uzoraka (obično u μL) te uz veliku točnost može detektirati uzorke koncentracija od 1 mg mL^{-1} do $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$. Plinskom kromatografijom moguće je analizirati anorganske i organske spojeve s masama u rasponu od 2 do preko 1000 Da. (McNair et al., 2019.) Uz plinsku kromatografiju često se koristi i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-pressure liquid chromatography*, HPLC). Lako kontrolirano i precizno uvođenje uzoraka osigurava kvantitativnu preciznost. Najveća prednost metode je primjenjivost na različite vrste analita, od malih organskih molekula do biomolekula i polimera. Važna karakteristika HPLC analize je visoka osjetljivost za komponente u tragovima. Preciznost i ponovljivost analize su razlog zašto obje metode pronalaze veliku primjenu u kemijskoj, farmaceutskoj, prehrambenoj i drugim industrijama. (Dong, 2013.)

3.1.2.1. Plinski kromatograf

Plinski kromatograf korišten u ovom radu je GC-2014 (Shimadzu, Japan) opremljen plameno-ionizacijskim detektorom (engl. *flame ionization detector*, FID) prikazan na slici 3.2. Kromatografski se sustav sastoji od generatora vodika (1), sustava za automatsko injektiranje (2), plinskog kromatografa (3) te računala (4). Pri analizi plinskom kromatografijom korištena je kiralna kolona Lipodex E za analizu supstrata (*S*)-epoksida i (*R*)-epoksida.



SLIKA 3.2. Kromatografski sustav

3.1.2.2. HPLC uređaj

Za analizu tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti korištena su dva HPLC uređaja, prikazana na slici 3.3. Ovisno o spoju koji se analizira korišten je ili HPLC s UV detektorom (Shimadzu, Japan) ili LC-40 Nexera Lite (Shimadzu, Japan) HPLC uređaj opremljen detektorom s nizom dioda (engl. *photo diode array*, PDA). HPLC uređaj s UV detektorom opremljen je s kiralnom kolonom Chiralpack IC-3 koja služi za analizu pojedinačnih enantiomera produkta cijanoalkohola. HPLC uređaj s PDA detektorom opremljen je akiralnom Kinetex Phenomenex Core-shell C18 kolonom. Navedena akiralna kolona služi za akiralnu analizu epoksida i cijanoalkohola.



SLIKA 3.3. A: HPLC opremljen PDA detektorom i B: HPLC s UV detektorom

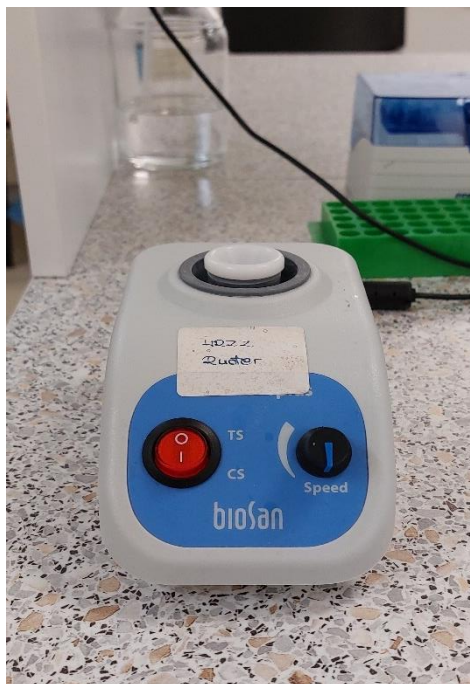
3.1.4. Ostala aparatura

Za vaganje uzoraka korištena je analitička vaga AUW120 (Shimadzu, Japan) prikazana na slici 3.4.

Za homogeniziranje i ekstrakciju uzoraka korištena je miješalica Vortex V-1 plus (Biosan, Latvija) prikazana na slici 3.5.



SLIKA 3.4. Analitička vaga AUW120



SLIKA 3.5. Miješalica Vortex V-1 plus

3.2. Priprava kemikalija

3.2.1. Popis kemikalija

U tablicama 3.1. i 3.2. navedene su kemikalije korištene pri provođenju eksperimenata.

TABLICA 3.1. Komercijalno dostupne kemikalije

PUNI NAZIV KEMIKALIJE	KEMIJSKI SIMBOL ILI POKRATA	PROIZVOĐAČ
2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer	Tris-SO ₄	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
dimetil sulfoksid	DMSO	Kemika d.d., Hrvatska
etil-acetat	EtOAc	Carlo Erba Reagents, Italija
<i>rac</i> -2-(4-fluorofenil)oksiran	C ₈ H ₇ FO	Alfa Aesar, SAD
natrijev cijanid	NaCN	Thermo Fisher Scientific, SAD
acetonitril	ACN	Thermo Fisher Scientific, SAD
trifluoroctena kiselina	TFA	Thermo Fisher Scientific, SAD

TABLICA 3.2. Komercijalno nedostupne kemikalije

PUNI NAZIV KEMIKALIJE	POKRATA	PROIZVOĐAČ
1-(<i>p</i> -nitrofenil)-2-bromoetanol	PNSHH	Sintetizirani na Institutu Ruđer Bošković u Laboratoriju za stereoselektivnu sintezu i biokatalizu.
<i>p</i> -nitrostiren oksid	PNSO	
varijanta C tipa halogenhidrin-dehalogenaze	ISM-4	Pripremljena na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu.

Pripravljena je temeljna otopina (TO) epoksida koncentracije 500 mM otapanjem odvage kapljevitoz uzorka u dimetil sulfoksidu, DMSO. TO je skladištena u hladnjaku pri temperaturi +4 °C i kao takva je stabilna mjesecima.

Temeljna otopina natrijeva cijanida, koncentracije 200 mM, pripremljena je otapanjem odvage natrijevog cijanida u Tris-SO₄ puferu. TO pripravljena na ovaj način skladištena je u zamrzivaču pri temperaturi – 20 °C do pet dana.

Pripravljena je TO racemične smjese PNSHH u DMSO koncentracije 100 mM. TO skladištena je u hladnjaku pri temperaturi +4 °C i korištena po potrebi.

Enzim ISM-4 ($\gamma = 4,38 \text{ mg mL}^{-1}$) skladišten je u zamrzivaču pri temperaturi – 20 °C i odmrzavan neposredno prije korištenja.

3.3. Analitičke metode

3.3.1. Analiza plinskom kromatografijom

Analiza uzoraka provedena je na uređaju GC-2014 (Shimadzu, Japan). Uzorak se unosi uz pomoć sustava za automatsko injektiranje AOC-20i (Shimadzu, Japan) pri uvjetima $T_{\text{injektor}} = 250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 39,4 \text{ kPa}$ te protoku $14,8 \text{ mL min}^{-1}$. Mobilna faza je bio dušik čistoće 5,0 iz spremnika (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska), dok je stacionarna faza bila kiralna kolona za analizu enantiomera epoksida Lipodex E (Macherey-Nagel, Njemačka) čije su osnovne karakteristike prikazane u tablici 3.3.

Tijekom detekcije ($T_{\text{detektor}} = 300 \text{ }^{\circ}\text{C}$) uzorci su spaljivani u smjesi sintetskog zraka čistoće 5,0 iz spremnika (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska) i vodika generiranog u uređaju Gas Generator 9150 (Parker Hannifin, SAD). Podaci su obrađivani uz programsku podršku GC Solutions (Shimadzu, Japan). Za kiralnu analizu epoksida provedena je metoda s promjenom temperature počevši od $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ kroz 5 min do $130 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Retencijska vremena (*S*)- i (*R*)-enantiomera epoksida iznosila su 6,0, odnosno 6,3min. Kromatogram i baždarni pravci prikazani su na kraju rada u prilogu 1.

TABLICA 3.3. Karakteristike stacionarne faze

	Lipodex E
literaturni izvor	https://www.mn-net.com/
tip kolone	kiralna
materijal	ciklodekstrin faza napravljena od cikličkih oligosaharida
duljina, m	50
promjer, mm	0,25
debljina pora, μm	informacija nije dostupna
temperaturni raspon, $^{\circ}\text{C}$	do 220

3.3.2. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

U ovom se radu za analizu koristila i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Stacionarne faze su bile kiralna kolona Chiralpak IC-3 (Daicel Chiral Technologies, Indija) za kiralnu analizu pojedinačnih enantiomera cijanoalkohola na HPLC uređaju s UV detektorom te akiralna Kinetex Core-shell C18 (Phenomenex, SAD) za akiralnu analizu epoksida i cijanoalkohola na HPLC uređaju sa PDA detektorom, kao i za analizu PNSHH i PNSO u testu aktivnosti. Osnovne karakteristike korištenih kolona prikazane su u tablici 3.4.

Kiralna analiza pojedinačnih enantiomera cijanoalkohola provedena je metodom izokratnog eluiranja pri 30 °C, 1 mL min⁻¹ i 254 nm, pri čemu je mobilna faza bio *n*-heksan uz dodatak 5% izopropanola. Retencijska vremena (*R*)-enantiomera i (*S*)-enantiomera produkta iznosila su 25,0, odnosno 26,7 minuta. Kromatogram i baždarni pravci prikazani su na kraju rada u prilogu 2.

Akiralna analiza supstrata epoksida i produkta alkohola provedena je metodom gradientnog eluiranja uz mobilnu fazu A (90% ACN u ultračistoj vodi) i B (ultračista voda). Analiza je provedena gradijentnom metodom mijenjanjem koncentracije faze B od 80 % do 50 % do 20. minute, zatim od 50 % do 80 % tijekom 5 minuta, nakon čega slijedi zadržavanje koncentracije faze B na 80 % do 27. minute. Protok faze pri 30 °C iznosio je 1 mL min⁻¹. Vrijeme zadržavanja supstrata epoksida iznosilo je 18,4 min, a produkta cijanoalkohola 10,2 min. Kromatogram i baždarni pravci prikazani su na kraju rada u prilogu 3.

Komponente u testu aktivnosti, tj. PNSHH i PNSO, praćeni su metodom gradijentnog eluiranja uz mobilnu fazu A (80 % ACN u ultračistoj vodi s 0,1 % TFA) i B (ultračista voda s 0,1% TFA). Analiza je provedena mijenjanjem koncentracije faze B od 40 % do 30 % do 5. minute, zatim od 30 % do 40 % tijekom pola minute, nakon čega slijedi zadržavanje koncentracije faze B na 40 % do 7. minute. Protok faze pri 30 °C iznosio je 1,5 mL min⁻¹. Vrijeme zadržavanja PNSHH iznosilo je 3,4 min, a PNSO 3,8 min. Kromatogram i baždarni pravci prikazani su na kraju rada u prilogu 4.

TABLICA 3.4. Karakteristike stacionarnih faza

	Chiralpak IC-3	Kinetex Core-shell C18
literaturni izvor	https://chiraltech.com/	https://www.phenomenex.com
tip kolone	kiralna	akiralna
materijal	polisaharidni derivat imobiliziran na silika gel	oktildecilsilan na čvrstoj silika podlozi
duljina, mm	150	100
promjer, mm	4,6	4,6
debljina pora, μm	3	2,6
temperaturni raspon, °C	0 – 40	do 60

3.4. Ispitivanje stabilnosti enzima tijekom inkubacije te operacijske stabilnosti enzima

Za određivanje stabilnosti tijekom inkubacije te operacijske stabilnosti enzima korišten je Tris-SO₄ pufer koncentracije 500 mM, pH vrijednosti 7,5. Eksperimenti su provedeni pri 25 °C i 1000 okr min⁻¹ u reaktoru volumena 500 μL.

Pri eksperimentima inkubacije, koncentracija enzima iznosila je $\gamma_{ISM-4} = 1 \text{ mg mL}^{-1}$, a koncentracije *rac*-epoksida i NaCN navedene su u tablicama 3.5. i 3.6. Inkubacija je provedena pri različitim koncentracijama *rac*-epoksida i natrijevog cijanida, no nikada istovremeno, kako ne bi došlo do enzimske reakcije između te dvije tvari. Kako bi se ustanovila stabilnost samog enzima, najprije je sirovi enzimski ekstrakt inkubiran u puferu bez dodatka *rac*-epoksida i NaCN.

Praćenje stabilnosti enzima provedeno je pokretanjem testa aktivnosti u određenim vremenskim intervalima. Test aktivnosti je test pretvorbe PNSHH u PNSO uz djelovanje enzima. Enzim iz inkubacijskog medija je uzorkovan, razrijeđen u puferu te odvojen od ostatka smjese na AmiconTM Ultra-0.5 centrifugalnom filtru (Merck, SAD) centrifugiranjem pri 4 °C te 14 000 okr min⁻¹ tijekom 5 minuta. Po završetku centrifugiranja, enzim je resuspendiran s ultracentrifugalnog filtera pomoću reakcijskog pufera. Volumen pufera koji se dodaje za resuspendiranje enzima s filtera podešavan je u različitim eksperimentima tako da odgovara konačnoj koncentraciji proteina od 0,01 mg mL⁻¹. Prethodno uzimanju uzoraka pripremljen je reaktor za određivanje aktivnosti enzima stavljanjem 465 μL Tris-SO₄ pufera za aktivnost u 25 μL PNSHH. Reakcijska smjesa je homogenizirana, a zatim se 10 μL enzima, odvojenog od ostatka medija na filteru, prenosilo u epruvetu sa prethodno pripremljenom otopinom PNSHH. Pri dodatku je pokrenuta štoperica, a uzorak homogeniziran nekoliko sekundi na ručnom vortexu. Potom je reakcija nastavljena u Thermomixer C tresilici (Eppendorf, Njemačka) pri 25 °C i 1000 okr min⁻¹. Test aktivnosti proveden je metodom početnih reakcijskih brzina, na način da je uzorkovan 5 puta unutar prvih 5 minuta, što odgovara konverziji supstrata PNSHH manjoj od 10%. Alikvot uzorka od 10 μL prebacio se u epruvetu s 500 μL EtOAc te je zapisano vrijeme. Uzorak je miješan 20 s na vortexu kako bi se ekstrahirali PNSHH i PNSO iz vodenog u organski medij, a zatim je organski sloj posušen propuštanjem preko sloja natrijevog sulfata u vijalicu. Ovako pripremljeni i dobro zatvoreni uzorci, čuvani su u digestoru do analize tekućinskom kromatografijom. Stabilnost enzima tijekom inkubacije praćena je na ovaj način tijekom 72 h.

TABLICA 3.5. Koncentracije epoksida pri ispitivanju stabilnosti enzima

	c_1, mM	c_2, mM	c_3, mM	c_4, mM
<i>rac</i>-epoksid	0	5	20	50

TABLICA 3.6. Koncentracije NaCN pri ispitivanju stabilnosti enzima

	c_1, mM	c_2, mM	c_3, mM	c_4, mM
NaCN	0	20	50	100

Postupak praćenja operacijske stabilnosti enzima istovjetan je praćenju stabilnosti enzima tijekom inkubacije, pri čemu je razlika u mediju iz kojeg se enzim uzorkuje i odvaja na filteru prije pokretanja testa aktivnosti. Operacijska stabilnost enzima je stabilnost enzima tijekom upotrebe u reaktoru, stoga je enzim uzorkovan iz šaržnih reaktora. Sastav reaktora dan je tablicama 3.7. – 3.12.

Pretvorba PNSHH u PNSO prilikom praćenja stabilnosti enzima određena je HPLC metodom kako je opisano u prethodnom poglavlju.

3.5. Eksperimenti validacije matematičkog modela

Sastav reakcijskih smjesa u reaktoru u eksperimentima provedenim radi validacije modela u šaržnom reaktoru navedeni su u tablicama 3.7. – 3.12. Početni sastav reakcijske smjese za eksperiment s ponovnim dodatkom supstrata prikazan je u tablici 3.13. Svakih pola sata, do petog sata, u reaktor je dodano 50 mM *rac*-epoksida i 25 mM NaCN do njihove konačne koncentracije. Eksperimenti su provedeni u digestoru. Za ispitivanu biokatalitičku reakciju temperatura je održavana pri 25 °C, dok se homogenizacija reakcijske smjese postizala pri 1000 okr min⁻¹. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 1000 µL.

Uzorkovanje reakcijske smjese provedeno je u pravilnim vremenskim intervalima tijekom 24 sata, odnosno u slučaju eksperimenta s ponovljenim dodatkom supstrata tijekom 6 sati. Alikvoti od 10 µL supstrata su ekstrahirani su na Vortex miješalici tijekom 20 sekundi u 500 µL EtOAc te su posušeni na sloju Na₂SO₄. Takvi uzorci podvrgnuti su HPLC, odnosno GC analizi, kako bi se dobili podaci o potrošnji supstrata i nastanku produkta.

TABLICA 3.7. Sastav reakcijske smjese za prvi eksperiment

	reaktor	DMSO	epoksid	pufer	NaCN	ISM-4
γ , mg mL ⁻¹	-	-	-	-	-	0,0101
<i>c</i> , mM	-	1400	30	500	150	-
<i>V</i> , μ L	1000	40	60	127	750	23

TABLICA 3.8. Sastav reakcijske smjese za drugi eksperiment

	reaktor	DMSO	epoksid	pufer	NaCN	ISM-4
γ , mg mL ⁻¹	-	-	-	-	-	0,0101
<i>c</i> , mM	-	1400	20	500	150	-
<i>V</i> , μ L	1000	60	40	127	750	23

TABLICA 3.9. Sastav reakcijske smjese za treći eksperiment

	reaktor	DMSO	epoksid	pufer	NaCN	ISM-4
γ , mg mL ⁻¹	-	-	-	-	-	0,0101
<i>c</i> , mM	-	1400	60	500	150	-
<i>V</i> , μ L	1000	40	60	127	750	23

TABLICA 3.10. Sastav reakcijske smjese za četvrti eksperiment

	reaktor	DMSO	epoksid	pufer	NaCN	ISM-4
γ , mg mL ⁻¹	-	-	-	-	-	0,0504
<i>c</i> , mM	-	1400	100	500	150	-
<i>V</i> , μ L	1000	0	100	35	750	115

TABLICA 3.11. Sastav reakcijske smjese za peti eksperiment

	reaktor	DMSO	epoksid	pufer	NaCN	ISM-4
γ , mg mL ⁻¹	-	-	-	-	-	1,0
<i>c</i> , mM	-	1400	52	500	25	-
<i>V</i> , μ L	1000	50	50	545	125	230

TABLICA 3.12. Sastav reakcijske smjese za šesti eksperiment

	reaktor	DMSO	epoksid	pufer	NaCN	ISM-4
γ , mg mL ⁻¹	-	-	-	-	-	0,5
<i>c</i> , mM	-	1400	100	500	50	-
<i>V</i> , μ L	1000	0	100	535	250	115

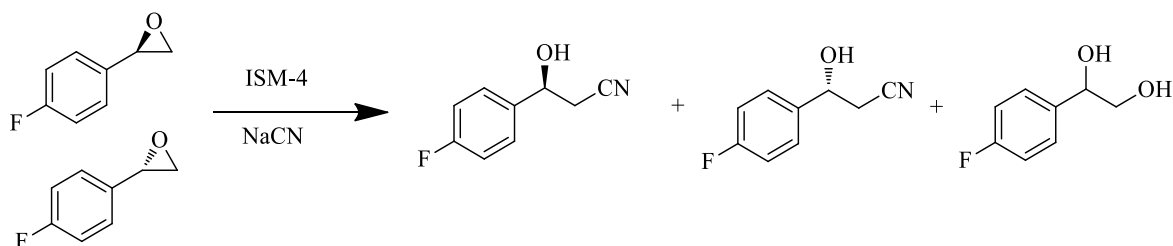
TABLICA 3.13. Sastav reakcijske smjese za sedmi eksperiment

	reaktor	DMSO	epoksid	pufer	NaCN	ISM-4
γ , mg mL ⁻¹	-	-	-	-	-	0,5
<i>c</i> , mM	-	1400	100	500	50	-
<i>V</i> , μ L	1500	75	75	284,5	37,5	1028

4. MATEMATIČKI MODEL BIOKATALITIČKE SINTEZE

FLUORIRANOG CIJANOALKOHOLA

Na slici 4.1. prikazana je shema biokatalitičke reakcije sinteze (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitrila otvaranjem epoksidnog prstena *rac*-2-(4-fluorofenil)oksirana cijanidnim ionima katalizirana ISM-4 varijantom HheC enzima. Reakcijom nastaje i neželjeni (*R*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitril te produkt hidrolize *rac*-2-(4-fluorofenil)-1,2-etandiol. Cjeloviti matematički model za navedeni biokatalitički proces u kotlastom reaktoru sastoji se od kinetičkog i reaktorskog modela.



SLIKA 4.1. Sinteza (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitrila otvaranjem epoksidnog prstena *rac*-2-(4-fluorofenil)oksirana cijanidnim ionima

4.1. Kinetički model

Nastajanje (*S*)-produkta, odnosno (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitrila, opisano je Michaelis-Menteničinom dvosupstratnom kinetikom uz uključenu inhibiciju supstratom epoksidom, te kompetitivnu inhibiciju produktom, diolom i DMSO kako je prikazano izrazom (4.1). Produkt nastaje iz (*R*)-2-(4-fluorofenil)oksirana. Nadalje, nastajanje (*R*)-produkta iz (*S*)-epoksida također je opisano dvosupstratnom Michaelis-Menteničinom kinetikom, uz uključenu kompetitivnu inhibiciju (*R*)-epoksidom i otapalom DMSO (4.2). Izraz (4.3) opisuje reakciju hidrolize *rac*-epoksida, odnosno nastajanje *rac*-2-(4-fluorofenil)-1,2-etandiola, koja prati kinetiku 1. reda.

$$r_1 = \frac{V_m^1 \cdot e^{-k_d \cdot t} \cdot c_{(R)\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{cijanid}} \cdot \gamma_{\text{ISM-4}}}{(K_{m1}^{\text{cijanid}} + c_{\text{cijanid}}) \cdot \left(K_{m1}^{(R)\text{-epoksid}} \cdot \left(1 + \frac{c_{\text{produkt}}}{K_{i1}^{\text{produkt}}} + \frac{c_{\text{diol}}}{K_{i1}^{\text{diol}}} + \frac{c_{\text{DMSO}}}{K_i^{\text{DMSO}}} \right) + c_{(R)\text{-epoksid}} + \frac{c_{(R)\text{-epoksid}}^2}{K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}} \right)} \quad (4.1)$$

$$r_2 = \frac{V_m^2 \cdot c_{(S)\text{-epoksid}} \cdot c_{\text{cijanid}} \cdot \gamma_{\text{ISM-4}}}{(K_{m2}^{\text{cijanid}} + c_{\text{cijanid}}) \cdot \left(K_{m2}^{(S)\text{-epoksid}} \cdot \left(1 + \frac{c_{(R)\text{-epoksid}}}{K_{i2}^{(R)\text{-epoksid}}} + \frac{c_{\text{DMSO}}}{K_i^{\text{DMSO}}} \right) + c_{(S)\text{-epoksid}} \right)} \quad (4.2)$$

$$r_3 = k_h \cdot c_{\text{rac-epoksid}} \quad (4.3)$$

4.1.1. Kinetika biokatalitičke reakcije

Kinetička ispitivanja prethodno su provedena na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu. Kinetički parametri, dobiveni eksperimentima u kotlastom reaktoru metodom početnih brzina, prikazani su u tablici 4.1., gdje eksponent 1 označava reakciju s (*R*)-2-(4-fluorofenil)oksiranom, a eksponent 2 sa (*S*)-2-(4-fluorofenil)oksiranom. Iz (*R*)-epoksida nastaje (*S*)-cijanoalkohol, a iz (*S*)-epoksida (*R*)-cijanoalkohol, no to ne znači da dolazi do inverzije konfiguracije, već je rezultat nomenklature, odnosno prioriternih skupina kod imenovanja po CIP pravilu. Poznavanjem vrijednosti kinetičkih parametara moguće je detaljnije opisati utjecaje supstrata i produkata na odvijanje reakcije. Provedenim se ispitivanjima omogućilo postavljanje kinetičkog modela biokatalitičke reakcije kako je prikazano u poglavlju 4.1.

TABLICA 4.1. Kinetički parametri reakcijskog sustava

PARAMETAR	MJERNA JEDINICA	VRIJEDNOST
V_m^1	U mg ⁻¹	42,211 ± 4,771
K_{m1}^{cijanid}	mM	67,735 ± 5,354
$K_{m1}^{(R)\text{-epoksid}}$	mM	26,704 ± 0,633
$K_{i1}^{(R)\text{-epoksid}}$	mM	58,898 ± 4,923
K_{i1}^{produkt}	mM	5,109 ± 0,424
K_{i1}^{diol}	mM	73,94 ± 6,77
K_i^{DMSO}	mM	1546,7 ± 119,7
V_m^2	U mg ⁻¹	4,994 ± 0,951
K_{m2}^{cijanid}	mM	194,58 ± 13,89
$K_{m2}^{(S)\text{-epoksid}}$	mM	19,049 ± 0,804
$K_{i2}^{(R)\text{-epoksid}}$	mM	1,102 ± 0,201
k_h	min ⁻¹	0,0025 ± 1,65 · 10 ⁻⁵

Brzina reakcije nastajanja (*S*)-produkta uz cijanat ovisna je o koncentraciji (*R*)-epoksida prema Michaelis-Menteničinoj kinetici uz inhibiciju supstratom (*R*)-epoksidom, DMSO otapalom te produktima reakcije β-hidroksinitrilom i *rac*-diolom. Situacija je malo jednostavnija u reakciji otvaranja (*S*)-epoksida obzirom da nastajanje produkta inhibira samo (*R*)-epoksid i DMSO. Kinetička mjerenja ne mogu dati odgovor na pitanje zašto se kod otvaranja epoksidnih enantiomera javljaju različite inhibicije. Zašto do nekih inhibicija dolazi, a do drugih ne moglo bi se utvrditi sa stajališta npr. molekuskog modeliranja proučavanjem načina i mjesta na koje se ovi inhibitori vežu. Inhibicija (*R*)-epoksidom izraženija je u slučaju otvaranja (*R*)-epoksida, gdje vrijednost konstante inhibicije K_i iznosi oko 58,898 mM, dok je u

slučaju otvaranja (*S*)-epoksida 1,102 mM. DMSO u oba slučaja jednako inhibira tijekom reakcije. Obzirom da je konstanta inhibicije izrazito velika, $K_i = 1546,7$ mM, može se zaključiti kako je inhibicijski utjecaj otapala malen u odnosu na utjecaje drugih komponenata, no treba imati na umu da je DMSO otapalo koje se u reaktor dodaje u mnogo većim količinama nego npr. supstrati.

Vrijednost Michaelis-ove konstante za cijanidne ione značajno je veća u slučaju reakcije otvaranja (*S*)-epoksida s cijanidom gdje iznosi 194,58 mM, dok je u istoj reakciji s (*R*)-epoksidom ta vrijednost 67,735 mM. Iz navedenog slijedi da enzim ima nizak afinitet prema cijanidnim ionima u reakciji s (*S*)-epoksidom te da je u ovom slučaju reakciju potrebno provoditi s puno većom količinom NaCN nego u slučaju s (*R*)-epoksidom kako bi se postigla maksimalna brzina reakcije.

Oba epoksidna enantiomera prate Michaelis-Menteničinu dvosupstratnu kinetiku, s tim da je maksimalna brzina reakcije oko deset puta veća u reakciji stvaranja (*S*)-produkta. Ova reakcija je favorizirana te je (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitril željeni produkt.

Reakcija hidrolize neizbježna je sporedna reakcija opisana kinetikom 1. reda uz konstantu hidrolize od $0,0025 \text{ min}^{-1}$. Iz navedenog se može zaključiti kako povećanjem koncentracije *rac*-epoksida dolazi do linearnog povećanja brzine reakcije hidrolize i nastanka *rac*-diola u većoj mjeri.

4.2. Reaktorski model

Reaktorski model sastoji se od bilancnih jednadžbi prikazanih izrazima (4.4) do (4.8). Navedene jednadžbe opisuju promjenu koncentracija supstrata i produkata u vremenu odvijanja reakcije.

$$\frac{dc_{\text{cijanid}}}{dt} = -r_1 - r_2 \quad (4.4)$$

$$\frac{dc_{(R)\text{-epoksid}}}{dt} = -r_1 - 0,5 \cdot r_3 \quad (4.5)$$

$$\frac{dc_{(S)\text{-epoksid}}}{dt} = -r_2 - 0,5 \cdot r_3 \quad (4.6)$$

$$\frac{dc_{(S)\text{-produkt}}}{dt} = r_1 \quad (4.7)$$

$$\frac{dc_{(R)\text{-produkt}}}{dt} = r_2 \quad (4.8)$$

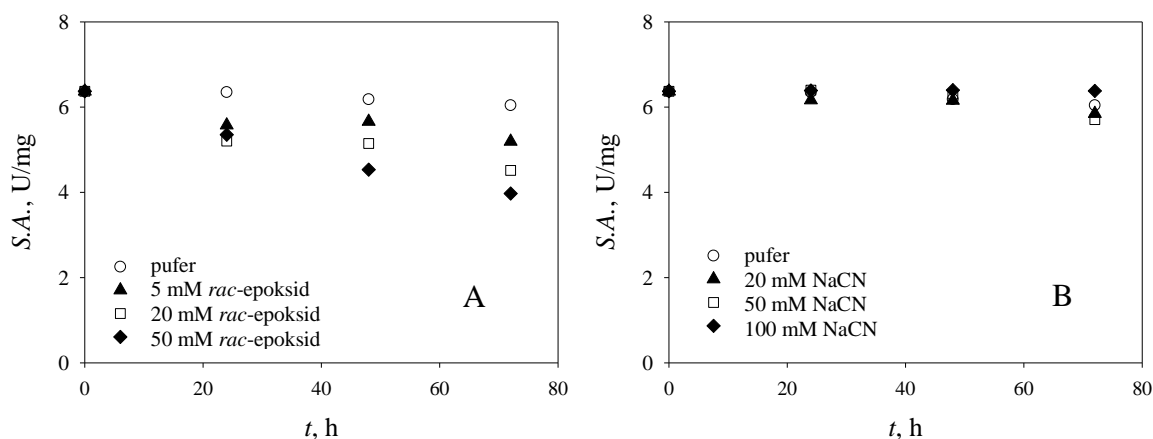
U prethodno navedenim izrazima r_1 predstavlja brzinu biokatalitičke reakcije nastanka (*S*)-produkta, r_2 brzinu biokatalitičke reakcije nastanka (*R*)-produkta, dok je r_3 brzina hidrolitičke reakcije nastanka diola. Nastankom (*S*)-produkta i (*R*)-produkta troši se cijanid. Potrošnja cijanida u izrazu (4.4) naznačena je negativnim predznacima ispred brzina nastanka produkata. Reakcija hidrolize mjerena je s racemičnim epoksidom, a kako je to kemijska reakcija koja nije enantioselektivna, pola odlazi na potrošnju (*R*)-epoksida, a pola na (*S*)-epoksida. Stoga se u bilancnim jednadžbama epoksidnih enantiomera, (4.5) i (4.6), javlja koeficijent 0,5. Promijena koncentracije (*S*)-produkta, odnosno (*R*)-produkta, u izrazima (4.7), odnosno (4.8), iskazana je brzinama biokatalitičkih reakcija nastanka produkta.

5. REZULTATI I RASPRAVA

5.1. Stabilnost enzima prilikom inkubacije sa supstratima

Stabilnost je važna karakteristika svakog biokatalizatora jer o njoj ovisi trajanje i uspješnost procesa. Pri određivanju kinetike svake biokatalitičke reakcije potrebno je ispitati enzimsku stabilnost kako bi se dobile informacije o adekvatnim reakcijskim uvjetima, utjecaju koncentracije supstrata, miješanja i sličnih faktora na strukturu, a time i aktivnost enzima.

U ovom je radu eksperimentima inkubacije ispitivan utjecaj natrijeva cijanida i supstrata *rac*-2-(4-fluorofenil)oksidirana na stabilnost ISM-4 varijante HheC enzima, pri čemu je enzim inkubiran sa svakim supstratom pojedinačno, kako ne bi došlo do enzimске reakcije. Uvjeti ispitivanja dani su u poglavlju 3.4. Na slici 5.1. vidljivo je da se stabilnost enzima prilikom inkubacije smanjuje porastom koncentracije *rac*-epoksida, dok cijanidni ioni, kao niti povećanje njihove koncentracije, ne utječu na stabilnost enzima u danom vremenskom periodu. Najveći pad stabilnosti u odnosu na početnu vrijednost javlja se pri dodatku 50 mM *rac*-epoksida, iz čega se može pretpostaviti da će upravo koncentracija *rac*-epoksida imati najvažniji utjecaj na operacijsku stabilnost enzima.



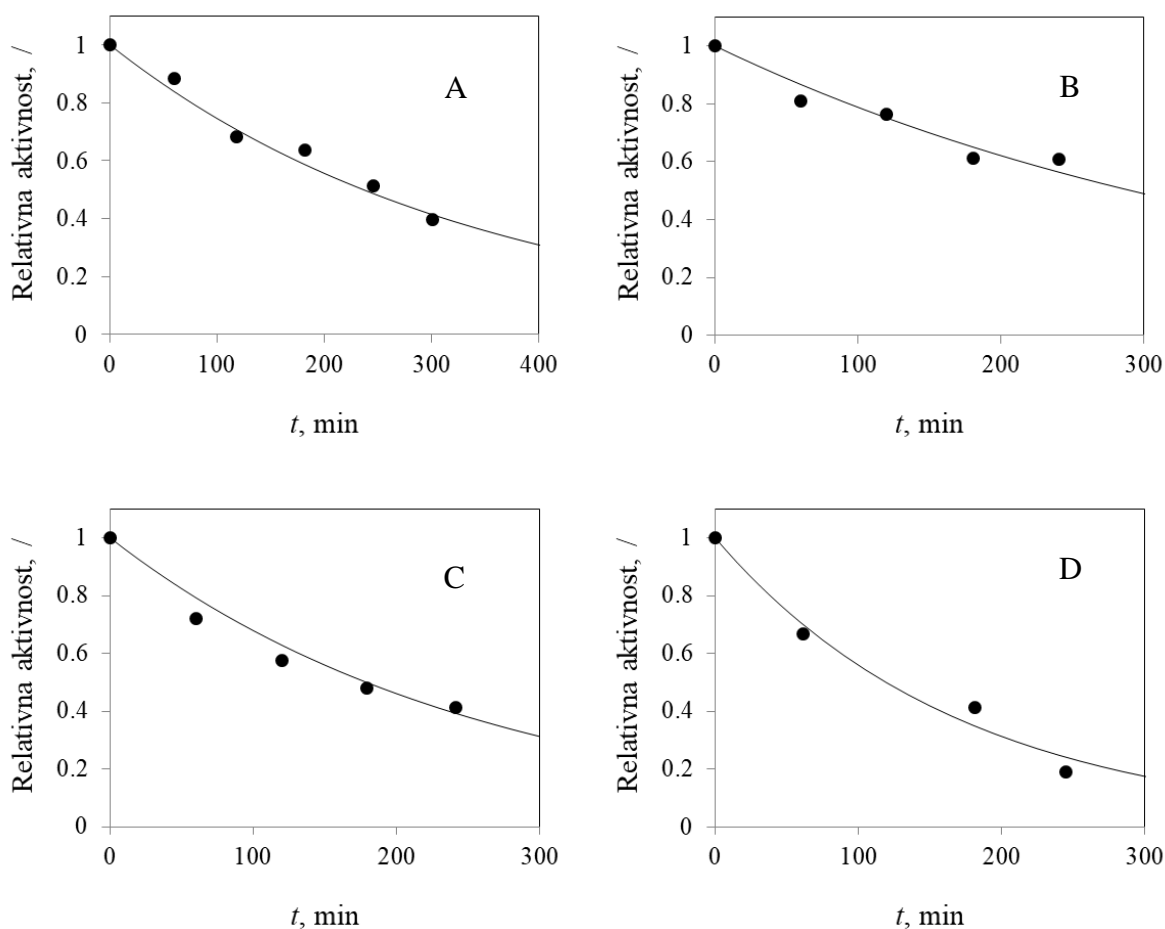
SLIKA 5.1. Utjecaj koncentracije **A:** *rac*-2-(4-fluorofenil)oksidirana i **B:** natrijeva cijanida na stabilnost HheC ISM-4 tokom inkubacije (500 mM Tris-SO₄, pH 7,5, 25 °C, 1000 okr min⁻¹, V_R = 500 μL, γ_{ISM-4} = 1 mg mL⁻¹)

5.2. Konstanta deaktivacije enzima

Za strukturiranje cjelovitog kinetičkog modela potrebno je definirati operacijsku stabilnost enzima. Praćenjem aktivnosti enzima tijekom eksperimenata validacije modela u kotlastom reaktoru moguće je procijeniti konstantu deaktivacije enzima (slika 5.3).

Konstanta deaktivacije (k_d , min^{-1}) procijenjuje se na temelju izraza (5.1) koji opisuje deaktivaciju enzima prema kinetici prvoga reda iz eksperimentalnih podataka prikazanih na slici 5.2. Konstante su prikazane u tablici 5.1.

$$\frac{d\gamma_{\text{ISM-4}}}{dt} = -k_d \cdot \gamma_{\text{ISM-4}} \quad (5.1)$$



SLIKA 5.2. Grafički prikazi s eksperimentalnim podacima na temelju kojih su procijenjene k_d vrijednosti, $V_R = 1000 \mu\text{L}$, $c_{\text{DMSO}} = 1400 \text{ mM}$, $c_{\text{Tris-SO}_4} = 500 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}} = 150 \text{ mM}$, $\text{pH } 7,5$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$; **A:** $c_{\text{rac-2-(4-fluorofenil)oksiran}} = 30 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0,0101 \text{ mg mL}^{-1}$
B: $c_{\text{rac-2-(4-fluorofenil)oksiran}} = 20 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0,0101 \text{ mg mL}^{-1}$, **C:** $c_{\text{rac-2-(4-fluorofenil)oksiran}} = 60 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0,0101 \text{ mg mL}^{-1}$ i **D:** $c_{\text{rac-2-(4-fluorofenil)oksiran}} = 100 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0,0504 \text{ mg mL}^{-1}$

Eksperimenti pri reakcijskim uvjetima navedenim u tablicama 3.7. – 3.10. (poglavlje 3.5.) su provedeni dva puta. Prvo je praćena je koncentracija supstrata i produkta kako bi se dobio podatak o tijeku reakcije (slika 5.4. A – D), a zatim operacijska stabilnost enzima (slika 5.2.).

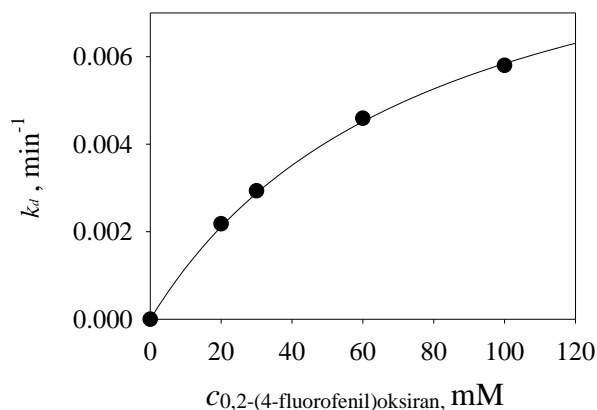
Kao što je i bilo za očekivati na temelju rezultata inkubacije enzima s različitim koncentracijama epoksida, utvrđeno je da operacijska stabilnost enzima ovisi o početnoj koncentraciji epoksida u kotlastom reaktoru, kako je prikazano na slici 5.3. Matematički izraz koji opisuje hiperboličnu ovisnost konstante deaktivacije o početnim koncentracijama epoksida dan je jednadžbom (5.2), dok parametri za procjenu k_d iznose $a = 0,0105 \pm 5,3 \cdot 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ te $b = 78,856 \pm 7,203 \text{ mM}$. Poznavanje ovisnosti konstante deaktivacije o početnoj koncentraciji epoksida vrlo je vrijedan podatak jer omogućuje odabir uvjeta u različitim reaktorima gdje deaktivacija enzima može biti minimizirana, iako je neizbježna.

$$k_d = \frac{c_{0,\text{epoksid}} \cdot a}{c_{0,\text{epoksid}} + b} \quad (5.2)$$

TABLICA 5.1. Ovisnost konstante deaktivacije o početnoj koncentraciji epoksida

$c_{0,2-(4\text{-fluorofenil})\text{oksiran}}, \text{mM}$	k_d, min^{-1}
0	0
30	$0,00293 \pm 1,93 \cdot 10^{-4}$
20	$0,00218 \pm 2,01 \cdot 10^{-4}$
60	$0,00459 \pm 4,07 \cdot 10^{-4}$
100	$0,00580 \pm 4,81 \cdot 10^{-4}$

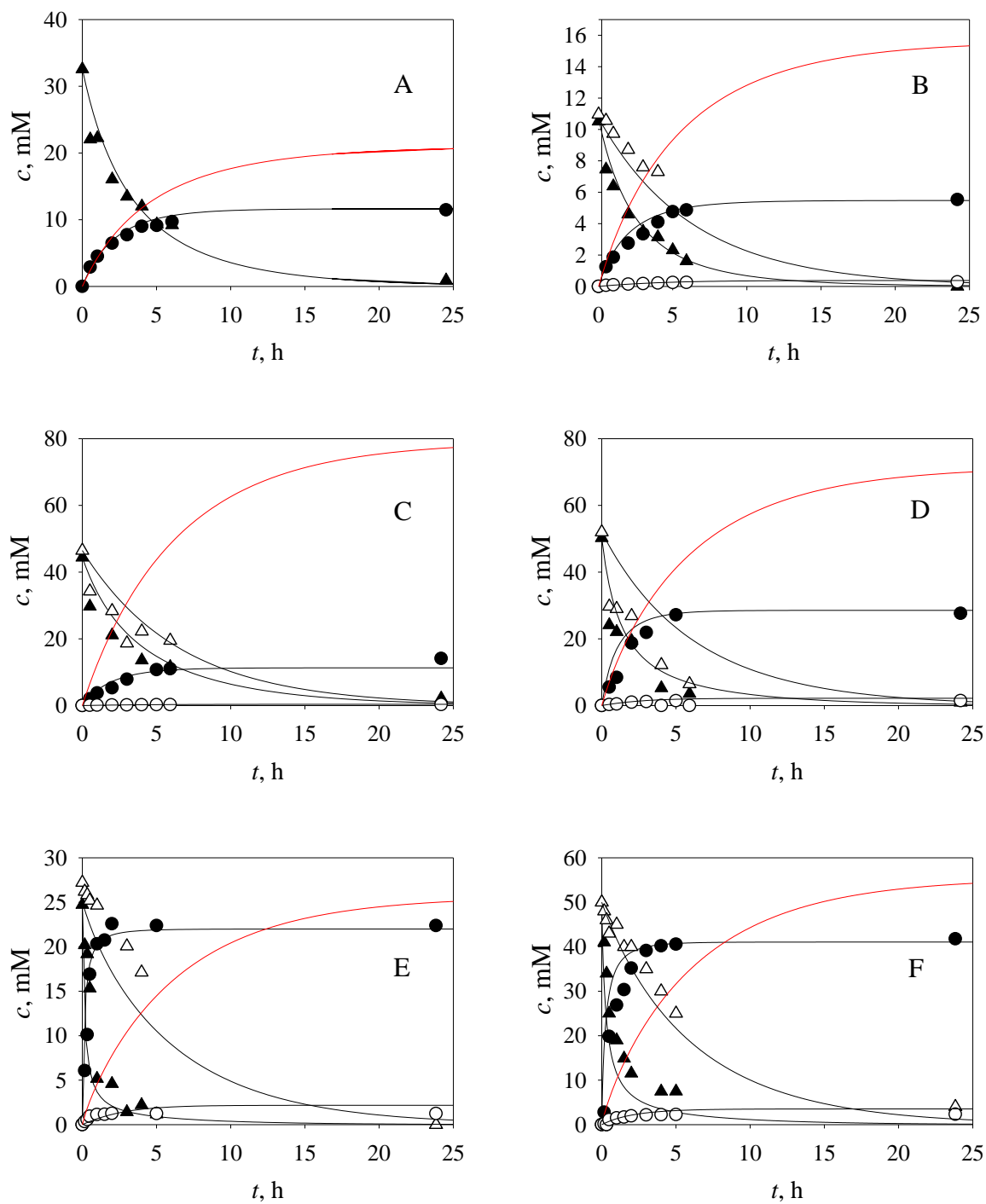
Navedenu ovisnost može se prikazati i grafički, kao što je učinjeno na slici 5.3. Može se uočiti kako povećanjem početne koncentracije epoksida, konstanta deaktivacije raste, odnosno operacijska stabilnost enzima opada.

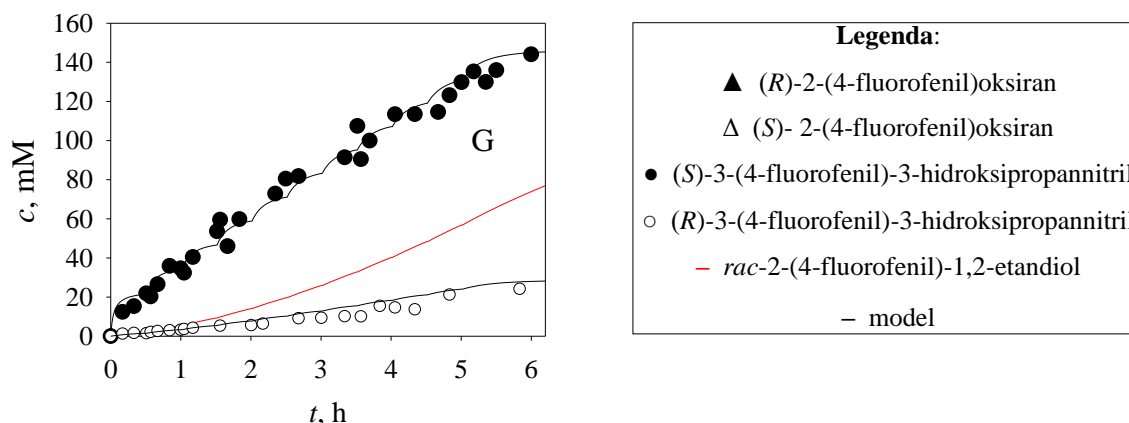


SLIKA 5.3. Grafički prikaz ovisnosti konstante deaktivacije o početnoj koncentraciji epoksida

5.3. Validacija modela

Poznavajući kinetiku biokatalitičke reakcije sinteze (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropionitrila razvijen je cjeloviti matematički model koji je u ovom radu validiran. Eksperimenti su provedeni kako je opisano u poglavlju 3.5. u kotlastom reaktoru i s posebnim slučajem repetitivnog dodatka supstrata u kotlasti reaktor. Dobiveni rezultati prikazani su na slici 5.4. A – G, a koncentracije su praćene plinskom i tekućinskom kromatografijom.





SLIKA 5.4. Eksperimenti validacije matematičkog modela u kotlastom reaktoru,

$V_R = 1000 \mu\text{L}$, $c_{\text{DMSO}} = 1400 \text{ mM}$, $c_{\text{Tris-SO}_4} = 500 \text{ mM}$, $\text{pH } 7,5$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$;

A: $C_{(R)\text{-}2\text{-(}4\text{-fluorofenil)oksiran}} = 33 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}} = 150 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$;

B: $C_{\text{rac-}2\text{-(}4\text{-fluorofenil)oksiran}} = 21.5 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}} = 150 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$;

C: $C_{\text{rac-}2\text{-(}4\text{-fluorofenil)oksiran}} = 91 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}} = 150 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0.01 \text{ mg mL}^{-1}$;

D: $C_{\text{rac-}2\text{-(}4\text{-fluorofenil)oksiran}} = 102 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}} = 150 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0.05 \text{ mg mL}^{-1}$;

E: $C_{\text{rac-}2\text{-(}4\text{-fluorofenil)oksiran}} = 52 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}} = 25 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 1 \text{ mg mL}^{-1}$;

F: $C_{\text{rac-}2\text{-(}4\text{-fluorofenil)oksiran}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}} = 50 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$;

G: repetitivni kotlasti reaktor $V_R = 1500 \mu\text{L}$ sa početnim reakcijskim uvjetima

$C_{\text{rac-}2\text{-(}4\text{-fluorofenil)oksiran}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}} = 50 \text{ mM}$, $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ s dodatkom 50 mM $\text{rac-}2\text{-(}4\text{-fluorofenil)oksirana}$ i 25 mM NaCN svakih 30 minuta do petog sata reakcije

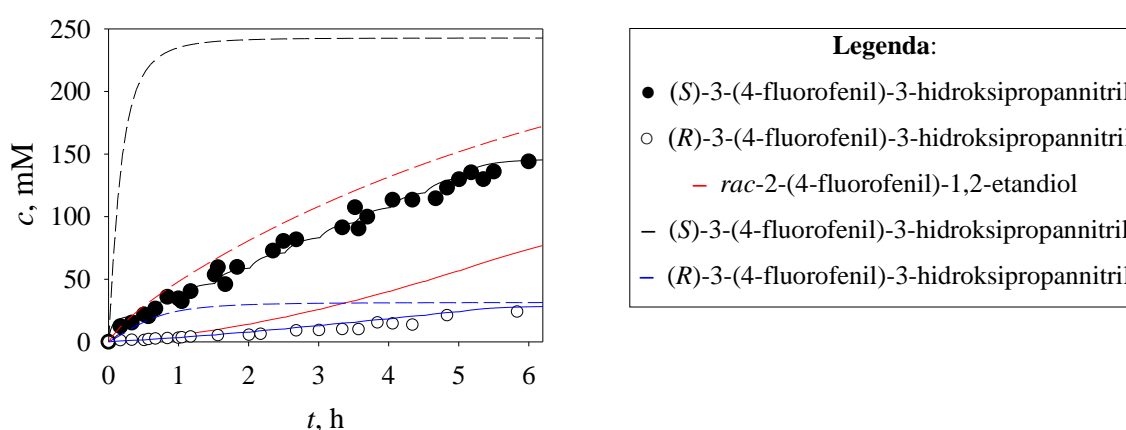
Najprije je provedena validacija modela s čistim (*R*)-epoksidom (slika 5.4. A), dok su ostali eksperimenti provođeni s racemičnom smjesom epoksida. Dobiveni rezultati pokazuju iznimno dobro slaganje s modelom. Obzirom na slab odziv diola, ovaj produkt nije kvantificiran, stoga je na slikama simulirana njegova koncentracija (slika 5.4 A-F). Kod eksperimenta s repetitivnim kotlastim reaktorom (slika 5.4. G), zbog loše topljivosti supstrata i slabe mogućnosti raspodjele u reakcijskoj smjesi pri ponovnom dodatku supstrata, praćeni su samo produkti reakcije.

Na formiranje produkta najviše utječe inhibicija supstratom (*R*)-epoksidom. (*R*)-epoksid do određene koncentracije ubrzava reakciju, a nakon toga reakcijska brzina opada. Ova promjena djelovanja epoksida u reakcijskom sustavu javlja se pri koncentraciji (*R*)-epoksida 30 mM , stoga bi njegovu koncentraciju trebalo držati ispod navedene vrijednosti.

Pri povišenim koncentracijama supstrata do izražaja dolazi spontana hidrolitička reakcija. Primjer je četvrti eksperiment (slika 5.4. D), gdje je koncentracija *rac*-epoksida 102 mM te je

u tom slučaju nastalo najviše hidrolitičkog produkta. Ovakav ishod je očekivan obzirom da je reakcija hidrolize reakcija 1. reda te je nastanak produkta linearno ovisan o koncentraciji supstrata. Stoga, kako bi se smanjio negativan utjecaj hidrolize na iskorištenje reakcije, potrebno je provoditi reakciju pri nižim koncentracijama supstrata. Osim toga, kako bi se smanjile neželjene sporedne reakcije potrebna je veća koncentracija enzima.

Modeliranjem je, uz eksperimentalno dobivene rezultate repetitivnog kotlastog reaktora dodana simulacija za biokatalitičku reakciju pri istim uvjetima u kotlastom reaktoru, odnosno kao da je u reaktor dodano odjednom svih 550 mM epoksida i 275 mM NaCN pri istim ostalim reakcijskim uvjetima (slika 5.5.). Kotlasti reaktor (crtkana linija na slici 5.5.) pokazuje bolju produktivnost u odnosu na šaržni reaktor s dodatkom supstrata (puna linija na slici 5.5.) jer nastaje više željenog produkta. Nakon 6 sati iskorištenje u slučaju kotlastog reaktora iznosi 88 %, a u slučaju repetitivnog 52 %. Međutim, u kotlastom reaktoru, biokatalitičku reakciju sinteze (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitrila je potrebno zaustaviti nakon prvih sat vremena kako ne bi došlo do gomilanja neželjenih produkata, (*R*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitrila i *rac*-2-(4-fluorofenil)-1,2-etandiola. Vidljivo je kako u kotlastom reaktoru nakon 1 h reakcije više ne nastaje željeni produkt, ali (*S*)-enantiomer supstrata se nastavlja trošiti u biokatalitičkoj i hidrolitičkoj reakciji. S druge strane, ukoliko je potrebna vrlo velika optička čistoća produkta, repetitivni je ipak nešto bolji jer nastaju manje količine neželjenog produkta diola. Tako je nakon 6 sati selektivnost u kotlastom reaktoru 1,2, dok je u repetitivnom 1,4.



SLIKA 5.5. Simulacije kotlastog reaktora (---) u usporedbi s repetitivnim kotlastim reaktorom (—) pri istim reakcijskim uvjetima, $c_{\text{DMSO}} = 1400 \text{ mM}$, $c_{\text{Tris-SO}_4} = 500 \text{ mM}$, pH 7,5, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, $1000 \text{ okr min}^{-1}$, uz početne koncentracije $c_{\text{rac-2-(4-fluorofenil)oksidiran}} = 100 \text{ mM}$, $c_{\text{NaCN}} = 50 \text{ mM}$ i $\gamma_{\text{ISM-4}} = 0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ s dodatkom $50 \text{ mM rac-2-(4-fluorofenil)oksidirana}$ i 25 mM NaCN

Ovdje je iskorištenje definirano kao omjer stvarno nastalih molova željenog biokatalitičkog produkta naspram teorijski moguće nastalih molova, a selektivnost kao omjer molova nastalog željenog biokatalitičkog produkta naspram molova nastalih neželjenih produkata, u ovom slučaju diola i suprotnog enantiomera biokatalitičkog produkta.

Kotlasti reaktor pokazao se u ovom trenutku kao najbolji tip reaktora za provedbu sinteze (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitrila. Šaržni reaktor s dotokom razmatran je kao mogućnost, međutim, dotok racemične smjese supstrata uzrokuje nakupljanje (*S*)-enantiomera supstrata, što također dovodi do ubrzavanja neželjene biokatalitičke i hidrolitičke reakcije. Protočno-kotlasti reaktor u ovom trenutku nije razmatran radi prisutne inhibicije produktom i budući da je stabilizacija enzima, npr. tehnikama imobilizacije, preduvjet za ekonomično provođenje reakcija u ovom tipu reaktora.

6. ZAKLJUČAK

Fluorirani optički čisti farmaceutici zauzimaju važno mjesto u industriji obzirom da, zbog prisustva fluora, imaju poboljšanu absorpciju i distribuciju te olakšane metaboličke puteve. Za njihovu sintezu potrebni su intermedijeri, kao što je npr. (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitril. Iako još uvijek nisu standardni način pripreme, biokatalitičke reakcije katalizirane halogenhidrin-dehalogenazama pokazale su se kao obećavajući način proizvodnje optički čistih spojeva u farmaceutskoj industriji. Primjer reakcije, ujedno i temelj ovog rada je sinteza važnog intermedijera (*S*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitrila otvaranjem epoksidnog prstena *rac*-2-(4-fluorofenil)oksirana cijanidnim ionima, katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom. Za navedenu biokatalitičku reakciju korištena je termostabilna ISM-4 varijanta HheC halogenhidrin-dehalogenaze. Uz željeni produkt, reakcijom nastaje i drugi enantiomer (*R*)-3-(4-fluorofenil)-3-hidroksipropannitril te produkt spontane reakcije hidrolize *rac*-2-(4-fluorofenil)-1,2-etandiol.

Prethodno je razvijen matematički model navedene biokatalitičke reakcije te je u ovom radu provedena validacija modela eksperimentima u kotlastom reaktoru s varijacijama u početnim koncentracijama epoksida, NaCN i ISM-4 enzima. Eksperimentima je potvrđeno zadovoljavajuće slaganje s modelom. Nadalje, matematičkim je modeliranjem utvrđeno kako je kotlasti reaktor najbolji izbor za biokatalitičku sintezu traženog fluoriranog cijanoalkohola. Pažljivim odabirom reakcijskih uvjeta u danom reaktoru moguće je smanjiti neizbježni efekt hidrolize, odnosno nastajanje neželjenog diola. Kako bi se smanjio efekt hidrolize, reakciju je potrebno provoditi pri nižim koncentracijama supstrata, što nije ekonomično. Također, eksperimentima inkubacije uočena je deaktivacija enzima koja je ovisna o početnoj koncentraciji epoksida. Operacijska stabilnost enzima opada porastom koncentracije epoksida, dok cijanidni nukleofil ne uzrokuje značajnije promjene u stabilnosti halogenhidrin-dehalogenaze.

7. POPIS SIMBOLA I POKRATA

ACN – acetonitril

API – aktivna farmaceutska tvar (engl. *active pharmaceutical ingredient*)

Arg – arginin

Asp – asparginska aminokiselina

ATP – adenzin-trifosfat

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

CIP – Cahn-Ingold-Prelog pravila nomenklature

CR – cijevni reaktor

DKR – dinamička kinetička rezolucija

DMSO – dimetil-sulfoksid

E – enzim

E_a – energija aktivacije, kJ

EC – komisijski broj enzima (engl. *enzyme commission number*)

ES – enzim-supstrat kompleks

EtOAc – etil-acetat

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

G – Gibbsova energija, kJ

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

HHDH – halogenhidrin-dehalogenaza

HheC – C tip halogenhidrin-dehalogenaze

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high-pressure liquid chromatography*)

ISM – iterativna mutagenaza zasićenja (engl. *iterative saturation mutagenesis*)

ISM-4 – varijanta HHDH dobivena primjenom četiri ciklusa iterativne mutagenaze zasićenja

k_1, k_{-1}, k_2 – konstante brzine reakcija formiranja i disocijacije kompleksa enzim-supstrat te nastajanja produkta, min^{-1}

K_i – konstanta inhibicije, mmol dm^{-3}

K_m – Michaelisova konstanta, mmol dm^{-3}

KR – kotlasti reaktor

Lys – lizin

NaCN – natrijev cijanid

p – tlak, kPa

P – produkt

PDA – detektor s nizom dioda (engl. *photo diode array*)

pH – negativan logaritam aktiviteta vodikovih iona

pK_a – negativan logaritam konstante disocijacije kiseline

PKR – protočno kotlasti reaktor

PNSHH – 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanol

PNSO – *p*-nitrostiren oksid

r – brzina enzimske reakcije, $\text{mmol dm}^{-3} \text{min}^{-1}$

S – supstrat

SDR – kratkolančane dehidrogenaze/reduktaze (engl. *short-chain dehydrogenase/reductase*)

Ser – serin

T – temperatura, °C

TFA – trifluoroctena kiselina

TO – temeljna otopina

t_R – vrijeme zadržavanja (engl. *retention time*), min

Tris-SO₄ – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer

Trp - triptofan

Tyr – tirozin

V – volumen, dm^3

V_m – maksimalna brzina enzimske reakcije, $\text{mmol dm}^3 \text{min}^{-1}$

Δ – promjena

γ – masena koncentracija, mg mL^{-1}

8. LITERATURA

B

Blanco A., Blanco G.; Medical Biochemistry, Elsevier, New York, 2017, str. 153-175.

Burke D., Henderson D. J.; Chirality: a blueprint for the future, British Journal of Anaesthesia **Vol. 88, Iss. 4**, (2002) 563-576.

D

Dokli I., Milčić N., Marin P., Svetec Miklenić M., Sudar M., Tang L., Findrik Blažević Z., Majerić Elenkov M.; Halohydrin dehalogenase-catalysed synthesis of fluorinated aromatic chiral building blocks, Catalysis Communications **Vol. 152, Article 106285** (2021)

Dong M. W.; Essence of Modern HPLC: Advantages, limitations, fundamentals and opportunities, LCGC North America, **Vol. 31, Iss. 6**, (2013) 472-479.

F

Faber K.; Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook, Springer, Berlin, 2018, str. 1-26.

Findrik Blažević Z.; Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2013, str. 7-8.

Findrik Blažević Z., Milčić N., Sudar M. Majerić Elenkov M.; Halohydrin Dehalogenases and Their Potential in Industrial Application – A Viewpoint of Enzyme Reaction Engineering, Advanced Synthesis & Catalysis, **Vol. 363, Iss. 2** (2021) 388-410.

G

Gomzi Z.; Kemijski reaktori, Hinus, Zagreb, 2009, str. 48-55., 95-96., 100-101., 228-229.

Gröger H., Asano Y.; Introduction – Principles and Historical Landmarks of Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, u: Drauz K., Gröger H. i May O. (ur.), Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Volume 1, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2012 str. 3-13.

H

<https://www.khanacademy.org/> (pristup 13. lipanj 2022.)

<https://www.mn-net.com/> (pristup 17. srpanj 2022.)

<https://chiraltech.com/> (pristup 17. srpanj 2022.)

<https://www.phenomenex.com> (pristup 25. srpanj 2022.)

I

Inoue M., Sumii Y., Shibata N.; Contribution of Organofluorine Compounds to Pharmaceuticals, ACS Omega, **Vol. 5 Iss. 19** (2020) 10633-10640.

K

Kumar P. A., Bir B.; Chirality in nature and biomolecules: An overview, International Journal of Life Sciences, **Vol. 9 Iss. 1** (2020) 72-84.

L

Liu S.; Bioprocess Engineering: Kinetics, Sustainability and Reactor Design, Elsevier, New York, 2020, str. 32-35., 229-237.

Lutje Spelberg J. H., Tang L., Kellogg R. M., Janssen D. B.; Enzymatic dynamic kinetic resolution of epihalohydrins, Tetrahedron: Asymmetry, **Vol. 15, Iss. 7** (2004) 1095-1102.

Lutje Spelberg J. H., de Vries E. J.; Hydrolysis and Formation of Epoxides, u: K. Drauz, H. Gröger i O. May (ur.), Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2012, str. 369-383.

M

Majerić Elenkov M., Hauer B., Janssen D. B.; Enantioselective Ring Opening of Epoxides with Cyanide Catalysed by Halohydrin Dehalogenases: A new approach to Non-Racemic β -Hydroxy Nitriles, *Advanced Sythesis & Catalysis* **Vol. 348, Iss. 4-5** (2006) 579-585.

Majerić Elenkov M., Szymański W., Janssen D. B.; Reactions Catalyzed by Halohydrin Dehalogenases, u: K. Faber, W.-D. Fessner i N. J. Turner (ur.), *Science of Synthesis: Biocatalysis in Organic Synthesis* Vol. 2, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2014, str. 507-527.

Marangoni A. G.; *Enzyme Kinetics, A Modern Approach*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2002, str. 41-65., 90-101.

Marić A.-K.; Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije katalizirane halogenhidrin-dehalogenazom, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2020, str. 3., 17.

McNair H. M., Miller J. M., Snow N. H.; *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2019, str. 1-12.

Milčić N., Česnik M., Sudar M., Findrik Blažević Z.; Primjena matematičkog modeliranja u razvoju enzimskih kaskadnih reakcija, *Kemija u industriji*, **Vol. 68, Iss. 9-10** (2019) 427-436.

R

Ram V. J., Sethi A., Nath M. Pratap R.; *The Chemistry of Heterocycles, Nomenclature and Chemistry of Three-to-Five Membered Heterocycles*, Elsevier, New York, 2017, str. 19., 44-52.

S

Schallmeyer M., Floor R. J., Szymanski W., Janssen D.B.; Hydrolysis and Reverse Hydrolysis: Halohydrin Dehalogenases, u: E. M. Carreira i H. Yamamoto (ur.), *Comprehensive Chirality, Volume 7: Synthetic Methods VI-Enzymatic and Semi-Enzymatic*, Elsevier, New York, 2012, str. 143-155.

Schallmey A., Schallmey M.; Recent advances on halohydrin dehalogenases-from enzyme identification to novel biocatalytic applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **Vol. 100, Iss. 18** (2016) 7827-7839.

Sheldon R. A., Woodley J. M.; Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry, *Chemical Reviews*, **Vol. 118, Iss. 2** (2018) 801-838.

Sin G., Woodley J.M., Gernaey K.V.; Application of Modeling and Simulation Tools for the Evaluation of Biocatalytic Processes: A Future Perspective, *Biotechnology Progress*, **Vol. 25, Iss. 6** (2009) 1529–1538.

V

Vasić-Rački Đ., Kragi U., Liese A.; Benefits of enzyme kinetics modelling, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **17 (1)** (2003) 3-14.

Vasić-Rački Đ., Findrik Z., Vrsalović Presečki A.; Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **Vol. 91, Iss. 4** (2011) 845-856.

Vrsalović Presečki A., Findrik Z., Zelić B.; Modeling of Biotransformation Processes, *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, **20 (3)** (2006) 227-241.

W

Wade L.G. ml.; *Organska kemija, Školska knjiga*, Zagreb, 2017, str. 1170-1172., 1188-1191.

Whittall J., Sutton P.W.; *Practical Methods for Biocatalysis and Biotransformations 2*, John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2012, str. 1-4., 52-53.

Wu Z., Deng W., Tong Y., Liao Q., Xin D., Yu H., Feng J., Tang L.; Exploring the thermostable properties of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1 by a combinatorial directed evolution strategy, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **Vol. 101, Iss. 8** (2017) 3201-3211.

Y

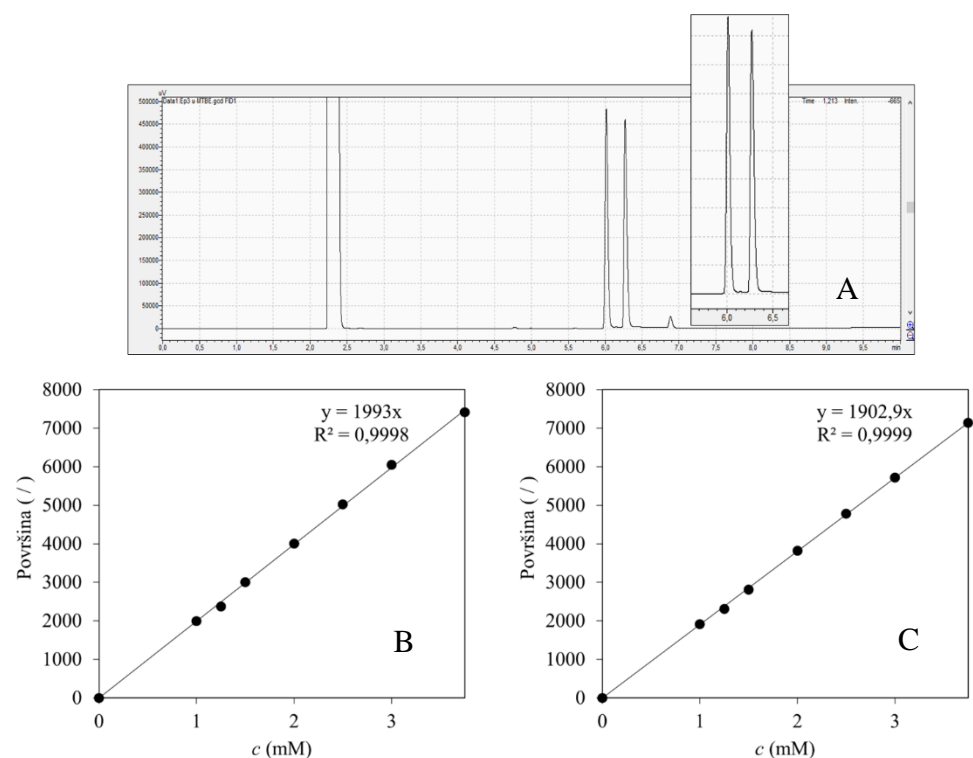
Yoshino M., Murakami K.; Analysis of the substrate inhibition of complete and partial types, SpringerPlus, **Vol. 4, Article 292** (2015)

You Z.-Y., Liu Z.-Q., Zheng Y.-G.; Properties and biotechnological applications of halohydrin dehalogenases: current state and future perspectives, Applied Microbiology and Biotechnology, **Vol. 97, Iss. 1** (2013) 9-21.

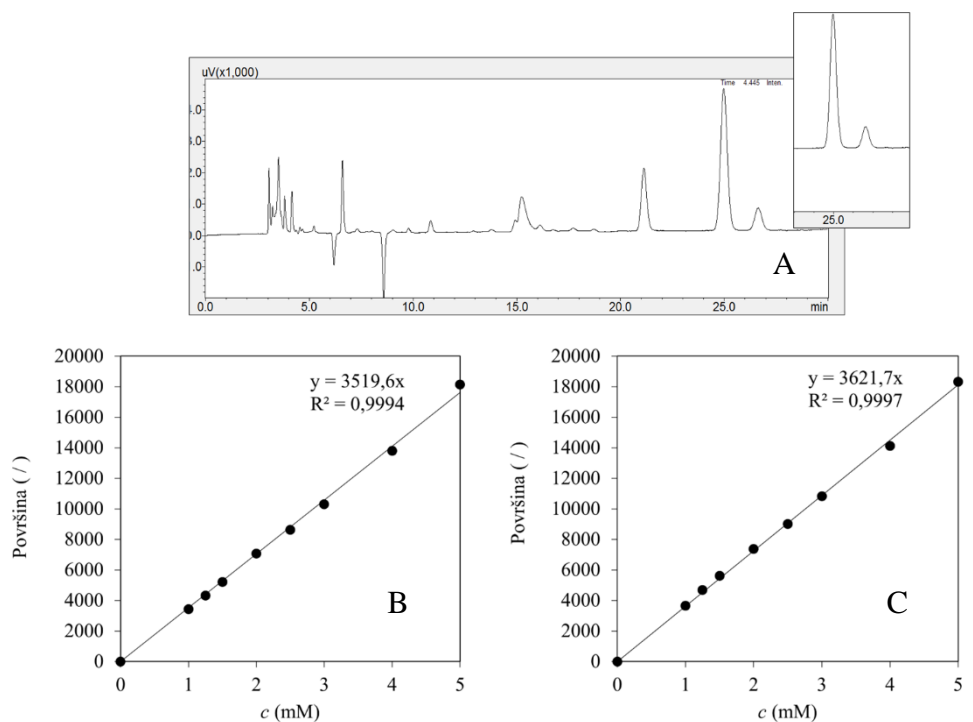
Z

Zrnčević S.; Kataliza i katalizatori, Hinus, Zagreb, 2005, str. 4-12., 16-17.

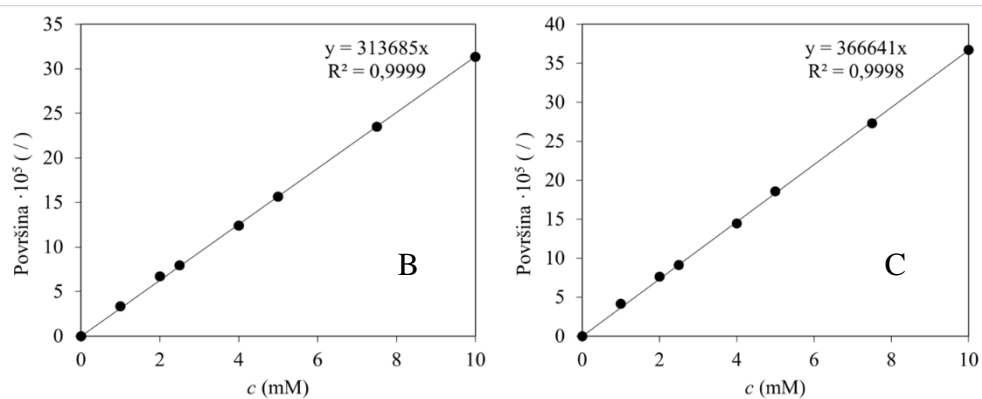
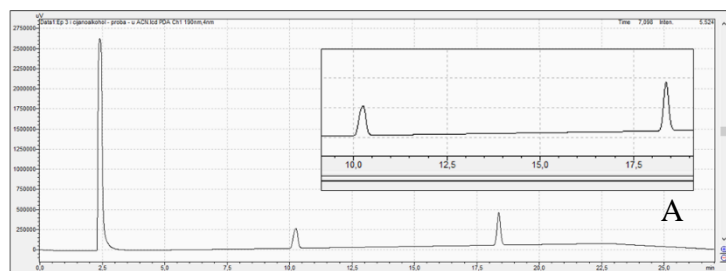
9. PRILOZI



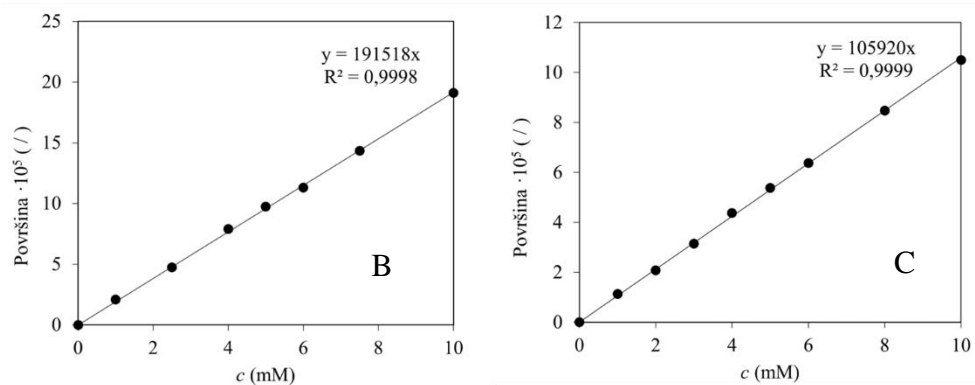
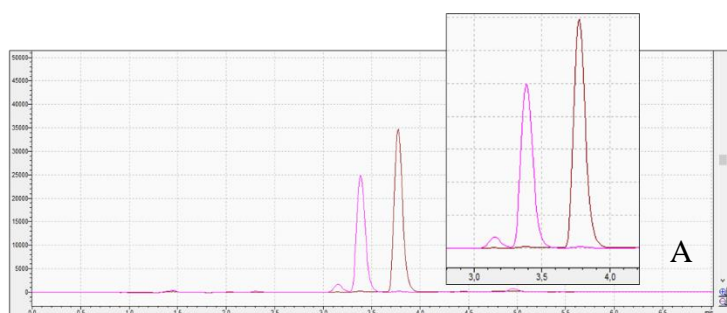
PRILOG 1. Kromatogram A i baždarni pravci za GC analizu B: (S)-epoksida i C: (R)-epoksida na Lipodex E koloni



PRILOG 2. Kromatogram A i baždarni pravci za HPLC analizu B: (R)-cijanoalkohola i C: (S)-cijanoalkohola na Chiralpack IC-3 koloni



PRILOG 3. Kromatogram A i baždarni pravci za HPLC analizu **B**: cijanoalkohola i **C**: *rac*-epoksida na Kinetex Phenomenex Core-shell C18 koloni



PRILOG 4. Kromatogram A i baždarni pravci za HPLC analizu **B**: PNSHH i **C**: PNSO na Kinetex Phenomenex Core-shell C18 koloni