

Evaluacija fluoriranih derivata stiren oksida kao supstrata halogenhidrin-dehalogenaze

Pranić, Marko

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:888012>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-08**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marko Pranić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, Prosinac 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Marko Pranić

EVALUACIJA FLUORIRANIH DERIVATA STIREN
OKSIDA KAO SUPSTRATA HALOGENHIDRIN–
DEHALOGENAZE

DIPLOMSKI RAD

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

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

doc. dr. sc. Martina Sudar

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, prosinac 2020.

*Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, u
Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu, ak. god. 2019./2020.*

Zahvaljujem se prof.dr.sc. Zvezdani Findrik Blažević što mi je pristala biti mentor diplomskog rada, te na pristupačnosti, savjetima i komentarima prilikom njegovog pisanja.

Hvala i mag. ing. oecoing. Neveni Milčić na pomoći prilikom rada na eksperimentalnom dijelu, te na ugodnoj radnoj atmosferi.

Na posljetku htio bih se zahvaliti i Wandi. Bez tebe moje godine studiranja bi bile puno teže i praznije. Hvala ti što si bila pored mene kada mi je to trebalo, na potpori i strpljenju u teškim razdobljima, i na dijeljenju radosti i ispunjenosti u dobrim.

Sažetak

Fluorirani aromatski spojevi su važni kiralni građevni blokovi u farmaceutskoj industriji. Jedna od metoda njihove sinteze je i biokatalitički put korištenjem enzima halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH). U ovom radu proučavana je reakcija otvaranja epoksidnog prstena, fluoriranog derivata stiren oksida uz azid kao nukleofil. Reakcija je katalizirana s HHDH iz divljeg soja mikroorganizma poznata i pod nazivom HheC.

Provedene su preliminarne reakcije u vodenom mediju s 5 % organskog otapala. U njima je evaluirano šest različitih epoksida s atomima fluora kao supstituentima na stiren oksidu. Metodom početnih brzina određeni su kinetički modeli i parametri za svaku od reakcija. Utjecaj koncentracije epoksida (c_{epox}) na brzinu enzimske reakcije odgovara Michaelis-Meteničinoj enzimskoj kinetici, dok utjecaj koncentracije azida odgovara kinetičkom modelu s inhibicijom supstrata. Enzimsku kinetiku u vodenom mediju bilo je moguće mjeriti samo do koncentracije epoksida od 20 mM, zbog njihove ograničene topljivosti. Kako bi se povećala topljivost epoksida, reakcije je potrebno provoditi pri većim udjelima organskog otapala.

Usporedbom procijenjenih kinetičkih parametara i pregledom literature određeno je da položaj supstituenta ima presudnu ulogu na aktivnost enzima i afinitet supstrata prema enzimu. Od ispitivanih stiren oksida najbolji supstrat za HheC je onaj koji ima najudaljenije supstituente od epoksidnog prstena, odnosno u para položaju.

Ključne riječi: epoksid, halogenhidrin-dehalogenaza, kinetika enzimske reakcije, evaluacija supstrata

Abstract

Fluorinated aromatic compounds are important chiral building blocks in the pharmaceutical industry. One of the methods for their synthesis is a biocatalytic path with enzyme halohydrin dehalogenase (HHDH). In this work, the ring-opening reaction of epoxides was studied. Substrates were fluorinated derivatives of styrene oxide with azide as a nucleophile. The reaction was catalyzed by wild-type HHDH, also known as HheC.

Preliminary reactions were ran in a buffered medium with 5 % of organic solvent. Six different epoxides with fluorine atom on different positions of the phenyl ring were evaluated. By using the initial reaction rate method, kinetic models and parameters for each reaction were determined. The influence of the concentration of epoxides (c_{epox}) on the rate of enzymatic reactions fits Michaelis-Menten kinetics, while the influence of azide concentration fits the Michaelis-Menten kinetics with substrate inhibition. Because of low epoxide solubility, enzymatic kinetic in the water medium can be determined up to the epoxide concentration of 20 mM. To increase epoxide solubility reactions need to be carried out at higher concentration of organic solvent.

By comparing the estimated kinetic parameters and literature search, it was found that the substituent position has a deterministic role in enzyme activity and affinity of the substrate towards the enzyme. From the tested styrene oxides, the best substrate for HheC is the one that has substituents on the opposite side from the epoxide ring.

Keywords: epoxide, halohydrin-dehalogenase, enzyme reaction kinetics, substrate evaluation

Sadržaj

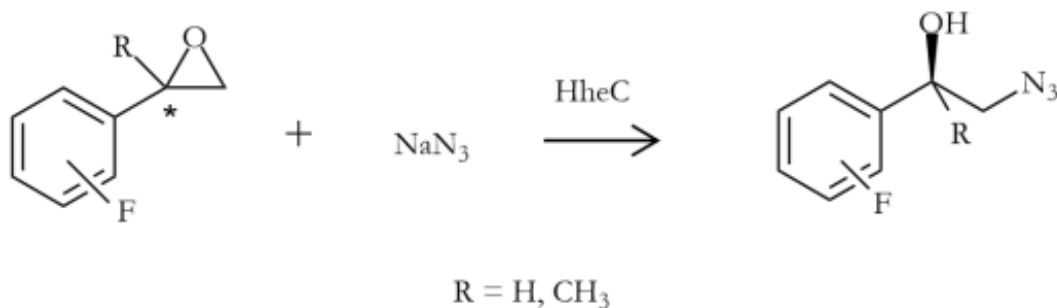
1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	2
2.1. Epoksidi.....	2
2.1.1. Stiren oksid i njegovi derivati	2
2.2. Kiralnost.....	3
2.3. Enzimi	4
2.3.1. Važnost biotehnologije i mjesto enzima u njoj	5
2.3.2. Djelovanje enzima	7
2.3.3. Uvjeti za djelotvoran enzim	8
2.3.4. Struktura enzima	8
2.3.5. Nomenklatura i podjela enzima	10
2.4. Halogenhidrin-dehalogenaze	11
2.4.1. Reakcijski mehanizam	12
2.4.2. Podjela HHDH	13
2.4.3. Primjena HHDH u kontroli onečišćenja u okolišu	13
2.4.4. Biotehnološka primjena HHDH.....	14
2.4.5. Otvaranje epoksidnog prstena s azidom.....	15
2.5. Razvoj biokatalitičkog procesa.....	16
2.6. Modeliranje biokatalitičkih reakcija	17
2.6.1. Poboljšanje, probir i karakterizacija enzima	18
2.6.2. Kinetički modeli enzimске reakcije	18
2.6.3. Procjena kinetičkih parametara	22
2.6.4. Validacija i upotreba modela	23
2.6.5. Kotlasti reaktor	23
3. Eksperimentalni dio.....	24
3.1. Karakterizacija enzima.....	25
3.1.1. Analiza enzima elektroforezom	25
3.1.2. Određivanje koncentracije enzima metodom po Bradfordu	27
3.1.3. Određivanje aktivnosti enzima spektrofotometrijskim testom s PNSHH	28
3.2. Kinetička ispitivanja	29

3.2.1. Određivanje stabilnosti epoksida.....	29
3.2.2. Ispitivanje kinetike u enzimatskoj reakciji epoksida s azidima	31
3.2.3. Analiza uzoraka plinskom kromatografijom	32
3.2.4. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	33
3.3. Obrada podataka u programskom paketu Scientist	34
4. Rezultati i rasprava	35
4.1. Karakterizacija enzima.....	35
4.1.1. Određivanje uspješnosti ekspresije enzima elektroforezom	35
4.1.2. Koncentracija i aktivnost enzima	36
4.2. Ispitivanje stabilnosti epoksida.....	37
4.3. Ispitivanje utjecaja epoksida na kinetiku enzimске reakcije	41
4.4. Ispitivanje utjecaja azida na kinetiku enzimске reakcije	44
5. Zaključak.....	45
6. Popis pokrata i simbola	46
7. Literatura.....	48
8. Prilozi.....	57
9. Životopis	61

1. Uvod

Svojstva aromatske molekule mogu se značajno promijeniti kada se u nju ugradi fluor. Razlog leži u tome što fluor ima jedinstvena sterička i elektronska svojstva. On je jedan od najmanjih mogućih supstituenata i kao takav manje će utjecati na promjenu molekulske konformacije nego neki veći. Radi visoke elektronegativnosti navlači elektrone na sebe te tako može stabilizirati molekulu ili utjecati na reaktivnost drugih funkcionalnih grupa u molekuli.¹ Također, C-F veza je jaka te utječe na inhibiciju metabolizma kada je fluor ugrađen na ugljik blizu reaktivnog mjesta. Radi toga fluorirani aromatski spojevi danas se koriste kao insekticidi, fungicidi i herbicidi.² Pronalaze svoju primjenu i u farmaceutskoj industriji jer ugradnja fluora mijenja biološku aktivnost i farmakokinetička svojstva lijeka, te posljedično može pospješiti dobavu, sigurnost i aktivnost lijeka.³ Osim navedenog, ovi spojevi koriste se u industriji boja i polimera.⁴

Fluorirani aromatski spojevi nisu široko rasprostranjeni u prirodi te se radi toga za industrijske potrebe moraju sintetizirati.⁵ Klasične kemijske metode sinteze uključuju korištenje toksičnih reagensa i metalnih katalizatora za ugradnju fluora u aromatski prsten.⁶ Ti procesi su skupi radi potrebe za naknadnim pročišćavanjem produkta od neželjenih toksičnih komponenata. Alternativa je biokatalitička modifikacija jednostavnijih spojeva kao što su fluorirani derivati stiren oksida, koji također mogu biti sintetizirani biokatalitičkim putem.⁷ U ovom radu proučavana je navedena alternativa te je shematski prikazana slikom 1.1. Radi se o enzimskoj reakciji otvaranja epoksidnog prstena kataliziranom enzimom HheC uz azid kao nukleofil. Mehanizam reakcije opisan je u poglavlju 2.4.1, dok se važnost produkta može pronaći u poglavlju 2.4.5. Enzimski put je industrijski zanimljiv jer se izbjegava potreba za naknadnim uklanjanjem opasnih tvari iz reakcijske smjese te radi dobivanja enatiomerno čistog produkta.



Slika 1.1. Biokatalitička modifikacija fluoriranih derivata stiren oksida

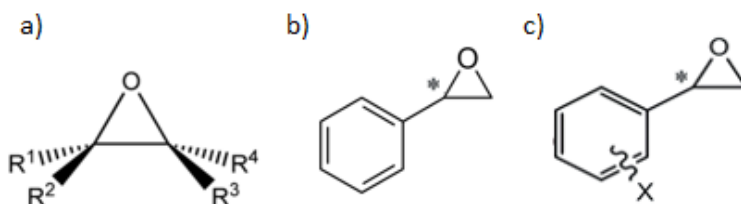
2. Opći dio

2.1. Epoksidi

Epoksidi ili oksirani su ciklički eteri s tri-atomnim prstenom koji sadrži kisik (slika 2.1 a). Pripadaju u vrlo reaktivne spojeve kao posljedica polarnosti i napetosti prstena. Karakteristična reakcija je otvaranje epoksidnog prstena kada se u njegovoj blizini nalazi reagens. Postoji široki raspon reagensa s kojima pojedini epoksid može reagirati, što znači da kao produkt mogu nastati različiti spojevi. Ti reagensi mogu biti nukleofili, elektrofilni, kiseline, baze, reducenski i oksidansi.⁸ Reaktivnost, i to da se mogu jednostavno pripremiti iz širokog raspona različitih polaznih kemikalija, čini epoksidge idealnim kao intermedijerom u organskim sintezama. Također, važno svojstvo koje pokazuju epoksidge, a koje je važno za industrijsku primjenu je kiralnost.⁹

2.1.1. Stiren oksid i njegovi derivati

Stiren oksid, poznat i kao 2-feniloksiran, je aromatski epoksid nastao iz stirena kao polaznog spoja (slika 2.2. b). Pripada u osnovne kemijske građevne jedinice jer sadrži aromatsku skupinu, kiralni centar na benzilnom ugljikovom atomu, te kao epoksid vrlo je reaktivan. Radi toga pronalazi svoju primjenu kada se želi sintetizirati kiralna aromatska molekula.¹⁰ Primjena mu se dalje proširuje kada se sintetiziraju njegovi derivati. Radi potrebe dobivanja enantiočistih derivata zanimljivi su biokatalitički putevi u kojima se osim HHDH koriste i epoksid hidrolaze u reakcijama kinetičke rezolucije. U njima dolazi do deprotonacije i posljedične supstitucije prilikom čega su jedan ili više vodika zamijenjeni s fluorom, bromom, klorom ili ugljikovim atomom.^{11,12} Dobivena molekula prikazana je na slici 2.2. c). Derivati stiren oksida koriste se za sintezu oksazolidinona, nove klase fungicida, antibakterijskih i antimikrobnih agensa koji se također koriste kao prekursori za sintezu β -amino kiselina.¹³ Također mogu se sintetizirati i β -azidoalkoholi (produkt na slici 1.1.). U literaturi mogu se pronaći studije u kojima su proučavane upotrebe derivata stirena kao građevnih blokova.¹⁴⁻¹⁶



Slika 2.1. a) epoksid; b) stiren oksid; c) derivat stiren oksida (X = F, Cl, Br, C)

2.2. Kiralnost

Neka molekula je kiralna kada se ne može preklopiti sa svojom zrcalnom slikom, u suprotnom za nju kažemo da je akiralna (prilog 1). Kiralne molekule su asimetrične te imaju jedan ili više stereocentara. U organskim molekulama stereocentri su većinom ugljikovi atomi koji imaju različite atome ili skupine vezane na sebe te se općenito na prikazima molekula označavaju sa zvjezdicom (*). Ako usporedimo dvije kiralne molekule koje su po svemu iste osim što se odnose kao predmet i njena zrcalna slika, za njih kažemo da su prostorni izomeri ili enantiomeri. Oni pokazuju ista fizikalna svojstva osim što zakreću ravninu svjetlosti u suprotnim smjerovima, pa se i prema tome drugačije označavaju prema Cahn-Ingold-Prelog pravilu. (*R*) (lat. *rectus* – desno) je oznaka za enantiomer koji zakreće ravninu u desno, dok (*S*) dolazi od latinske riječi *sinsiter* što znači lijevo.^{17,18} Prilikom sinteze neke organske molekule, jer su enantiomeri jako slični, može se dogoditi da se kao produkt dobije smjesa enantiomera. Mjera čistoće ovih spojeva je enantiomerni višak (*ee*) koji govori o tome koliko u spoju ima više jednog enantiomera od drugoga, te računa se prema jed. 2.1., gdje je *n* broj molova pojedinog enantiomera. Ako u produktu ima jednaka količina oba enantiomera dobiveni produkt se naziva racemična smjesa (*ee* = 0 %). U slučaju da ima više jednog enantiomera od drugog naziva se enatiomerno obogaćen spoj (*ee* = 0 – 100 %), a ako je sintetiziran samo jedan enatiomer, onda se naziva enatiomerno čisti spoj (*ee* = 100 %).¹⁹

$$ee [\%] = \frac{n(R) - n(S)}{n(R) + n(S)} \cdot 100 \quad (2.1.)$$

Iako enantiomeri pokazuju ista fizikalna i kemijska svojstva, organizam ih često drugačije metabolizira, tj. mogu imati različitu biološku aktivnost. To je zato što enantiomer mora geometrijski odgovarati receptorskom mjestu u organizmu, zaslužnom za njegovu metabolizaciju (prilog 1).²⁰ Navedena pojava je važna za farmaciju i proizvodnju agrokemikalija. Jedan enatiomer može imati željeni učinak dok drugi može biti toksičan, imati nikakvo ili slabo djelovanje na organizam. Pa se tako lijek Ibuprofen prodaje kao racemat jer oba enantiomera imaju pozitivan učinak, dok suprotno u Talidomidu samo (*R*)-izomer ima željeni sedativni učinak, dok (*S*)-izomer je kancerogen. Indoxcarb je insekticid u kojemu (*S*)-izomer je dvostruko aktivniji od (*R*)-izomera, što znači da ako se on koristi u enatiomerno obogaćenom obliku, smanjuje se ukupna količina kemikalija koja se koristi te to smanjuje negativni utjecaj na okoliš.²¹ Općenito, može se reći da enatiomerno čisti spoj ima bolji učinak nego enatiomerna smjesa.

2.3. Enzimi

Enzimi su organske makromolekule koje ubrzavaju biokemijske reakcije unutar živih organizama. Radi toga poznati su pod nazivom biokatalizatori, dok ime enzim su dobili jer su prvi put pronađeni u stanicama kvasca (grč. *enzumé* – u kvascu).²² Ne zamjenjiva je uloga enzima za živi svijet. U organizmima sudjeluju u metaboličkim putevima, respiraciji, digestiji i drugim važnim životnim procesima. Omogućuju održavanje homeostaze, tj. ravnotežnih uvjeta u organizmu.²³ Također, zato što su industrijski enzimski procesi održivi, važna je njihova uloga u biotehnologiji. Enzimi su obnovljivi materijal jer nastaju unutar stanica te procesi uzgoja enzima za proizvodne potrebe su repetitivni. Biorazgradivost enzima i atmosferski uvjeti u enzimskim procesima doprinose održivosti i čine te procese prihvatljivim za okoliš.²⁴ Općenita svojstva enzima, važna za njihovu ulogu u živom svijetu i industriji, prikazan su u tablici 2.1.

Tablica 2.1. Općenita svojstva enzima

Svojstvo	Opis	Značaj za primjenu u industriji
Aktivnost ²²	Mjera katalitičke moći enzima. Enzimi s višom aktivnosti će prevesti više supstrata u produkt u istom vremenu.	Enzimi se mogu koristiti umjesto kemijskih katalizatora. Što je veća aktivnost to je potrebna manja količina enzima po količini produkta.
Stabilnost ²⁵	Ostatak enzimске aktivnosti nakon određenog vremena. Ako enzim pokazuje mali gubitak aktivnosti u vremenu, kažemo da je on stabilan.	Potrebno je pažljivo održavati uvijete u procesu koji odgovaraju enzimima. Većina enzimatskih procesa mora se provoditi u blagim uvjetima pri niskim tlakovima i temperaturama.
Selektivnost ^{26,27}	Svojstvo da enzim reagira samo s jednim supstratom ili grupom supstrata.	Enzimi se mogu koristiti za separaciju smjesa sličnih molekula. Nastaje manje nusprodukata. Biosenzori mogu detektirati analite na koje su enzimi selektivni.
Promiskuitentnost ²⁸	Suprotan pojam od selektivnosti. Enzimi kataliziraju reakcije iz dvije ili više različitih skupina	Enzimi iz iste grupe mogu se koristiti za različite procese u industriji.
Specifičnost enzima prema supstratu ²⁹	Kinetičko svojstvo koje govori o afinitetu enzima prema supstratu. Što je veće to će enzim brže reagirati s njim prevodeći ga pritom u produkt.	Procesi postaju kraći. Moguće su brze reakcije s malom količinom supstrata. Visoka specifičnost daje brzi odziv u detekciji analita s enzimima u biosenzorima.

2.3.1. Važnost biotehnologije i mjesto enzima u njoj

Biotehnologija je korištenje organizama ili njihovih dijelova u industrijske i druge komercijalne svrhe. Temelji se na oponašanju i ugradnji bioloških procesa u proizvodne procese kako bi se dobio ekonomski isplativi produkt.³⁰ Biotehnologija pronalazi ulogu u proizvodnji lijekova za medicinu i farmaceutsku industriju, povećanju prinosa u agroindustriji, uklanjanju onečišćenja iz okoliša te za proizvodnju kemikalija u kemijskoj industriji.³¹ 2017. svjetsko tržište biotehnologije vrijedilo je skoro 400 milijarde \$ te se predviđa porast do 775 milijarde \$ do 2025.³² Može se reći da je rast imponantan, u 8 godina očekuje se skoro dvostruki rast te je zato u izvještaju Poslovi budućnosti, Svjetski Ekonomski Forum (WFE) uključio biotehnologiju u 20 poslovnih područja s najvećim utjecajem na svjetsku ekonomiju za sljedećih 5 godina.³³ Glavni razlozi tog rasta kriju se u rastu populacije i općeg životnog standarda radi kojih dolazi do povećane potrebe za hranom i lijekovima.³² Biotehnologija može uspješno odgovoriti na tu potrebu. Također, poticaji vlada i javnosti da se pređe na održive proizvodne procese te razvoj novih tehnologija koje čine procese unutar biotehnologije ekonomski isplativijim daju prednost biotehnologiji nad drugim proizvodnim granama.^{32,34,35} Biotehnologiju možemo podijeliti prema području na kojem se primjenjuje kako je prikazano u tablici 2.2. U svim područjima prisutni su procesi s enzimima, a najviše su razvijeni u biofarmaciji ili crvenoj biotehnologiji te bioindustriji ili bijeloj biotehnologiji.³⁶ U nastavku poglavlja slijede primjeri korištenja enzima u biotehnologiji.

Enzimi se koriste za proizvodnju kemikalija i proizvoda unutar bijele biotehnologije. Primjer su lipaze i proteaze kao dio modernih detergenata. Lipaze kataliziraju raspad kemijskih veza u molekulama ulja i masti, te je posljedično omogućeno lakše uklanjanje tih tvari s odjeće. Proteaze razgrađuju proteine te se tako s tekstila lakše uklanja ljudski znoj te druge proteinske tvari.^{37,38} Ove dvije skupine enzima koriste se i u prehrambenoj industriji za proizvodnju sireva i aroma.^{39,40} Za prehrambenu industriju značajna je proizvodnja sintetskih zaslađivača koji se dodaju u prehrambene proizvode. Pa se tako iz kukuruznog škroba aktivnošću enzima glukoamilaza ili glukoizomeraza proizvodi glukozno-fruktozni sirup.⁴¹ Istraživanja pokazuju upitan utjecaj tog zaslađivača na ljudsko zdravlje, te neka ga povezuju s pretilošću i srčanim tegobama.⁴² Radi toga danas raste tržište niskokaloričnih zaslađivača koji nemaju značajan negativni utjecaj na zdravlje.⁴³ Primjer je aspartam koji se sintetizira iz asparginske kiseline uz enzim termolizin.⁴⁴

U farmaceutskoj industriji proizvodnja lijekova često zahtjeva više koraka u kojima se od početne molekule preko niza intermedijera proizvodi produkt koji može imati pozitivan učinak na zdravlje. Spomenuti intermedijeri su često kiralni te izvrsna regioselektivnost i stereoselektivnost koju pokazuju enzimi pojednostavljuje sintezu tih kompleksnih spojeva.⁴⁵ Selektivnost enzima je omogućila razvoj brojnih enzimski puteva za proizvodnju antibiotika, protuupalnih lijekova i drugih farmaceutika. Primjer su β -laktamskih antibiotici, kao što je penicilin, koji zauzimaju 65% ukupnog tržišta antibiotika.⁴⁶ Osim sinteze farmaceutika, enzimskim putem se mogu dobiti spojevi koji se dodaju u lijekove kako bi se poboljšala stabilnost i smanjili neželjeni efekti lijeka. Primjer je ciklodekstrin kao dio protuupalnog lijeka ibuprofena.⁴⁷

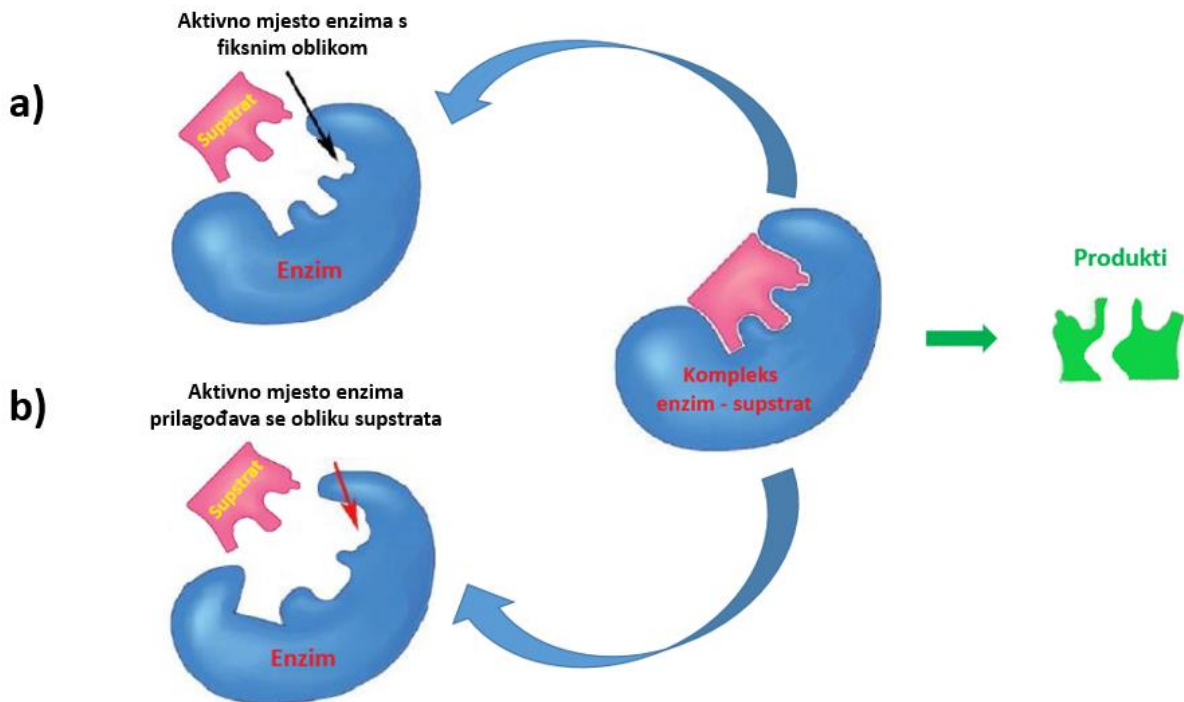
Potaknuto strožim zakonodavstvom koje teži smanjenju emisije stakleničkih plinova i rizika koji su povezani s tradicionalnom petrokemijskom industrijom, dolazi do porasta proizvodnje biogoriva u biotehnološkim procesima.³⁵ U njima se za proizvodnju goriva koristi lignocelulozna biomasa kao održivi resurs. Usko grlo procesa je njena predobrada kojom se iz kompliciranog polisaharida dobiju jednostavni šećeri spremni za fermentaciju i proizvodnju goriva. Upravo se korištenje celulaza i hemicelulaza, enzima koji razgrađuju lignocelulozu, smatra kao opcija za uklanjanje tog uskog grla i posljedično poboljšanje ekonomičnosti procesa.⁴⁸

Tablica 2.2. Najvažnije boje (područja) biotehnologije

Boja biotehnologije	Opis	Uloga enzima u njoj
Bijela ⁴⁹ (industrijska biotehnologija)	Proizvodnja finih kemikalija i kemikalija široke potrošnje.	Enzimi zamjenjuju korištenje kemijskih katalizatora u proizvodnji kemikalija.
Crvena ⁴⁹ (farmaceutska biotehnologija)	Primjena biotehnologije u zdravstvu i farmaceutskom sektoru. Proizvodnja specijalnih kemikalija.	Prisutni su u brojnim sintetskim putevima, te koriste se za racemizaciju.
Zelena ⁵⁰	Korištenje genetskih modificiranih biljaka za proizvodnju kemikalija i hrane.	Pomažu u razvoju biljaka otpornih na biotičke i abiotičke čimbenike.
Plava ⁵⁰	Iskorištavanje bioraznolikosti mora i slatkih voda kao izvor novih proizvoda.	Enzimi porijeklom iz vodenih organizama se koriste za razvoj novih sintetskih procesa.
Siva ^{30,51}	Razvoj biotehnoloških procesa za primjenu u okolišu.	Korištenje enzima unutar biosenzora za praćenje onečišćenja u okolišu. Bioremedijacija tla.

2.3.2. Djelovanje enzima

Enzimi, isto kao i klasični kemijski katalizatori, ubrzavaju kemijsku reakciju tako što smanjuju energiju koju je potrebno dovesti reaktantima da bi prešli u produkte. Ta energija se zove energija aktivacije, a reaktanti u enzimskim reakcijama se nazivaju supstrati. Smanjenje energije aktivacije se postiže tako što se enzim i supstrat vežu u kompleks radi kojeg je supstratu lakše prijeći u produkt nego da nema enzima. Zato što je enzim znatno veći nego supstrat koncentracija kompleksa je znatno veća nego supstrata, te će to uzrokovati proporcionalno povećanje brzine reakcije. Nakon što je produkt nastao, kompleks se raspada u produkt i enzim koji iz reakcije izlazi nepromijenjen.^{52,53} Vezanje se događa jer aktivno mjesto na enzimu geometrijski odgovara obliku supstrata. To se može zamisliti kao ključ koji ulazi u bravu, te je zato autor E. Fischer i nazvao tu teoriju ključ-brava. D.E. Koshland je nadgradio tu teoriju i rekao da enzim i supstrat si ne moraju idealno geometrijski odgovarati, nego da supstrat uzrokuje promjenu aktivnog mjesta prilikom vezanja. Često se povlači analogija s rukavicom i rukom. Rukavica i ruka su geometrijski komplementarne u obliku, međutim kada se rukavica navuče na ruku ona mijenja svoj oblik kako bi bolje pristala.⁵⁴ Bez obzira o kojoj se teoriji radi, kao posljedica geometrijskog vezanja u kompleks enzimi posjeduju visoku selektivnost za pojedini supstrat.²⁶ Veze prisutne prilikom nastajanja kompleksa mogu biti van der Waalsove, hidrofobne, vodikove i ponekad kovalentne.⁵³



Slika 2.2. Djelovanje enzima teorijom ključ-brava (a), inducirane pobude (b)

2.3.3. Uvjeti za djelotvoran enzim

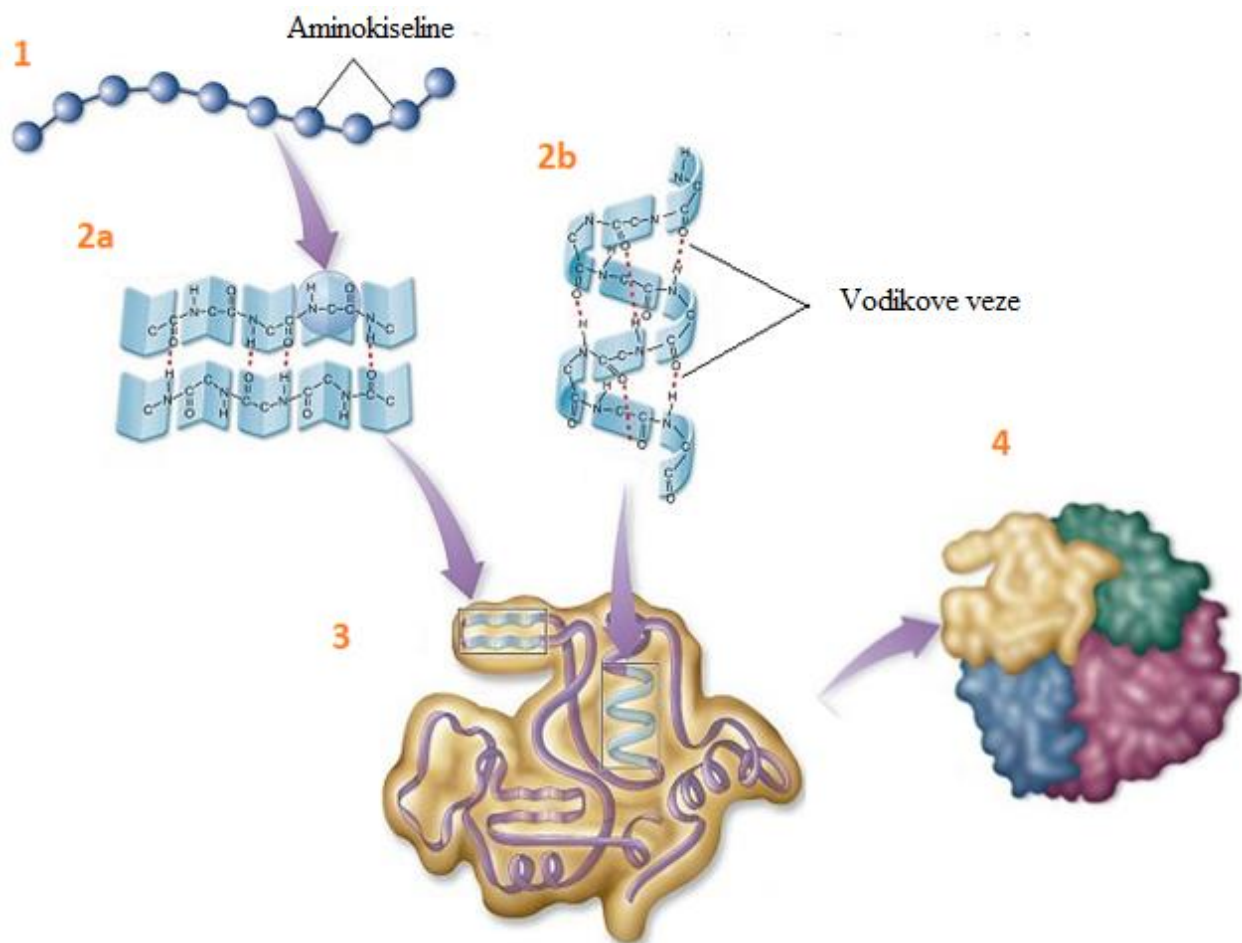
U nekom komercijalnom industrijskom procesu potrebno je održavati uvjete koji odgovaraju enzimima kako bi gubitak enzimske aktivnosti u vremenu bio što manji. Ti uvjeti trebaju biti slični biološkim uvjetima u organizmima u kojima se enzimi prirodno nalaze. Radi se o pH blizu 7, temperaturi između 20 – 50 °C, atmosferskom tlaku te o razrijeđenim vodenim otopinama. Često su stvarni uvjeti u procesu različiti od idealnih. Razlog tomu je težnja za većom produktivnosti koja se teško može postići u uvjetima koji prirodno odgovaraju enzimima.^{55,56} Na primjer, više će produkta moći nastati ako se enzim nalazi u koncentriranoj otopini pri višoj temperaturi. Međutim u takvim uvjetima enzim neće moći biti dugo stabilan.⁵⁷ Radi toga pribjegava se metodama koje mijenjaju i proširuju uvjete u kojima su enzimi stabilni. Najpoznatija je heterogena biokataliza u kojoj se enzim imobilizira na nosioc ili se zadržava u nekom volumenu pomoću membrana sve kako bi se poboljšala svojstva enzima navedena u tablici 2.1. Istraživanja heterogene biokatalize se intenzivno provode jer se smatra kao jedno od glavnih oruđa u poboljšanju ekonomičnosti enzimskih procesa.^{58,59} Osim toga proteinskim inženjerstvom i genetskom modifikacijom enzima te posljedično promjenom u njegovoj strukturi također se može postići da enzim bude aktivniji u širem području.⁵⁶

Većina enzima djeluje unutar stanica u kojima nastaju (intercelularno) dok se neki nakon sinteze izlučuju izvan stanice gdje pokazuju aktivnost (ekstracelularno).⁶⁰ Da budu aktivni, bez obzira gdje se nalaze, potrebna im je bar minimalna količina vode u svojem okruženju⁶¹. Osim toga nekim enzimima za aktivnost je potrebna ne proteinska molekula koja se veže na strukturu enzima i čini enzim aktivnim. Takve molekule nazivaju se kofaktori i često se radi o metalnim ionima kao što su bakar, cink ili željezo. Ako je za djelovanje enzima potrebna organska molekula, kofaktor se još naziva koenzim. Kofaktori se često moraju dodavati u reakcijsku smjesu u nekom enzimatskom procesu kako bi se reakcija mogla provoditi.⁶² Osim toga važni su i za živi svijet. Razlog zašto ljudi moraju konzumirati vitamine i minerale je u tome što oni imaju ulogu kofaktora u metaboličkim putevima u organizmu.⁶³

2.3.4. Struktura enzima

Svi enzimi su proteini. Osnovne građevne jedinice proteina su aminokiseline koje se međusobno povezuju stvarajući molekulu velike molarne mase. Ona se naziva makromolekula te njezina molarna masa može biti od nekoliko tisuća pa sve do nekoliko milijuna g mol⁻¹. S obzirom

na kompleksnost, strukturu enzima možemo podijeliti u četiri stupnja (slika 2.3.).⁶⁴ Primarnu strukturu čine molekule aminokiseline koje se povezuju vezom između karboksilne grupe jedne aminokiseline i amino grupe sljedeće aminokiseline u nizu. Ta veza se naziva peptidna i kada se tako nekoliko stotina aminokiselina poveže dobije se primarna struktura, tj. polipeptidni lanac. On nije linearan, već je slobodan u prostoru te je moguća rotacija između veza u lancu. Radi toga struktura je fleksibilna i težit će stabilizaciji. Kemijske grupe u polipeptidnom lancu približit će se jedna drugoj te dolazi do stvaranja vodikovih veza koje stabiliziraju strukturu i to između vodika u amino grupi i kisika u karboksilnoj. Dobiveni oblik može biti heliks ili ploča i predstavlja sekundarnu strukturu proteina. Polipeptidni lanac ja i dalje fleksibilan te dolazi do njegovog uvijanja, savijanja i zbijanja te dobije se kompaktna trodimenzionalna globularna struktura koja dodatno stabilizira makromolekulu te naziva se tercijarna struktura. I na kraju najstabilnija je kvartarna struktura koja se dobije kada se međusobno poveže više polipeptidnih lanaca.⁵³ Disulfidni mostovi i ne kovalentne veze su karakteristične za tercijarnu i kvartarnu strukturu.



Slika 2.3. Struktura enzima: 1-primarna 2-sekundarna (a-ploča, b-heliks) 3-tercijarna 4-kvartarna

Kvartarna struktura je isto globularni protein. Globularnost znači da je protein u obliku sfere te je takva struktura i dalje fleksibilna što je važno kako bi enzim mogao primati supstrat na sebe. Iako samo mali dio enzimske molekule sudjeluje u stvaranju aktivnog mjesta, važan je i ostatak molekule jer on stabilizira strukturu enzima i stvoreni kompleks između enzima i supstrata.⁶⁵ Strukturu enzima je važno poznavati jer ona određuje najvažnija enzimska svojstva navedena u tablici 2.1., te promjenama u strukturi ona se mogu poboljšati.⁶⁶

2.3.5. Nomenklatura i podjela enzima

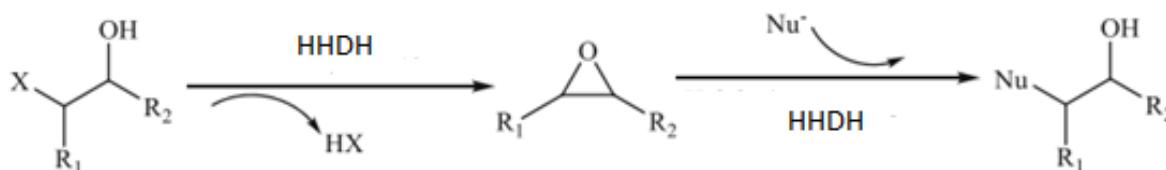
U literaturi se može lako prepoznati je li neki spoj enzim, po tome da li ima sufiks *-aze* (eng. *-ase*). Samo ime enzima daje neku informaciju o enzimskom sustavu, bilo da se radi o supstratu, produktu ili o reakciji u kojoj oni sudjeluju. Npr., enzim oksidaza katalizira reakciju oksidacije. Kroz povijest pojedini enzim je ponekad dobivao i više imena, te naziv enzima nije uvijek davalo najbolju indicaciju o reakciji. Primjer je enzim invertaza koji katalizira hidrolizu sukroze u fruktozu i glukozu. Neka od alternativnih imena za invertazu su saharaza, glukosukraza, invertin te EC 3.2.1.26. Zadnji naziv, koji je poznat kao EC broj, uveden je od strane Enzimske Komisije kako bi se izbjeglo nasumično imenovanje enzima te radi toga preferira se kada se želi točno opisati ime enzima. On se sastoji od 4 dijela koja su objašnjena na primjeru invertaze. Prvi broj u nazivu je 3 te on ukazuje da invertaza pripada u grupu hidrolaza koja je jedna od 6 glavnih grupa enzima (tablica 2.3.). Sljedeći brojevi u nazivu se odnose na podgrupe. 2 predstavlja glikozilaze koje kataliziraju cijepanje glikozidne veze nakon čega slijedi 1 koji kaže da se cijepa veza na O ili S-glikozidu (glikozidaza). Zadnji broj najbliže opisuje enzim te u slučaju invertaze kaže da ona pripada u β -fruktofuranozidaze koje kataliziraju terminalne β -fruktofuranozide.⁶⁷ Sve informacije o nazivljima enzima mogu se pronaći u web bazama podataka (BRENDA, ExPASy...)^{68,69}

Tablica 2.3. Osnovne grupe enzima

Prvi EC broj i grupa enzima	Tip katalizirane reakcije
1. Oksidoreduktaze	Oksidacija i redukcija
2. Transferaze	Prijenos atoma ili funkcionalne skupine među molekulama
3. Hidrolaze	Hidroliza
4. Liaze	Uklanjanje funkcionalne skupine kidanjem kovalentne veze
5. Izomeraze	Izomerizacija
6. Ligaze	Stvaranje kovalentne veze uz istovremenu hidrolizu pirofosfatne

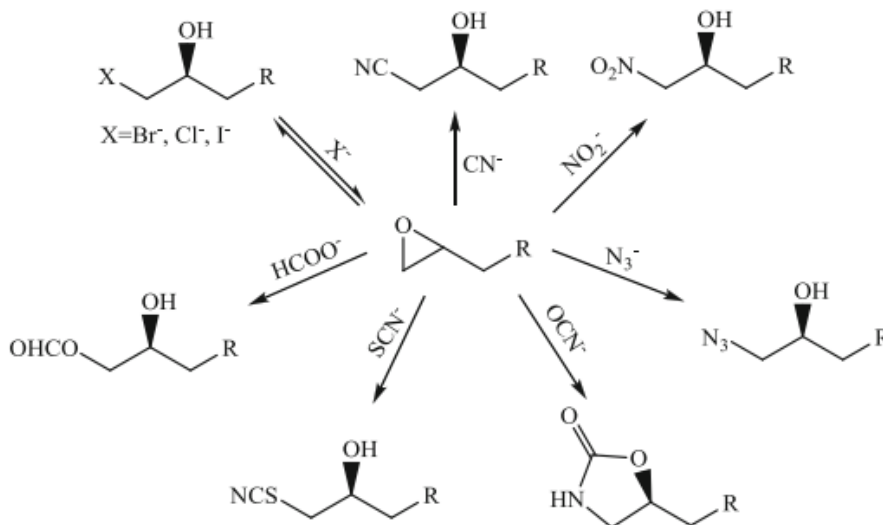
2.4. Halogenhidrin-dehalogenaze

HHDH spadaju u enzimsku grupu liaza (EC 4.5.1.-) te se još nazivaju haloalkol-dehalogenaze, halohidrin-epoksidaze i halohidrin hidrogen-halid-liaze.⁷⁰ Kao i kod drugih enzima, iz naziva se može zaključiti o reakcijama u kojima sudjeluju i supstratima s kojim reagiraju. Ovi enzimi u metabolizmu kataliziraju reverzibilnu dehalogenaciju vicinalnih haloalkohola (halohidrina) prilikom čega kao produkt nastaje epoksid i halid (HX) (slika 2.4.).⁶⁰ Drugim riječima HHDH reagira sa supstratima koji na susjednim ugljikovim atomima imaju hidroksilnu skupinu (OH) i halogeni element (X), dolazi do zatvaranja prstena i nastajanja epoksida te pritom vodik (H) s X-om izlazi iz spoja.



Slika 2.4. Zatvaranje i otvaranje epoksidnog prstena s HHDH⁷¹

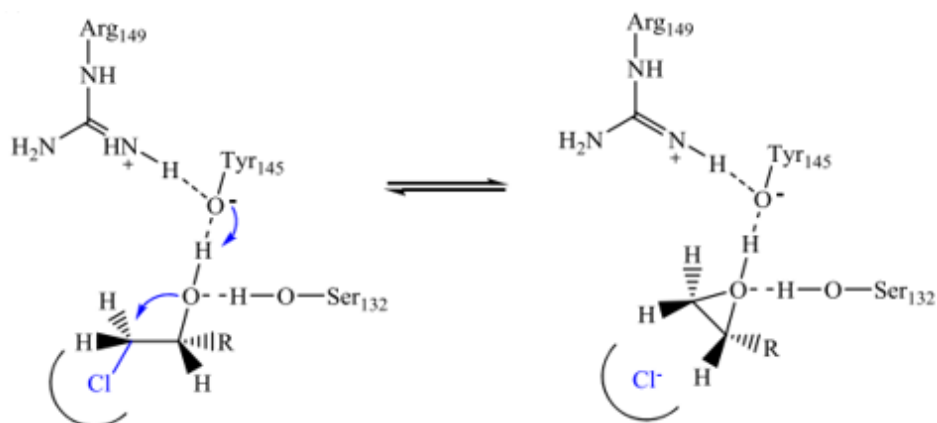
HHDH katalizira i reverzibilnu reakciju (slika 2.4.) u kojoj dolazi do otvaranja epoksidnog prstena u prisustvu nukleofila (Nu⁻). Ovo svojstvo je važno za komercijalnu primjenu HHDH jer su osim halida i drugi nukleofili (slika 2.5.) poput cijanida (CN⁻) ili azida (N₃⁻) prihvaćeni od strane ovih enzima te može doći do nastajanja nove C-C, C-O, C-N ili C-S veze.⁷² Ako u otvaranju prstena sudjeluju nukleofili osim halida, reakcija je ireverzibilna. Također, ako je prisutna voda u sustavu ona će se ponašati nukleofilno i može doći do nastajanja 1,2-diola.⁶⁰



Slika 2.5. Katalitičko područje djelovanja HHDH

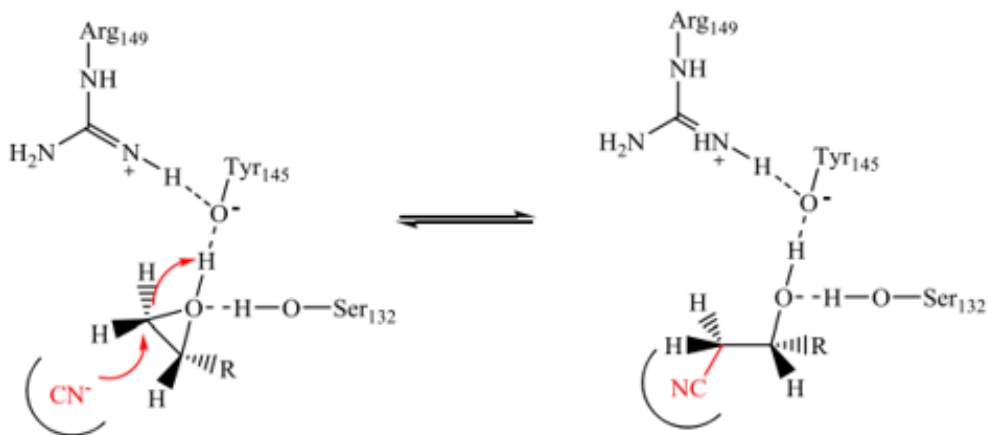
2.4.1. Reakcijski mehanizam

Katalitički mehanizam dehalogenacije s HHDH prikazan je na slici 2.6. Aktivno mjesto na ovom enzimu izgrađeno je od 3 aminokiseline: serin (Ser), tirozin (Tir) i arginin (Arg). Reakcija počinje tako što nukleofilni Tir uzima proton od OH s epoksida i posljedično kisik iz OH nukleofilno napada susjednu C-X vezu na epoksidu. Prilikom toga dolazi do zatvaranja prstena, X (na slici Cl⁻) izlazi iz supstrata te oduzima vodik Tir-u. Nastali epoksid izlazi iz aktivnog mjesta i HHDH je spreman za novu katalitičku reakciju.^{71,73}



Slika 2.6. Mehanizam otvaranja epoksidnog prstena s HHDH

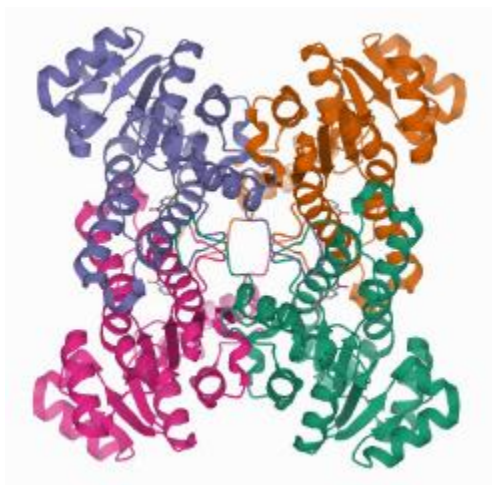
Epoksidi su reaktivni spojevi te napadom nukleofila (na slici CN⁻) dolazi do otvaranja njegovog prstena. Tir donira proton kisiku iz epoksidnog prstena, reakcija je gotova i došlo je do stvaranja cijanohidrina (slika 2.7.). U oba mehanizma Arg ima ulogu da polarizira OH grupu Tir-a i ubrza prijenos protona, dok Ser kroz interakciju sa supstratom pozicionira OH prema Tir-u. Mehanizam je isti bez obzira o kojem se nukleofilu radi.^{71,73}



Slika 2.7. Mehanizam zatvaranja epoksidnog prstena s HHDH

2.4.2. Podjela HHDH

HHDH možemo filogenetski podijeliti na podtipove s obzirom na sekvencu gena i aktivnost koju pokazuju. Primjer jednog enzima iz grupe HHDH je HheA2. Hhe znači da se radi o HHDH, A je podtip te poslije njega se dodaje broj ako postoji više enzima unutar jednog podtipa. Trenutačno su za biotehnoško iskorištavanje komercijalno dostupna 5 HHDH koje spadaju u 3 podtipa A, B i C dok se u zadnjih 5 godina otkrivene na desetine novih HHDH koje su predmet istraživanja te su svrstane u podtipove A – G.^{70,74} Najznačajniji enzim je HheC (slika 2.8.) porijeklom iz bakterija *Agrobacterium radiobacter* i *Rhizobium sp.*⁷⁵



Slika 2.8. 3D struktura HheC

2.4.3. Primjena HHDH u kontroli onečišćenja u okolišu

Uloga HHDH u metabolizmu pojedinih mikroorganizama je da im omogući preživljavanje situacija kada se u njihovom organizmu nađu toksični vicinalni halohidriini. Ti mikroorganizmi mogu razgraditi navedene spojeve enzimskim putem kako je opisano u prethodnom poglavlju, prilikom čega dolazi do uklanjanja halogenog atoma, te se dobije organski spoj kojega mikroorganizmi mogu sigurno iskoristiti kao izvor ugljika i energije.⁷⁶ Kako biotehnoški procesi nastoje oponašati prirodu, tako se i oponaša navedeni proces da bi HHDH biorazgradio toksična halogenirana organska onečišćavala prisutna u tlu i vodi. Oni tamo dolaze jer su u širokoj upotrebi u proizvodnji kemikalija, te primjer je razgradnja 1,2,3 – trihalopropanola i drugih supstituiranih halogeniranih derivata propanola koristeći genetski modificiranu *A. radiobacter*. Navedeni spojevi često su prisutni u otpadnim strujama polimerne i papirne industrije.⁷⁷ Osim toga od posebnog je interesa uklanjanje toksičnih spojeva koji nastaju prilikom prerade hrane kako bi ona postala sigurna za konzumaciju. Primjer su mono i diklorirani propanoli i esteri masnih kiselina koji

nastaju prilikom hidrolize proteina i uklanjanja mirisa iz biljnih ulja. Za uklanjanje navedenih spojeva mogu se koristiti HHDH unutar cijelih stanica ili kao pročišćeni enzimi. U oba slučaja HHDH se kombinira s lipazama i hidrolazama za postizanje učinkovitog procesa.^{78,79}

HHDH se također mogu koristiti za kvantifikaciju azida i cijanida u vodenoj fazi. Ovi nukleofili imaju široku upotrebu u pripravi finih kemikalija. Međutim, inhibiraju metaboličke puteve u organizmima te radi toga potrebno je pratiti i kontrolirati njihovu koncentraciju u okolišu. Razvijena metoda s HHDH za njihovu detekciju je brza, ekološki prihvatljiva, jeftina, jednostavna i selektivna, a zasniva se na reakciji epoksida s azidom ili cijanidom kataliziranom HHDH. Dobiveni produkti se analiziraju s plinskom kromatografijom.⁸⁰

2.4.4. Biotehnoška primjena HHDH

Promiskuitetnost HHDH omogućuje ovim enzimima široku primjenu u proizvodnji različitih kemikalija za farmaceutske i industrijske potrebe. Osim toga visoka aktivnost, enantioselektivnost, i specifičnost koju pokazuju pojedini tipovi HHDH, te također to da im ne trebaju kofaktori za reakcije čini te procese ekonomski isplativima.⁸¹ Slijede primjeri najznačajnijih komercijalnih procesa u kojima se koriste HHDH.

Najvažnija primjena HHDH je u visokotonažnoj proizvodnji prekursora za sintezu Lipitora, najprodavanijeg lijeka u svijetu s godišnjom prodajom od oko 10 milijardi \$. Lipitor pripada u grupu statina, lijekova koji se koriste za snižavanje kolesterola.⁸² Prekursor je (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutirat te proizvodi se iz etilnog (*S*)-4-kloro-3-hidroksibutirata koristeći genetski modificiranu HheC. Enantiomerna čistoća dobivenog prekursora je viša od 99.9 % (*ee*). To je važno jer *ee* Lipitora ovisi isključivo o *ee* prekursora, a kako bi se sintetizirani Lipitor mogao koristiti kao lijek potrebno je da ima *ee* viši od 99.5 %.⁸³ Težnja za tako visokom *ee* dovela je do razvijanja biotehnoških puteva za sintezu Lipitora koristeći HHDH, te oni postaju sve kompetitivniji klasičnim kemijskim procesima, posebno ako se uzme u obzir njihova prihvatljivost za okoliš.

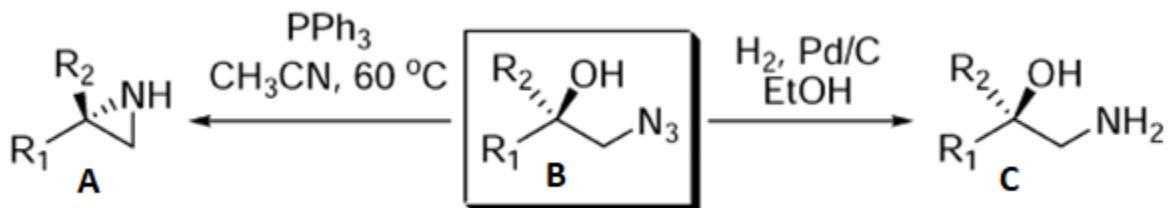
HHDH se koristi u sintezi kiralnih epoksida, vrijednih spojeva za proizvodnju enantiomerno čistih farmaceutika i agrokemikalija.⁸⁴ Procesi koji se koriste su već spomenuto zatvaranje prstena, te kinetička rezolucija i kaskadna reakcija. Kinetička rezolucija je proces u kojemu visoka enantioselektivnost enzima omogućuje brže reagiranje s jednim enantiomerom i dobivanje enantiomerno obogaćenog produkta. Ovakav proces se može kombinirati u kaskadu s

in-situ racemizacijom sporije reagirajućeg enantiomera kako bi teoretski iskorištenje bilo 100 %.⁸⁵ Primjeri procesa u kojima se HHDH koriste za proizvodnju epoksida navedenim putevima su dani u literaturi.^{86,87}

Kao što je prikazano na slici 2.5., HHDH se u procesu otvaranja epoksidnog prstena koristi u sintezi širokog spektra proizvoda. Najzastupljeniji komercijalni procesi su otvaranje prstena s azidima i nitratima kao nukleofilima. Osim toga važno je spomenuti i sintezu tercijarnih alkohola iz 2,2-disupstituiranih epoksida te ulogu cijanida kao nukleofila u proizvodnja antimikrobnih agensa.⁸⁸

2.4.5. Otvaranje epoksidnog prstena s azidom

β -amino alkoholi se koriste u medicini kao β -blokatori u liječenju kardiovaskularnih bolesti, asimetričnoj sintezi kiralnih liganada i pomoćnih tvari u lijekovima, te u proizvodnji insekticida.⁸⁹ Klasične metode za dobivanje enantiomerno čistih β -amino alkohola zahtijevaju kinetičku rezoluciju racemične smjese ili njeno pročišćavanje kromatografskim metodama. Ti procesi mogu biti skupi te se dobiva znatna količina neželjenog enantiomera.⁹⁰ Njihova alternativa su biotehnološki putevi u kojima se dobiva samo jedan enantiomer, i to direktno ili preko međuprodukta. Jedan od tih puteva je i otvaranje epoksidnog prstena s azidom kao nukleofilom, gdje kao međuprodukti nastaju optički čisti β -azidoalkoholi.⁹¹ Iz njih se vrlo jednostavno redukcijom mogu sintetizirati aminoalkoholi ili aziridini (slika 2.9.).⁹² Radi svoje reaktivnosti i jer sadrže amino grupu, aziridini su vrijedni polazni spojevi za sintezu u organskoj i medicinskoj kemiji.⁹³



Slika 2.9. Proizvodnja azirdina (A) i aminoalkohola (C) redukcijom iz azidoalkohola (B) dobivenog biotehnološkom putem s HHDH⁹²

2.5. Razvoj biokatalitičkog procesa

Što je potrebno napraviti ako želimo imati uspješnu proizvodnju nekog produkta biokatalitičke reakcije, tj. drugima riječima kako imati uspješan biotehnološki proces? Odgovor na to pitanje nije jednostavan te zahtijeva razvoj procesa kroz 3 razine: laboratorijsko, poluindustrijsko i na kraju industrijsko. Ako je utvrđeno da postoji tržište na koje bi se mogao plasirati neki produkt, a za njega ne postoji proizvodni proces, prvi korak je ispitivanje mogućnosti proizvodnje produkta u najmanjem, tj. laboratorijskom mjerilu. Slijedi ispitivanje u većem poluindustrijskom mjerilu kako bi se dobila veća količina produkta s kojim se može testirati njegov plasman na tržište te da se olakša prelazak na industrijsku razinu. Bez obzira o kojoj se razini radi mjera uspješnosti procesa su pokazatelji koji govore o ekonomskoj isplativosti procesa (tablica 2.4.).^{94,95} Idealno bi bilo da svi pokazatelji imaju što višu vrijednost, međutim oni su međusobno ovisni te povećanje jednog često znači smanjenje drugog i radi toga potrebno je naći optimum između pokazatelja⁹⁶. Osim ekonomskog drugi aspekt koji utječe na uspješnost procesa je njegov utjecaj na okoliš. On treba biti što manji, a da proces i dalje bude ekonomski isplativ.⁹⁷

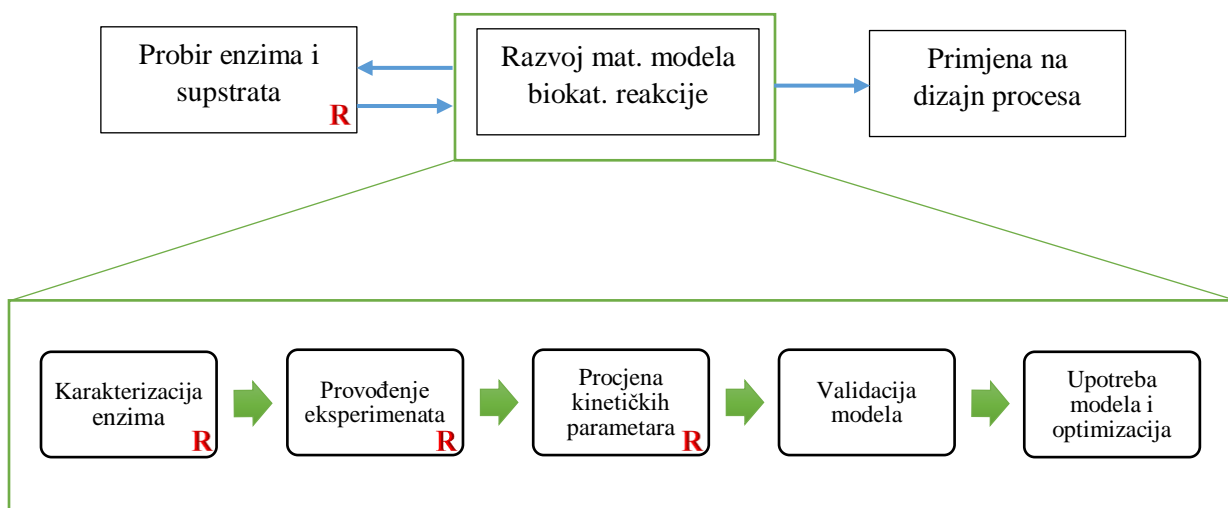
U ovom radu biokatalitički proces za proizvodnju β -amino alkohola enzimskim putem s HHDH (slika 1.1.) razmatran je na laboratorijskoj razini te slična metodologija može se primijeniti na bilo koju drugu biokatalitičku reakciju. Proces nije razmatran na višim razinama. Ukoliko bi se to htjelo, potrebno je koristiti alate i metodologije za utvrđivanje ekonomske uspješnosti i uklanjanje uskih grla procesa.^{95,98,99}

Tablica 2.4. Tipični pokazatelji uspješnosti biokatalitičkog procesa⁹⁴

Pokazatelj	Mjerna jedinica	Važnost za razvoj procesa
Konverzija supstrata	$g_{\text{prod}} g_{\text{reak}}^{-1}$	Govori o tome koliko se je reaktanta pretvorilo u produkt ili nusprodukt. Treba biti visok za jeftine proizvode.
Volumna produktivnost	$g_{\text{prod}} l_{\text{reakt}}^{-1} h^{-1}$	Određuje veličinu industrijskog postrojenja i kapitalne troškove.
Specifična produktivnost	$g_{\text{prod}} g_{\text{enzim}}^{-1} h^{-1}$	Određuje potrebnu količinu enzima za proizvodnju određene količine produkta
Koncentracija produkta	$g_{\text{prod}} l_{\text{reakt}}^{-1}$	Određuje kapitalne troškove i troškove pročišćavanja produkta.
Produktivnost biokatalizatora	$g_{\text{prod}} g_{\text{biokat}}^{-1}$	Mjera doprinosa enzima ukupnim troškovima procesa. Što je veća to je potrebno manje enzima.

2.6. Modeliranje biokatalitičkih reakcija

Laboratorijskim provođenjem reakcija u malom mjerilu dolazi se do modela koji opisuju brzinu potrošnje supstrata ili brzinu nastajanja produkta u ovisnosti o parametrima procesa. Najvažniji su kinetički modeli koji daju vezu između brzine biokatalitičke reakcije i koncentracije pojedinih sudionika reakcijske smjese. Kada se oni kombiniraju s modelom reaktora u kojemu se provodi reakcija moguće je pri različitim uvjetima procijeniti pokazatelje iz tablice 2.4. Tako se mogu pronaći optimalni uvjeti za provedbu reakcije. Također može se vidjeti inhibira li pojedini sudionik reakcijske smjese reakciju, u kojemu tipu reaktora bi bilo najbolje provoditi reakciju ili kolika količina kofaktora je potrebna za uspješnu reakciju. Kombinacija kinetičkog i reaktorskog modela naziva se matematički model biokatalitičke reakcije te je općenita strategija za njegov razvoj prikazana na slici 2.10.^{100,101}



Slika 2.10. Strategija razvoja enzimskog procesa na laboratorijskoj razini^{100,101}

Gornji dio sheme prikazuje iterativni proces između probira enzima i supstrata te razvoja matematičkog modela. Prilikom razvoja modela prikupljaju se informacije koje ukazuju na uspješnost pojedinog enzima i supstrata kao sudionika biokatalitičke reakcije. Tako se može naći optimalni par enzima i supstrata s kojima se ide u daljnja ispitivanja. Sam razvoj modela je dugotrajan proces kroz 5 koraka prikazanih na donjem dijelu sheme, a opisan u sljedećim poglavljima. Jednom dobiveni matematički model može se primijeniti na dizajn biokatalitičkog procesa prilikom čega se uklanjaju uska grla procesa i olakšava se prelazak na poluindustrijsku razinu.^{102,103} Na shemi su sa R označeni koraci koji su eksperimentalno provedeni u ovom radu.

2.6.1. Poboljšanje, probir i karakterizacija enzima

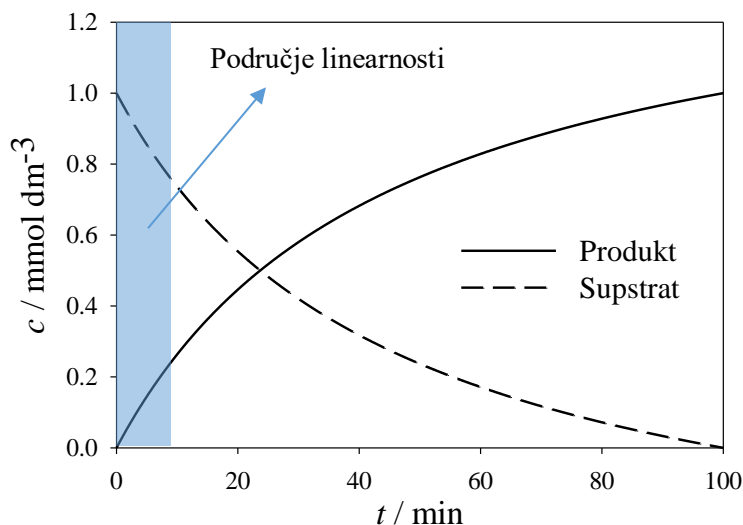
Ako se utvrdi da postoji enzimski put sinteze nekog industrijski zanimljivog produkta, prvi korak u razvoju procesa za njegovu proizvodnju ili za poboljšanje postojećeg procesa je pronalazak idealnog enzima. Metodologija u prvom koraku je da se uzme enzim za koji je dokazano da katalizira reakciju sinteze produkta, te se onda razvijaju i poboljšavaju njegova svojstva. To se postiže zamjenom aminokiselina u primarnoj strukturi enzima te se naziva proteinsko inženjerstvo.⁹⁴ Primjer je studija u kojoj su autori uspjeli poboljšati volumnu produktivnost HHDH za 4000 puta pretražujući bazu podataka u kojoj je dana veza između sekvence aminokiselina i volumne produktivnosti.¹⁰⁴ Osim pretraživanja baza podataka drugi često korišteni alat u proteinskom inženjerstvu je usmjerena evolucija. Ona se svodi na namjerno izazivanje mutacija u genu odgovornom za nastanak enzima, te posljedičnoj ugradnji tog gena u bakteriju kako bi u njoj došlo do nastajanja mutiranih enzima. Dobivenim mutantima određuju se katalitička svojstva i ako ona zadovoljavaju, njihovim genima izazivaju se nove mutacije i proces se ponavlja.¹⁰⁵ Usmjerenom evolucijom može se poboljšati aktivnost divljeg tipa HheC za 10 puta, termostabilnost za 8 °C te se može postići okretanje enantioselektivnosti enzima prema suprotnom izomeru.¹⁰⁶ Može se reći da bilo koje svojstvo enzima može biti poboljšano proteinskim inženjerstvom i usmjerenom evolucijom, te radi toga su te tehnologije omogućile komercijalizaciju biokatalize. Važnost se vidi i u tome što je 2018. godine Nobelova nagrada za kemiju dodijeljena F. H. Arnold za cjeloživotni rad na području usmjerene evolucije.¹⁰⁵

Enzime je potrebno karakterizirati u ovisnosti o različitim uvjetima u sustavu kako bi se pronašli optimalni uvjeti pri kojima bi enzimski svojstva bila najpovoljnija. Uglavnom je cilj odrediti aktivnost, selektivnost i stabilnost pri industrijski relevantnom pH, temperaturi i koncentraciji pojedinih sudionika reakcijske smjese.¹⁰¹ Također, može se odrediti stabilnost enzima u različitim organskim otapalima te pronaći optimalni uvjeti ako se u sustavu nalaze više različitih enzima. Informacije dobivene karakterizacijom enzima također služe kao pokazatelj uspješnosti proteinskog inženjerstva i usmjerene evolucije, te ukazuju na katalitičku mogućnost divljeg tipa.¹⁰⁷

2.6.2. Kinetički modeli enzimske reakcije

Do kinetičkih modela dolazi se provođenjem testova (eng. *assays*) u kojima se određuje enzimski aktivnost u ovisnosti o koncentraciji supstrata u sustavu.. Najčešće se koristi

eksperiment u kojemu se pomiješa poznata količina enzima i supstrata te se prati nestajanje supstrata ili nastajanje produkta u vremenu (slika 2.11). U sustav je potrebno dodati i pufer jer enzimska aktivnost ovisi o pH, te je zato potrebno podesiti ga na konstantu vrijednost tijekom eksperimenta.¹⁰⁸ Za praćenje koncentracije supstrata i produkta u enzimskim testovima mogu se koristiti kolorimetrijske i spektroskopske metode, te plinska ili tekućinska kromatografija.

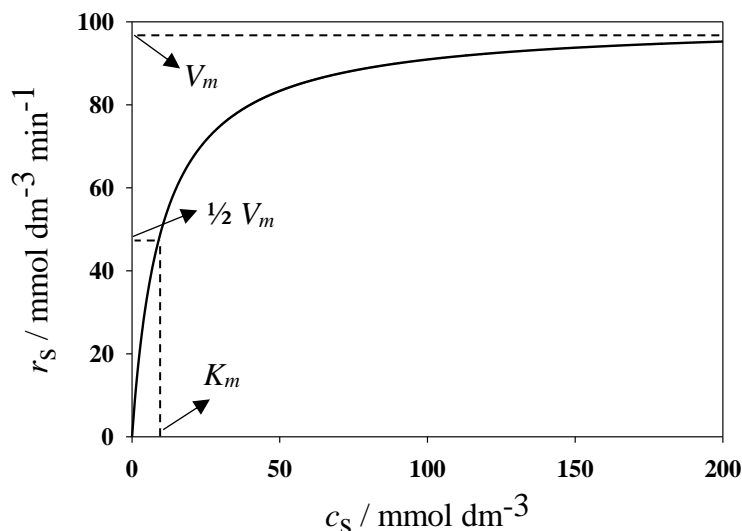


Slika 2.11. Primjer promjena koncentracije supstrata i produkta u enzimskom sustavu

Promatrajući sliku 2.11. može se primijetiti da na početku reakcije, uobičajeno tijekom prvih nekoliko sekundi ili minuta, promjena koncentracije supstrata ili produkta u vremenu je konstanta (linearna) i veća nego nakon tog perioda kada dolazi do pada. Glavni razlog je u tome što je na početku supstrat u suvišku u usporedbi s aktivnim mjestima na enzimu, te kako se on troši tako postaje limitirajući faktor. Koncentracija produkta na početku reakcije je minimalna te zato se može zanemariti utjecaj inhibicije produktom ako ona postoji. Osim toga enzim se može denaturirati tijekom reakcije. Radi tih efekata brzina enzimске reakcije, koja je definirana kao promjena koncentracije u vremenu [$\text{mmol dm}^{-3} \text{ min}^{-1}$], mjeri se na početku kada je ona približno konstanta. Ta brzina naziva se početna ($r_{s,0}$) i određuje se iz linearnog područja na grafu povlačeći tangentu na točku $t = 0$ prema jed. (2.2.)^{53,109}

$$r_{s,0} = \frac{\Delta c}{\Delta t} \quad (2.2.)$$

Dobivena $r_{s,0}$ je pri određenoj početnoj koncentraciji supstrata, $c_{s,0}$ [mmol dm^{-3}]. Eksperiment se može ponoviti tako da se ta koncentracija promijeni, a sve ostalo u sustavu ostane konstantno te tako se dobije niz parova vrijednosti r_s i c_s koji se mogu prikazati na grafu. Najopćenitiji primjer takve ovisnosti je prikazan na slici 2.12. te predstavlja enzimsku kinetiku.¹⁰⁹

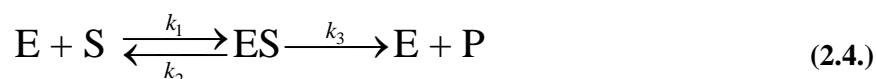


Slika 2.12. Primjer ovisnosti brzine enzimske reakcije o koncentraciji supstrata

Kretanje podataka na slici 2.12. opisuje se pravokutnom hiperbolom te naziva se Michaelis-Menteničin (M-M) model (jed. 2.3.).⁶⁰ Promatrajući sliku može se primijetiti da kada je c_s mali, njegovim povećanjem će se značajno povećati r_s , a kako idemo prema većim c_s tako se taj trend smanjuje.¹¹⁰ Razlog leži u tome što enzim ima maksimalan broj aktivnih mjesta koja se pri visokim koncentracijama supstrata zasite s njim. Brzina reakcije se pri tim uvjetima naziva maksimalna i označava se s V_m [$\text{mmol min}^{-1} \text{dm}^{-3}$], te dodatno povećanje koncentracije supstrata ima zanemariv utjecaj na njeno povećanje. Osim V_m drugi parametar M-M modela je Michaelisova konstanta K_m [mmol dm^{-3}]. Ona se definira kao koncentracija supstrata pri kojoj je brzina enzimska reakcije jednaka polovici V_m . K_m je indikator afiniteta supstrata prema enzimu. Pri niskoj vrijednosti K_m enzimu je potrebna manja količina supstrata da on bude zasićen s njim, tj. enzim ima visoki afinitet prema supstratu. Tada se V_m postiže pri niskim koncentracijama supstrata. Pri visokim K_m vrijedi suprotno.⁶⁰

$$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_{m,S} + c_S} \quad (2.3.)$$

Mehanistički M-M kinetika može se objasniti jed. 2.4. Mehanizam se bazira na nastajanju prijelaznog stanja (ES) između enzima i supstrata kinetikom za koju je karakteristična konstanta k_1 . ES se može raspasti nazad na enzim (E) i supstrat (S) što je opisano k_2 ili može dati produkt (P) kinetikom k_3 . Bez obzira dali nastane S ili P, enzim iz reakcije izlazi nepromijenjen.



Iz jed. 2.3. definiraju se parametri M-M kinetike prema jed. 2.5. i 2.6. Daljnjim izvodom iz tih jednadžbi može se dobiti osnovni M-M model (jed 2.3.). Prilikom izvoda u obzir je potrebno uzeti dvije pretpostavke. Prva je da na početku reakcije, kada se mjeri početna brzina, koncentracija produkta je zanemariva te se zato može zanemariti povratna reakcija u kojoj se produkt vraća u supstrat. Druga pretpostavka je da koncentracija supstrata je znatno veća od koncentracije enzima (c_E).

$$V_m = k_3 \cdot c_E \quad (2.5.)$$

$$K_m = \frac{k_1 + k_3}{k_2} \quad (2.6.)$$

K_m i V_m su karakteristični za određeni enzimski sustav. Posebno je zanimljiv K_m jer ako se promijeni supstrat, a enzim ostane isti K_m će imati drugačiju vrijednost. To znači da se provođenjem više eksperimenata s istim enzimom, a različitim supstratima dobiti različite vrijednosti parametara čijom usporedbom se dobiva uvid u to koji supstrat ima najveći afinitet prema enzimu. Prilikom toga uvjeti u sustavu kao što je temperatura i pH moraju biti konstanti jer oni utječu na K_m vrijednost. Korišteni enzim mora biti uzgojen u istom organizmu, jer i porijeklo enzima utječe na kinetiku. K_m vrijednosti se uobičajeno kreću u području niskih koncentracija.¹⁰⁹

M-M kinetika je osnovna enzimska kinetika, te na nju se mogu nadograđivati različiti efekti koji se mogu pojaviti u sustavu. Ako ima više supstrata ili kosupstrata za svaki je potrebno dodati član na M-M model koji se odnosi na pojedini supstrat i koji sadrži njegov K_m . U nekim

slučajevima povećanje koncentracije supstrata nakon određene vrijednosti ima inhibirajući učinak na enzim. Osim toga produkt koji nastaje može također inhibirati enzimsku aktivnost. Ako navedene inhibicije postoje, ugrađuju se u M-M model s pripadajućom konstantom inhibicije (K_i). Osnovni enzimski kinetički modeli mogu se pronaći u prilogu 1. Oni se mogu međusobno kombinirati, sve s ciljem da se što bolje opiše kretanje eksperimentalnih podataka.¹¹¹

2.6.3. Procjena kinetičkih parametara

Nakon što su dobiveni eksperimentalni podaci i kada je pretpostavljen model koji opisuje njihovo kretanje, može se ići u procjenu vrijednosti kinetičkih parametara koji se nalaze u tom modelu. Za to se uobičajeno koriste nelinearne regresijske numeričke i statističke *in silico* metode koje na temelju eksperimentalnih podataka i modela pretpostavljaju određenu vrijednost parametara te rješavaju model s njima. Simulacijom dobivene vrijednosti uspoređuju se s onima koje su dobivene eksperimentom. Na početku su odstupanja značajna, međutim proces se ponavlja prilikom čega vrijednost parametara se u svakom koraku mijenja tako da odstupanja između simuliranih i eksperimentalnih podataka bude što manja. Primjer metode, koja je korištena u ovom radu, opisana je u eksperimentalnom dijelu (poglavlje 3.3.). Alternativa navedenim metodama je korištenje grafičkih metoda u kojima se linearizira model i interpolacijom procjenjuju vrijednosti parametara. Međutim nedostatak je što one ne mogu dovoljno dobro procijeniti parametre kompleksnih više-supstratnih i inhibicijskih kinetika.¹¹²

Prednost kompjuterskih programa za procjenu parametara je i u tome što oni automatski mogu dati statističku analizu parametara. Parametre je potrebno statistički analizirati kako bi se dobio uvid u njihovu pouzdanost. Na primjer, mjera točnosti može biti standardna devijacija (σ) koja je dana kao \pm vrijednost uz iznos parametra ili kvadrat te vrijednosti koji se naziva varijanca (σ^2). Niske vrijednosti navedenih pokazatelja znače da podaci dobiveni simulacijom su blizu eksperimentalnih, tj. očekivanih. Ako su vrijednosti visoke, poželjno je prikupiti dodatne eksperimentalne podatke kako bi se prilikom procijene parametara dobile točnije vrijednosti.^{113,114} Osim statističke analize korisno je i procijeniti osjetljivost dobivenih parametara. Tako se dobije uvid u to koji parametri najviše utječu na rezultate modela, te jesu li neki suvišni. Što su dobiveni parametri pouzdaniji, to će validacija koja je sljedeći korak u razvoju matematičkog modela biti uspješnija.¹⁰¹

2.6.4. Validacija i upotreba modela

Validacija je korak u kojem se provode eksperimenti izvan uvjeta koji su korišteni za razvoj modela kako bi se on validirao, tj. kako bi se vidjelo u kojim uvjetima je model valjan. Provodi se niz eksperimenata pri različitim početnim uvjetima koncentracije biokatalizatora i supstrata te se prati promjena koncentracije u vremenu. Eksperimenti se uobičajeno provode u kotlastom reaktoru (KR). Dobiveni rezultati eksperimenta uspoređuju se s rezultatima simulacije u istim uvjetima te ako se oni slažu uz prihvatljivu pogrešku model je validiran. U suprotnom potrebno se je vratiti u neki od prethodnih koraka u razvoju modela te prikupiti nove podatke.¹¹² Nakon što je model validiran napokon se može upotrijebiti za pronalazak tih koncentracija supstrata i biokatalizatora u različitim reaktorima koje će omogućiti ispunjavanje zahtjeva koje za proces daje industrija (tablica 2.4.).¹¹⁵

2.6.5. Kotlasti reaktor

KR je najčešći tip reaktora za provođenje enzimskih testova u laboratorijskim uvjetima. Razlog leži u tome što je često potrebno provesti na stotine kratkih eksperimenata u malom volumenu reaktora. Jednostavni laboratorijski pribor kao što su plastična kiveta ili mala staklena bočica vjerno simulira KR. Za provođenje istih testova u cijevnom ili protočno-kotlastom reaktoru potrebno je posebna izvedba reaktora te oni se više koriste kada se želi uvećati proces.^{116,117}

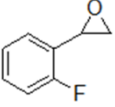
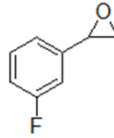
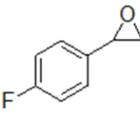
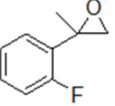
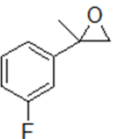
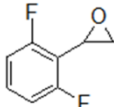
Kako bi se mogao izmodelirati proces u KR potrebno je uzeti u obzir pretpostavke koje pojednostavljaju matematički opis procesa. Prva pretpostavka je da je KR zatvoreni sustav te da tijekom reakcije ne dolazi do izmjene tvari s okolinom, tj. da je volumen reakcijske smjese u KR konstantan. Prilikom provođenja enzimskih testova potrebno je uzeti određeni volumen reakcijske smjese kako bi se uzorak mogao staviti na analizu. Potrebno je paziti da se ne uzme previše (maksimalno do 10% početnog volumena) kako bi pretpostavka zatvorenog sustava bila ispravna. Druga pretpostavka je idealno miješanje, što znači da su sastav reakcijske smjese i temperatura u svakoj točki reakcijskog volumena isti. Kako se provodi reakcija u KR tako dolazi do promijene veličina stanja u sustavu. Prema tome KR uvijek radi u nestacionarnom radu. Za modeliranje enzimskih reakcija važno je pratiti promjenu sastava reakcijske smjese koja se matematički opisuje modelom kotlastog reaktora prikazano na jed. 2.7.¹¹⁸

$$r_s = -\frac{dc_s}{dt} \quad (2.7.)$$

3. Eksperimentalni dio

Eksperimentalni dio ovog radu može se podijeliti na dvije cjeline. Prva se odnosi na karakterizaciju enzima. U njoj su provedeni analitički testovi kojima je određena koncentracija i aktivnost enzima. Ti testovi su općeniti i uobičajeno se provode nakon što je enzim uzgojen u nekom mikroorganizmu. Nakon toga provedeni su specifični eksperimenti u kojima je provedena kinetička karakterizacija različitih epoksida kao supstrata HHDH. Razvijene su metode za analitičko praćenje koncentracije epoksida na plinskoj kromatografiji (GC) i tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (HPLC). Dobiveni rezultati korišteni su za razvijanje kinetičkih modela uz pomoć programskog paketa Scientist. Ispitivani epoksidi mogu se pronaći u tablici 3.1. Ostale korištene kemikalije u ovom radu mogu se pronaći u prilogu 3.

Tablica 3.1. Epoksidi korišteni kao supstrati za evaluaciju HHDH

Naziv epoksida	Struktura	Pokrata
2-(2-fluorfenil)oksiran		Epox - 1
2-(3-fluorfenil)oksiran		Epox - 2
2-(4-fluorfenil)oksiran		Epox- 3
2-(2-fluorfenil)-2-metiloksiran		Epox - 4
2-(3-fluorfenil)-2-metiloksiran		Epox- 5
2-(2,6-difluorfenil)oksiran		Epox- 6

3.1. Karakterizacija enzima

3.1.1. Analiza enzima elektroforezom

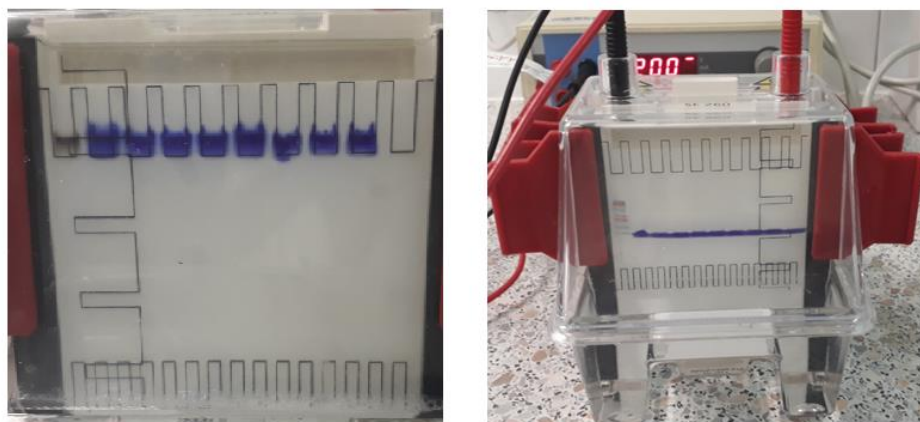
U ovom radu korišten je HheC iz genetski modificirane *Escherichia coli*. Kako bi nastalo više enzima, prilikom uzgoja je potaknuta njegova ekspresija. Za određivanje uspješnosti ekspresije korištena je gel elektroforeza. To je metoda za separaciju makromolekula, najčešće proteina, na temelju veličine i ponekad naboja molekule. Uzorak koji sadrži proteine nanese se na polimerni gel, te pod utjecajem električne struje dolazi do putovanja molekula kroz njega. Molekule koje se separiraju su negativno nabijene te putuju prema pozitivno nabijenoj anodi. Poroznost gela predstavlja prepreku na tom putu te molekule koje imaju manju molekulsku masu (M_w) mogu brže putovati kroz gel te se tako separiraju prema veličini. U ovom radu korištena je poliakrilamidna gel elektroforeza (PAGE) koja je pogodna za separaciju proteina s M_w između 5 – 2000 g mol⁻¹. Točan naziv procedure je SDS-PAGE jer se u njoj koristi detergent natrijev dodecil sulfat (SDS) za denaturaciju proteina. SDS razara strukturu proteina pretvarajući je u negativno nabijene linearne polipeptidne lance. Također se veže na lanac u omjeru dva SDS-a na jednu amino grupu. Kao posljedica toga svaka molekula proteina imat će isti omjer M_w i naboja te će doći do separacije jedino kao posljedica razlike u M_w .^{119,120}

SDS-PAGE postupak se može podijeliti u nekoliko koraka. Priprava poliakrilamidnog (PA) gela i uzoraka za analizu nakon čega slijedi separacija proteina elektroforezom i na kraju detekcija separiranih proteina.¹²⁰ PA gel se pripravlja radikalskom polimerizacijom unutar vertikalnog kalupa za gel između dva stakalca. Sastojci za pripravu gela su akrilamid kao polimerizirajući monomer, amonijev persulfat (APS) i tetrametiletildiamin (TEMED) kao inicijatori polimerizacije, SDS, voda i Tris pufer. Razlikujemo donji veći razdvajajući (RG) i gornji kraći koncentrirajući gel (SG). Prvo se nanosi RG odmah nakon početka polimerizacije ($V = 6.75 \text{ cm}^3$) nakon čega se pričekava oko pola sata da gel očvrstne nakon čega se SG nanosi istom procedurom ($V = 0.75 \text{ cm}^3$). Na vrh SG-a umetne se češljčić kako bi nastale jažice unutar kojih će se nanositi uzorci. Volumeni i udjeli pojedinih sastojaka za pripravu oba gela mogu se naći u prilogu 4. SG ima visoku poroznost i pripravljen je pri pH 6.8. pri kojemu proteini su negativno nabijeni. Radi toga molekule proteina mogu brzo putovati do granice između dva gela prilikom čega se koncentriraju (eng. *stacking*) u mali volumen, tzv. proteinsku vrpцу. RG se još naziva i separirajući gel jer se u njemu događa separacije molekula. Radi toga on ima malu poroznost i

pripravljen je pri puferu od pH 8.8. pri kojemu su proteini slabije negativno nabijeni. Radi takvih svojstava RG-a molekule će sporo putovati kroz njega i posljedično se moći bolje separirati.

Cilj pripreme uzorka za elektroforezu je denaturacija proteina. Radi toga sirovi enzimski ekstrakt pomiješan je s puferom za uzorke koji kako bi došlo do denaturacije sadrži SDS i 2-merkaptoetanol čija je uloga da reducira disulfidne mostove u terciarnoj enzimskoj strukturi. Također kako bi se pospješila denaturacija, uzorak se nakon miješanja treba zagrijavati 10 minuta u sušioniku na 95 °C. Prije i poslije sušenja uzorak je potrebno centrifugirati kako bi se separirali manji proteini od većih staničnih organela. Pufer za uzorke također sadrži 10% otopinu bromfenoplavo čija je uloga da oboji uzorak te da se tako može pratiti proces elektroforeze.

Nakon što je uzorak pripravljen, nanese se u jažicu u SG-u (slika 3.1. lijevo). Osim toga poželjno je u prvu jažicu staviti uzorak koji sadrži proteine s poznatim omjerom molekularne mase i naboja, tzv. page ruler. Potom prostor iznad gela s uzorkom i u komoru u kojoj se nalazi gel napuni se s runing puferom. Napokon, elektroforeza se može pokrenuti tako da se elektrode kalupa za gel priključe na izvor struje. Prvih 10 minuta provodi se pri naponu od 100 V, a nakon toga pri 200 V dok se crta s uzorcima ne spusti do dna gela. Po završetku procesa gel se oslobodi između stakalca te je spreman za detekciju separiranih proteina bojanjem s Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB). To se provodi u kadici koja je pričvršćena na tresilici u digestoru te traje 1 h. Po završetku bojanja provodi se obezbojenje gela prilikom čega se vizualiziraju proteinske vrpce. Za to se koristi 10 % octena kiselina te se obezbojenje također provodi 1 h. Volumeni i udjeli pojedinih sastojaka za pripremu korištenih pufera i otopine za obezbojenje mogu se pronaći u prilogu 5.

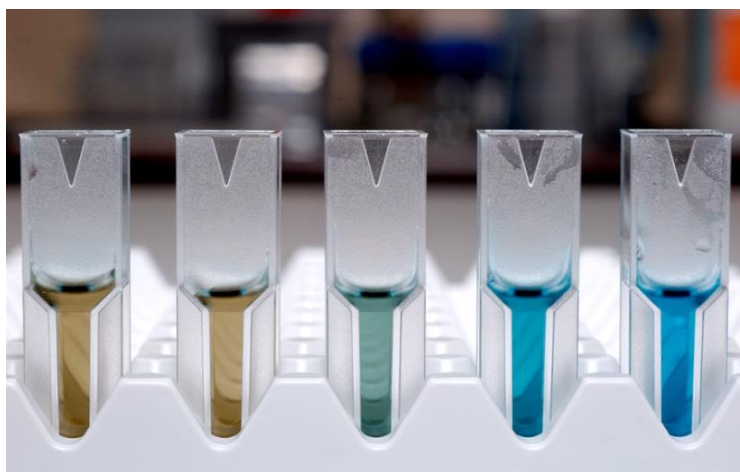


Slika 3.1. Lijevo: PA gel s nanesenim uzorcima neposredno prije početka elektroforeze;
Desno: kretanje uzoraka tijekom elektroforeze

3.1.2. Određivanje koncentracije enzima metodom po Bradfordu

Kako bi se mogla dodati željena količina enzima u neki reakcijski sustav potrebno je znati njegovu koncentraciju i aktivnost. Koncentracija proteina u sirovom enzimskom ekstraktu određena je metodom po Bradfordu koristeći spektrofotometar UV-1601 (Shimadzu, Japan) mjereći apsorbanciju pri 595 nm. Metoda se temelji na izravnom vezanju boje CBB u kiselom mediju hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama na amino grupe proteina. Kao posljedica dolazi do stabilizacije boje u anionskom obliku i do vidljive promjene obojenja iz smeđeg u plavu. Prilikom toga dolazi do pomaka maksimuma apsorbancije boje, od $\lambda_{\max} = 465$ do $\lambda_{\max} = 595$ nm. Boja se dodaje u suvišku te što je veća koncentracija enzima to će se više boje vezati na enzim te će posljedično uzorak biti intenzivnije plavo obojen (slika 3.2.). U metodi CBB se ne dodaje sam u uzorak enzima već se koristi u obliku Bradfordovog reagensa (prilog 6). Ova metoda je u širokoj upotrebi jer je priprema reagensa jednostavna, boja je stabilna i brzo se razvija te radi brzine i širokog opsega proporcionalnosti intenziteta obojenja i koncentracije proteina.¹²¹

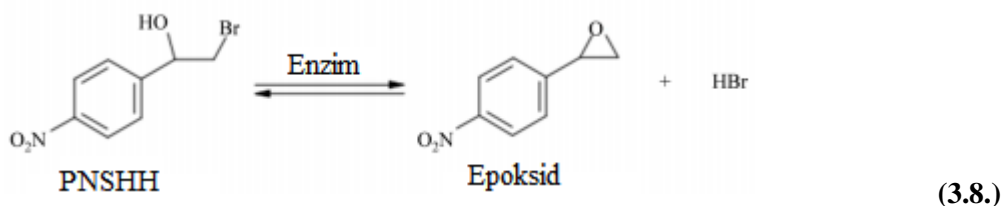
Da bi koncentraciju enzima mogli izravno odrediti mjereći apsorbanciju, potrebno je napraviti baždarni pravac koji pokazuje ovisnost apsorbancije o koncentraciji enzima. Za izradu baždarnog pravca korištene su standardne otopine albumina goveđeg seruma (BSA) koncentracija $1,0 \mu\text{g cm}^{-3}$; $2,5 \mu\text{g cm}^{-3}$; $5 \mu\text{g cm}^{-3}$ i $7,0 \mu\text{g cm}^{-3}$. Postupak određivanja koncentracije proteina je sljedeći: $0,2 \text{ cm}^3$ reagensu doda se u alikvot od $0,8 \text{ cm}^3$ uzorka proteina te se pomiješa 5 s na miješalici i ostavi da inkubira na sobnoj temperaturi 5 minuta. Nakon toga na spektrofotometru očitana je apsorbancija. Napravljene su 3 paralelne probe za svaki uzorak te je postupak bio isti za otopine BSA i sirovi enzimski ekstrakt.



Slika 3.2. Metoda po Bradfordu

3.1.3. Određivanje aktivnosti enzima spektrofotometrijskim testom s PNSHH

Aktivnost enzima određena je mjereći promjenu apsorbancije u vremenu u reakcijskom sustavu prikazanom jed. 3.1., na spektrofotometru UV-1800 (Shimadzu, Japan) pri valnoj duljini, $\lambda = 310$ nm. Podaci su obrađeni uz program UV Probe (Shimadzu, Japan). U sustavu enzim katalizira reakciju u kojoj halohidrin 1-(p-nitrofenil)-2-bromoetanol (PNSHH) prelazi u epoksid para-nitrostiren oksid. Kako epoksid nastaje tako dolazi do povećanja apsorbancije pri $\lambda = 310$ nm, te je ona proporcionalna koncentraciji enzima.¹²²



Za test je potrebno pripremiti temeljnu otopinu (TO) otapanjem 1,23 μg PNSHH u 500 μL dimetil sulfoksida (DMSO). U kvarcnu kivetu dodano je 990 μL Tris- SO_4 pufera i 5 μL TO PNSHH-a. Potrebno je intenzivno miješati kako bi DMSO ostao dispergirani. PNSHH nije stabilan u vodenom mediju te se zato ovaj korak provodio neposredno prije korištenja. Napokon dodavanjem 5 μL enzima u sustav reakcija kreće te je zato potrebno odmah kivetu staviti u spektrofotometar i pokrenuti mjerenje na računalnom programu. Izmjerena promjena apsorbancije u vremenu ($\Delta A/\Delta t$) služi kako bi se izračunala volumna aktivnost ($V.A.$) enzima prema jednadžbi 3.2.:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (3.9.)$$

Volumen uzorka u kivetu (V_r) je bio 1 cm^3 , ε je ekstinkcijski koeficijent PNSHH te iznosi 4,289 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$, širina kvarcne kivete (d) je 1 cm, V_E je volumen dodanog enzima.

Mjerna jedinica $V.A.$ je U cm^{-3} . U (eng. units) predstavlja promjenu količine supstrata u vremenu ($\mu\text{mol min}^{-1}$) te je mjerna jedinica za enzimsku aktivnost. Kako bi se mogle uspoređivati aktivnosti različitih enzima poželjno je koristiti specifičnu aktivnost ($S.A.$) tako da se $V.A.$ podijeli s masenom koncentracijom enzima (γ) koja se u ovom radu dobila metodom po Bradfordu. Mjerna jedinica $S.A.$ je U mg^{-1} .

3.2. Kinetička ispitivanja

3.2.1. Određivanje stabilnosti epoksida

Reakcijski medij u ovom radu je 500 mM Tris-SO₄ pri pH 7.5. Zato što je to vodeni sustav, epoksidi su nestabilni u njemu te dolazi do reakcije hidrolize. Kako bi se mogao dobiti ispravan kinetički model potrebno je odrediti koliki je utjecaj hidrolize na potrošnju epoksida, a to se postiže određivanjem brzine reakcije hidrolize.

Reakcijski sustav (slika 3.3.) se sastoji od staklene bočice koja služi kao kotlasti reaktor, magneta i magnetske miješalice pri 900 okretaja u minuti za postizanje homogenih uvjeta u sustavu. Za uzimanje uzoraka iz reaktora koristila se je igla i šprice kako bi se smanjio gubitak lako hlapljivog epoksida.



Slika 3.3. Reakcijski sustav za određivanje stabilnosti epoksida

Postupak određivanja stabilnosti epoksida je opisan u nastavku teksta. Prvo je potrebno pripremiti temeljnu otopinu epoksida ($c_{\text{TO,epox,GC}} = 5 \text{ M}$, $c_{\text{TO,epox,HPLC}} = 0.5 \text{ M}$) tako da se određena masa izvaže na analitičkoj vagi i otopi u dimetil sulfoksidu (DMSO) jer epoksid nije topljiv u vodenom mediju koji se koristi u sustavu. Iz temeljne otopine uzet je alikvot za pripremu otopine željene početne koncentracije za reakciju, te je dodana određena količina DMSO-a kako bi se osigurao njegov udio u sustavu od 5 %. Dodatkom pufera u reaktor smatra se da reakcija raspada epoksida kreće. Tijekom odvijanja reakcije periodično se uz pomoć igle i šprice uzima 20-30 μl uzorka iz reaktora, koji se prebaci u kivetu iz koje se može točno uzeti 10 μl pomoću polu-

automatske pipete. Uzorak je potrebno razrijediti tako da se uzetih 10 μl prebaci u kivetu s puferom čime se postiže potrebno razrjeđenje kako bi epoksid mogao biti detektiran s GC-om ili HPLC-om. U tom trenutku radi razrjeđivanja smatra se da je reakcija zaustavljena i zapiše se vrijeme od početka reakcije. Uzorak se homogenizira par sekundi na miješalici i iz njega se uzima 10 μl koji se prebaci u kivetu s 500 μl metil terc-butil etera (MTBE). Svrha ovog koraka je da se epoksid ekstrahira iz vodene u organsku fazu kako bi bio spreman za detekciju. Naime voda i drugi sastojci reakcijske smjese (azidi) mogu smetati i oštetiti analitičku opremu korištenu u ovom radu te ih je zato potrebno ukloniti. Ekstrakcija se provodi homogenizacijom od 20 sekundi te nakon toga se cijeli volumen iz kivete uz pomoć Pasteurove pipete i kapaljke prebaci kroz novu Pasteurovu pipetu koja sadrži higroskopni Na_2SO_4 u staklenu vialu. Nakon toga uzorak koji sadrži DMSO, MTBE, epoksid i produkte raspada je spreman za analizu. Tijekom reakcije uzima se 6 uzoraka jedan za drugim te se uzorci čuvaju na ledu do trenutka kada se stave na analizu. Ukupna količina uzetih uzoraka nije prešla 10 % volumena reakcijske smjese. Prije analize svakog epoksida potrebno je napraviti njegov baždarni pravac u rasponu koncentracija od 0.1 – 10 mM. Eksperimenti su ponovljeni pri različitim koncentracijama koje se mogu pronaći u tablici 3.2.

Tablica 3.2. Početni sastav reakcijskog sustava za određivanja stabilnosti epoksida

Ekspiriment*	$C_{\text{epox,GC}}$ [mmol dm ⁻³]	$V_{\text{TO,epox,GC}}$ [μL]	$V_{\text{DMSO,GC}}$ [μL]**	$C_{\text{epox,HPLC}}$ [mmol dm ⁻³]	$V_{\text{TO,epox,HPLC}}$ [μL]	$V_{\text{DMSO,HPLC}}$ [μL]**
1	10	1,2	28,8	1	1	19
2	20	2,4	27,6	2	2	18
3	30	3,6	26,4	5	5	15
4	50	6,0	24,0	10	10	10
5	75	9,0	21,0	15	15	5
6	100	12,0	18,0	20	20	0
7	125	15,0	15,0			
8	150	18,0	12,0			
9	175	21,0	9,0			
10	200	24,0	6,0			

* Za sve epoksidge provedeno je do 10 eksperimenata, ukupni volumen reakcijskog sustava je bio 600 μL za analize na GC-u te 500 μL za analize na HPLC-u, $V_{\text{pufer,GC}} = 570 \mu\text{L}$, $V_{\text{pufer,HPLC}} = 570 \mu\text{L}$

** Dodani V_{DMSO} odgovara udjelu DMSO-a u sustavu od 5 %

3.2.2. Ispitivanje kinetike u enzimatskoj reakciji epoksida s azidima

Protokol za određivanje kinetike reakcije prikazane u uvodu ovog rada sličan je opisanom protokolu za određivanje stabilnosti epoksida u prošlom poglavlju. Razlika proizlazi iz toga što se reakcija provodi s azidima ($c_{\text{TO,azid}} = 0.3 \text{ M}$) koji su toksični i lako hlapivi te se radi toga reakcija je provodila u digestoru (slika 3.4.). Korištena je metoda početnih brzina te su radi toga uzrokovanja provedena pri konverziji supstrata ispod 10 %, tj jedno za drugim nakon dodatka enzima. Kao KR služila je Eppendorf kiveta. Za svih 6 reakcija varirane su koncentracije epoksida (tablica 3.4.) dok za EPOX – 3 varirani su i azidi (1 - 50 mM) pri $c_{\text{epox-3}} = 10 \text{ mM}$.



Slika 3.4. Ispitivanje kinetike s azidima u digestoru

Tablica 3.4. Početni sastav reakcijskog sustava za ispitivanje kinetike s azidima (GC analiza)

Eksperiment*,**	$c_{\text{epox}} [\text{mmol dm}^{-3}]$	$V_{\text{TO,epox}} [\mu\text{L}]$	$V_{\text{DMSO}} [\mu\text{L}]$
1	1	1	19
2	2	2	18
3	3	3	17
4	4	4	16
5	5	5	15
6	10	10	10
7	20	20	0

* Za sve eksperimente ovi su uvjeti konstanti: volumen reakcijskih sustava je 500 μL , $V_{\text{puffer}} = 438.3 \mu\text{L}$, $V_{\text{TO,azid}} = 16.7 \mu\text{L}$ što odgovara $c_{\text{azid}} = 10 \text{ mM}$, 5 % DMSO

** Za epox – 3 ispitivanja su provedena pri $c_{\text{epox-3}}$ do 200 mM

3.2.3. Analiza uzoraka plinskom kromatografijom

Uzorci su analizirani plinskom kromatografijom GC-2014 (Shimadzu, Japan) prikazanoj na slici 3.5. Za stacionarnu fazu korištena je HP-5 kapilarna kolona (Agilent Technologies, SAD) čije su karakteristike prikazane u tablici 3.5. Kao mobilna faza korišten je smjesa dušika. Plina se nalazi se u visokotlačnom spremniku (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska). Injektiranje uzoraka u kolonu provodilo se automatski koristeći uređaj AOC-20i (Shimadzu, Japan) pri sljedećim uvjetima: $T_{\text{injektor}} = 250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $p = 37,8 \text{ kPa}$ i $q = 13,8 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Kako bi se uklonile potencijalne nečistoće igla za injektiranje prije svake analize automatski je bila isprana 5 puta s 1 μL MTBE, 3 puta s uzorkom te 5 puta s MTBE nakon injektiranja. Nakon injektiranja uzorci su putovali kroz kolonu koja je 2 minute bila na $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ nakon čega temperature se povisila do $140 \text{ }^{\circ}\text{C}$ brzinom od $15 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Ukupno trajanje jedne analize je 6.33 min. Za detekciju spojeva po izlasku iz kolone koristio se plameno ionizacijski detektor u kojem su uzorci spaljivani pri temperaturi od $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ u smjesi sintetskog zraka i vodika generiranog uređajem Gas Generator 9150 (Parker Hannifin, SAD) uzimajući sintetski zrak iz spremnika. Nakon svakih 5 analiziranih uzoraka potrebno ju je spaljivati pri $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 25 – 30 min dok se bazna linija ne ustabilji kako bi se uklonile nečistoće zaostale u koloni. U prilogu 7 može se naći primjer kromatograma za epox – 3 te pripadajuća vremena zadržavanja pojedinih komponenti. Dobiveni podaci obrađivani su programom GC Solutions (Shimadzu, Japan).



Slika 3.5. GC sustav: 1 – spremnici s plinovima, 2 – generator vodika, 3 – sustav za automatsko injektiranje, 4 – plinski kromatograf, 5 – računalna podrška

Tablica 3.4. GC kolona korištena u radu

Karakteristika	HP-5
Literaturni izvor	https://www.agilent.com
Tip kolone	kiralna
Materijal	(5%-fenil)-metilpolisiloksan
Duljina, m	30
Unutarnji promjer, mm	0,32
Debljina filma, μm	0,25
Maksimalna temperatura, $^{\circ}\text{C}$	250

3.2.4. Analiza uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Osim GC-a uzorci su analizirani i HPLC-om Kao stacionarna faza korištena je Kinetex™ C18 kolona (Phenomenex, SAD) čije se karakteristike mogu pronaći u tablici 3.5. Pokretnu fazu ja činila smjesa metanola i ultra čiste vode koja je izokratno eluirala kolonu pri konstantnom protoku oba otapala od $0.5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$. Ukupno trajanje metode je 12 minuta te uzroci po izlasku iz kolone su detektirani sa spektrometrom pri valnoj duljini od 254 nm. Volumen injektiranog uzorka po analizi je bio $5 \mu\text{L}$. Konstantna temperatura u sustavu od $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ se postigla s pećicom. U prilogu 8 može se naći primjer kromatograma za epox – 3 te pripadajuća vremena zadržavanja pojedinih komponenti. Podaci su obrađeni u programu HPLC Solutions (Shimadzu, Japan).



Slika 3.6. HPLC sustav korišten u radu

Tablica 3.5. HPLC kolona korištena u radu

Naziv	Kintex™ C18
Literaturni izvor	https://www.phenomenex.com/Kinetex
Aktivna skupina stacionarne faze	C18 (ugljik)
Endcapping	tetrametilsilan
Duljina, mm	250
Unutarnji promjer, mm	4,6
Veličina čestica, μm	5
Veličina pora (Å)	100

3.3. Obrada podataka u programskom paketu Scientist

Dobiveni rezultati kinetičkih ispitivanja metodom početnih brzina obrađivani su nelinearnom regresijom u programskom paketu Scientist.¹²³ Korištene su metoda najmanjih kvadrata i simpleks metoda kako bi se procijenila vrijednost parametara kinetičkih modela iz eksperimentalnih podataka i pretpostavljenog kinetičkog modela. Metoda najmanjih kvadrata je statistička metoda kojom se parametri procjenjuju tako da se iterativno minimizira odstupanje zbroja kvadratnih devijacija između eksperimentalnih i procijenjenih vrijednosti. Prije nego li se metoda može koristiti potrebno je proizvoljno staviti početnu vrijednost parametara. Ako je ta vrijednost blizu ispravne, metodom najmanjih kvadrata moći će se dobro procijeniti konačna vrijednost parametara.¹²⁴ Ako nije potrebno je koristiti Simpleks metodu kojom se može procijeniti približna vrijednost parametara. Simpleks metoda je numerička metoda koja koristi algoritam za pronalazak minimuma funkcijske gubitka koja predstavlja razliku između procijenjenih i pravih vrijednosti.¹²⁵

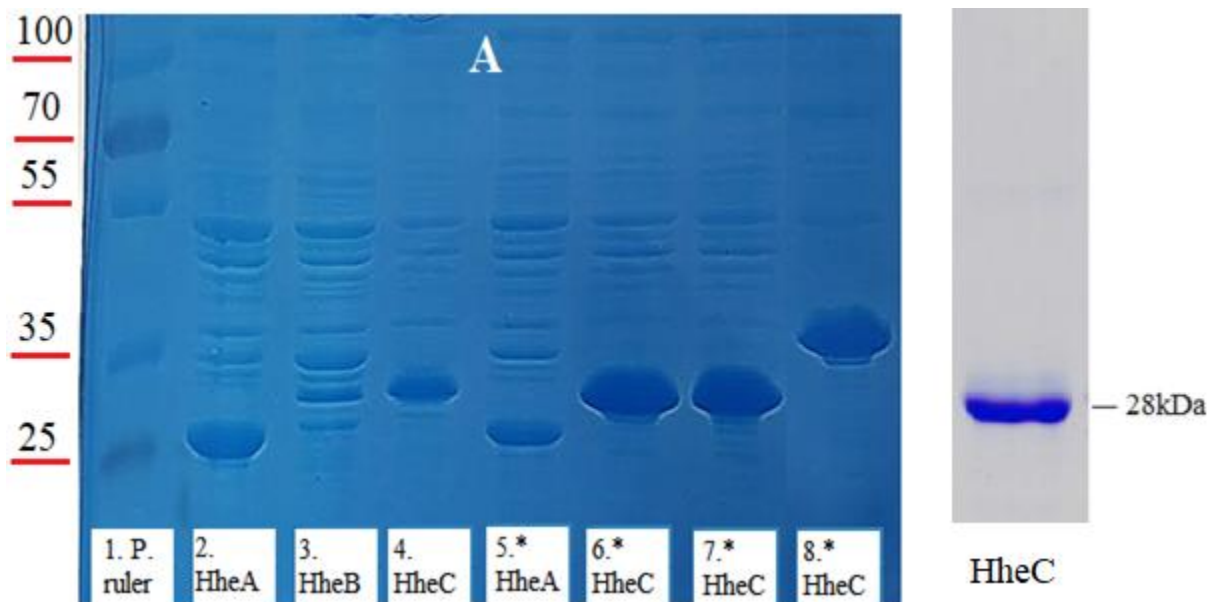
4. Rezultati i rasprava

4.1. Karakterizacija enzima

4.1.1. Određivanje uspješnosti ekspresije enzima elektroforezom

Rezultati elektroforeze mogu se vidjeti na slici 4.1. A. Na njoj svaka proteinska vrpca predstavlja nakupinu makromolekula određene M_w koja se može otprilike odrediti iz *Page ruler*a pod brojem 1. Uz njega se nalaze oznake za M_w iskazanu u kDa. Ispitivano je 7 različitih HHDH uzgojenih u *E. coli* te HheC pod brojem 4 se koristio za reakcije u ovom radu. Enzimi s oznakom * su modificirani proteinskim inženjerstvom, a bez oznake su divlji tip. Radi usporedbe, slika 4.2. B prikazuje rezultat elektroforeze za pročišćenu HheC iz literature.¹²⁶

S obzirom na to da enzimi od 2-8 nisu bili pročišćeni, moguće je vidjeti niz proteinskih vrpca različite M_w . Razlog tomu je što se nakon uzgoja HHDH stanica *E. coli* razbila i dobio se tzv. sirovi enzimski ekstrakt koji sadrži stanične organele, proteine te druge makromolekule koje se također mogu separirati elektroforezom. Najintenzivnija vrpca predstavlja HHDH te za HheC ona se nalazi oko 30 kDa što odgovara literaturnim vrijednostima od 28 – 30.^{127,128} Genetski modificirane HheC (6-8) imaju izraženiju proteinsku vrpcu za enzim što znači ga je prilikom uzgoja nastalo više. HheC pod brojem 8 ima proteinsku vrpcu oko 35 kDa. Veća M_w je posljedica utjecaja proteinskog inženjerstva na promjenu strukture enzima.



Slika 4.1. A) Rezultati elektroforeze za ispitivane enzime. B) primjer rezultata iz literature¹²⁶

Iz rezultata elektroforeze također se može vidjeti da većina prisutnih makromolekula ima M_w veću od HHDH. Poznavanje M_w komponenti u sirovom enzimskom ekstraktu je dobar početak za postavljanje protokola za pročišćavanje enzima. Čisti enzim pokazuje bolja katalitička svojstva, međutim separacijske tehnike kojima se on dobiva su skupe. Zato je dobro već u samom startu prilikom uzgoja dobiti veću količinu enzima, što se postiže proteinskim inženjerstvom. Važne separacijske tehnike za pročišćavanje enzima su gel filtracija, ionska i kromatografija isključenjem.^{126,129–131}

U rezultatima iz ovog rada (slika 4.1. A) može se primijetiti lošije obezbojenje gela i posljedično slabije vizualiziranje proteinskih vrpca nego u literaturnom (slika 4.2. B). Ako se želi poboljšati vizualiziranje potrebno je obezbojiti gel dulje od 1 h te posljedično češće mijenjati otopinu za obezbojavanje. Protokol u literaturi ističe da bi se gel trebao obezbojiti barem 1 dan u 7 % octenoj kiselini. Međutim, potrebno je uzeti u obzir stabilnost gela, jer neispravan protokol može uništiti gel.¹²⁰

4.1.2. Koncentracija i aktivnost enzima

Masena koncentracija enzima (y_e) je određena metodom po Bradfordu, te u sirovom enzimskom ekstraktu iznosi 11,128 mg cm⁻³. Izračunata je iz baždarnog pravca (prilog 9) uzimajući u obzir razrjeđenje od 2000 puta. Volumna aktivnost HheC određena PNSHH testom iznosi 10,352 U cm⁻³. Iz nje i y_e slijedi da specifična aktivnost iznosi 0,930 U mg⁻¹. Za usporedbu u tablici 4.1. u primjerima 1-3 mogu se vidjeti slične vrijednosti za aktivnost HheC. Iako su one određene istim PNSHH testom, do razlika dolazi kao posljedica drugog uzgoja. Primjeri 4 i 5 su testovi u kojima su korišteni drugačiji supstrati nego PNSHH. Očekivano je da su u njima aktivnosti različite jer enzimi pokazuju drugačiju aktivnost prema različitim supstratima. Što je aktivnost viša to enzim ima bolja katalitička svojstva. Ako želimo usporediti aktivnosti različitih enzima potrebno je provesti testove s istim supstratom.^{134,135}

Tablica 4.1. Aktivnosti divljeg tipa HheC preuzete iz literature

Primjer	V.A. [U cm ⁻³]	S.A. [U mg ⁻¹]	Supstrat u testu	Literatura
1	13,20	-	PNSHH	ref. 128
2	10,20	1,889	PNSHH	ref. 132
3	9,44	0,729	PNSHH	ref. 133
4	-	6,4	5 mM 1,3-dikloro-2-propanol	ref. 134
5	-	3,6	5 mM 1,2-epoksiheksan	ref. 135

4.2. Ispitivanje stabilnosti epoksida

Kako bi se mogla odrediti kinetika enzimske reakcije potrebno je ispitati ostale utjecaje na potrošnju supstrata, tj. epoksida. Kada se oni znaju mogu se uključiti u matematičko modeliranje, ili podesiti reakcijski uvjeti tako da se smanje. Za epoksidge karakteristična je hidroliza u vodenom mediju prilikom čega dolazi do nastajanja diola i ketona mehanizmom pregradnje karbokationa.¹³⁶ Također oni su lako hlapivi spojevi što se može primijetiti po intenzivnom mirisu, te zato prilikom reakcija potrebno je smanjiti gubitke radi hlapljenja. Radi navedenih utjecaja ispitivana je kinetika stabilnosti epoksida (r_{SE}) te rezultati konstanti (k_{SE}) mogu se pronaći u tablici 4.1 a grafički prikaz rezultata na slikama 4.2 i 4.3. Utvrđeno je da se radi o kinetici 1. stupnja prikazanom jed. 4.1. Ispitivanja su provedena u vodenom puferu pripremljenom s ultračistom vodom i radi toga moguće je zanemariti ostale utjecaje na stabilnost epoksida.

$$r_{SE} = k_{SE} \cdot c_{epox} \quad (4.10.)$$

Tablica 4.1. Rezultati ispitivanja stabilnosti epoksida

Epoksid	$t_{R,GC}$ [min]	$k_{SE,GC}$ [min ⁻¹]	SE_{GC} [% h ⁻¹]	$t_{R,HPLC}$ [min]	$k_{SE,HPLC}$ [min ⁻¹]	SE_{HPLC} [% h ⁻¹]
Epox – 1	4,608	$k_1 = 0,0285$ $R^2 = 0,9779$	181	8,853	$k_1 = 0,0040$ $R^2 = 0,9996$	25
Epox – 2	4,809	$k_2 = 0,0103$ $R^2 = 0,9801$	69	8,310	$k_2 = 0,0057$ $R^2 = 0,9935$	33
Epox – 3	4,846	$k_3 = 0,0112$ $R^2 = 0,9407$	152	10,196	$k_3 = 0,0028$ $R^2 = 0,9449$	24
Epox – 4	4,601	$k_4 = 0,0245$ $R^2 = 0,9613$	205	11,510	$k_4 = 0,0059$ $R^2 = 0,9899$	36
Epox – 5	5,100	$k_5 = 0,0114$ $R^2 = 0,9240$	79	11,840	$k_5 = 0,0047$ $R^2 = 0,9984$	26
Epox – 6	5,013	$k_6 = 0,0558$ $R^2 = 0,9849$	91	7,457	$k_6 = 0,0028$ $R^2 = 0,9984$	15

U literaturi se mogu pronaći eksperimenti za određivanje stabilnosti epoksida (SE), kojima se ispituje hidroliza u vodenom mediju te se rezultati iskazuju kao postotak raspadnute kemikalije po satu (% h⁻¹). Eksperimenti se uobičajeno provode nekoliko sati prilikom čega se prati promjena koncentracije kemikalije pri nekoj početnoj koncentraciji u reakcijskom mediju. Da bi se rezultati

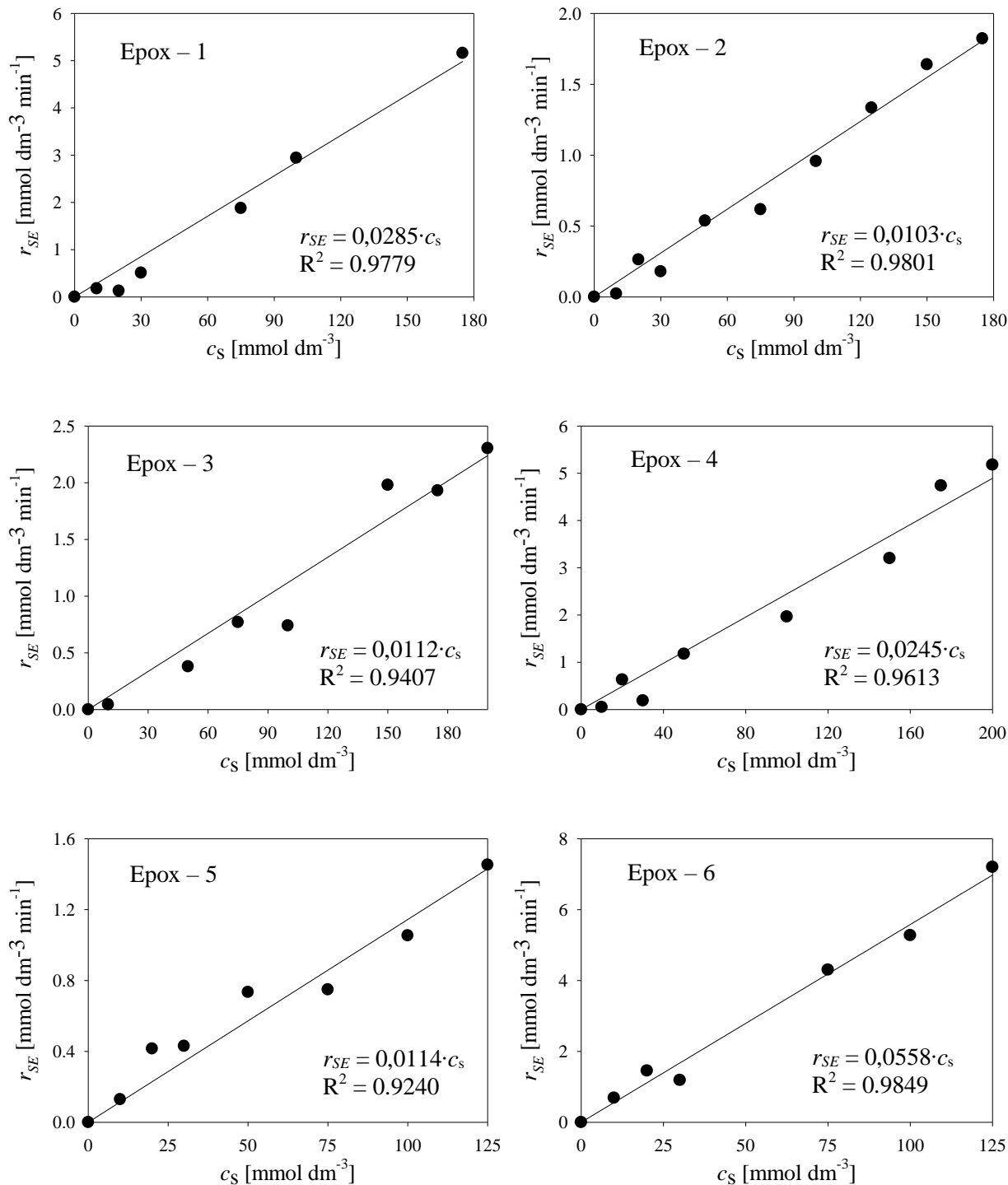
iz ovog rada mogli usporediti s literaturnim potrebno je koristiti jed. 4.2. da se iz kinetičkih mjerenja kojima je određena k_{SE} izračuna SE (% h⁻¹). Jed. 4.2. predstavlja konverziju epoksida po vremenu. c_{epox,t_1} je koncentracija epoksida u vremenu t_1 nakon početka reakcije, a c_{epox,t_2} koncentracija u vremenu t_2 uzetog što bliže kraju eksperimenta. Zadnji član se odnosi na korekciju vremena i pretvorbu minuta u sate. Za izračunavanje SE uzete su c_{epox} iz onih kinetičkih mjerenja čiji par vrijednosti r_{SE} , c_{epox} (slika 4.2 i 4.3.) pada ili je što bliže pravcu kojim je određen k_{SE} .

$$SE(\% / h) = \frac{c_{epox,t_1} - c_{epox,t_2}}{c_{epox,t_1}} \cdot 100 \cdot \frac{60}{t_2 - t_1} \quad (4.11.)$$

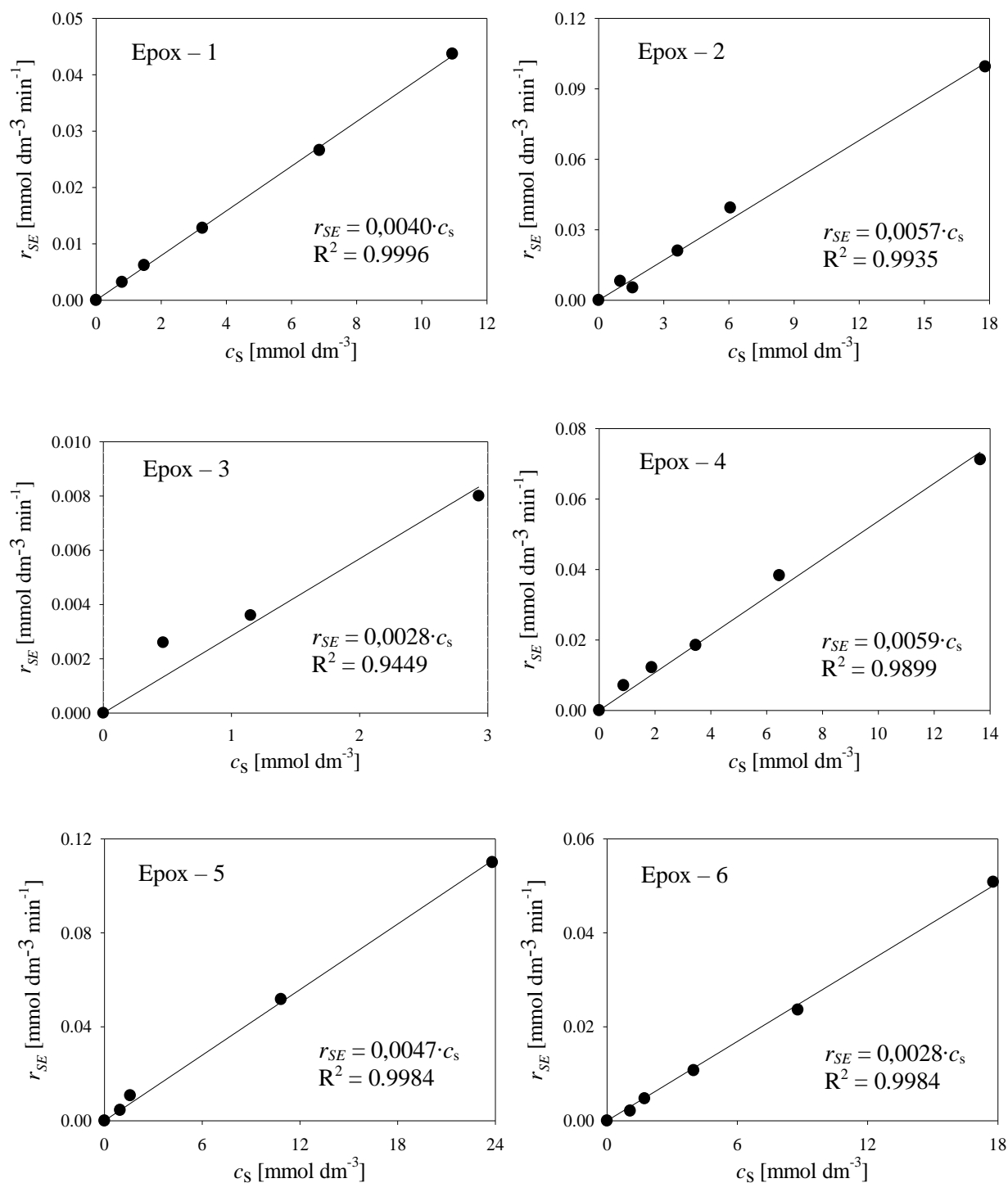
U tablici 4.1. može se vidjeti da su k_{SE} i SE dobiveni na GC-u 2-20 puta viši nego na HPLC-u. SE_{GC} kreće se oko 70 do 200 % h⁻¹ pri koncentracijama do 200 mM, a SE_{HPLC} između 15 do 36 % h⁻¹ pri koncentracijama do 20 mM. Vrijednosti iznad 100 % h⁻¹ dobivene su ekstrapolacijom, te ukazuju na to da bi se teoretski sav epoksid trebao raspasti prije 1 h. Postavlja se pitanje koji su rezultati realniji? SE iz ovog rada ne može se direktno usporediti s literaturnim jer su eksperiment i koncentracije drugačiji. Međutim, u literaturi nije pronađena SE koja je viša od 15 % h⁻¹ pri koncentracijama do 50 mM.¹³⁷ Prema tome rezultati na HPLC-u moraju biti realniji. To najbolje pokazuje rad u kojemu je ispitivana stabilnost istih epoksida kao u ovom radu, samo pri koncentracijama od 2 mM te je određena SE od 5-10 % ovisno o epoksidu.¹³²

Postoji više objašnjenja zašto analitika na GC-u ukazuje na nisku stabilnost epoksida. Uzorci prije nego li se analiziraju na GC-u nalaze se u otvorenom autosampleru na sobnoj temperaturi te se uslijed visoke hlapivosti mogu adsorbirati u dijelovima uređaja te može doći do značajne promjene koncentracije epoksida u uzorku. Također to je izraženije pri visokim početnim koncentracijama, a ispitivanja na GC-u su provedena pri koncentracijama epoksida do 200 mM. Epoksidi su slabo topivi u vodenom mediju te kako je u sustavu samo 5 % organskog otapala (DMSO) dio epoksida mogao je ostati ne otopljen i kao takav ne u potpunosti prijeći u organsku fazu prilikom ekstrakcije s MTBE. Za razliku od GC-a, prilikom analiza na HPLC-u autosampler se nalazio u hladnom i zatvorenom prostoru. Također, ispitivanja su provedena pri nižim koncentracijama epoksida (do 20 mM) te prema tome gubitak uslijed hlapljenja može biti manji, a topljivost veća. Radi takvih eksperimentalnih uvjeta i načina analize SE_{HPLC} su bliže literaturnim i niži nego isti na GC-u. Može se zaključiti da je kinetička ispitivanja epox 1 – 6 potrebno provoditi

pri c_{epox} do 20 mM i ako je moguće što više smanjiti gubitak uslijed hlapljenja. Ako se želi ići na više koncentracije potrebno je povećati topljivost povećanjem udjela organskog otapala u sustavu.



Slika 4.2. Rezultati određivanja stabilnosti epoksida pri koncentracijama epoksida do 200 mM (c_{epox} praćene GC-om)



Slika 4.3. Rezultati određivanja stabilnosti epoksida pri koncentracijama epoksida do 20 mM (c_{epox} praćene HPLC-om)

4.3. Ispitivanje utjecaja epoksida na kinetiku enzimске reakcije

Metodom početnih brzina ispitivan je utjecaj c_{epox} na kinetiku enzimске reakcije. Za sve epoksidge utvrđena je M-M kinetika osim za epox – 3 koji pokazuje linearnu ovisnost $S.A.$ o c_{epox} . Rezultati procijenjenih parametara se nalaze u tablici 4.2. Također u njoj se nalaze i rezultati osjetljivosti parametara dobiveni Scientistom te iskazani preko σ . Na slici 4.5. mogu se pronaći grafički rezultati eksperimenata i provedenih simulacija s procijenjenim parametrima.

Drugačija kinetika za epox – 3, u usporedbi s ostalim ispitivanim epoksidima, može se objasniti time što su za njega eksperimenti provedeni pri visokim koncentracijama epoksidge do 200 mM. U eksperimentima ispitivanja stabilnosti epoksidge utvrđeno je da epoksid nije u potpunosti otopljen pri koncentracijama epoksidge višim od 20 mM. Prema tome su slaba topljivost i manjak afiniteta enzima prema supstratu utjecali i na to da se je prilikom određivanja enzimске kinetike za epox – 3 dobila kinetika prvog reda karakterizirana s parametrom $k = 0.0664 \text{ min}^{-1}$. Za sve ostale epoksidge eksperimenti su provedeni do 20 mM kako bi epoksid bio u potpunosti otopljen.

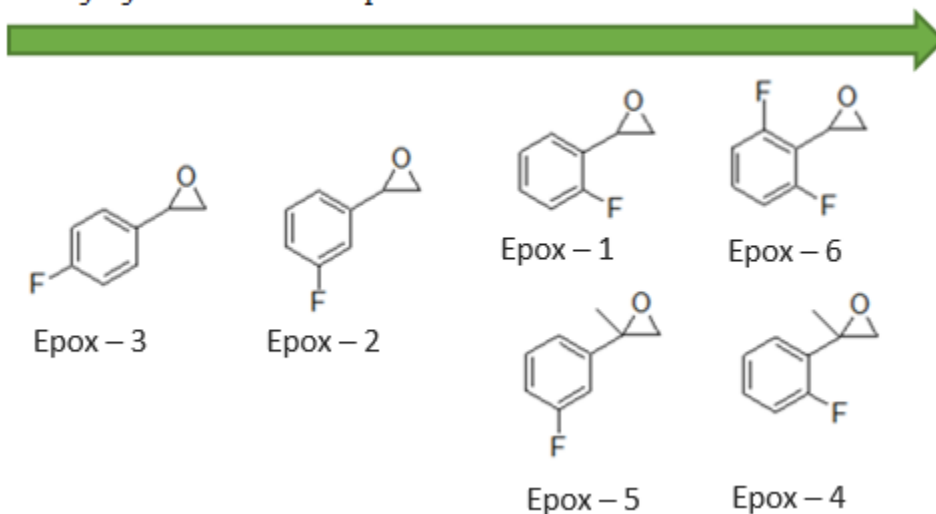
Tablica 4.2. Vrijednosti procijenjenih parametara za M-M kinetiku

Epoksid	V_m [U mg ⁻¹]	σ ±	σ %	K_m [mM]	σ ±	σ %
Epox – 1	0,877	0,230	26,2	7,572	4,710	62,2
Epox – 2	0,420	0,087	20,7	6,175	2,436	39,4
Epox – 4	0,165	0,068	41,2	3,699	3,004	81,2
Epox – 5	0,287	0,025	8,7	6,769	1,305	19,3
Epox – 6	0,263	0,031	11,7	7,724	1,471	19,0

Uvjeti određivanja kinetike su bili isti bez obzira na epoksid. Prema tome vrijednosti određenih parametara u tablici 4.2. trebali bi se razlikovati jedino kao posljedica razlike u strukturi i svojstvima između epoksidge. Usporedbom dobivenih parametara možemo zaključiti o tome koji epoksid ima najveći afinitet prema korištenoj HheC, međutim prilikom toga moramo uzeti u obzir i nesigurnost u njihovu vrijednost iskazanu preko σ . Epox – 4 ima najmanju vrijednost K_m -a i prema tome najveći afinitet te ga potom slijede epox 2, 5, 1 i 6 s najmanjim afinitetom. Međutim, σ vrijednost za epox – 4 je znatno veća za oba procijenjena parametra nego kod drugih epoksidge i prema tome najmanja je sigurnost u njihovu vrijednost. Ako zanemarimo epox – 4 ostali epoksidge

pokazuju sličnu vrijednost K_m -a između 6 – 8 mM. Tada kao najbolji supstrat se pokazao epox – 2. Strukturno on se razlikuje od drugih epoksida po tome što ima jedan fluorov atom na *meta* položaju. Epox – 1 ima fluor na *orto* položaju te pokazuje manji afinitet nego epox – 2 dok epox – 3 ima fluor na *para* položaju te se iz rezultata ne može zaključiti o njegovom afinitetu. Međutim Marin je odredio afinitet epox – 3 u istom reakcijskom sustavu prema sličnom enzimu (HheA) te zaključeno je da on pokazuje najveći afinitet od testiranih epoksida.¹³² Osim toga Majerić Elenkov i sur. su pokazali da supstrat koji ima fluor atom u *para* položaju na fenilnom prstenu pokazuje viši afinitet prema HHDH nego isti u *orto* i *meta*.¹³⁸ Može se zaključiti da položaj supstituenta ima utjecaj na afinitet epoksida prema enzimu te da najbolji afinitet pokazuje onaj epoksid koji ima supstituente najudaljenije od epoksidnog prstena. To se također može primijetiti ako se usporede strukture epox 2 i 5. Oni se razlikuju samo po tome što epox – 5 ima metilnu grupu na kiralnom C atomu koji se nalazi na epoksidnom prstenu. Kao posljedica toga epox – 5 je lošiji supstrat za HheC nego epox – 2. Epox – 6 ima manji afinitet od epox 1, 2 i 3 jer ima 2 fluorova atoma na *orto* položaju. Vizualno objašnjenje rezultat može se vidjeti na slici 4.4.

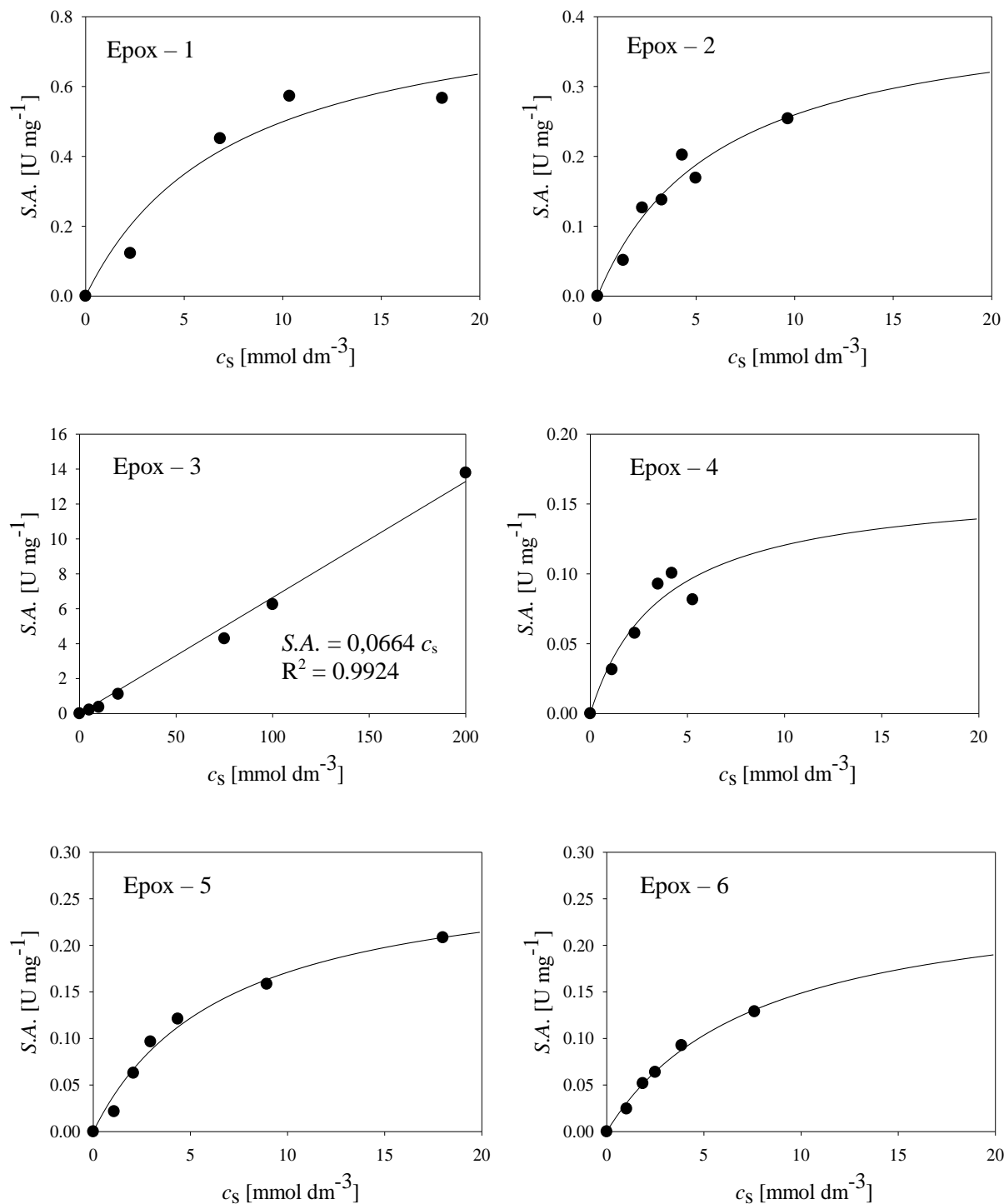
Smanjenje afiniteta HheC prema fluoriranim derivatima stiren oksida



Slika 4.4. Smanjenje afiniteta HheC prema epoksidima

Od ispitivanih epoksida epox – 3 je najbolji supstrat za HheC jer mu je fluor najudaljeniji od epoksidnog prstena. Međutim u ovom radu za epox – 3 nije bilo moguće odrediti vrijednost kinetičkih parametara radi slabe topljivosti, te za konkretne zaključke potrebno je provesti dodatne eksperimente pri višim koncentracijama od 20 mM. Kako bi se to moglo postići potrebno je povećati udio organskog medija u sustavu više od 5 % DMSO-a. Pri provođenju takvih

eksperimenta potrebno je uzeti u obzir da enzimi pokazuju manju aktivnost u organskom mediju. To je pogotovo slučaj za enzime iz prirodnih mikroorganizama te zato je poželjno koristiti enzime kojima je proteinskim inženjerstvom smanjena osjetljivost na organski medij.



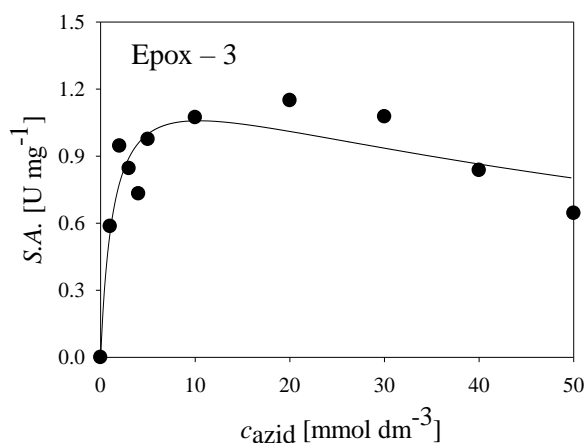
Slika 4.5. Rezultati određivanja utjecaja epoksida na brzinu enzimske reakcije

4.4. Ispitivanje utjecaja azida na kinetiku enzimske reakcije

Da bi se odredio kinetički model enzimske reakcije potrebno je ispitati utjecaj koncentracije svih sudionika na brzinu svih reakcija koje su prisutne u sustavu. U ovom radu osim epoksida, supstrat enzimu je i nukleofilni azid. On se u sustav dodao u obliku otopljenog NaN_3 te ispitivan je utjecaj njegove koncentracije na brzinu enzimske reakcije. Eksperiment je proveden samo za epox – 3 jer je za njega pretpostavljeno da je najbolji supstrat za HheC.

Pri ispitivanju utjecaja jednog supstrata na brzinu enzimske reakcije potrebno je eksperimente provoditi pri koncentracijama zasićenja ostalim supstratima. Takvi uvjeti osiguravaju da male promijene u koncentracijama supstrata, koje se žele držati konstante, nemaju utjecaj na brzinu reakcije. Rezultati određivanja kinetike epoksida (slika 4.5.) ukazuju da bi koncentracija epoksida zasićenja bila oko od 20 mM. Međutim, eksperimenti su provedeni pri nižoj koncentraciji epoksida od 10 mM gdje je utvrđeno da je epoksid u potpunosti otopljen za sve slučajeve.

Rezultati ispitivanja utjecaja azida na kinetiku enzimske reakcije mogu se vidjeti na slici 4.6. Kretanje eksperimentalnih podataka može se opisati kinetičkim modelom enzimske reakcije s inhibicijom supstrata (prilog 2). Određeni su parametri kinetičkog modela te oni iznose $V_m = 1,3427 \text{ U mg}^{-1}$, $K_m = 1,3948 \text{ mM}$, i $K_i = 77,1751 \text{ mM}$. Maksimalna brzina enzimske reakcije je oko c_{azid} od 10 mM nakon čega povećanje koncentracije ima negativan utjecaj na brzinu enzimske reakcije. U literaturi do sada nije spomenut inhibicijski učinak azida na HHDH. Međutim, poznato je da mali nukleofili kao što su azidi i cijanidi pri visokim koncentracijama inhibiraju enzime.^{139,140}



Slika 4.6. Određivanja utjecaja azida na brzinu enzimske reakcije ($c_{\text{epox-3}} = 10 \text{ mM}$)

5. Zaključak

Epox – 3 se pokazao kao najbolji supstrat za divlji tip HheC u reakciji otvaranja epoksidnog prstena stiren oksida s azidima. Slijede ga epox – 2, 1, 5, 6 i 4. To tog zaključka se je došlo određivanjem utjecaja epoksida na kinetiku enzimske reakcije i pregledom literature. Položaj supstituenta na stiren oksidu određuje aktivnost enzima i afinitet supstrata prema enzimu. Što je atom fluora na stiren oksidu udaljeniji od epoksidnog prstena, to će taj epoksid biti bolji supstrat. Također, metilna grupa koja se nalazi na epoksidnom prstenu ima negativan utjecaj na afinitet i aktivnost. Prema tome epox – 3 treba biti najbolji supstrat jer nema metilnu grupu i ima jedan atom fluora na *para*-položaju.

Eksperimentalno se je odredilo da svi ispitivani epoksidi, osim epox – 3 pokazuju M-M kinetiku. Radi sličnosti s drugim epoksidima, za epox – 3 se također može pretpostaviti M-M kinetika. Međutim to u ovom radu nije potvrđeno jer za njega određivana je kinetika pri koncentracijama u kojima on nije dovoljno topiv. Ispitivan je i utjecaj koncentracije azida na kinetiku enzimske reakcije te određeno je da se on ponaša kao inhibitor. Pri koncentracijama azida višim od 10 mM on usporava brzinu enzimske reakcije i djeluje kao inhibitor.

Prilikom svih eksperimenata bilo je problematično određivati kinetiku enzimske reakcije jer su epoksidi hlapivi. Također, pokazuju slabu topivost i skloni su hidrolizi u ispitivanom vodenom mediju sa samo 5 % organskog DMSO-a. Radi toga enzimsku kinetiku je bilo moguće odrediti samo do koncentracije epoksida od 20 mM. Buduća istraživanja ispitivanog sustava nužno je usmjeriti prema višim koncentracijama epoksida. To se može postići provođenjem reakcija u mediju s većim udjelom organskog otapala jer tako će epoksidi biti stabilniji i topljiviji. Tada treba uzeti u obzir da enzimi pokazuju manju aktivnost i stabilnost u organskom mediju i radi toga bit će potrebno naći optimum reakcijskih uvjeta da odgovaraju epoksidu i enzimu. Proteinsko inženjerstvo može se koristiti za poboljšanje svojstava enzima i i povećanoj toleranciji prema organskom mediju. Za buduća ispitivanja i razvoj matematičkog modela ispitivanog enzimskog sustava može se koristiti opisani pristup u teorijskom dijelu (poglavlje 2.6). Za praćenje koncentracije epoksida razvijene su metode na GC-u i HPLC-u. Također bit će potrebno razviti i metodu za praćenje koncentracije produkta kako bi se moglo jednoznačnije odrediti kinetika enzimske reakcije.

6. Popis pokrata i simbola

A – apsorbancija, [/]

BSA – albumin govedjeg seruma (engl. *bovine serum albumin*)

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

d – debljina kvarcne kivete, [cm]

DMSO – dimetil sulfoksid

E – enzim

ee – enantiomerni višak (engl. *enantiomeric excess*), %

EPOX – epoksid

ES – enzim-supstrat kompleks

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

HHDH – halohidrin dehalogenaza (engl. *halohydrin dehalogenase*)

HheC – C tip halohidrin dehalogenaze

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, (engl. *high performance liquid chromatography*)

k – kinetička konstanta, [min^{-1}]

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

KR – kotlasti reaktor

m – masa, [g]

MTBE – metil *terc*-butil eter

M_w – molarna masa (engl. *molecular weight*)

n – množina tvari, mol

P – produkt

PAGE – poliakrilamidna gel elektroforeza

PC – osobno računalo (engl. *personal computer*)

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

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

R^2 – koeficijent linearne regresije

S – supstrat

S.A. – specifična aktivnost, [U mg⁻¹]

SDS – natrijev dodecil sulfat, (engl. sodium dodecil sulfat)

SE – stabilnost enzima, [% h⁻¹]

T – temperatura, [°C]

t – vrijeme, [s]

TO – temeljna otopina

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

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

U – jedinica enzimске aktivnosti (engl. units) [μmol min⁻¹]

V – volumen, [cm³]

V.A. – volumna aktivnost, [U cm⁻³]

V_m – maksimalna brzina enzimске reakcije, [mmol dm⁻³ min⁻¹]

V_r – volumen reakcijske smjese, [cm³]

γ – masena koncentracija, [mg dm⁻³]

Δ – promjena

ε – ekstinkcijski koeficijent, [mM⁻¹ cm⁻¹]

λ – valna duljina, [nm]

σ – standardna devijacija, [-]

7. Literatura

1. Smart, B. E. Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J. Fluor. Chem.* **109**, 3–11 (2001).
2. Jeschke, P. The unique role of fluorine in the design of active ingredients for modern crop protection. *ChemBioChem* **5**, 570–589 (2004).
3. Pastores, G. M. Metabolism of Fluorine-Containing Drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 1761–1783 (2001).
4. Resnick, R.P. Practical uses of fluorinated heterocycles u Petrov, V.A. Fluorinated Heterocyclic Compounds, Synthesis, Chemistry, and Applications. 493-506 (2009)
5. Harper, D. B. & O’Hagan, O. The fluorinated natural products. *Nat. Prod. Rep.* **11**, 123–133 (1994).
6. Gerstenberger, M. R. C. & Haas, A. Methods of Fluorination in Organic Chemistry. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **20**, 647–667 (1981).
7. Schmid, A., Hofstetter, K., Feiten, H. J., Hollmann, F. & Witholt, B. Integrated Biocatalytic Synthesis on Gram Scale: The Highly Enantioselective Preparation of Chiral Oxiranes with Styrene Monooxygenase. *Adv. Synth. Catal.* **343**, 732–737 (2001).
8. Gorzynski, S., J. Syntehtically useful reactions of epoxides, *Synthesis* 629-656 **8**, (1984)
9. Blaser, H. U. Chirality and its implications for the pharmaceutical industry. *Rend. Lincei* **24**, 213–216 (2013).
10. Palucki, M., Pospisil, P. J. & Zhang, W. Highly Enantioselective, Low-Temperature Epoxidation of Styrene. *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 9333–9334 (1994).
11. Monterde, M. I. *et al.* Enzymatic transformations. Part 58: Enantioconvergent biohydrolysis of styrene oxide derivatives catalysed by the *Solanum tuberosum* epoxide hydrolase. *Tetrahedron Asymmetry* **15**, 2801–2805 (2004).
12. Yildirim, D., Tükel, S. S., Alagöz, D. & Alptekin, Ö. Preparative-scale kinetic resolution of racemic styrene oxide by immobilized epoxide hydrolase. *Enzyme Microb. Technol.* **49**, 555–559 (2011).
13. Wan, N. *et al.* Regioselective Ring-Opening of Styrene Oxide Derivatives Using Halohydrin Dehalogenase for Synthesis of 4-Aryloxazolidinones. *Adv. Synth. Catal.* **361**, 4651–4655 (2019).
14. Pedragosa-Moreau, S., Archelas, A. & Furstoss, R. Microbiological transformations 32: Use of epoxide hydrolase mediated biohydrolysis as a way to enantiopure epoxides and vicinal diols: Application to substituted styrene oxide derivatives. *Tetrahedron* **52**, 4593–4606 (1996).
15. Capriati, V., Florio, S., Perna, F. M. & Salomone, A. Lithiated fluorinated styrene oxides: Configurational stability, synthetic applications, and mechanistic insight. *Chem. - A Eur.*

- J.* **16**, 9778–9788 (2010).
16. Spelberg, J. H. L., Van Vlieg, J. E. T. H., Tang, L., Janssen, D. B. & Kellogg, R. M. Highly enantioselective and regioselective biocatalytic azidolysis of aromatic epoxides. *Org. Lett.* **3**, 41–43 (2001).
 17. Mislow, K. Molecular chirality u Denmark, S.E. Topics in Stereochemistry 1-83 (1999)
 18. Mislow, K. & Siegel, J. Stereoisomerism and Local Chirality. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 3319–3328 (1984).
 19. Leung, D., Kang, S. O. & Anslyn, E. V. Rapid determination of enantiomeric excess: A focus on optical approaches. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 448–479 (2012).
 20. Maher, T. J. & Johnson, D. A. Review of chirality and its importance in pharmacology. *Drug Dev. Res.* **24**, 149–156 (1991).
 21. Cossy, J. R. *1.1 Introduction: The Importance of Chirality in Drugs and Agrochemicals. Comprehensive Chirality* vol. 1 (2012).
 22. Palmer, T. & Bonner, P. L. Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry: Second Edition. 2-11 (2007).
 23. Weber, G., Banerjee, G., Bixler, D. & Ashmore, J. Role of Enzymes in Metabolic Homeostasis. *J. Nutr.* **74**, 157–160 (1961).
 24. Beach, E. S., Cui, Z. & Anastas, P. T. Green Chemistry: A design framework for sustainability. *Energy Environ. Sci.* **2**, 1038–1049 (2009).
 25. Iyer, P. V. & Ananthanarayan, L. Enzyme stability and stabilization-Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochem.* **43**, 1019–1032 (2008).
 26. Hedstrom, L. Enzyme Specificity and Selectivity. *Encycl. Life Sci.* 1–7 (2001)
 27. Songa, E. A. & Okonkwo, J. O. Recent approaches to improving selectivity and sensitivity of enzyme-based biosensors for organophosphorus pesticides: A review. *Talanta* **155**, 289–304 (2016).
 28. Kapoor, M. & Gupta, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochem.* **47**, 555–569 (2012).
 29. Evtugyn, G. A., Budnikov, H. C. & Nikolskaya, E. B. Sensitivity and selectivity of electrochemical enzyme sensors for inhibitor determination. *Talanta* **46**, 465–484 (1998).
 30. Evans, G. M. & Furlong, J. C. *Environmental Biotechnology: Theory and Application: Second Edition. Environmental Biotechnology: Theory and Application: Second Edition* (2010). doi:10.1002/9780470975152.
 31. Tang, W. L. & Zhao, H. Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnol. J.* **4**, 1725–1739 (2009).
 32. Biotechnology Market Share, Growth Forecasts Report for Year 2025. <https://www.gminsights.com/industry-analysis/biotechnology-market>. (29.10.2020)

33. World Economic Forum, Job of Tomorrow, Mapping Opportunity in the New Economy (2020)
34. Wang, Z. Media, Biotechnology, and Trust: What Drives Citizens to Support Biotechnology. *Stud. Media Commun.* **5**, 157 (2017).
35. Burk, M. J. & Van Dien, S. Biotechnology for Chemical Production: Challenges and Opportunities. *Trends Biotechnol.* **34**, 187–190 (2016).
36. Soetaert, W. Vandamme, E.J. The Scope and Impact of Industrial Biotechnology u Soetaert, W. Vandamme, E.J. Industrial Biotechnology, Sustainable Growth and Economic Success 1-16 (2010).
37. Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S. & Hameed, A. Enzymes used in detergents: Lipases. *African J. Biotechnol.* **9**, 4836–4844 (2010).
38. Maurer, K. H. Detergent proteases. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**, 330–334 (2004).
39. Sawant, R. & Nagendran, S. Protease : an Enzyme With Multiple Industrial Applications. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* **3**, 568–579 (2014).
40. Aravindan, R., Anbumathi, P. & Viruthagiri, T. Lipase applications in food industry. *Indian J. Biotechnol.* **6**, 141–158 (2007).
41. White J.S. Sucrose, HFCS and Fructose: History, Manufacture, Composition, Applications, and Production u White J.S. Fructose, High Fructose Corn Syrup, Sucrose and health. 13-33 (2014)
42. Parker, K., Salas, M. & Nwosu, V. C. High fructose corn syrup : Production , uses and public health concerns. *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* **5(5)**, 71–78 (2010).
43. Philippe, R. N., De Mey, M., Anderson, J. & Ajikumar, P. K. Biotechnological production of natural zero-calorie sweeteners. *Curr. Opin. Biotechnol.* **26**, 155–161 (2014).
44. Birrane, G., Bhyravbhatla, B. & Navia, M. A. Synthesis of aspartame by thermolysin: An x-ray structural study. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 706–710 (2014).
45. Patel, R. N. Synthesis of chiral pharmaceutical intermediates by biocatalysis. *Coord. Chem. Rev.* **252**, 659–701 (2008).
46. Beta-lactam and beta-lactamase inhibitors Market Size and Share - 2028. <https://www.alliedmarketresearch.com/beta-lactam-and-beta-lactamase-inhibitors-market> (29.10.2020.)
47. Biwer, A., Antranikian, G. & Heinzle, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 609–617 (2002).
48. Hosseini Koupaie, E., Dahadha, S., Bazyar Lakeh, A. A., Azizi, A. & Elbeshbishy, E. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. *J. Environ. Manage.* **233**, 774–784 (2019).
49. Coelho, M.A.Z. Ribeiro, B.D. Castro, A.M. Principles of Green Chemistry and White Biotechnology u Coelho, M.A.Z. Ribeiro, B.D. White Biotechnology. 1-7 (2016)

50. Barcelos, M. C. S., Lupki, F. B., Campolina, G. A., Nelson, D. L. & Molina, G. The colors of biotechnology: General overview and developments of white, green and blue areas. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, (2018).
51. Karigar, C. S. & Rao, S. S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. *Enzyme Res.* **2011**, (2011).
52. Kirby, A. J. Enzyme Mechanisms, Models, and Mimics. *Angew. Chemie (International Ed. English)* **35**, 706–724 (1996).
53. Suzuki, H. How Enzymes Work, From Structure to Function 17-31, 53-71 (2015)
54. Koshland, D. E. The Key - Lock Theory and the Induced Fit Theory *Angew. Chemie* **106**, 2468–2472 (1994).
55. Findrik Blažević Z., Bioreakcijska tehnika I, Interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2013.
56. Singh, R. K., Tiwari, M. K., Singh, R. & Lee, J. K. From protein engineering to immobilization: Promising strategies for the upgrade of industrial enzymes. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 1232–1277 (2013).
57. Daniel, R. M., Danson, M. J., Eissenthal, R., Lee, C. K. & Peterson, M. E. The effect of temperature on enzyme activity: New insights and their implications. *Extremophiles* **12**, 51–59 (2008).
58. Sheldon, R. A. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1289–1307 (2007).
59. Mateo, C., Palomo, J. M., Fernandez-Lorente, G., Guisan, J. M. & Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451–1463 (2007).
60. Buchholz, K. Kasche, V. Bornscheuer, U.T. Biocatalysts and Enzyme Technology 1-29 (2012)
61. Rezaei, K., Jenab, E. & Temelli, F. Effects of water on enzyme performance with an emphasis on the reactions in supercritical fluids. *Crit. Rev. Biotechnol.* **27**, 183–195 (2007).
62. Broderick, J. B. Coenzymes and Cofactors. *Encycl. Life Sci.* (2001)
63. Pietrzik, K. & Brönstrup, A. Vitamins B12 B6 and foalte as determinants of homocysteine concentration in the healthy population. *Eur. J. Pediatr.* **2**, 135–138 (1998).
64. Branden, C. Tooze, J. Introduction to Protein Structure 1-12 (1999)
65. Karplus, M. & Mccammon, J. A. I. The internal dynamics of globular proteins. *Crit. Rew. in Biochem.* **9**, 293–349 (1981).
66. Dinner, A. R., So, S. S. & Karplus, M. Use of quantitative structure-property relationships to predict the folding ability of model proteins. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **33**, 177–203 (1998).

67. McDonald, A. G. & Tipton, K. F. Fifty-five years of enzyme classification: Advances and difficulties. *FEBS J.* **281**, 583–592 (2014).
68. <https://www.brenda-enzymes.org/> (29.10.2020)
69. <https://enzyme.expasy.org/> (29.10.2020)
70. Schallmey, M., Koopmeiners, J., Wells, E., Wardenga, R. & Schallmey, A. Expanding the halohydrin dehalogenase enzyme family: Identification of novel enzymes by database mining. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 7303–7315 (2014).
71. You, Z. Y., Liu, Z. Q. & Zheng, Y. G. Properties and biotechnological applications of halohydrin dehalogenases: Current state and future perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 9–21 (2013).
72. Janssen, D. B., Majerić-Elenkov, M., Hasnaoui, G., Hauer, B. & Spelberg, J. H. L. Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 291–295 (2006).
73. De Jong, R. M. *et al.* Structure and mechanism of a bacterial haloalcohol dehalogenase: A new variation of the short-chain dehydrogenase/reductase fold without an NAD(P)H binding site. *EMBO J.* **22**, 4933–4944 (2003).
74. Koopmeiners, J., Halmschlag, B., Schallmey, M. & Schallmey, A. Biochemical and biocatalytic characterization of 17 novel halohydrin dehalogenases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 7517–7527 (2016).
75. Liao, Q. *et al.* Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1: Preparation, characterization and application as a biocatalyst. *J. Biotechnol.* **272–273**, 48–55 (2018).
76. Van Hylckama Vlieg, J. E. T. *et al.* Halohydrin dehalogenases are structurally and mechanistically related to short-chain dehydrogenases/reductases. *J. Bacteriol.* **183**, 5058–5066 (2001).
77. Dvorak, P., Bidmanova, S., Damborsky, J. & Prokop, Z. Immobilized synthetic pathway for biodegradation of toxic recalcitrant pollutant 1,2,3-trichloropropane. *Environ. Sci. Technol.* **48**, 6859–6866 (2014).
78. Bornscheuer, U. T. & Hessler, M. Enzymatic removal of 3-monochloro-1,2-propanediol(3-MCPD) and its esters from oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 552–556 (2010).
79. Kasai, N., Suzuki, T. & Idogaki, H. Enzymatic degradation of esters of dichloropropanols: Removal of chlorinated glycerides from processed foods. *LWT - Food Sci. Technol.* **39**, 86–90 (2006).
80. Wan, N. W., Liu, Z. Q., Xue, F. & Zheng, Y. G. An enzymatic method for determination of azide and cyanide in aqueous phase. *J. Biotechnol.* **214**, 27–32 (2015).
81. Hasnaoui-Dijoux, G., Elenkov, M. M., Lutje Spelberg, J. H., Hauer, B. & Janssen, D. B. Catalytic promiscuity of halohydrin dehalogenase and its application in enantioselective

- epoxide ring opening. *ChemBioChem* **9**, 1048–1051 (2008).
82. Ma, S. K. *et al.* A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chem.* **12**, 81–86 (2010).
 83. Patel, J. M. Biocatalytic synthesis of atorvastatin intermediates. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **61**, 123–128 (2009).
 84. Choi, W. J. & Choi, C. Y. Production of chiral epoxides: Epoxide hydrolase-catalyzed enantioselective hydrolysis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **10**, 167–179 (2005).
 85. Ward, R. S. Dynamic kinetic resolution. *Tetrahedron: Asymmetry* **6**, 1475–1490 (1995).
 86. Assis, H. M. S., Bull, A. T. & Hardman, D. J. Synthesis of chiral epihalohydrins using haloalcohol dehalogenase A from *Arthrobacter erithii* H10a. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 545–551 (1998).
 87. Seisser, B., Lavandera, I., Faber, K., Spelberg, J. H. L. & Kroutil, W. Stereo-complementary two-step cascades using a two-enzyme system leading to enantiopure epoxides. *Adv. Synth. Catal.* **349**, 1399–1404 (2007).
 88. Schallmeyer, M. Floor, R.J. Szymanski, W. Janssen, D.B. Hydrolysis and reverse hydrolysis: halohidrin dehalogenase u Carreira, E.M. Yamamoto, H. *Comprehensive Chirality* 143-154 (2012).
 89. Zelaszczyk, D. & Kiec, K. Biocatalytic approaches to optically active β -blockers. *Curr. Med. Chem.* **14**, 53–65 (2007).
 90. Bhagavathula, D. S., Boddeti, G. & Venu, R. A Brief Review on Synthesis of β -amino Alcohols by Ring Opening of Epoxides. *Res. Rev. J. Chem.* **6**, 27–46 (2017).
 91. Schrittwieser, J. H., Lavandera, I., Seisser, B., Mautner, B. & Kroutil, W. Biocatalytic cascade for the synthesis of enantiopure β -azidoalcohols and β -hydroxynitriles. *European J. Org. Chem.* 2293–2298 (2009)
 92. Molinaro, C., Guilbault, A. A. & Kosjek, B. Resolution of 2,2-disubstituted epoxides via biocatalytic azidolysis. *Org. Lett.* **12**, 3772–3775 (2010).
 93. Hu, X. E. Nucleophilic ring opening of aziridines. *Tetrahedron* **60**, 2701–2743 (2004).
 94. Woodley, J. M. Integrating protein engineering with process design for biocatalysis. *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **376**, (2018).
 95. Lima-Ramos, J., Neto, W. & Woodley, J. M. Engineering of biocatalysts and biocatalytic processes. *Top. Catal.* **57**, 301–320 (2014).
 96. Ognjanovic, N., Bezbradica, D. & Knezevic-Jugovic, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresour. Technol.* **100**, 5146–5154 (2009).
 97. Rajendran, K. & Murthy, G. S. How does technology pathway choice influence economic viability and environmental impacts of lignocellulosic biorefineries? *Biotechnol. Biofuels* **10**, 1–19 (2017).

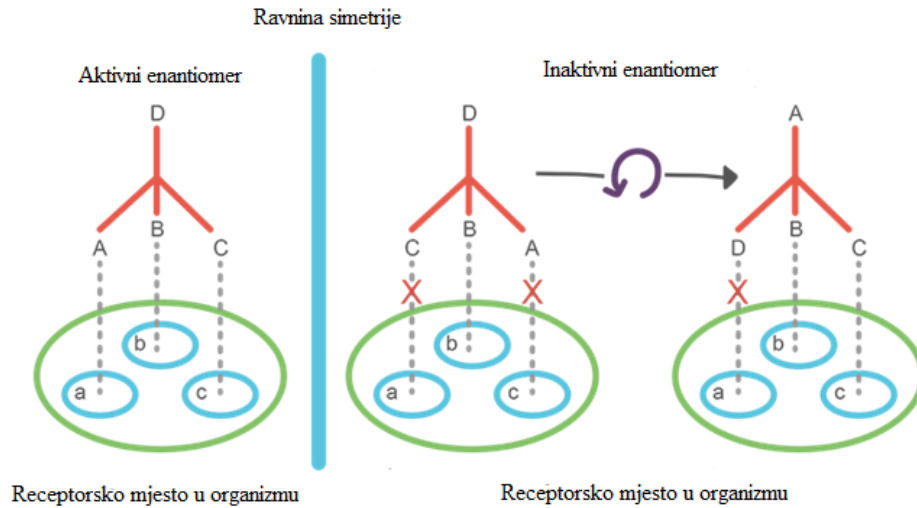
98. Schmidt, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 425–435 (2005).
99. Tufvesson, P., Fu, W., Jensen, J. S. & Woodley, J. M. Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food Bioprod. Process.* **88**, 3–11 (2010).
100. Ringborg, R. H. & Woodley, J. M. The application of reaction engineering to biocatalysis. *React. Chem. Eng.* **1**, 10–22 (2016).
101. Vasić-Rački, D., Findrik, Z. & Vrsalović Presečki, A. Modelling as a tool of enzyme reaction engineering for enzyme reactor development. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 845–856 (2011).
102. Woodley, J. M. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**, 4733–4739 (2019).
103. Gernaey, K. V., Lantz, A. E., Tufvesson, P., Woodley, J. M. & Sin, G. Application of mechanistic models to fermentation and biocatalysis for next-generation processes. *Trends Biotechnol.* **28**, 346–354 (2010).
104. Fox, R. J. *et al.* Improving catalytic function by ProSAR-driven enzyme evolution. *Nat. Biotechnol.* **25**, 338–344 (2007).
105. The Royal Swedish Academy of Sciences. Scientific Background on the Nobel Prize in Chemistry 2018. Directed Evolution of Enzymes and Binding Proteins. (2018)
106. Schallmeyer, M. *et al.* Biocatalytic and Structural Properties of a Highly Engineered Halohydrin Dehalogenase. *ChemBioChem* **14**, 870–881 (2013).
107. Delcardayré, S. B. *et al.* Engineering ribonuclease a: Production, purification and characterization of wild-type enzyme and mutants at Gln11. *Protein Eng. Des. Sel.* **8**, 261–273 (1995).
108. Donald Allison, R. & Purich, D. L. Practical considerations in the design of initial velocity enzyme rate assays. *Methods Enzymol.* **63**, 3–22 (1979).
109. Robinson, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem.* **59**, 1–41 (2015).
110. Bisswanger, H. Enzyme Kinetics: Principles and Methods 59-74 (2008).
111. Dunn, I.J. Heinzle, E. Ingham, J. Prenosil, J.E. Biological Reaction Engineering 67-97 (2003)
112. Bechtold, M & Panke, S. Reaction engineering and Biontransformation u Carreira, E.M. Yamamoto, H. Comprehensive Chirality 72-98 (2012).
113. Wang, G., Post, W. M., Mayes, M. A., Frerichs, J. T. & Sindhu, J. Parameter estimation for models of ligninolytic and cellulolytic enzyme kinetics. *Soil Biol. Biochem.* **48**, 28–38 (2012).
114. Straathof, A. J. J. Development of a computer program for analysis of enzyme kinetics by progress curve fitting. *J. Mol. Catal. - B Enzym.* **11**, 991–998 (2001).

115. Česnik, M. *et al.* Model-based optimization of the enzymatic aldol addition of propanal to formaldehyde: A first step towards enzymatic synthesis of 3-hydroxybutyric acid. *Chem. Eng. Res. Des.* **150**, 140–152 (2019).
116. Goel, R., Mino, T., Satoh, H. & Matsuo, T. Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. *Water Res.* **32**, 2081–2088 (1998).
117. Al-Kassim, L., Taylor, K. E., Bewtra, J. K. & Biswas, N. Optimization of phenol removal by a fungal peroxidase from *Coprinus macrorhizus* using batch, continuous, and discontinuous semibatch reactors. *Enzyme Microb. Technol.* **16**, 120–124 (1994).
118. Gomzi, Z., *Kemijski Reaktori*, 7-30 (2009)
119. Schägger, H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 16–22 (2006).
120. Maizel, J. V. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Viral Proteins. u Maramorosch, K., Koprowski, H. *Methods in Virology* 180-244 (1971)
121. Kruger, N. J. The Bradford Method. u Walker, J.M. *Basic Protein and Peptide Protocols* 17–24 (2009)
122. Tang, L., Lutje Spelberg, J. H., Fraaije, M. W. & Janssen, D. B. Kinetic mechanism and enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from *agrobacterium radiobacter*. *Biochemistry* **42**, 5378–5386 (2003).
123. www.micromath.com (29.10.2020))
124. Dekking, F. M., Kraaikamp, C., Lopuhaä, H. P. & Meester, L. E. The method of least squares. u *A Modern Introduction to Probability and Statistics, Understanding Why and How.* 329-337, (2005).
125. Huang, Y. & McColl, W. F. Improved simplex method for function minimization. *Proceedings of the IEEE International Conference on Systems, Man and Cybernetics* vol. 3 1702–1705 (1996).
126. Xue, F., Liu, Z. Q., Wan, N. W. & Zheng, Y. G. Purification, Gene Cloning, and Characterization of a Novel Halohydrin Dehalogenase from *Agromyces mediolanus* ZJB120203. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **174**, 352–364 (2014).
127. Johan, E. T. *et al.* Halohydrin Dehalogenases Are Structurally and Mechanistically Related to Short-Chain Dehydrogenases. *J. Bacteriol.* **183**, 5058–5066 (2001).
128. Tang, L., Li, Y. & Wang, X. A high-throughput colorimetric assay for screening halohydrin dehalogenase saturation mutagenesis libraries. *J. Biotechnol.* **147**, 164–168 (2010).
129. Dartois, V., Phalip, V., Schmitt, P. & Diviès, C. Purification, properties and DNA sequence of the D-lactate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*. *Res. Microbiol.* **146**, 291–302 (1995).
130. Andorn, N. & Aronovitch, J. Purification and properties of histidinol dehydrogenase from *Escherichia coli* B. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 579–584 (1982).

131. Van Den Wijngaard, A. J., Reuvekamp, P. T. W. & Janssen, D. B. Purification and characterization of haloalcohol dehalogenase from *Arthrobacter* sp. strain AD2. *J. Bacteriol.* **173**, 124–129 (1991).
132. Marin, P., Biokatalitička azidoliza fluoriranih derivata stiren oksida. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (2020).
133. Milčić, N., Matematički model dinamičke kinetičke rezolucije katalizirane halogenhidrin dehalogenazom. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu (2018).
134. Wang, X. *et al.* MDC-Analyzer-facilitated combinatorial strategy for improving the activity and stability of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter* AD1. *J. Biotechnol.* **206**, 1–7 (2015).
135. Gul, I. *et al.* A high-throughput screening assay for the directed evolution-guided discovery of halohydrin dehalogenase mutants for epoxide ring-opening reaction. *J. Biotechnol.* **311**, 19–24 (2020).
136. Solomons T. W. G., Fryhle C. B., Snyder S. A., *Organic Chemistry*, 191-239 (2013)
137. Majerić Elenkov, M. *et al.* Catalytic activity of halohydrin dehalogenases towards spiroepoxides. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 5063–5072 (2012).
138. Wan, N. *et al.* Identification and characterization of a highly S-enantioselective halohydrin dehalogenase from *Tsukamurella* sp. 1534 for kinetic resolution of halohydrins. *Bioorg. Chem.* **81**, 529–535 (2018).
139. Forti, G. & Gerola, P. Inhibition of Photosynthesis by Azide and Cyanide and the Role of Oxygen in Photosynthesis. *Plant Physiol.* **59**, 859–862 (1977).
140. Ohyama, T. & Yamazaki, I. Formate dehydrogenase: Subunit and mechanism of inhibition by cyanide and azide. *J. Biochem.* **77**, 845–852 (1975).
141. Lutje Spelberg J. H., de Vries E. J., Hydrolysis and Formation of Epoxides, u Drauz, K., Gröger H., May O.; *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, 363 – 411. (2012)
142. Schallmeyer M., Tarabion C., Tang L., P. C. . P. and I. of H., *Dehalogenases; Protokol; Biotransformation and Biocatalysis*, Sveučilište u Gronningenu (2008)

8. Prilozi

Prilog 1. Prikaz enantiomera i enantioselektivnosti receptora u živim organizmima



Prilog 2. Osnovni enzimski kinetički modeli

Naziv modela	Model	Parametri modela
Michaelis-Meteničina kinetika	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_{m,S} + c_S}$	$V_m \quad K_{m,S}$
Michaelis-Meteničina dvosupstratna kinetika	$r_S = \frac{V_m \cdot c_{S1} \cdot c_{S2}}{(K_{m,S1} + c_{S1}) \cdot (K_{m,S2} + c_{S2})}$	$V_m \quad K_{m,S1} \quad K_{m,S2}$
Kompetitivna inhibicija	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_{m,S} \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right) + c_S}$	$V_m \quad K_{m,S} \quad K_{i,P}$
Antikompetitivna inhibicija	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{K_{m,S} + c_S \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right)}$	$V_m \quad K_{m,S} \quad K_{i,P}$
Nekompetitivna inhibicija	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{(K_{m,S} + c_S) \cdot \left(1 + \frac{c_P}{K_{i,P}}\right)}$	$V_m \quad K_{m,S} \quad K_{i,P}$
Inhibicija supstratom	$r_S = \frac{V_m \cdot c_S}{\left(K_{m,S} + c_S + \frac{c_S^2}{K_{i,S}}\right)}$	$V_m \quad K_{m,S} \quad K_{i,S}$

Prilog 3. Popis važnih kemikalija korištenih u radu

Kemikalija	Pokrata ili kemijski simbol	Proizvođač ili ref. u kojoj je opisana sinteza
1-(p-nitrofenil)-2-bromoetanol	PNSHH	Ref. 141 ¹⁴¹
2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer	TriS-SO ₄	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
Albumin goveđeg seruma	BSA	Honeywell Fluka, SAD
Bezvodni natrijev sulfat	Na ₂ SO ₄	Lach – Ner s.r.o., Češka Republika
C tip halogenhidrin dehalogenaze	HheC	Ref. 142 ¹⁴²
Coomassie Brilliant Blue G-250	CBB	Honeywell Fluka, SAD
Dimetil sulfoksid	DMSO	Kemika d.d., Hrvatska
Ispitivani epoksidi	Epox 1 - 6	Preuzeto s instituta Ruđer Bošković
Metil- <i>terc</i> -butil-eter	MTBE	VWR Chemicals, Francuska
Natrijev azid	NaN ₃	Sigma-Aldrich Corporation, SAD
PageRuler #26619		Thermo Scientific™, SAD
Sumporna Kiselina	H ₂ SO ₄	Kemika d.d., Hrvatska

Prilog 4. Volumeni i udjeli sastojaka za pripremu gelova za elektroforezu

Sastojak*	Separirajući gel		Gel za koncentriranje	
	Udio sastojka [%]	V [cm ³]	Udio sastojka [%]	V [cm ³]
H ₂ O	0,3350	3,350	0,6020	3,050
0.5 M Tris pH 6,8	-	-	0,2470	1,250
1.5 M Tris pH 8,8	0,2500	2,500	-	-
Akrilamid 30 %	0,4000	4,000	0,1300	0,660
SDS 10 %	0,0100	0,100	0,0099	0,050
APS 10 %	0,0050	0,050	0,0099	0,050
TEMED	0,0005	0,005	0,0010	0,005

* Sve kemikalije su pripravljene s ultra čistom vodom i čuvane su u hladnjaku. Radi nestabilnosti APS je pripremljen neposredno prije upotrebe.

Prilog 5. Sastojci za pripremu pufera i otopine za bojanje korištene u elektroforezi

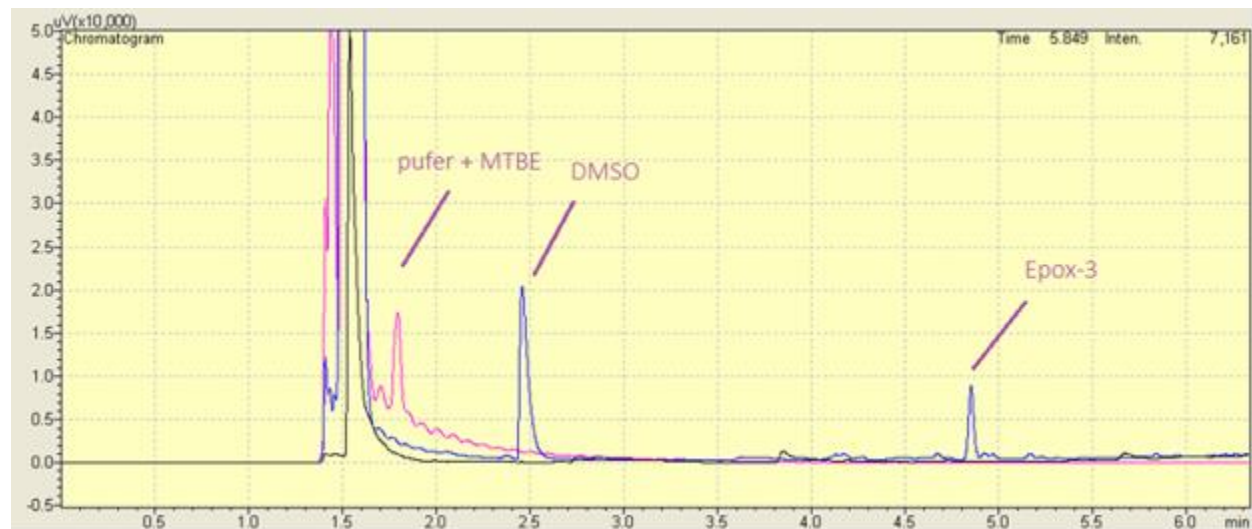
Pufer za uzorke		Running pufer		Otopina za bojanje	
$V(\text{H}_2\text{O}), \text{cm}^3$	3,55	$V(\text{H}_2\text{O}), \text{dm}^3$	1	$V(\text{H}_2\text{O}), \text{cm}^3$	43
$V(\text{Tris pH } 6,8 \text{ } 0,5 \text{ M}), \text{cm}^3$	1,25	$m(\text{Tris}), \text{g}$	30,285	$V(\text{MetOH}), \text{cm}^3$	50
$V(\text{glicerol}), \text{cm}^3$	2,5	$m(\text{Glicin}), \text{g}$	144,1344	$V(10\% \text{ CH}_3\text{COOH}), \text{cm}^3$	7
$V(10\% \text{ SDS}), \text{cm}^3$	2	$m(\text{SDS})$	10	$m(\text{CBB}), \text{g}$	0,1
$V(10\% \text{ BPB}^*), \text{cm}^3$	0,2				

*Otopina bromfenolplavo

Prilog 6. Sastojci za priprevu Bradfordovog reagensa

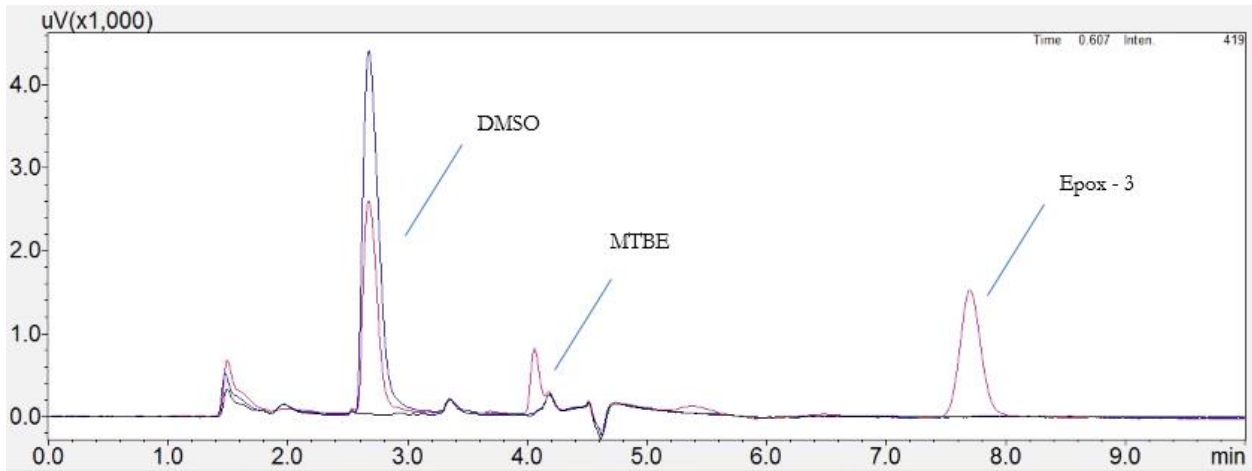
Bradfordov reagens	
$V(\text{H}_2\text{O}), \text{dm}^3$	0,85
$V(\text{EtOH}), \text{cm}^3$	50
$V(85\% \text{ H}_3\text{PO}_4), \text{cm}^3$	100
$m(\text{CBB}), \text{g}$	100

Prilog 7. Primjer GC kromatograma za epox – 3



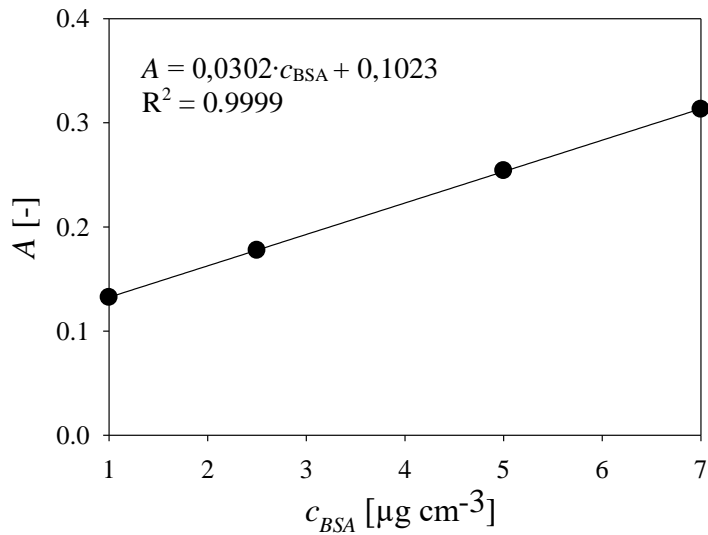
$t_{r, \text{MTBE}} = 1,469 \text{ min}$; $t_{r, \text{DMSO}} = 2,447 \text{ min}$; $t_{r, \text{epox-3}} = 4,846 \text{ min}$

Prilog 8. Primjer HPLC kromatograma za epox – 3



$t_{r,MTBE} = 2,6 \text{ min}$; $t_{r,DMSO} = 4,1 \text{ min}$; $t_{r,epox-3} = 7,6 \text{ min}$

Prilog 9. Baždarni pravac za Bradforda



Za računanje y_e uzela se je srednja vrijednost apsorbancije (A) iz 3 nezavisnih mjerenja te je iznosila 0.27033. Razrjeđenje, kako bi y_e upao u baždarni pravac, je bilo 2000 puta.

9. Životopis

Marko Pranić [REDACTED] polazi i završava Gimnaziju Bjelovar. U Zagrebu upisuje smjer Ekoinženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. 2018 je obranio završni rad preddiplomskog studija na temu RO/NF obrada komunalne otpadne vode, te potom upisuje diplomski studij na istom smjeru. Na Institutu Ruđer Bošković odrađuje stručnu praksu u zavodu za Istraživanje mora i okoliša. Kao pripravnik je boravio 7 mjeseci na Institutu Wetsus u Nizozemskoj gdje je radio na uređaju za laboratorijsko testiranje membranskih procesa. U budućnosti planira upisati doktorski studij na nekom od sveučilišta u Nizozemskoj. Znanstveno ga zanimaju biotehnologija i tehnologije obrade otpadnih i drugih voda.