

# Biokatalitička sinteza (R)-4-kloro-3-hidroksibutironitrila katalizirana s halogenhidridindehalogenazom

---

Matić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:185891>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-21**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Matic

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Matic

**BIOKATALITIČKA SINTEZA (R)-4-KLORO-3-  
HIDROKSIBUTIRONITRILA KATALIZIRANA S  
HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZOM**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Zvezdana Findrik Blažević

doc. dr. sc. Dragana Vuk

prof. dr. sc. Marija Vuković Domanovac

Zagreb, srpanj 2022.

*Najprije zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Zvezdani Findrik Blažević na izvrsnom mentorstvu - strpljenju, poticanju logičkog razmišljanja i samostalnog rada te iskazanom povjerenju i stručnom vodstvu.*

*Zahvaljujem mag.ing.oecoing. Ivani Čevič na savjetima i pomoći prilikom izvođenja eksperimentalnog dijela te utrošenom vremenu i fleksibilnosti prilikom bilo kakvog dogovora.*

*Zahvaljujem i ostatku Zavoda za reakcijsko inženjerstvo i katalizu na ugodnoj radnoj atmosferi u laboratoriju.*

*Od sveg srca zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj podršci i ljubavi tijekom cijelog života. Mama, tata i seka hvala vam što ste se veselili i plakali sa mnom i trudili se razumijeti me čak kada to i nije bilo moguće u potpunosti. Hvala vam što ste mi bili oslonac, vjerovali u mene i pružili mi i više nego što je bilo dovoljno.*

*Zahvaljujem i svim svojim prijateljima, a posebno Dori, Doriji i Katarini na brojnim utjehama, bezuvjetnoj potpori, sretnim trenucima, stvorenim uspomenama te pametnim i malo manje pametnim savjetima.*

*Velika zahvala i mojoj GASL obitelji koji su mi uvijek izlazili u susret kada je to bilo potrebno, bili mi neizmjerena podrška, vjerovali u mene i bili mi vjetar u leđa.*

## SAŽETAK

### BIOKATALITIČKA SINTEZA (*R*)-4-KLORO-3-HIDROKSIBUTIRONITRILA KATALIZIRANA S HALOGENHIDRIN-DEHALOGENAZOM

Enzimi su biokatalizatori koji kataliziraju reakcije u živim organizmima. Njihova primjena omogućuje niz prednosti, poput odvijanja reakcija u blažim uvjetima te smanjenje nastanka štetnih nusprodukata. Prirodna uloga halogenhidrin-dehalogenaza je kataliza halohidrina u odgovarajuće epoksidge (reakcija dehalogenacije), odnosno kataliza reakcije zatvaranja epoksidnog prstena pri čemu dolazi do otpuštanja halogenih iona. U ovom radu je ispitana reakcija biokatalitičke sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila uz B-tip halogenhidrin-dehalogenaze.

Sinteza optički čistih tvari izuzetno je važan dio farmaceutske industrije s obzirom na to da dva enantiomera mogu imati potpuno različita svojstva, a vrlo često jedan od njih može pokazivati štetno i toksično biološko djelovanje. Epoksidge su visoko vrijedni spojevi u organskoj sintezi zbog toga što se epoksidni prsten može kemijski transformirati u brojne sintetski korisne intermedijere. Reakcije u kojima su uključeni enzimi potrebno je pomno istražiti i okarakterizirati kako bi se mogle provoditi u industrijskom mjerilu.

Reakcija biokatalitičke sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila provedena je u kotlastom reaktoru uz natrijev cijanid kao nukleofil, a uzorci su analizirani uporabom plinske kromatografije. Ispitan je utjecaj koncentracija reakcijskih komponenti na brzinu enzimske reakcije te je pokazan nizak afinitet enzima prema supstratu i nukleofilu kod oba enzima, a također je uočen značajan inhibicijski učinak produkta. Aktivnost enzima praćena je spektrofotometrijski, a rezultati su pokazali da aktivnost kod oba enzima pada s vremenom, odnosno dolazi do njihove deaktivacije.

**Ključne riječi:** biokataliza, enzimi, halogenhidrin-dehalogenaza, epoksid, (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril

## SUMMARY

### BIOCATALYTIC SYNTHESIS OF (*R*)-4-CHLORO-3-HYDROXIBUTYRONITRILE CATALYZED WITH HALOGENHYDRINE DEHALOGENASE

Enzymes are biocatalysts that catalyze reactions in living cells. Their usage provides a number of advantages, such as conducting a reaction in milder conditions and a reduction in the occurrence of harmful by-products. The natural role of halohydrin-dehalogenases is the catalysis of halohydrins to the corresponding epoxides (dehalogenation). Halohydrin-dehalogenase catalyzes the epoxy ring closure in which halogen ions are released. In this work, the reaction of biocatalytic synthesis of (*R*)-4-chloro-3-hydroxybutyronitrile with type B halohydrin-dehalogenase was investigated.

The synthesis of optically pure substances is an extremely important part of the pharmaceutical industry since two enantiomers can have completely different properties and very often one of them can show harmful and toxic biological effects. Epoxides are highly valuable compounds in organic synthesis because the epoxy ring can be chemically transformed into a number of synthetic beneficial intermediates. Reactions involving enzymes need to be carefully investigated and characterized in order to be carried out on an industrial scale.

The biocatalytic synthesis of (*R*)-4-chloro-3-hydroxybutyronitrile was carried out in a batch reactor with sodium cyanide as a nucleophile. The samples were analyzed using gas chromatography. The influence of the concentration of the reaction components on the rate of the enzymatic reaction was tested. Low enzyme affinity for the substrate and nucleophile was observed in reactions with both enzymes. A significant inhibitory effect of the product was also shown. The activity of the enzyme was monitored by spectrophotometer and it was observed that in both enzymes there is a decrease in activity over time.

**Key words:** biocatalysis, enzymes, halohydrin-dehalogenase, epoxide, (*R*)-4-chloro-3-hydroxybutyronitrile

# Sadržaj

|   |    |
|---|----|
| <b>1. UVOD</b> .....  | 1  |
| <b>2. TEORIJSKI DIO</b> .....   | 3  |
| <b>2.1 Biokatalizatori</b> .....  | 3  |
| <b>2.1.1 Općenito o biokatalizatorima</b> .....                                       | 3  |
| <b>2.1.2 Teorije djelovanja enzima</b> .....  | 4  |
| <b>2.1.3 Podjela enzima</b> .....   | 6  |
| <b>2.1.4 Primjena enzima</b> .....  | 7  |
| <b>2.1.5 Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH)</b> .....                                  | 8  |
| <b>2.1.5.1 Upotreba HHDH u biokatalizi</b> .....                                      | 9  |
| <b>2.2 Optički čiste tvari</b> .....  | 10 |
| <b>2.2.1 Kiralnost</b> .....  | 10 |
| <b>2.2.2 Enantiomerna čistoća</b> .....   | 12 |
| <b>2.2.3 Epoksidi</b> .....   | 13 |
| <b>2.2.3.1 Općenito o epoksidima</b> .....  | 13 |
| <b>2.2.3.2 Zatvaranje i otvaranje epoksidnog prstena</b> .....                        | 14 |
| <b>2.2.3.3 Primjena epoksida u industriji</b> .....                                   | 15 |
| <b>2.2.4 (R)-4-klor-3-hidroksibutironitril</b> .....                                  | 16 |
| <b>2.3 Kotlasti reaktor</b> .....   | 17 |
| <b>2.4 Kinetika enzimskih reakcija</b> .....  | 18 |
| <b>3. EKSPERIMENTALNI DIO</b> .....   | 23 |
| <b>3.1 Aparatura</b> .....  | 23 |
| <b>3.1.1 Reakcijski sustav</b> .....  | 23 |
| <b>3.1.2 Plinski kromatograf</b> .....  | 24 |
| <b>3.1.3 Spektrofotometar</b> .....   | 25 |
| <b>3.1.4 Ostala aparatura</b> .....   | 26 |
| <b>3.1.5 Kemikalije</b> .....   | 28 |
| <b>3.2 Analitičke metode</b> .....  | 29 |
| <b>3.2.1 Analiza uzoraka plinskom kromatografijom</b> .....                           | 29 |
| <b>3.2.2 Spektrofotometrijska karakterizacija enzima</b> .....                        | 31 |
| <b>3.2.2.1 Određivanje koncentracije enzima metodom po Bradfordu</b> .....            | 31 |
| <b>3.2.2.2 Određivanje aktivnosti enzima spektrofotometrijskim testom s PNSHH</b> ... | 32 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 3.2.3 | Kinetička ispitivanja .....   | 34 |
| 3.2.4 | Provođenje reakcije u kotlastom reaktoru .....  | 38 |
| 3.2.5 | Operacijska stabilnost HHDH tijekom reakcije u kotlastom reaktoru .....   | 39 |
| 4.    | RASPRAVA I REZULTATI .....  | 42 |
| 4.1   | Koncentracija i aktivnost enzima .....  | 42 |
| 4.2   | Kinetička ispitivanja .....   | 42 |
| 4.3   | Biokatalitička sinteza ( <i>R</i> )-4-klor-3-hidroksibutironitrila katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom ..... | 48 |
| 4.4   | Operacijska stabilnost HHDH tijekom reakcije u kotlastom reaktoru .....   | 52 |
| 5.    | ZAKLJUČAK .....   | 54 |
| 6.    | POPIS POKRATA I SIMBOLA .....   | 56 |
| 7.    | LITERATURA .....  | 58 |
| 8.    | PRILOZI .....   | 65 |



## 1. UVOD

U današnje vrijeme sve se više pažnje posvećuje zaštiti okoliša, a u svrhu njegovog očuvanja prelazi se na čiste tehnologije. Čista tehnologija obuhvaća i primjenu enzima u industriji. Zbog dostupnosti velike količine enzima u okolišu te sve veće orijentacije prema zelenoj kemiji, biokatalizatori se sve više primjenjuju u brojnim industrijama. Biokataliza je otvorila vrata održivim tehnologijama i selektivnim enzimima te je na taj način omogućila prijelaz štetnih kemijskih procesa bliže onima neutralnijima za okoliš. Biokatalizatori korišteni u industrijskoj katalizi su cijele stanice organizama ili pročišćeni enzimi dobiveni rekombinantom ekspresijom enzima u stanicama domaćina ili u matičnim stanicama [1]. Tehnologija rekombinantne DNA omogućuje učinkovitu proizvodnju i modifikacije enzima s ciljem dobivanja enzima željenih svojstava te razvoja procesa prema većoj stabilnosti i učinkovitosti [2].

Katalitičko djelovanje enzima ima nekoliko prednosti u odnosu na standardne kemijske katalizatore poput jednostavnijeg puta sinteze, minimalne energetske potrebe te nastanka manje nusprodukta i otpada. Osim navedenog, biokatalitičke reakcije su brže, blaži su reakcijski uvjeti i minimalna je toksičnost za okoliš [1]. Međutim, praktična upotreba enzima kao bioloških katalizatora započeta je zapravo zbog njihove svestranosti, regio-, kemo- i enantioselektivnosti, zajedno s potrebom da kemijska industrija prijeđe na ekološki kompatibilne katalizatore i procese. Navedena svojstva enzima dovode do smanjenja troškova proizvodnje te doprinose poboljšanju konkurentnosti, pogotovo u visoko reguliranim državama. Poboljšanja procesa poput povećanja prinosa i smanjenja potrošnje sirovina, emisija i otpada kao rezultat daju manje troškove procesa što biotransformacijama daje prednost pred tradicionalnim kemijskim putevima. Iako primjena enzima kao katalizatora ima brojne prednosti, njih karakteriziraju i određeni nedostaci koji ponekad znaju onemogućiti njihovu primjenu u sintezama. Naime, enzimi imaju smanjenu stabilnost izvan prirodnog okruženja, podložni su deaktivaciji i inhibiciji, a velik problem još uvijek predstavlja njihova relativno visoka cijena [3].

Unatoč nedostacima, enzimi nalaze svoju primjenu u brojnim područjima poput proizvodnje organskih tvari (hrana, šećer, pivo, ulja, masti, kozmetika), "finskih" kemikalija, sredstva za čišćenje, a također se očekuje i brzi razvoj u polju polimera. Enzimi se primjenjuju u industriji detergenata, industriji papira, tekstilnoj industriji, kemijskoj industriji, farmaceutskoj industriji te su vrlo značajni u proizvodnji kiralnih spojeva [4]. Između navedenih, najznačajnija primjena enzima u industrijske svrhe upravo je u farmaceutskoj industriji u kojoj su enzimi ključni za

sintezu aktivnih farmaceutskih supstanci. Enzimi omogućuju dobivanje optički čistih spojeva koji se koriste kao prekursori u farmaceutskoj industriji, a velik broj konvencionalnih kemijskih procesa u farmaceutskoj industriji može biti zamijenjen korištenjem enzima što ih čini privlačnim izborom za primjenu u budućnosti. Enzimi su već sada pokazali veliki potencijal u industrijskoj primjeni zbog mogućnosti široke primjene, proizvodnje i modifikacije svojstva te će se njihova primjena sve više širiti [5].

## 2. TEORIJSKI DIO

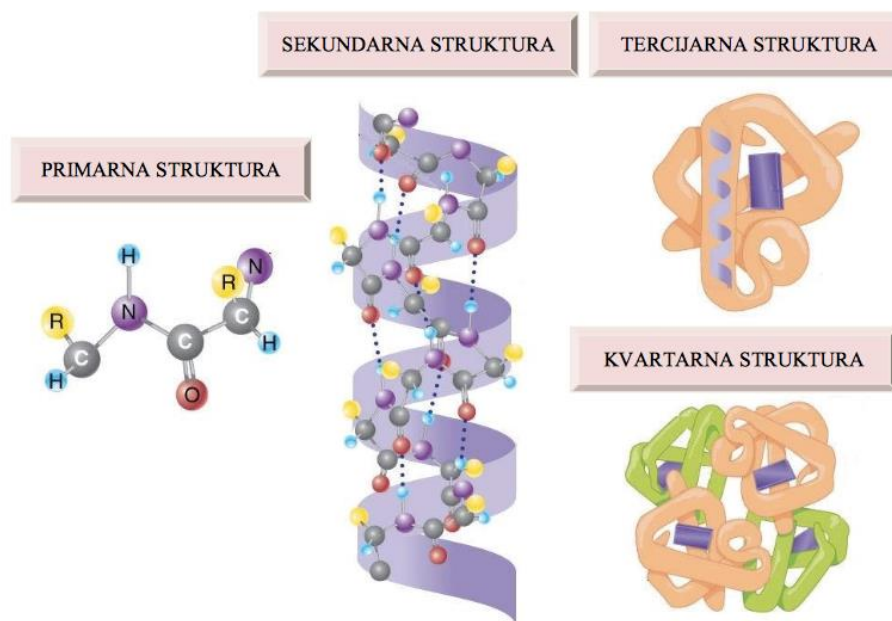
### 2.1 Biokatalizatori

#### 2.1.1 Općenito o biokatalizatorima

Biokatalizatori ili enzimi organske su makromolekule, odnosno globularni proteini koji nastaju u živoj stanici gdje djeluju kao katalizatori biokemijskih reakcija vezanih za život. Bez prisutnosti enzima, većina biokemijskih reakcija se odvija vrlo sporo ili se uopće ne odvija pri blagim uvjetima tlaka i temperature. Enzimi imaju relativno veliku molekulsku masu, a sastoje se prvenstveno od lanaca aminokiselina koje su povezane peptidnim vezama. Sve skupine enzima dobivaju se iz obnovljivih sirovina poput bakterija, biljaka, gljiva te kvasaca i plijesni te ih to klasificira kao prirodne produkte. Osim toga, enzimi pokazuju još neka kvalitetna svojstva poput biorazgradivosti, učinkovitosti, aktivnosti te stabilnosti, a osobito važna svojstva koja ih izdvajaju u odnosu na standardne katalizatore su regio, stereo i enantioselektivnost. Upravo svojstvo enantioselektivnosti razlog je širokog raspona korištenja enzima u organskoj sintezi, osobito u asimetričnoj sintezi i kinetičkoj rezoluciji kako bi se dobili čisti enantiomeri.

Budući da su enzimi evoluirali tako da efikasno kataliziraju biokemijske reakcije u blagim reakcijskim uvjetima unutar bioloških sustava posebno su primjenjivi u zelenoj kemiji. Zbog blagih reakcijskih uvjeta enzimskih procesa, oni se mogu provoditi korištenjem relativno jednostavne opreme te se mogu lako kontrolirati. Međutim, biokatalizatore karakteriziraju i određeni nedostaci poput niske stabilnosti i/ili aktivnosti u određenim radnim uvjetima te smanjenje efikasnosti. Naime, česti razlog pada efikasnosti enzima je inhibicija zbog prisutnosti određenih supstrata ili produkata reakcije, što također smanjuje i životni vijek korištenja odgovarajućeg enzima. Osim navedenih nedostataka, enzime karakterizira i visoka cijena te kompleksna struktura [6,7].

Kao što je već spomenuto, enzimi su građeni od jednog ili više polipeptidnih lanaca, koji se sastoje od aminokiselina međusobno povezanih peptidnim vezama između amino i karboksilnih skupina. Primarnu strukturu predstavlja prosječni polipeptidni lanac, prikazan na slici 1., koji je sastavljen od 500 molekula aminokiselina [8].



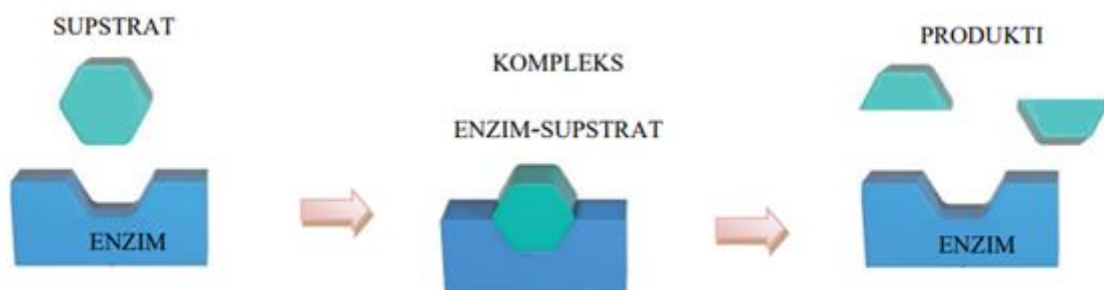
**Slika 1.** Struktura proteina - primarna, sekundarna, terciarna i kvartarna struktura

Sekundarna struktura proteina odnosi se na lokalnu strukturnu konformaciju polipeptidnih lanaca, koji izvijanjem i stvaranjem vodikovih veza tvore alfa-uzvojnice ili beta-strukture proteina, jer takvom konformacijom postižu nižu energiju makromolekule, odnosno veću stabilnost. Daljnjim savijanjem i sabijanjem lanaca dolazi do stvaranja trodimenzionalne terciarne strukture proteina. Slaganjem terciarnih struktura u veće agregate dolazi do stvaranja kvartarne strukture. Najbolji biokatalizatori dolaze upravo u obliku kvartarnih struktura, tj. globularnih kompleksa stabiliziranih disulfidnim mostovima i sekundarnim valencijskim silama [9].

### 2.1.2 Teorije djelovanja enzima

Reakcije katalizirane enzimima slijede drugačiji reakcijski put u odnosu na nekatalitičke reakcije. Kako bi se reakcija ubrzala, potreban je fizički kontakt enzima i supstrata. Postoje dvije teorije koje opisuju tu interakciju. Prva pretpostavlja međusobnu komplementarnost supstrata i enzima (slika 2.), odnosno supstrat se veže na specifični dio proteinske molekule enzima koje se zove aktivno mjesto. Da bi se supstrat mogao vezati na aktivno mjesto, prostorna

struktura tog dijela proteinske molekule i molekule reaktanta moraju si međusobno odgovarati kao brava i ključ [8,10].



**Slika 2.** Shematski prikaz hipoteze djelovanja enzima - princip ključ-brava

Druga teorija pretpostavlja da je enzim komplementaran prijelaznom stanju supstrata (slika 3.), tj. onom kemijskom obliku koji supstrat mora poprimiti pri prelasku u produkt reakcije. U oba slučaja enzim i supstrat tvore kompleks pomoću Van der Waalsovih sila, elektrostatskih sila, vodikovih veza ili nešto rjeđe pomoću kovalentnih veza. Kompleksiranje i odvajanje mora biti vrlo brzo i reverzibilno kako bi nepromijenjeni enzim mogao nastaviti svoje katalitičko djelovanje na ostalim molekulama [11]. Nakon nastajanja međuspoja u biokatalizi dolazi do prijelaza protona s molekule reaktanta na molekulu enzima, pa je biokataliza u osnovi kiselo-bazna kataliza. Konfiguracija molekule enzima utječe na biokatalizu pa tako efekt približavanja omogućava dovođenje u blizinu reaktivnih (veznih) grupa i katalitičkog centra, a efekt površine dovodi do pada polarnosti otapala u blizini površine enzima (desolvatacija molekula reaktanata). Molekule supstrata i enzima se pritom deformiraju kako bi lakše došlo do vezanja (biokatalize) [8]. Postojanje međuspoja dokazano je nizom eksperimentalnih istraživanja kao što su rendgenska analiza, spektroskopija i elektron spin rezonancija [12,13].



**Slika 3.** Shematski prikaz hipoteze djelovanja enzima – pobuđena prilagodba

Za neke enzime nije dovoljan samo fizički kontakt sa supstratom kako bi pokazali katalitičku aktivnost i ubrzali odvijanje reakcije nego je potrebna prisutnost kofaktora i koenzima na aktivnom mjestu enzima. Kofaktori su neproteinske molekule koje se ili trajno ili privremeno vežu za enzim te time znatno poboljšavaju odvijanje biokemijske transformacije. Oni su najčešće metalni ioni poput bakra, kalcija, magnezija, željeza, kalija itd., a ako se radi o organskim neproteinskim molekulama, tada se oni nazivaju koenzimi [14].

### 2.1.3 Podjela enzima

Enzimi se mogu podijeliti u 6 osnovnih skupina i to prema reakcijama koje kataliziraju. U tablici 1. prikazana je podjela enzima uz pripadajuće reakcije koje kataliziraju i svojstva koja ih karakteriziraju.

**Tablica 1.** Podjela enzima uz reakciju koju kataliziraju i svojstva koja ih karakteriziraju [15]

| Skupina enzima         | Katalizirana reakcija   | Svojstva enzima   |
|------------------------|---|---|
| <b>Oksidoreduktaze</b> | oksidacijsko/redukcijske reakcije u kojima dolazi do prijenosa elektrona, vodikovih ili kisikovih atoma | - dio su centralnog metabolizma<br>- zahtijevaju prisustvo koenzima i isključivo su unutarstanični katalizatori   |
| <b>Transferaze</b>     | reakcije u kojima dolazi do prijenosa funkcionalne skupine od donora do akceptora                       | - unutarstanični enzimi<br>- zahtijevaju prisustvo koenzima   |
| <b>Hidrolaze</b>       | hidroliza, odnosno reakcije cijepanja veze dodavanjem molekula vode                                     | - uglavnom ne zahtijevaju prisustvo koenzima<br>- velika većina je vanstanična i dovoljno robusna da bi mogle provoditi reakcije pri definiranim reakcijskim uvjetima |
| <b>Izomeraze</b>       | Izomerizacija   | - mali broj izomeraza se iskorištava tehnološki<br>- većina ih je unutarstanično  |
| <b>Liaze</b>           | eliminacija funkcionalnih skupina kidanjem kovalentnih veza   | - većina liaza zahtijeva prisustvo koenzima<br>- vanstanični enzimi   |
| <b>Ligaze</b>          | reakcije vezanja dva supstrata na teret hidrolize adenintrifosfata                                      | - isključivo unutarstanični, kompleksni enzimi  |

Enzimi se također mogu podijeliti prema njihovoj primjeni u industriji te tada razlikujemo enzime koji se primjenjuju u prehrambenoj industriji, enzime za obradu, enzime kao industrijske biokatalizatore, enzime za genetsko inženjerstvo i enzime koji se koriste u kozmetičkoj industriji [16].

#### **2.1.4 Primjena enzima**

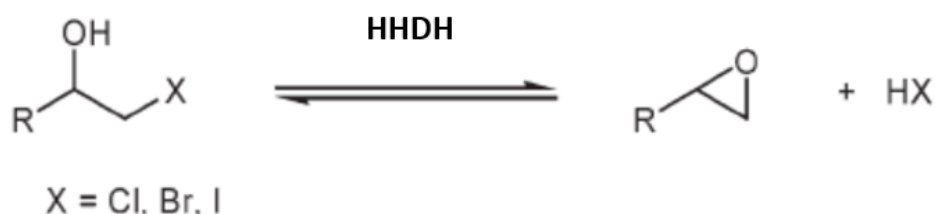
Posljednjih godina enzimi se sve više primjenjuju u biokatalizi. Biokataliza uključuje katalizu kemijskih reakcija gdje se kao katalizator koriste prirodni katalizatori, izolirani enzimi te cijele žive stanice mikroorganizama [17]. Kako je potreba za održivom proizvodnjom i razvojem selektivnih metoda za sintezu farmaceutskih međuprodukata rasla, tako je također došlo do porasta interesa za biokatalizom. Razvoj u proteinskom inženjerstvu te optimizaciji funkcija i značajka enzima uzrokovao je jednostavnije industrijske uvjete prilikom sinteza. Veliki značaj pokazuje razvoj enantioselektivne sinteze kiralnih alkohola i amina, ali kako bi se mogli koristiti u industrijske svrhe, potrebno ih je proizvoditi u velikim količinama [18]. Mikroorganizmi su glavni izvor enzima zbog svoje široke dostupnosti, velike brzine rasta i mogućnosti genetskih manipulacija kako bi se dobili enzimi željene kvalitete. Najveći doprinos u proizvodnji industrijskih enzima imaju kvasci i plijesni, zatim slijede bakterije, te u malom postotku životinjski i biljni izvori. U prirodi se nalazi oko 3000 enzima, ali u industrijske svrhe se koristi samo 5% [19,20].

Međutim, upotreba enzima nije novitet. Naime, enzimi su se ranije koristili u pivarstvu, proizvodnji sira, kod pečenja i sl. Zadnjih godina veliki doprinos korištenju enzima donio je razvoj tehnologije rekombinantne DNA i napredni bioprocesi. Razvojem ovih tehnologija omogućila se proizvodnja i pročišćavanje enzima u velikim količinama, a rezultat toga je primjena enzima u raznim industrijama poput kemijske, tekstilne, prehrambene, agrokemijske, industrije papira i slično [21]. Enzimi se u kemijskoj industriji koriste već neko vrijeme, a razvojem novih tehnologija sve više raste. Najveću primjenu enzimi imaju u proizvodnji organskih proizvoda, lijekova i sredstva za čišćenje, a uskoro je očekivana i velika primjena u polimernoj industriji [22]. Svakim danom sve više raste primjena biokatalize u farmaceutskoj industriji zbog širokog spektra mogućnosti te činjenici da enzimi pružaju alternativna zelena rješenja koja imaju velik utjecaj na smanjenje onečišćenja okoliša.

Prednost enzima kao katalizatora u farmaceutskoj industriji proizlazi iz svojstva regioselektivnosti i stereoselektivnosti čime se omogućuje lakša sinteza željenih produkata [23]. Korištenje enzima kao katalizatora u farmaceutskoj industriji doprinijelo je sintezi spojeva poput antikancerogenih, antivirusnih, antiinfektivnih, antipsihotičkih i drugih [24]. Korištenjem enzima u industrijske svrhe moguće je provoditi procese pri boljim reakcijskim uvjetima, bez potrebe za visokim temperaturama i tlakovima, pri neutralnoj pH vrijednosti i bez uporabe organskih otapala. Također, smanjuju se operacijski troškovi, toksičnost i negativan utjecaj na okoliš, a dobivaju se željeni produkti visoke čistoće [25].

### 2.1.5 Halogenhidrin-dehalogenaze (HHDH)

Halogenhidrin-dehalogenaze (još zvane haloalkohol-dehalogenaze ili vodik-halid-liaze) bakterijski su enzimi koji pripadaju posebnoj grupi enzima koji kataliziraju cijepanje halidnog iona i protona s vicinalnog halohidrina pritom formirajući epoksid. Prirodna uloga HHDH je kataliza konverzije vicinalnih halohidrina u odgovarajuće epoksidge (reakcije dehalogenacije), odnosno kataliza reakcija zatvaranja epoksidnog prstena [26,27] pri čemu dolazi do otpuštanja halogenih iona [28], shema reakcije prikazana je na slici 4.

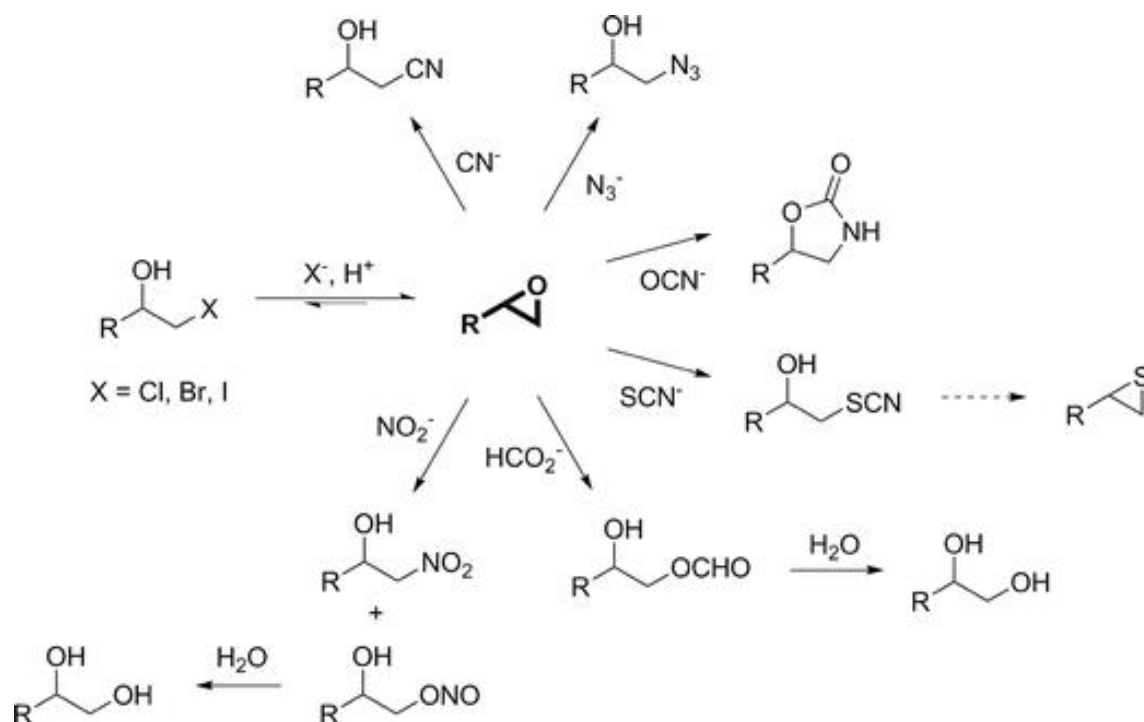


**Slika 4.** Reakcijski mehanizam dehalogenacije kataliziran halogenhidrin-dehalogenazama

Halohidrin-dehalogenaze rijetki su enzimi otkriveni tek u nekoliko bakterijskih sojeva u kojima sudjeluju u biološkoj razgradnji ksenobiotika kao na primjer epiklorhidrina, 1,3-diklor-2-propanola ili 1,2-dibrometana. Dehalogenacija ovih spojeva odvija se eliminacijom halida s haloalkohola tvoreći epoksid intramolekularnim zatvaranjem prstena [29,30].

Zahvaljujući strukturi, HHDH također mogu iskoristiti druge, negativno nabijene nukleofile poput cijanida, azida ili nitrita (slika 5.) u ireverzibilnom otvaranju epoksidnog prstena pri čemu nastaju nove C-C, C-N ili C-O veze [31].





**Slika 5.** Opseg katalitičkog djelovanja halohidrin dehalogenaza u dehalogenaciji i otvaranju epoksidnog prstena [31]

Ove rijetke enzime karakterizira nekoliko vrlo bitnih svojstva poput stabilnosti, katalitičke raznolikosti te mogućnosti primjene kao industrijskog katalizatora, a vrlo lako se mogu pripremiti standardnim rekombinacijskim ekspresijskim sustavom u stanicama *Escherichia coli* zbog čega se smatraju multifunkcionalnim biokatalitičkim alatom [32].

### 2.1.5.1 Upotreba HDDH u biokatalizi

Dehalogenacija katalizirana s HDDH ima nekoliko prednosti u odnosu na druge načine, poput ekološki prihvatljivih reakcijskih uvjeta i jeftinog početnog materijala, a također je dokazano kako su haloalkohol-dehalogenaze vrijedna alternativa kemijskim katalizatorima koji se danas koriste za dehalogeniranje halohidrina u proizvodnji epoksida [26,33]. U posljednjih nekoliko desetljeća, halogenhidrin-dehalogenaze prepoznate su kao koristan alat za proizvodnju farmaceutskih međuprodukata i biorazgradnju otrovnih kloriranih organskih spojeva. Brojni halogenirani spojevi su industrijski nusproizvodi te su štetni za okoliš pa se sugerira da haloalkohol-dehalogenaze mogu biti korisni katalizatori za njihovu biorazgradnju, s potencijalnom primjenom u bioremedijaciji. Naime, halogenhidrin-dehalogenaze su mikrobn

enzimi koji kataliziraju nukleofilno premještanje atoma halogena hidroksilnom skupinom u halogenhidrinu kako bi stvorili halid, proton te već spomenuti epoksid [34].

HHDH su trenutno u aktivnom razvoju za proizvodnju enanti čistog etil (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutirata (HN) i optički čistih epoksida i halohidrina. Optički aktivan (*R*)-HN važan je kiralni sinton za bočni lanac lijeka za snižavanje kolesterola (Lipitor), koji je član porodice statina takozvanih inhibitora HMG-CoA reduktaze koji blokiraju sintezu kolesterola u jetri [35,36]. Posljednjih se godina HHDH primjenjuje u biokatalitičkoj pripremi optički čistih proizvoda [36].

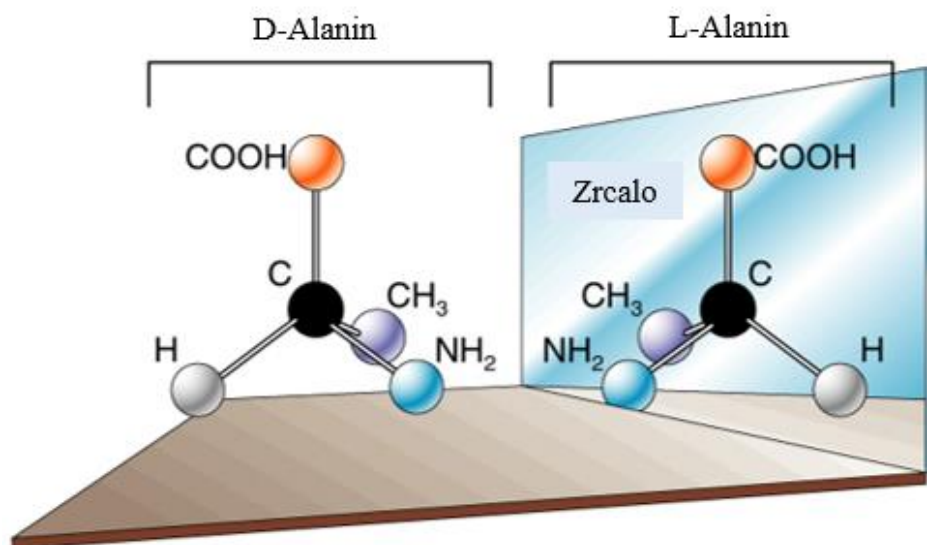
Ovi enzimi također učinkovito kataliziraju reverznu reakciju, halogeniranje epoksida i dehalogeniranje vicinalnih klorkarbonila u hidroksikarbonile [37,38]. Iako put biokatalize u kojem se halogenhidrin-dehalogenaze koriste kao katalizatori za sintezu epiklorhidrina ima velik potencijal, postoji nekoliko problema koji se javljaju prilikom navedene sinteze. Konkretno, njegova stabilnost i ponovna upotreba relativno su loši u usporedbi s mnogim drugim industrijskim biokatalizatorima. Spomenuti problemi mogu se riješiti učinkovitim imobilizacijom enzima. Imobilizacija kovalentnom vezom enzima na čvrste nosače ima višestruke prednosti, uključujući niske troškove, visoku mehaničku čvrstoću te izvrsnu termostabilnost i mogućnost recikliranja enzima za kontinuirane procese. Dakle, imobilizacija kovalentnom vezom široko je korišten pristup za imobilizaciju industrijskih enzima. Međutim, zabilježeno je malo istraživanja o imobilizaciji halogenhidrin-dehalogenaza kovalentnom vezom [34].

## 2.2 Optički čiste tvari

### 2.2.1 Kiralnost

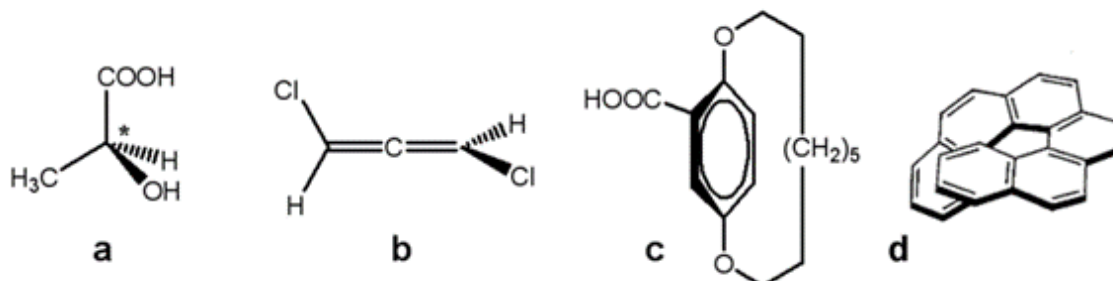
Kiralnost je čisto geometrijsko svojstvo, odnosno jedna od osnovnih pojava u prirodi i karakteristična je za živi svijet i njegove osnovne građevne jedinice poput aminokiselina, šećera i lipida. Molekula je kiralna kada se ne može preklopiti s vlastitom zrcalnom slikom, poput dlanova ruke (grč. *χείρ* (*cheír*) - ruka), a akiralna kada se ne može preklopiti s vlastitom zrcalnom slikom. Molekule koje su u zrcalnom odnosu, tj. odnose se kao predmet i njegova

slika, a ne mogu se preklopiti, nazivaju se enantiomerima (slika 6.), dok se smjesa dvaju enantiomera u molarnom omjeru 1:1 naziva racemičnom smjesom.



**Slika 6.** Enantiomeri aminokiseline alanina

Stereoizomeri imaju identičnu kemijsku strukturu, tj. atomi u molekuli povezani su na isti način, ali je prostorni raspored atoma drugačiji. Stereoizomeri se dijele na konformacijske i konfiguracijske, a konfiguracijski opet na geometrijske i optičke. U geometrijske stereoizomere ubrajamo cis i trans-izomere, dok optičke stereoizomere čine enantiomeri i dijastereomeri. Razlika u prostornom rasporedu atoma unutar molekule može uzrokovati razliku u biološkim svojstvima optičkih stereoizomera, odnosno enantiomera i dijastereomera. Postoje četiri oblika kiralnosti: središnja, osna, planarna i helikoidalna kiralnost (slika 7.), a kod molekula je najčešća središnja kiralnost [39,40,41,42].



**Slika 7.** Četiri oblika kiralnosti: središnja (a), osna (b), planarna (c) i helikoidalna (d) [40]

Enantiomeri pokazuju optičku aktivnost odnosno zakreću ravninu polarizirane svjetlosti za isti iznos kuta, ali u suprotnim smjerovima. Prema tome u kojem smjeru zakreću ravninu, razlikujemo (*R*)-enantiomere (lat. *rectus* – desni) i (*S*)-enantiomere (lat. *sinister* – lijevi) [43].

### 2.2.2 Enantiomerna čistoća

Kiralni spoj koji je smjesa jednakih količina enantiomera naziva se racemat (racemična smjesa) te ne pokazuje optičku aktivnost. Optička aktivnost podrazumijeva zakretanje ravnine polariziranog svjetla za određeni broj stupnjeva. Otopina čistog enantiomera pokazuje maksimalno skretanje ( $\alpha_{\max}$ ). Smjesi enantiomera koja nije racemična može se izmjeriti optičko skretanje ( $\alpha_{\text{exp}}$ ) te ukoliko je poznat podatak  $\alpha_{\max}$ , moguće je odrediti optičku čistoću (OP) spoja prema jednadžbi (1) [44]:

$$OP(\%) = \frac{\alpha_{\text{exp}}}{\alpha_{\max}} \cdot 100 \quad (1)$$

U idealnom slučaju, doprinos pojedinog enantiomera u optičkom skretanju je direktno proporcionalan molarnom udjelu enantiomera. Mjerenje optičkog skretanja je tradicionalna metoda određivanja sastava neracemične smjese enantiomera. Međutim, pokazalo se kako eksperimentalno određeno optičko skretanje nije uvijek u linearnoj vezi s optičkom čistoćom. Zato je 1971. godine uveden termin enantiomerni višak (*ev*) koji govori koliko je uzorak enantiomerno čist i računa se prema jednadžbi (2) [45]:

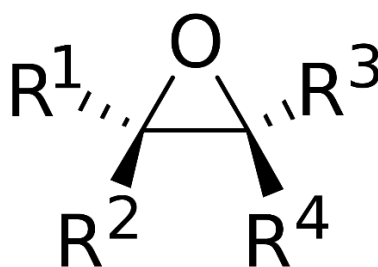
$$ev = |\%R - \%S| = \left| \frac{R-S}{R+S} \cdot 100 \right| \quad (2)$$

Dakle, enantiomerni višak od 100 % označava enantiomerno čist spoj, dok vrijednost od 0 % označava racemičnu smjesu. Enantiomerni višak od 80 % znači da imamo smjesu 90 % jednog enantiomera i 10 % drugoga, odnosno imamo 80 % čistog enantiomera i 20 % racemata koji ne utječe na optičku aktivnost. Određivanje enantiomernog viška zahtijeva zasebno određivanje količine pojedinog enantiomera u smjesi, što je omogućeno razvojem kiralnih kromatografskih metoda i metoda NMR spektroskopije 60-ih i 70-ih godina prošlog stoljeća [44].

### 2.2.3 Epoksidi

#### 2.2.3.1 Općenito o epoksidima

Epoksidi su ciklički eteri koji u tročlanom prstenu sadrže kisikov atom, tj. sadrže djelomično pozitivno nabijene atome ugljika i bazični kisik (slika 8.). Polarnost prstena čini epokside vrlo reaktivnima, uključujući i nukleofile i elektrofile, kiseline i baze [46].



**Slika 8.** Struktura epoksidnog prstena

Budući da je tročlani prsten epoksida dosta napregnut, to ih čini mnogo reaktivnijim prema nukleofilnoj supstituciji od ostalih etera [47]. Reaktivnost epoksidnog prstena povećava se reakcijom njihovog otvaranja te nakon toga slijedi nukleofilna adicija. Ako se radi o vodenom mediju, dolazi do adicije vode, odnosno nastajanja hidroksilne skupine [48]. Voda djeluje kao nukleofil te napada protonirani epoksid sa strane nasuprot epoksidnoj skupini, odnosno dolazi do  $S_N2$  nukleofilnog napada gdje nukleofil napada manje ometani ugljik na epoksidnom prstenu i cijepa C-O vezu [49]. Međutim, do otvaranja epoksidnog prstena može doći i drugim putem, odnosno tijekom bazne katalize do koje će doći ukoliko je epoksid asimetričan. U tom slučaju nukleofil će napasti manje supstituirani ugljik.

Budući da su epoksidi vrlo reaktivni, to ih čini kancerogenima jer prolaze vrlo lagane nukleofilne reakcije supstitucije s DNK. Nukleofilna mjesta na DNK reagiraju na otvaranje epoksidnog prstena, uzrokujući alkiliranje DNK stvaranjem kovalentne veze s karcinogenom [47].

U enzimskim reakcijama epoksid se ponaša kao supstrat, a upravo o supstratu ovise enzimska aktivnost i brzina reakcije. Enzimi su vrlo specifični prema supstratima te ih upravo to čini vrlo privlačnima za primjenu u brojnim industrijama. Budući da halogenhidrin-halogenaze u prirodi služe kao katalizatori reakcija dehalogenacije popraćene zatvaranjem epoksidnog prstena, ne

čudi činjenica da su alifatski i aromatski vicinalni halohidriini pogodni supstrati za halogenhidrin-dehalogenaze [32].

### 2.2.3.2 Zatvaranje i otvaranje epoksidnog prstena

Tijekom reakcije dehalogenacije, odnosno zatvaranja epoksidnog prstena dolazi do transfera protona što se odvija preko mreže vodikovih veza uspostavljenih između bočnih lanaca aminokiselina i molekula vode iz otapala. Kao posljedica nukleofilnog napada, dolazi do pucanja veze ugljik-halogen (C-X veze) i otpuštanja halogenidnog iona koji se stabilizira na anionskom veznom mjestu enzima. Razna istraživanja su pokazala da su reakcije zatvaranja prstena vicinalnih halohidrina reverzibilne. U slučaju ove reakcije, reverzibilnost se smatra nedostatkom zbog toga što je ona uzrok nepotpune konverzije vicinalnog halohidrina u epoksid [26]. Međutim, reverzibilnost se može umanjiti premještanjem ravnoteže reakcije na stranu produkata uklanjanjem epoksida iz reakcijske smjese različitim kemijskim reakcijama [32].

Mehanizam obrnut od mehanizma zatvaranja epoksidnog prstena je otvaranje epoksidnog prstena koje podrazumijeva nukleofilni napad uz protoniranje kisika prilikom čega nastaje veza između ugljika i halogenida [50]. Kemijske metode koje se primjenjuju za otvaranje epoksidnih prstenova imaju nisku regioselektivnost, potrebna im je visoka temperatura, prisutnost Lewisove kiseline kao katalizatora, zahtijevaju upotrebu raznih organskih otapala te se reakcija odvija dugo. Za razliku od kemijskih metoda, biokatalitičke reakcije otvaranja epoksidnih prstenova ne zahtijevaju navedene uvjete, nego upravo suprotno. Naime, biokatalitičkim reakcijama otvaranja prstena epoksida (s cijanidima) potrebni su blagi uvjeti, vodeni medij, a reakcije su visoko regio- i enantioselektivne. Međutim, visoka selektivnost u ovom slučaju može biti i neželjena jer je moguće dobiti samo jedan stereoizomer željenog produkta. Osim toga, još jedan nedostatak ovih reakcija je smanjena aktivnost u prisutnosti nenabijenih nukleofila poput amonijaka i vode te ograničenje na terminalne epoksidne supstrate [26,32].

### 2.2.3.3 Primjena epoksida u industriji

Epoksidi imaju širok spektar upotrebe, koriste se kao sirovina u brojnim sintezama, kao omekšivači i stabilizatori, prekursori u raznim reakcijama te drugo. Epoksidi su naročito važni u farmaceutskoj industriji upravo zbog svoje velike reaktivnosti, radi čega mogu služiti kao reaktanti u brojnim reakcijama za dobivanje raznih organskih spojeva [51]. Primjer jedne takve reakcije je dobivanje (*R*)-4-cijano-3-hidroksibutirata koji služi kao važan prekursor u proizvodnji lijeka za snižavanje kolesterola, a dobiva se upravo iz epoksidnog prstena s cijanidima koji je nastao u reakciji dehalogenacije (*S*)-4-klor-3-hidroksibutirata [52,53,54].

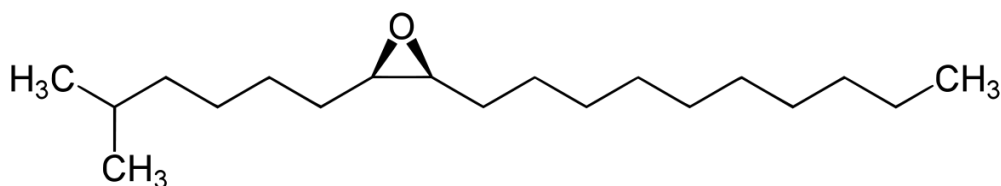
Također, zahvaljujući velikoj reaktivnosti epoksida, oni su najčešće prekursori u raznim biološkim reakcijama. Zbog velike reaktivnosti epoksida, spoj vrlo lako prelazi u konačni produkt što može biti kolesterol ili neki od steroidnih hormona (testosteron, kortizon i slično). Osim toga, epoksidi su vrlo važni prekursori u procesu pretvorbe esencijalne aminokiseline L-fenilalanina u neesencijalnu aminokiselinu L-tirozin. Ovaj proces je bitan jer će kod osoba s manjkom enzima za pretvorbu tih aminokiselina, sav dostupan L-fenilalanin biti preveden metaboličkim reakcijama u fenilpirogrožđanu kiselinu, a ta kiselina može biti uzrok retardacije kod male djece [55].

Nadalje, etilen-oksidi, koji je prvi sintetizirani epoksid, primjenjuje se u plinovitom obliku za sterilizaciju medicinske opreme koji ne podnose visoke temperature. To se provodi na način da se medicinski instrumenti i pribor u posebnim komorama izlože djelovanju para etilen-oksida na temperaturi od 45 do 65 °C. Tako se steriliziraju predmeti poput štrcaljki, jednokratnih sterilnih plastičnih proizvoda i rublja te kirurških konaca [56].

Propilen-oksidi koriste se u raznim sintezama, kao otapalo u smolama i ljepilima te kao sastojak pesticida i rashladnih tekućina. Epoksidirane masne kiseline koriste se kao omekšivači i stabilizatori u preradi polivinilklorida gdje reagiraju s klorom nastalim raspadom polivinilklorida [57].

Osim toga, postoji epoksid koji se naziva disparlur (*cis*-7,8-epoksi-2-metiloktadekan), prikazan na slici 9., kojeg proizvode ženke moljaca kako bi privukle mužjake. Naime, kad mužjaci osjete prisusnost tog feromona, prate miris do izvora te na taj način pronalaze svoj par. Ovaj spoj pronašao je svoju primjenu u sprječavanju razmnožavanja moljaca tako da se sintetski spoj disparlur nanese na zaraženo područje čime se privuku mužjaci koji zatim postaju zbunjeni jer

ne mogu detektirati prisustvo plodne ženke moljca, dok one žive odvojeno od mužjaka. Ovim načinom kontrolira se širenje moljaca [55].



**Slika 9.** Disparlur

#### 2.2.4 (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril

Cijanohidriini su oduvijek bili važni i kao kemikalije i kao reagensi u raznim organskim sintezama. Posebno su se istaknuli u sintezama kiralnih lijekova te fiziološki aktivnih spojeva. Optički aktivni cijanohidriini korisni su kao prekursori u sintezi kiralnih karboksilnih kiselina i alkohola [53]. Iz tog se razloga posljednjih godina značajno radi na razvoju kemijskih i enzimskih metoda u kojima se upravo optički aktivni cijanohidriini koriste kao prekursori u spomenutim sintezama. Kemijske metode uključuju diastereoselektivno i enantioselektivno dodavanje trimetilsilil cijanida aldehidima u prisutnosti kiralnih katalizatora, dok enzimске metode uključuju enantioelektivnu hidrolizu, esterifikaciju cijanohidrina lipazom te enantioselektivno dodavanje HCN-a aldehidima i ketonima uz oksinitrilazu kao katalizator [59,60,61].

Posljednjih godina došlo je do napretka u sintezi optički aktivnog 4-klor-3-hidroksibutironitrila, koji je vrsta klorcijanohidrina, iz optički aktivnog epiklorhidrina [62,63,64,65]. (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril koristi se kao prekursor L-karnitina koji igra važnu ulogu u ljudskom metabolizmu i transportu dugolančanih masnih kiselina u membrani mitohondrija [66,67]. S druge strane, (*S*)-4-klor-3-hidroksibutironitril koristi se kao ključna struktura u sintezi inhibitora HMG-CoA reduktaze, što je enzim koji ograničava brzinu biosinteze kolesterola [68,69,70]. Osim navedenog, (*S*)-4-klor-3-hidroksibutironitril se također koristi i u sintezi fiziološki aktivnog vitamina D koji ima važnu ulogu u imunološkom sustavu [71,72]. Optički aktivni hidroksibutironitril lako se pretvara u razne biološki bitne spojeve poput 4-amino-3-hidroksimaslačne kiseline i 4-hidroksipirrolidona iz 4-klor-3-hidroksibutanoata [73,74,75,76,77]. Na temelju navedenog, može se zaključiti kako je optički aktivni



hidroksibutironitril ključan u sintezi brojnih kiralnih lijekova zbog čega je sve veći broj istraživanja na temu sinteze hidroksibutironitrila [78].

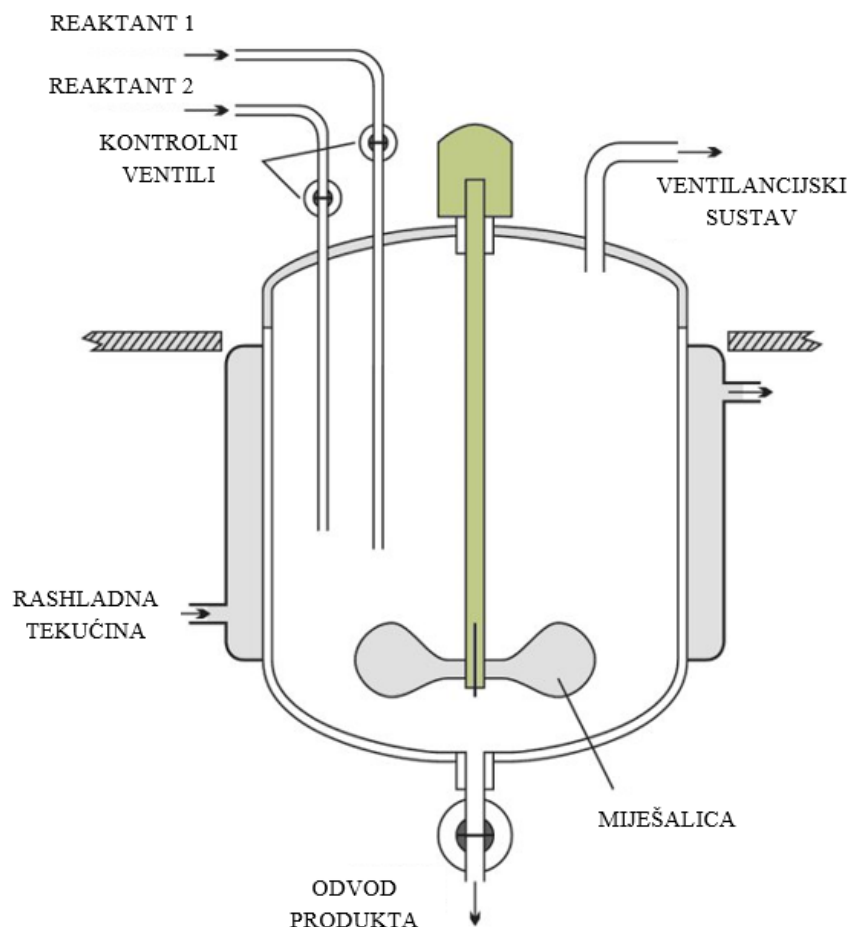
### 2.3 Kotlasti reaktor

Kotlasti reaktori (eng. *batch reactors*) pripadaju grupi kemijskih reaktora koji su zatvoreni sustavi. U kemijskim reaktorima ne dolazi do izmjenjivanja sadržaja s okolinom tijekom reakcije, odnosno sva količina reakcijske mase u kotlastom reaktoru se unese na početku reakcije. Kemijske i toplinske promjene ovisne su o vremenu, a unutar reaktora te veličine su iste u svakom njegovom dijelu. Što se tiče konstrukcije, kotlasti reaktori su valjkaste posude koje imaju zaobljeno dno i odgovarajući uređaj za prijenos topline i miješanje. Najčešće su na njih povezana odgovarajuća kontrolna i mjerna osjetila, sigurnosne brtve, cjevovodi i ventili koji služe za unos i izvođenje reakcijske smjese itd. Reaktori su valjkastog oblika zbog konstruktivnih razloga poput lakše proizvodnje, mogućnosti postizanja višeg tlaka te boljeg miješanja i lakšeg čišćenja [79]. Veličina reaktora se kreće od 1 L do 15 000 L, a materijali od kojih su izrađeni su najčešće nehrđajući čelik, staklo, keramika, plastika, cement i pleksiglas. Reaktanti se unose cjevovodima na vrhu poklopca reaktora, dok se produkti odvođuju cjevovodima na dnu reaktora [80].

Izbor prikladnog reaktora za provođenje reakcije ovisi o mnogo čimbenika kao što su kapacitet proizvodnje, cijena sirovine, ekološki zahtjevi, investicijski troškovi, a najviše o vrsti kemijske reakcije koja se provodi. Kako bi se pravilno odabrao reaktor potrebno je što detaljnije poznavati fizičke i kemijske osobine reakcija, od kojih su najvažnije: kemizam reakcije, termodinamika reakcije, podaci o kinetici reakcije, podaci o fizičkim svojstvima sudionika u reakciji, podaci o katalizatorima (gustoća katalizatora, poroznost, raspodjela veličina pora, aktivna površina, selektivnost, sastav, mehaničke karakteristike, itd.).

Jedna od prednosti kotlastog reaktora uz dotok supstrata je prilagodljivost promjeni reakcijskih uvjeta što znači da se dodavanje reaktanata može jednostavno količinski i vremenski programirati, temperatura se može lako programirati tako da bude optimalna tijekom reakcije s obzirom na selektivnost jednog produkta, a vrijeme trajanja reakcije moguće je po potrebi skratiti. Također, još jedna prednost kotlastog reaktora je mogućnost dobre i jednolične suspenzije vrlo sitnih čestica katalizatora u kapljevitoj fazi čime se postiže dobar kontakt s

reaktantima i postiže se velika aktivna površina [81]. Shema kotlastog reaktora prikazana je na slici 10.



**Slika 10.** Shema kotlastog reaktora

## 2.4 Kinetika enzimskih reakcija

Određivanje kinetike enzima odnosi se na proučavanje brzine enzimski kataliziranih reakcija. Najčešće korištena metoda određivanja kinetike je metoda početnih brzina. Provedba ove metode temelji se na mjerenju brzine reakcije pri niskoj konverziji supstrata  $< 10\%$  tako da se povratna reakcija ili inhibicije mogu zanemariti [79]. Mjerenjem početnih brzina moguće je odrediti konstantu napredujuće reakcije. Potrebno je provoditi niz eksperimenata pri različitim koncentracijama, kako bi se dobilo više mjernih podataka. Prati se promjena koncentracije u vremenu te se grafički prikazuje. Na dobivenu krivulju povuče se tangenta u  $t = 0$  i odredi se

nagib koji predstavlja početnu brzinu reakcije,  $r_{s0}$ , pri određenoj koncentraciji supstrata,  $c_{s0}$  (jednadžba 3).

$$r_{s0} = \frac{dc_{s0}}{dt} \quad (3)$$

Zatim se grafički prikazuju parovi vrijednosti koncentracije supstrata o brzini reakcije [82].

Enzimska kinetika opisuje se pomoću Michaelis-Menteničine jednadžbe. Također, ta se jednadžba naziva i kinetika zasićenja jer su Michaelis i Menten prepostavili da su enzim i supstrat u ravnoteži tijekom katalize i da brzina stvaranja produkta ne narušava tu ravnotežu. Kinetika zasićenja može se prikazati jednostavno reakcijskom shemom (jednadžba 4) koja uključuje reverzibilnu reakciju formiranja enzim-supstrat kompleksa te stvaranje produkta i oslobađanje nepromijenjenog enzima [83].



Pomoću navedenog mehanizma dolazi se do Michaelis-Menteničine jednadžbe (jednadžba 5):

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s} \quad (5)$$

gdje je u  $r_s$  [ $\text{mmol dm}^3 \text{ min}^{-1}$ ] brzina reakcije,  $c_s$  [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ] koncentracija supstrata,  $V_m$  [ $\text{mmol dm}^3 \text{ min}^{-1}$ ] maksimalna brzina reakcije i  $K_m$  [ $\text{mmol dm}^{-3}$ ] Michaelisova konstanta.

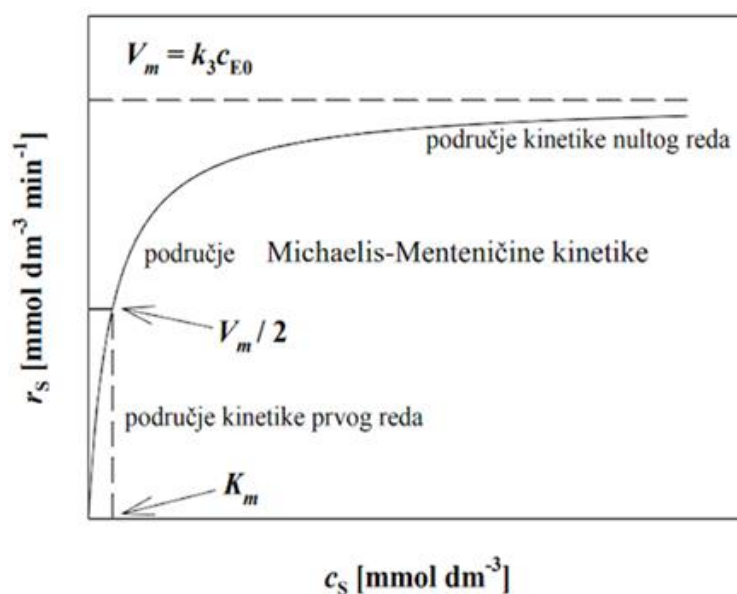
Kao što se može vidjeti jednadžba ima dva parametra,  $V_m$  koji predstavlja maksimalnu brzinu reakcije i Michaelisovu konstantu  $K_m$ . Maksimalna brzina reakcije je umnožak katalitičke konstante enzima  $k_3$  i njegove koncentracije  $c_{E0}$  (jednadžba 6) što znači da ju je moguće promijeniti promjenom koncentracije enzima, dok Michaelisova konstanta predstavlja omjer kinetičkih konstanti  $k_1$ ,  $k_2$  i  $k_3$  (jednadžba 7).

$$V_m = k_3 \cdot c_{E0} \quad (6)$$

$$K_m = \frac{k_1 + k_3}{k_2} \quad (7)$$

Michaelisova konstanta  $K_m$  odgovara koncentraciji supstrata pri kojoj je brzina reakcije jednaka polovini maksimalne brzine. Konstanta opisuje afinitet prema supstratu, veća konstanta odgovara manjem afinitetu [9].

Michaelis-Menteničina kinetika prikazuje se grafički kao ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata te je karakterizira hiperboličan oblik. (Slika 11.) Krivulja se može podijeliti na tri dijela. U području niskih koncentracija brzina reakcije proporcionalno raste s koncentracijom, a koncentracija supstrata je puno manja od Michaelisove konstante ( $K_m \gg c_s$ ). To područje je definirano kinetikom prvog reda. U području visokih koncentracija, brzina reakcije ne ovisi o koncentraciji supstrata te je Michaelisova konstanta puno manja od koncentracije supstrata ( $K_m \ll c_s$ ). To područje je definirano kinetikom nultog reda. Između ta dva područja nalazi se područje u kojem vrijedi Michaelis-Menteničina jednadžba [84].



**Slika 11.** Ovisnost brzine reakcije o koncentraciji supstrata za Michaelis-Menteničinu jednadžbu

Navedena Michaelis-Menteničina jednađžba (jednađžba 5) vrijedi za jednosupstratnu enzimsku reakciju. Prilikom dvosupstratne enzimске reakcije poprima oblik:

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_{s1} \cdot c_{s2}}{(K_{m,s1} + c_{s1}) \cdot (K_{m,s2} + c_{s2})} \quad (8)$$

Osim broja supstrata na brzinu enzimске reakcije utječe i inhibicija enzima. Inhibitori su molekule koje smanjuju ili usporavaju enzimsku aktivnost. Inhibitori zauzimaju slobodno aktivno mjesto enzima i na taj način smanjuju njegovu aktivnost [85]. Inhibitori mogu biti reverzibilni ili ireverzibilni. Reverzibilni inhibitori naknadno disociraju, dok se ireverzibilni trajno vežu na enzim i trajno smanjuju njegovu aktivnost [83]. U enzimski kataliziranim reakcijama dolazi do pojave tri vrste inhibitora: kompetitivni, nekompetitivni i antikompetitivni inhibitori. Kod kompetitivnih inhibitora supstrat i inhibitor su oba konkurenti za interakciju s aktivnim mjestima enzima. Inhibitori se vežu za aktivna mjesta i na taj način smanjuju broj aktivnih mjesta za vezanje supstrata. Nekompetitivni inhibitori reagiraju s enzimom na mjestu koje se razlikuje od aktivnog mjesta, pa fizički ne blokiraju mjesto vezivanja supstrata, ali mu otežavaju djelovanje. Dok je antikompetitivna inhibicija prilično rijetka, a inhibitor djeluje tako da se veže na enzim nakon što se molekula supstrata već vezala [82,86]. Michaelis-Menteničini izrazi za kompetitivnu, nekompetitivnu i antikompetitivnu inhibiciju dani su jednađžbama 9-11, a u jednađžbama  $c_i$  [mmol dm<sup>-3</sup>] predstavlja koncentraciju inhibitora, a  $K_i$  [mmol dm<sup>-3</sup>] konstantu inhibicije [9].

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right) + c_s} \quad (9)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (10)$$

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{(K_m + c_s) \cdot \left(1 + \frac{c_i}{K_i}\right)} \quad (11)$$

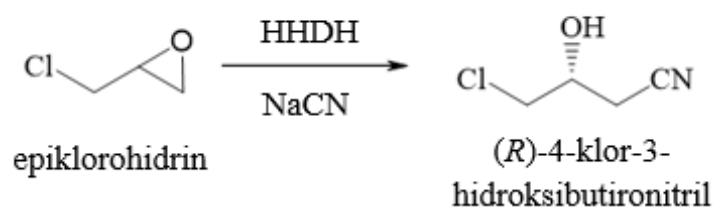
Inhibicijski učinak na enzimsku aktivnost mogu imati supstrati (Michaelis-Menteničina jednačba s inhibicijom supstratom, jednačba 12), ali i dobiveni produkti te se uočava kao smanjenje brzine reakcije. Smanjenje brzine reakcije također mogu uzrokovati i drugi čimbenici poput temperature, pH vrijednosti, ionska snaga otapala i slično, no ti utjecaji su najčešće izbjegnuti ispitivanjem optimalnih uvjeta te kontroliranim provođenjem reakcije [87].

$$r_s = \frac{V_m \cdot c_s}{K_m + c_s + \frac{c_s^2}{K_i}} \quad (12)$$

Uz pomoć spomenutih modela, iz parova eksperimentalnih podataka za početnu reakcijsku brzinu i koncentraciju te nelinearne regresijske analize procjenjuju se kinetički parametri [9]. Dobiveni kinetički model se kombinira s jednačbama tvari za kotlasti reaktor kako bi se simulirala vremenska promjena koncentracije supstrata i produkta. Dobiveni matematički model se mora eksperimentalno potvrditi, odnosno validirati, a model je validiran ukoliko se eksperimentalni podaci slažu s onim dobivenim simulacijom, uz prihvatljivu pogrešku [88]. Validirani model koristi se za optimizaciju procesa, odabir odgovarajućeg reaktora i procesnih uvjeta [89].

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

Cilj rada bio je provesti reakciju otvaranja prstena epiklorhidrina uz cijanid kao nukleofil te enzim halogenhidrin dehalogenazu (HheB2-T120A i HheB2-36-120-124-125) kao katalizator. Reakcija je provedena u kotlastom reaktoru te je prikazana na slici 12. Koncentracije utrošenog epoksida u reakciji te nastalog produkta praćene su na plinskom kromatografu, dok je aktivnost enzima tijekom reakcije praćena spektrofotometrijski.

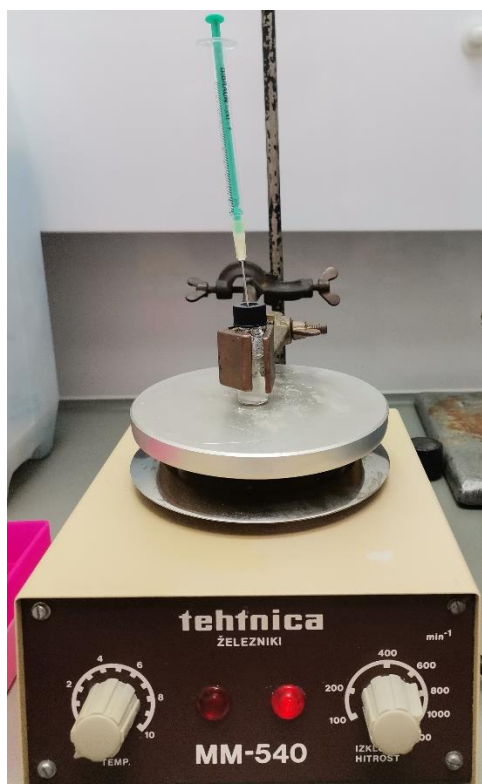


**Slika 12.** Shema biokatalitičke sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom

#### 3.1 Aparatura

##### 3.1.1 Reakcijski sustav

Reakcije su provedene u sustavu prikazanom na slici 13. Reakcijski sustav sastojao se od kotlastog reaktora kojeg su predstavljale bočice od 5 mL, magnetske miješalice MM-540 Tehtnica (Železniki, Slovenija) pri 700 okr min<sup>-1</sup> i magneta za postizanje homogenih uvjeta te igle i šprice za uzorkovanje reakcijske smjese.



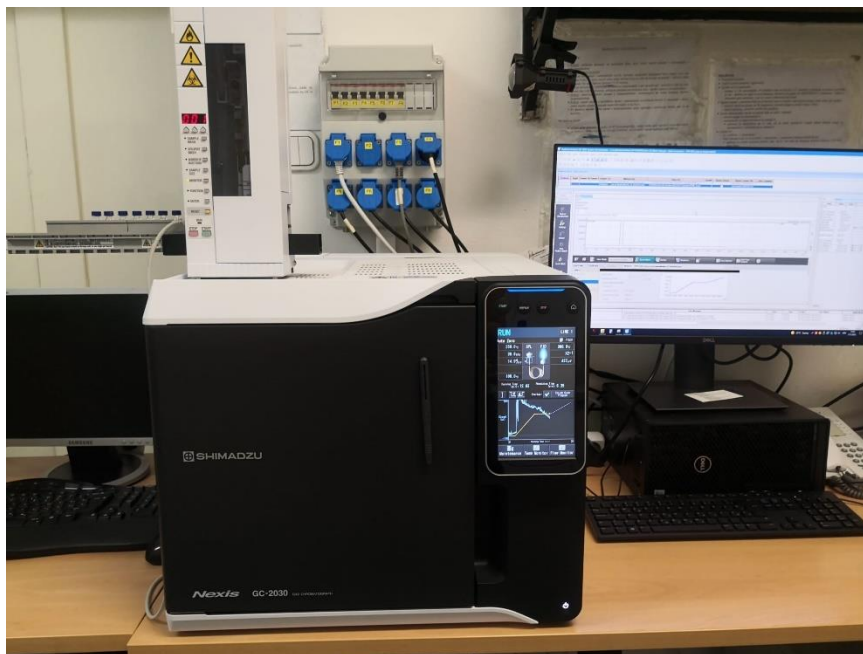
Slika 13. Reakcijski sustav

### 3.1.2 Plinski kromatograf

Plinski kromatograf je analitički instrument koji služi za mjerenje kvantitativnog i kvalitativnog sastava različitih komponenti u uzorku. Analiza koja se provodi plinskim kromatografom naziva se plinska kromatografija (engl. *Gas chromatography*, GC). Načelo plinske kromatografije kaže kako uzorak injektiran u instrument ulazi u plinski tok koji ga prenosi do cijevi za separaciju, odnosno do kolone. Kao plin nosioc koriste se ili helij ili dušik. Različite komponente separiraju se unutar kolone, a detektor mjeri količinu komponenti koje izlaze iz kolone. Stacionarna faza može biti čvrsta ili tekuća, a mobilna je plinovita. Komponente se pod utjecajem mobilne faze kreću kroz stacionarnu fazu različitom brzinom i tako se razdvajaju. Dobiveni kromatogrami kvalitativno i kvantitativno određuju sastav plinovitog ili tekućeg uzorka. Kvalitativna analiza se provodi prema vremenu zadržavanja komponenti, dok kvantitativna analiza uzorka podrazumijeva integriranje pikova odgovarajućih komponenti. Uzorci su analizirani na uređaju GC-2030 (Shimadzu, Japan) koji je prikazan na slici 14. Osnovne komponente korištenog GC sustava su Parker 9150 generator vodika, plinski kromatograf koji se sastoji od peći za grijanje kolone, injektora, regulatora tlaka plina nosača i zraka te plameno ionizacijskog detektora (engl.



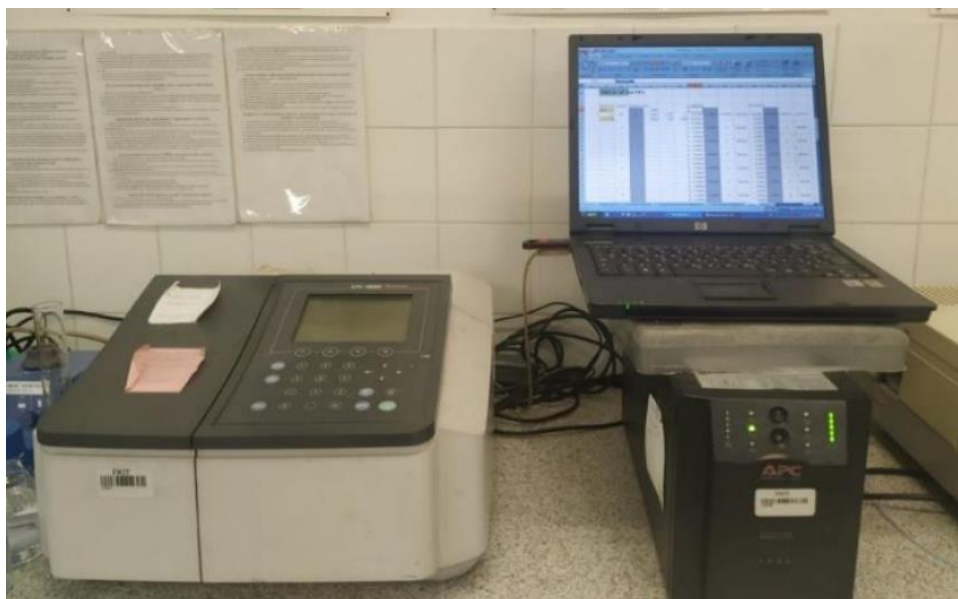
*Flame ionization detector*, FID). Cijelim sustavom upravlja softver *GC Solution*. Uzorak se unosi pomoću sustava za automatsko injektiranje AOC-20i (Shimadzu, Japan).



**Slika 14.** Plinski kromatograf

#### 3.1.3 Spektrofotometar

Spektrofotometrija je analitička metoda kojom se određuju koncentracije tvari u uzorku indirektnim mjerenjem količine apsorbirane svjetlosti određene valne duljine, a zasniva se na Lambert-Beerovom zakonu. Svjetlost se iz izvora širi i kroz pukotinu usmjerava na monokromator te se time dobije svjetlost točno određene valne duljine. Zatim se zraka usmjerava na kvarcnu kivetu s uzorkom koji apsorbira dio svjetlosti, a izlazna zraka smanjenog intenziteta usmjerava se na detektor koji očitava signal. Određivanje aktivnosti enzima provedeno je na UV-1800 spektrofotometru (Shimadzu, Japan) prikazanom na slici 15., a podaci su obrađivani pomoću programa *UV Probe* (Shimadzu, Japan).



**Slika 15.** Spektrofotometar UV-1800

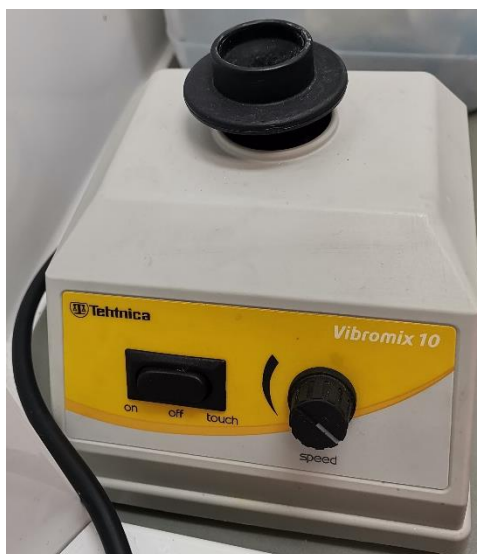
### 3.1.4 Ostala aparatura

Vaganje uzoraka provedeno je na AUW120 vagi (Shimadzu, Japan) prikazanoj na slici 16.



**Slika 16.** Vaga AUW120

Miješanje i ekstrakcija uzoraka provedeni su na miješalici Vibromix 10 (Tehtnica, Slovenija) prikazanoj na slici 17.



**Slika 17.** Miješalica Vibromix 10

Odvajanje enzima od reakcijske smjese provedeno je u centrifugi Multifuge 3 (S)-R (Heareus, Njemačka) prikazanoj na slici 18.



**Slika 18.** Centrifuga Multifuge 3 (S)-R

U radu je korištena i Eppendorf tresilica ThermoMixerC (Eppendorf, Njemačka) prikazana na slici 19.



Slika 19. Eppendorf tresilica

### 3.1.5 Kemikalije

U tablici 2. prikazane su kemikalije koje su korištene u eksperimentalnom dijelu rada s navedenim proizvođačima.

**Tablica 2.** Korištene kemikalije

| Kemikalija   | Proizvođač                                |
|--|---|
| Metil <i>terc</i> -butil eter (MTBE)   | Sigma-Aldrich Corporation                 |
| Tris-SO <sub>4</sub> (2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer) | Sigma-Aldrich Corporation                 |
| ( <i>R</i> )-epiklorhidrin   | MERCK-Schuchardt                          |
| Dimetil sulfoksid (DMSO)   | Sigma-Aldrich Corporation, SAD            |
| NaCN   | Sigma-Aldrich Corporation                 |
| 1-( <i>p</i> -nitrofenil)-2-brometanol   | Sintetizirano na Institutu Ruđer Bošković |
| Coomassie Brilliant Blue (CBB)   | Honeywell Fluka, SAD                      |
| Sumporna kiselina  | Kemika d.d., Hrvatska                     |
| Natrijev sulfat  | Sigma-Aldrich Corporation, SAD            |

Tris-SO<sub>4</sub> pufer (100 mM i 500 mM) pripremljen je otapanjem čvrstog uzorka u ultračistoj vodi i podešavanjem pH vrijednosti na 7,5 razrijeđenom otopinom sumporne kiseline. Otopina pripremljena na opisani način skladištena je u hladnjaku na temperaturi +4 °C i vađena neposredno prije korištenja.

Temeljne otopine natrijevog cijanida koncentracije 400 mM i 800 mM pripravljene su otapanjem čvrstog natrijevog cijanida (NaCN, Sigma-Aldrich Corporation, SAD) u ultračistoj vodi. Tako pripremljene otopine skladištene su u zamrzivaču na temperaturi -20 °C i vađene neposredno prije korištenja.

Reakcije su provedene sa sirovim enzimskim ekstraktima HheB2-T120A i HheB2-36-120-124-125 (četverostruki mutant). U genetski modificiranoj bakteriji *Escherichia coli* nalazi se rekombinantni plazmid koji potiče stvaranje enzima HheB2-T120A i HheB2-36-120-124-125 (četverostruki mutant). Iz tih bakterija izoliran je enzim koji se zatim koristi u reakcijama. Koraci prije izolacije su razmnožavanje bakterija na inkubatoru, nakon čega slijedi centrifugiranje s ciljem razbijanja stanične stijenke bakterija, a zatim izolacija enzima iz biomase. Sirovi enzimski ekstrakti HheB2-T120A i HheB2-36-120-124-125 (četverostruki mutant) skladišteni su u zamrzivaču pri temperaturi -20 °C i odmrzavani neposredno prije korištenja.

## 3.2 Analitičke metode

### 3.2.1 Analiza uzoraka plinskom kromatografijom

Priprema uzoraka za analizu na plinskom kromatografu sastojala se od nekoliko koraka. Najprije je alikvot uzorka prebačen automatskom pipetom u prethodno pripremljenu Eppendorf epruvetu s određenim volumenom metil-*tert*-butiletera (MTBE). Zatim se tako pripremljen uzorak miješao na Vortex miješalici 20 sekundi kako bi došlo do ekstrakcije uzorka u MTBE. Pri tome nastaju dva međusobno nemješljiva sloja. Gornji sloj, koji je organski, prebačen je u kapalicu napunjenu vatom i higroskopskim natrijevim sulfatom. Uzorak je osušen od vodene faze potiskivanjem kroz kapalicu uz pomoć automatske pipete u vijalicu za GC analizu. Uzorci su čuvani u zamrzivaču pri temperaturi od -20 °C do neposredno prije analize. Uređaj koji se

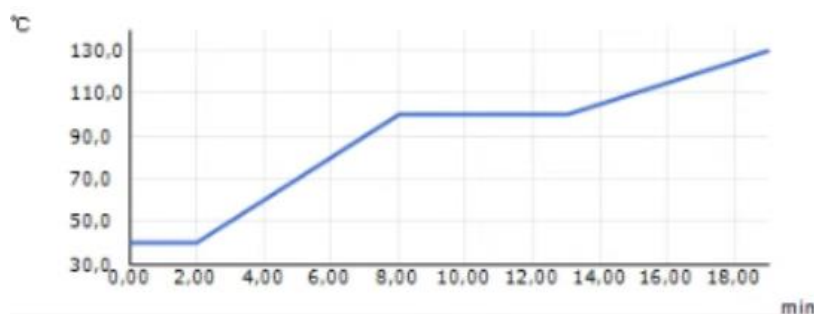
koristio za plinsku kromatografiju je GC-2030 (Shimadzu, Japan) prikazan na slici 14. Stacionarnu fazu činila je kapilarna kolona HP-5 (Agilent Technologies, SAD) čije su karakteristike prikazane u Tablici 3., a kao mobilna faza korišten je dušik, N<sub>2</sub>. Plin se nalazio u visokotlačnom spremniku (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska). Injektiranje u kolonu provodilo se automatski pomoću sustava AOC-20i (Shimadzu, Japan) pri slijedećim uvjetima:  $T_{\text{injektor}} = 250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $p = 34,8 \text{ kPa}$ ; protok  $14,9 \text{ mL min}^{-1}$ . Uređaj sadrži FID gdje su pri detekciji ( $T_{\text{detektor}} = 300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) uzorci spaljivani u smjesi sintetskog zraka iz spremnika (Uljanik tehnički plinovi, Hrvatska). Ukupno trajanje metode iznosi 19 minuta, a kromatografski uvjeti provedbe analize i retencijska vremena pojedinih spojeva dana su u tablici 4., na slici 20., odnosno tablici 5. Podaci su obrađivani uz programsku podršku *GC Solutions* (Shimadzu, Japan). U prilogu 6. nalazi se primjer kromatograma.

**Tablica 3.** Karakteristike korištene GC kolone

| Karakteristika         | HP-5   |
|------------------------|--|
| Literaturni izvor      | <a href="http://www.agilent.com">www.agilent.com</a> |
| Tip kolone             | akiralna   |
| Materijal              | (5%-fenil)-metilpolisiloksan                         |
| Duljina, m             | 30   |
| Unutarnji promjer, mm  | 0,32   |
| Debljina filma         | 0,25   |
| Raspon temperatura, °C | od -60 do 325 (350)                                  |

**Tablica 4.** Kromatografski uvjeti

| Stupanj | Brzina promjene temperature, °C min <sup>-1</sup> | T, °C | Vrijeme održavanja T, min |
|---------|---|-------|---------------------------|
| I.      | -   | 40    | 2                         |
| II.     | 10  | 100   | 5                         |
| III.    | 5   | 130   | 0                         |



Slika 20. Kromatografski uvjeti

Tablica 5. Retencijska vremena pojedinih komponenti

| Komponenta            | Retencijsko vrijeme, ( $t_R$ ), min |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Epiklorhidrin         | 4,6                                 |
| Epoksicijanid         | 6,8                                 |
| 1,3-diklor-2-propanol | 7,5                                 |
| Cijanoalkohol         | 10,8                                |
| Dicijanoalkohol       | 17,3                                |

### 3.2.2 Spektrofotometrijska karakterizacija enzima

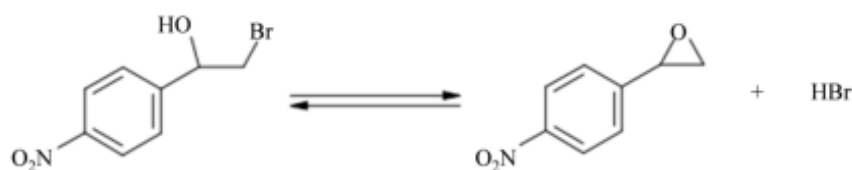
#### 3.2.2.1 Određivanje koncentracije enzima metodom po Bradfordu

Koncentracija proteina u uzorku enzima određena je metodom po Bradfordu na UV-1800 spektrofotometru (Shimadzu, Japan) pri  $\lambda = 595$  i  $450$  nm. Metoda se temelji na povezivanju amino grupe proteina hidrofobnim interakcijama i ionskim vezama na boju Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) u kiselom mediju. Kod povezivanja dolazi do stabilizacije boje u anionskom obliku što uzrokuje promjenu boje iz smeđe u plavu. Odnosno, dolazi do pomaka maksimuma apsorbancije od  $\lambda = 465$  nm do  $\lambda = 595$  nm. Kako bi se provela metoda po Bradfordu pripremljen je Bradfordov reagens koji se sastoji od boje CBB. Dodano je 100 mg bojila CBB u mješavinu 50 mL 95 %-tnog etanola i 100 mL 85 %-tne ortofosforne kiseline te ultračiste vode do 1 L. Nakon čega je potrebno otopinu homogenizirati na magnetskoj mješalici te višestruko filtrirati kroz 0,45  $\mu\text{m}$  šprica filter do smeđe boje. Dobiveni reagens se čuvao na 4 °C omotan folijom.

Da bi se odredila koncentracija enzima u uzorku, potrebno je napraviti baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji enzima. Za izradu baždarnog pravca korištene su standardne otopine albumina goveđeg seruma (BSA) koncentracija  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ;  $15 \text{ mg mL}^{-1}$  i  $20 \text{ mg mL}^{-1}$ . Otopine su pripravljene u kivetama prema tablici u prilogu 1. te je u svaku kivetu dodano  $500 \mu\text{L}$  reagensa, s razmakom od 10 sekundi i miješano na Vortex miješalici 5 sekundi, nakon čega je ostavljeno da se inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon 10 minuta provedeno je mjerenje na spektrofotometru i očitane su apsorbancije. Za svaku koncentraciju pripravljene su tri paralelne probe. Za određivanje koncentracije proteina u sirovom enzimskom ekstraktu koristio se isti postupak kao i za otopinu BSA. Dobiveni baždarni pravac nalazi se u prilogu 2.

### 3.2.2.2 Određivanje aktivnosti enzima spektrofotometrijskim testom s PNSHH

Kako bi se odredila aktivnost enzima proveden je spektrofotometrijski test s 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanolom tj. PNSHH pri  $\lambda = 310 \text{ nm}$ . Korišten je UV-1800 spektrofotometar (Shimadzu, Japan) te su podaci obrađivani uz programsku podršku *UV Probe* (Shimadzu, Japan). Test se temeljni na razlici apsorbancije između halohidrina, 1-(*p*-nitrofenil)-2-bromoetanolom (PNSHH) i epoksida, *p*-nitrostiren oksida (PNSO), pri  $\lambda = 310 \text{ nm}$ , a shema reakcije prikazana je na slici 21.



**Slika 21.** Jednadžba reakcije za spektrofotometrijski PNSHH test

Za provedbu testa pripravljena je otopina PNSHH u dimetil sulfoksidu (DMSO) koncentracije  $19 \text{ mM}$  (odvagom  $0,0234 \text{ g}$  PNSHH u  $100\%$ -tnom DMSO) te je kao takva čuvana u hladnjaku na  $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ . U kiveti od kvarcnog stakla debljine  $1 \text{ cm}$  pripravljena je otopina od  $990 \mu\text{L}$  pufera Tris- $\text{SO}_4$  (koncentracije  $100 \text{ mM}$  i pH vrijednosti  $7,5$ ) i  $10 \mu\text{L}$  temeljne otopine PNSHH. Kako bi otopina bila homogena miješana je na Vortex miješalici. U pripravljenu otopinu neposredno



prije mjerenja dodan je enzim HheB2 (mjerenja za T120A i HheB-36-120-124-125 (četverostruki mutant)) u različitim volumenima krenuvši od 10  $\mu\text{L}$  kako bi se pokrenula reakcija. U različitim ispitivanjima korišteni su različiti volumeni enzima, kako bi promjena apsorbancije uvijek bila u rasponu  $0,02 - 0,2 \text{ min}^{-1}$ , te različiti volumeni pufera, kako bi ukupni volumen u kiveti uvijek bio 1,01 mL. Mjerenje se provodilo 100 sekundi. Za linearni dio dobivene krivulje određen je nagib pravca  $dA/dt$ . Iz dobivenog nagiba pravca, odnosno promjene apsorbancije u vremenu izračunata je volumna aktivnost enzima  $V.A.$  prema sljedećoj jednadžbi:

$$V.A. = \frac{V_r}{\varepsilon \cdot d \cdot V_E} \cdot \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (13)$$

Gdje je:

$V.A.$  – volumna aktivnost enzima,  $\text{U mL}^{-1}$ ,

$V_r$  – volumen uzorka, mL,

$\varepsilon$  - ekstinkcijski koeficijent,  $\text{mM cm}^{-1}$ ,

$d$  – širina kivete, cm,

$V_E$  – volumen enzima, mL

$\Delta A/\Delta t$  – promjena apsorbancije u vremenu,  $\text{min}^{-1}$ .

U provedenom eksperimentu volumen uzorka iznosio je 1 mL (volumen PNSHH bio je 10  $\mu\text{L}$ , volumen pufera Tris- $\text{SO}_4$  iznosio je 990  $\mu\text{L}$  uz slučaj kada je volumen enzima  $V_E$  iznosio 10  $\mu\text{L}$ , promjenom volumena enzima promijenio se i volumen pufera tako da konačni volumen uzorka uvijek iznosi 1 mL), širina kivete,  $d$ , iznosi 1 cm, a ekstinkcijski koeficijent 3,05  $\text{mM cm}^{-1}$  i 4,289  $\text{mM}^{-1}$ .

Mjerna jedinica enzimske aktivnosti je u vremenu i predstavlja promjenu količine supstrata u vremenu [ $\mu\text{mol min}^{-1}$ ]. Kako bi se aktivnosti različitih enzima mogle uspoređivati izračunata je specifična aktivnost  $S.A.$  tako što se volumna aktivnost podijelila s masenom koncentracijom

enzima,  $\gamma$ , dobivenom metodom po Bradfordu što je prikazano jednadžbom (14). Mjerna jedinica specifične aktivnosti je  $U\ mg^{-1}$ .

$$S.A. = \frac{V.A.}{\gamma_E} \quad (14)$$

### 3.2.3 Kinetička ispitivanja

Određivanje kinetike reakcije sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila katalizirane enzimom HheB2-T120A te HheB2-36-120-124-125 provedeno je pri sobnoj temperaturi, na magnetskoj miješalici pri  $600\ \text{okr}\ \text{min}^{-1}$  te je kao medij korišten Tris-SO<sub>4</sub> pufer (500 mM, pH 7,5). Određivanje kinetike reakcije provedeno je metodom početnih reakcijskih brzina, odnosno uzorkovanja su provedena u prvih 10 % konverzije supstrata, pri čemu je reakcijska smjesa uzorkovana minimalno 5 puta u pravilnim vremenskim intervalima tijekom 15 minuta. Kinetika je praćena s obzirom na supstrat epiklorhidrin, produkt (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril te cijanid. Kako bi se odredio utjecaj koncentracije pojedine komponente na brzinu reakcije, kinetika je praćena tako da se mijenjala koncentracija komponente od manje prema većoj. Reakcija je praćena plinskom kromatografijom preko koncentracije produkta. Sastavi reakcijskih smjesa prilikom praćenja utjecaja koncentracije epiklorhidrina na kinetiku reakcije s enzimom HheB2-T120A te HheB2-36-120-124-125 prikazani su u tablicama 6. i 7.

Reakcija je pokrenuta dodatkom enzima u sustav čime je započelo mjerenje vremena. Uzet je alikvot uzorka iz reaktora od  $100\ \mu\text{L}$  i prebačen u  $200\ \mu\text{L}$  MTBE, zatim je ekstrahiran miješanjem na Vortex miješalici 20 sekundi te osušen od vodene faze propuštanjem kroz kapalicu napunjenu natrijevim sulfatom i vatom u vijalicu. Za pojedine uzorke proveden je korak razrjeđenja kako bi koncentracije bile unutar pripremljenih baždarnih pravaca (prilog 7.) Istim postupkom određen je i utjecaj ostalih komponenata na kinetiku reakcije. Sastavi reakcijskih smjesa prilikom praćenja utjecaja koncentracije produkta te cijanida na kinetiku reakcije prikazani su u tablicama 8. – 11.

**Tablica 6.** Sastav reakcijske smjese pri određivanju utjecaja koncentracije epiklorhidrina na brzinu reakcije s enzimom HheB2-T120A

| $V_{\text{reaktora}}, \mu\text{L}$ | $c_{R\text{-EKH}}, \text{mM}$ | $V_{R\text{-EKH}}, \mu\text{L}$ | $c_{\text{NaCN}}, \text{mM}$ | $V_{\text{NaCN}}, \mu\text{L}$ | $\gamma_{\text{HHDH}}, \text{mg mL}^{-1}$ | $V_{\text{HHDH}}, \mu\text{L}$ | $V_{\text{pufera}}, \mu\text{L}$ |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|
| 4000                               | 0,10                          | 2                               | 5                            | 100,0                          | 0,077                                     | 100                            | 3798,0                           |
| 4000                               | 0,25                          | 5                               | 5                            | 100,0                          | 0,077                                     | 100                            | 3795,0                           |
| 4000                               | 0,50                          | 10                              | 5                            | 100,0                          | 0,077                                     | 100                            | 3790,0                           |
| 4000                               | 2,00                          | 40                              | 5                            | 100,0                          | 0,077                                     | 100                            | 3760,0                           |
| 4000                               | 10,00                         | 200                             | 5                            | 100,0                          | 0,077                                     | 100                            | 3760,0                           |
| 4000                               | 14,00                         | 280                             | 5                            | 100,0                          | 0,077                                     | 100                            | 3520,0                           |
| 4000                               | 20,00                         | 400                             | 5                            | 100,0                          | 0,077                                     | 100                            | 3400,0                           |
| 4020                               | 30,00                         | 603                             | 5                            | 100,5                          | 0,077                                     | 100                            | 3216,5                           |
| 4010                               | 50,00                         | 1002,5                          | 5                            | 100,3                          | 0,077                                     | 100                            | 2807,3                           |

**Tablica 7.** Sastav reakcijske smjese pri određivanju utjecaja koncentracije epiklorhidrina na brzinu reakcije s enzimom HheB2-36-120-124-125

| $V_{\text{reaktora}}, \mu\text{L}$ | $c_{R\text{-EKH}}, \text{mM}$ | $V_{R\text{-EKH}}, \mu\text{L}$ | $c_{\text{NaCN}}, \text{mM}$ | $V_{\text{NaCN}}, \mu\text{L}$ | $\gamma_{\text{HHDH}}, \text{mg mL}^{-1}$ | $V_{\text{HHDH}}, \mu\text{L}$ | $V_{\text{pufera}}, \mu\text{L}$ |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|
| 4000                               | 0,10                          | 2                               | 5,00                         | 100,0                          | 0,075                                     | 100                            | 3798,0                           |
| 4000                               | 0,25                          | 5                               | 5,00                         | 100,0                          | 0,075                                     | 100                            | 3795,0                           |
| 4000                               | 0,50                          | 10                              | 5,00                         | 100,0                          | 0,075                                     | 100                            | 3790,0                           |
| 4000                               | 1,00                          | 20                              | 5,00                         | 100,0                          | 0,075                                     | 100                            | 3780,0                           |
| 4000                               | 2,00                          | 40                              | 5,00                         | 100,0                          | 0,075                                     | 100                            | 3760,0                           |
| 4020                               | 6,02                          | 121                             | 5,00                         | 100,5                          | 0,075                                     | 100                            | 3698,5                           |
| 4020                               | 14,03                         | 282                             | 5,00                         | 100,5                          | 0,075                                     | 100                            | 3537,5                           |
| 4020                               | 30,00                         | 603                             | 5,00                         | 100,5                          | 0,075                                     | 100                            | 3216,5                           |
| 4020                               | 40,00                         | 804                             | 5,00                         | 100,5                          | 0,075                                     | 100                            | 3015,5                           |
| 4020                               | 50,00                         | 1005                            | 5,00                         | 100,5                          | 0,075                                     | 100                            | 2814,5                           |

**Tablica 8.** Sastav reakcijske smjese pri određivanju utjecaja koncentracije (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila na brzinu reakcije s enzimom HheB2-T120A

| $V_{\text{reaktora}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $c_{R\text{-EKH}}$ ,<br>mM | $V_{R\text{-EKH}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $c_{\text{NaCN}}$ ,<br>mM | $V_{\text{NaCN}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $c_{(R)\text{-CNOH}}$ ,<br>mM | $V_{(R)\text{-CNOH}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $\gamma_{\text{HHDH}}$ ,<br>$\text{mg mL}^{-1}$ | $V_{\text{HHDH}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $V_{\text{pufera}}$ , $\mu\text{L}$ |
|--|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--|---|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 0,00                          | 0  | 0,077   | 100                                  | 3650,0                              |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 0,25                          | 5  | 0,077   | 100                                  | 3645,0                              |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 0,50                          | 10                                       | 0,077   | 100                                  | 3640,0                              |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 0,75                          | 15                                       | 0,077   | 100                                  | 3635,0                              |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 1,00                          | 20                                       | 0,077   | 100                                  | 3630,0                              |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 2,00                          | 40                                       | 0,077   | 100                                  | 3610,0                              |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 6,00                          | 120                                      | 0,077   | 100                                  | 3530,0                              |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 10,00                         | 200                                      | 0,077   | 100                                  | 3450,0                              |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 14,00                         | 280                                      | 0,077   | 100                                  | 3370,0                              |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 2,50                      | 50,00                                | 20,00                         | 400                                      | 0,077   | 100                                  | 3250,0                              |

**Tablica 9.** Sastav reakcijske smjese pri određivanju utjecaja koncentracije (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila na brzinu reakcije s enzimom HheB2-36-120-124-125

| $V_{\text{reaktora}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $c_{R\text{-EKH}}$ ,<br>mM | $V_{R\text{-EKH}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $c_{\text{NaCN}}$ ,<br>mM | $V_{\text{NaCN}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $c_{(R)\text{-CNOH}}$ ,<br>mM | $V_{(R)\text{-CNOH}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $\gamma_{\text{HHDH}}$ ,<br>$\text{mg mL}^{-1}$ | $V_{\text{HHDH}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $V_{\text{pufera}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ |
|--|----------------------------|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--|---|--------------------------------------|--|
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 5,00                      | 50,00                                | 0,00                          | 0  | 0,075   | 100                                  | 3650,0                                 |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 5,00                      | 50,00                                | 0,25                          | 5  | 0,075   | 100                                  | 3645,0                                 |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 5,00                      | 50,00                                | 0,50                          | 10                                       | 0,075   | 100                                  | 3640,0                                 |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 5,00                      | 50,00                                | 1,00                          | 20                                       | 0,075   | 100                                  | 3630,0                                 |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 5,00                      | 50,00                                | 2,00                          | 40                                       | 0,075   | 100                                  | 3610,0                                 |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 5,00                      | 50,00                                | 3,00                          | 60                                       | 0,075   | 100                                  | 3590,0                                 |
| 4000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 5,00                      | 50,00                                | 4,00                          | 80                                       | 0,075   | 100                                  | 3570,0                                 |
| 1000                                     | 10,00                      | 50,00                                 | 5,00                      | 50,00                                | 10,00                         | 50                                       | 0,300   | 100                                  | 750,0                                  |
| 1000                                     | 10,00                      | 200,00                                | 5,00                      | 50,00                                | 20,00                         | 100                                      | 0,300   | 100                                  | 700,0                                  |

**Tablica 10.** Sastav reakcijske smjese pri određivanju utjecaja koncentracije cijanida na brzinu reakcije s enzimom HheB2-T120A

| $V_{\text{reaktora}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $c_{R\text{-EKH}}$ , mM | $V_{R\text{-EKH}}$ , $\mu\text{L}$ | $c_{\text{NaCN}}$ , mM | $V_{\text{NaCN}}$ , $\mu\text{L}$ | $\gamma_{\text{HHDH}}$ , $\text{mg mL}^{-1}$ | $V_{\text{HHDH}}$ , $\mu\text{L}$ | $V_{\text{pufera}}$ , $\mu\text{L}$ |
|--|-------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 0,05                   | 1                                 | 0,077  | 100                               | 3699,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 0,13                   | 2,5                               | 0,077  | 100                               | 3697,5                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 0,25                   | 5                                 | 0,077  | 100                               | 3695,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 0,50                   | 10                                | 0,077  | 100                               | 3690,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 1,00                   | 20                                | 0,077  | 100                               | 3680,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 2,00                   | 40                                | 0,077  | 100                               | 3660,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 3,00                   | 60                                | 0,077  | 100                               | 3640,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 5,00                   | 100                               | 0,077  | 100                               | 3600,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 7,00                   | 140                               | 0,077  | 100                               | 3560,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 10,00                  | 200                               | 0,077  | 100                               | 3500,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 14,00                  | 280                               | 0,077  | 100                               | 3420,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 20,00                  | 400                               | 0,077  | 100                               | 3300,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 30,00                  | 600                               | 0,077  | 100                               | 3100,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 40,00                  | 800                               | 0,077  | 100                               | 2900,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 50,00                  | 1000                              | 0,077  | 100                               | 2700,0                              |

**Tablica 11.** Sastav reakcijske smjese pri određivanju utjecaja koncentracije cijanida na brzinu reakcije s enzimom HheB2-36-120-124-125

| $V_{\text{reaktora}}$ ,<br>$\mu\text{L}$ | $c_{R\text{-EKH}}$ , mM | $V_{R\text{-EKH}}$ , $\mu\text{L}$ | $c_{\text{NaCN}}$ , mM | $V_{\text{NaCN}}$ , $\mu\text{L}$ | $\gamma_{\text{HHDH}}$ , $\text{mg mL}^{-1}$ | $V_{\text{HHDH}}$ , $\mu\text{L}$ | $V_{\text{pufera}}$ , $\mu\text{L}$ |
|--|-------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 0,10                   | 2                                 | 0,075  | 100                               | 3698,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 0,25                   | 5                                 | 0,075  | 100                               | 3695,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 0,50                   | 10                                | 0,075  | 100                               | 3690,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 1,00                   | 20                                | 0,075  | 100                               | 3680,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 2,00                   | 40                                | 0,075  | 100                               | 3660,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 4,00                   | 80                                | 0,075  | 100                               | 3620,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 6,00                   | 120                               | 0,075  | 100                               | 3580,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 10,00                  | 200                               | 0,075  | 100                               | 3500,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 40,00                  | 800                               | 0,075  | 100                               | 2900,0                              |
| 4000                                     | 10,00                   | 200,00                             | 20,00                  | 400                               | 0,075  | 100                               | 3300,0                              |

### 3.2.4 Provođenje reakcije u kotlastom reaktoru

Kao što je prikazano slikom 13., reakcijski sustav sastojao se od kotlastog reaktora, odnosno staklene bočice volumena 5 mL, magneta i magnetske miješalice s  $700 \text{ okr min}^{-1}$  kako bi se održavala homogenost sustava.

Pripremljeno je nekoliko reakcijskih sustava različitih koncentracija te se pratila promjena koncentracije u vremenu. Iz temeljnih otopina poznate koncentracije (prilozi 4. i 5.) uzeti su različiti volumeni kako bi se dobila željena koncentracija u reaktoru. Reakcijski sustavi pripremljeni su prema tablici 12. kada se kao enzim koristio HheB-T120 te prema tablici 13. kada se kao enzim koristio HheB2-36-120-124-125 (četverostruki mutant). Vrijeme se počelo pratiti dodatkom enzima u reaktor. Uzorci za određivanje koncentracije u vremenu uzimani su u različitim vremenskim intervalima unutar 24 sata (0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h). Uzeto je  $100 \mu\text{L}$  uzorka iz reaktora te dodano u  $200 \mu\text{L}$  metil-*terc*-butiletera, MTBE. Budući da su bile poznate koncentracije supstrata i nukleofila u reaktoru, provođen je korak razrjeđenja kako bi koncentracije bile unutar pripremljenih baždarnih pravaca (prilog 7.) za analizu na plinskom kromatografu. Iz navedenog razloga, nije uvijek uzeto direktno  $100 \mu\text{L}$  uzorka iz reaktora, već je u međukoraku, ovisno o koncentraciji u reaktoru, uzet određeni volumen i razrijeđen u Tris-SO<sub>4</sub> puferu iz čega je zatim uzeto  $100 \mu\text{L}$  uzorka i prebačeno automatskom pipetom u  $200 \mu\text{L}$  MTBE. MTBE se koristio za zaustavljanje reakcije, odnosno ekstrakciju supstrata iz vodenog medija u organski kako bi se moglo provoditi mjerenje na plinskom kromatografu. U vodenoj fazi bi zaostao enzim pa se tako zaustavljala reakcija. Ekstrakcija se provodila miješanjem na Vortex miješalici 20 sekundi, nakon čega se uzorak propustio kroz kapalicu napunjenu vatom i higroskopnim natrijevim sulfatom u vijalu. Ukoliko se analiza na uzorku nije provodila odmah, vijale je bilo potrebno držati u zamrzivaču pri temperaturi od  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

**Tablica 12.** Sastav reaktora u reakciji sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila katalizirana enzimom HheB2-T120A

| $V_{\text{reaktora, } \mu\text{L}}$ | $c_{R\text{-EKH, mM}}$ | $V_{R\text{-EKH, } \mu\text{L}}$ | $c_{\text{NaCN, mM}}$ | $V_{\text{NaCN, } \mu\text{L}}$ | $\gamma_{\text{HHDH, mg mL}^{-1}}$ | $V_{\text{HHDH, } \mu\text{L}}$ | $V_{\text{pufera, } \mu\text{L}}$ |
|-------------------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 3000                                | 5                      | 30,0                             | 5                     | 18,75                           | 0,184                              | 147,4                           | 2803,9                            |
| 3400                                | 10                     | 68,0                             | 10                    | 42,5                            | 1                                  | 1104,9                          | 2184,6                            |
| 3000                                | 50                     | 300,0                            | 50                    | 187,5                           | 0,184                              | 147,4                           | 2365,1                            |
| 3400                                | 100                    | 680,0                            | 100                   | 425,0                           | 2                                  | 2209,8                          | 85,2                              |

**Tablica 13.** Sastav reaktora u reakciji sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila katalizirana enzimom HheB2-36-120-124-125

| $V_{\text{reaktora, } \mu\text{L}}$ | $c_{R\text{-EKH, mM}}$ | $V_{R\text{-EKH, } \mu\text{L}}$ | $c_{\text{NaCN, mM}}$ | $V_{\text{NaCN, } \mu\text{L}}$ | $\gamma_{\text{HHDH, mg mL}^{-1}}$ | $V_{\text{HHDH, } \mu\text{L}}$ | $V_{\text{pufera, } \mu\text{L}}$ |
|-------------------------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| 3500                                | 5                      | 35,0                             | 5                     | 21,88                           | 0,025                              | 29,1                            | 3414,0                            |
| 3500                                | 10                     | 70,0                             | 10                    | 43,75                           | 0,025                              | 29,1                            | 3357,1                            |
| 7000                                | 50                     | 700,0                            | 50                    | 875,0                           | 0,25                               | 583,0                           | 4842,1                            |
| 7000                                | 100                    | 1400,0                           | 100                   | 1750,0                          | 0,30                               | 699,0                           | 3150,5                            |

### 3.2.5 Operacijska stabilnost HHDH tijekom reakcije u kotlastom reaktoru

Kako bi se provjerilo utječu li epiklorhidrin i cijanid na aktivnost enzima u vremenu, odnosno jesu li enzimi HheB2-T120A i HheB2-36-120-124-125 (četverostruki mutant) stabilni u prisutnosti supstrata i nukleofila ili dolazi do pada njihove stabilnosti, provedena su ispitivanja operacijske stabilnosti enzima. Ispitivanja su provedena praćenjem aktivnosti enzima tijekom reakcije kod različitih uvjeta, tj. koncentracije epiklorhidrina i cijanida. Kroz određeno vrijeme te su tijekom tog vremena uzimani uzorci iz reaktora i mjerena im je vrijednost aktivnosti enzima. Reakcija do koje dolazi u reaktoru je biokatalitička sinteza (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila iz epiklorhidrina uz natrijev cijanid te katalizator halogenhidrin-dehalogenazu (slika 12.).

U staklenoj bočici, koja je predstavljala kotlasti reaktor, pripremljen je sustav koji se sastojao od epiklorhidrina (koncentracije 5 mM, 10 mM, 50 mM i 100 mM), natrijevog cijanida (koncentracije 5 mM, 10 mM, 50 mM i 100 mM), Tris-SO<sub>4</sub> pufera (500 mM, pH 7,5) te enzima HheB2-T120A/36-120-124-125. Sirovi enzimski ekstrakt je bio profiltriran kroz filter 0,45  $\mu\text{m}$  prije dodatka u reaktor kako bi se uklonile potencijalno zaostale cijele stanice *E. coli*. Uzorkovanje za mjerenje aktivnosti enzima vršilo se u sljedećim vremenskim intervalima: 0 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 16 h i 24 h. Prije dodatka enzima, uzorak je uzet direktno

iz reaktora, odnosno staklene bočice radi provjere početne koncentracije reaktanata. Reakcija se provodila pri 25 °C i 1000 okr min<sup>-1</sup>.

Svojstva temeljnih otopina epiklorohidrina i natrijevog cijanida pomoću kojih su pripremljene ostale otopine u ovom radu nalaze se u prilogu 3. Pripremljene su temeljne otopine epiklorohidrina koncentracije 500 mM te natrijevog cijanida koncentracije 400 mM prema tablici u prilogu 4., odnosno u prilogu 5. Pomoću dobivenih temeljnih otopina pripremljena su četiri reaktora u kojima je koncentracija supstrata i nukleofila iznosila 5 mM, 10 mM, 50 mM i 100 mM. Sastav reaktora pripremljen je prema tablici 14. (reaktor s enzimom HheB2-T120A) i tablici 15. (reaktor s enzimom HheB2-36-120-124-125). Reakcija je pokrenuta dodatkom enzima u sustav čime je započelo mjerenje vremena.

**Tablica 14.** Sastav reaktora za ispitivanje operacijske stabilnosti enzima HheB2-T120

| $V_{\text{reaktora}}, \mu\text{L}$ | $c_{R\text{-EKH}}, \text{mM}$ | $V_{R\text{-EKH}}, \mu\text{L}$ | $c_{\text{NaCN}}, \text{mM}$ | $V_{\text{NaCN}}, \mu\text{L}$ | $\gamma^{\text{HHDH}}, \text{mg mL}^{-1}$ | $V_{\text{HHDH}}, \mu\text{L}$ | $V_{\text{pufera}}, \mu\text{L}$ |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|
| 1500                               | 5                             | 15,0                            | 5                            | 18,8                           | 0,184                                     | 73,8                           | 1392,5                           |
| 1500                               | 10                            | 30,0                            | 10                           | 37,5                           | 1,0                                       | 400,8                          | 1031,7                           |
| 1500                               | 50                            | 150,0                           | 50                           | 187,5                          | 0,184                                     | 74,0                           | 1088,7                           |
| 1500                               | 100                           | 300,0                           | 100                          | 375,0                          | 2,0                                       | 802,0                          | 23,3                             |

**Tablica 15.** Sastav reaktora za ispitivanje operacijske stabilnosti enzima HheB2-36-120-124-125

| $V_{\text{reaktora}}, \mu\text{L}$ | $c_{R\text{-EKH}}, \text{mM}$ | $V_{R\text{-EKH}}, \mu\text{L}$ | $c_{\text{NaCN}}, \text{mM}$ | $V_{\text{NaCN}}, \mu\text{L}$ | $\gamma^{\text{HHDH}}, \text{mg mL}^{-1}$ | $V_{\text{HHDH}}, \mu\text{L}$ | $V_{\text{pufera}}, \mu\text{L}$ |
|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|----------------------------------|
| 36100                              | 5                             | 361,0                           | 5                            | 451,3                          | 0,025                                     | 301,0                          | 34987,1                          |
| 5200                               | 10                            | 104,0                           | 10                           | 130,0                          | 0,025                                     | 43,0                           | 4922,7                           |
| 7000                               | 50                            | 700,0                           | 50                           | 875,0                          | 0,25                                      | 583,0                          | 4842,1                           |
| 7000                               | 100                           | 1400,0                          | 100                          | 1750,0                         | 0,30                                      | 699,0                          | 3150,5                           |

Nakon dodatka enzima u reaktor, uzorkovana je nulta točka pomoću koje je izmjerena aktivnost enzima. Reakcijski sustav, nakon dodatka enzima i uzorkovanja nulte točke, je prebačen automatskom pipetom u 8 Eppendorf epruveta koje su zatim smještene na Eppendorf tresilicu odakle je uzet uzorak za analizu aktivnosti. Alikvot uzorka od 200  $\mu\text{L}$  prebačen je automatskom pipetom u Eppendorf epruvetu s filterom te centrifugiran na 5 min pri 4 °C i 14 000 okr min<sup>-1</sup>. Enzim u koncentriranoj otopini ostaje na filtru dok ostatak prolazi kroz filter zbog čega je filtrat bačen, a enzim je korišten za test aktivnosti. Test aktivnosti enzima provodio se



spektrofotometrijski s PNSHH. Prvo je pripremljena temeljna otopina PNSHH koncentracije 19 mM, otapanjem odvage od 0,0234 g PNSHH u 100 %-tnom DMSO. Zatim je uzeto 10  $\mu$ L koncentriranog enzima zaostalog na filtru te dodano u kivetu u kojoj se nalazilo 990  $\mu$ L Tris-SO<sub>4</sub> pufera (100 mM, pH 7,5) i 12  $\mu$ L pripremljenog PNSHH. Reakcija se pratila na spektrofotometru 100 sekundi pri valnoj duljini 310 nm. Analiza i izračun dobivenih rezultata opisana je u poglavlju 4.4.

## 4. RASPRAVA I REZULTATI

Cilj rada bio je ispitati mogućnost odvijanja reakcije otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina katalizirane B-tipom halogenhidrin-dehalogenaze (HheB2-T120A i HheB2-36-120-124-125) uz natrijev cijanid kako nukleofil, u kotlastom reaktoru. Reakcija je praćena na plinskom kromatografu određivanjem koncentracije utrošenog supstrata i nastalog produkta. Također je praćen i nastanak nusprodukata iz sporednih reakcija. Aktivnost enzima tijekom reakcije praćena je spektrofotometrijski.

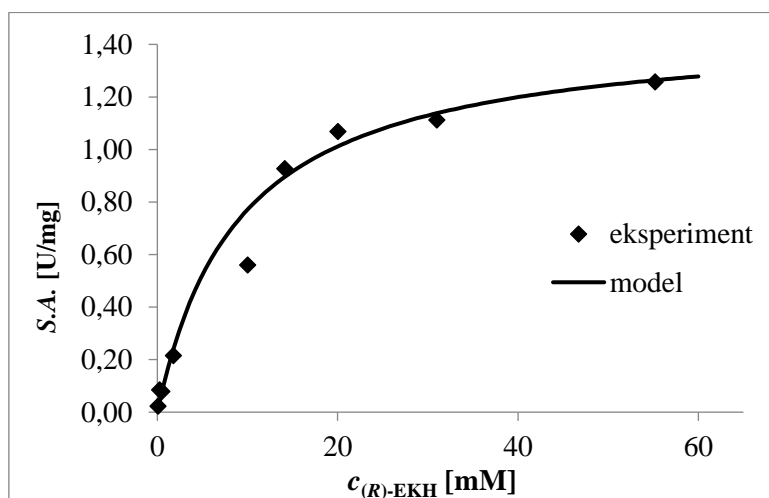
### 4.1 Koncentracija i aktivnost enzima

Metodom po Bradfordu dobiven je baždarni pravac (prilog 2.) s jednadžbom  $A = 0,2238\gamma + 0,7653$  te su pomoću njega određene koncentracije proteina u sirovim ekstraktima HheB2-T120A i četverostrukog mutanta. Koncentracija HheB2-T120A iznosi  $\gamma = 3,12 \text{ mg mL}^{-1}$ , a za HheB2-36-120-124-125  $\gamma = 3,43 \text{ mg mL}^{-1}$ . Spektrofotometrijskim testom s PNSHH dobivene su vrijednosti specifične aktivnosti enzima te iznose za HheB2-T120A:  $S.A. = 5,17 \text{ U mg}^{-1}$  i četverostruki mutant  $S.A. = 3,73 \text{ U mg}^{-1}$ .

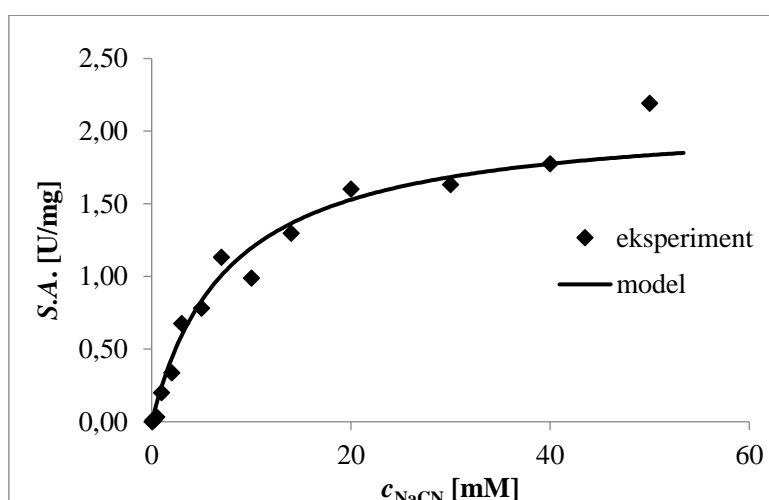
### 4.2 Kinetička ispitivanja

Kinetička ispitivanja biokatalitičke transformacije (*R*)-epiklorhidrina u (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril provedena su određivanjem utjecaja koncentracije svih sudionika reakcije na specifičnu aktivnost enzima. Ispitivanje je provedeno metodom početnih reakcijskih brzina za svakog sudionika reakcije. Dakle, ispitan je utjecaj koncentracija epiklorhidrina kao supstrata, cijanida kao nukleofila te (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila kao produkta. Ispitivanje utjecaja koncentracije spomenutih spojeva na specifičnu aktivnost enzima provodi se promjenom koncentracije jednog od spojeva, dok se koncentracije ostalih sudionika održavaju konstantnima. Koncentracije komponenti reakcijskog sustava određene su plinskom kromatografijom, a podaci su analizirani u programskom paketu *SCIENTIST* koristeći metodu najmanjih kvadrata za procijenu parametara.

Rezultati ispitivanja utjecaja koncentracija svih komponenata reakcijskog sustava otvaranja epoksidnog prstena na specifičnu aktivnost enzima HheB2-T120A dani su na slikama 22. – 24. Na slikama 22. i 23. prikazani su utjecaji supstrata i nukleofila na specifičnu aktivnost enzima. Analizom dobivenih rezultata uočava se kako epiklorhidrin i cijanid prate dvosupstratnu Michealis-Menteničinu kinetiku. Procijenjeni kinetički parametri prikazani su u tablici 16. Maksimalna brzina reakcije iznosi  $V_m = 4,177 \text{ U mg}^{-1}$ , a dobivene vrijednosti parametara  $K_m^{\text{EKH}}$  i  $K_m^{\text{NaCN}}$  upućuju na nizak afinitet enzima prema oba spoja.

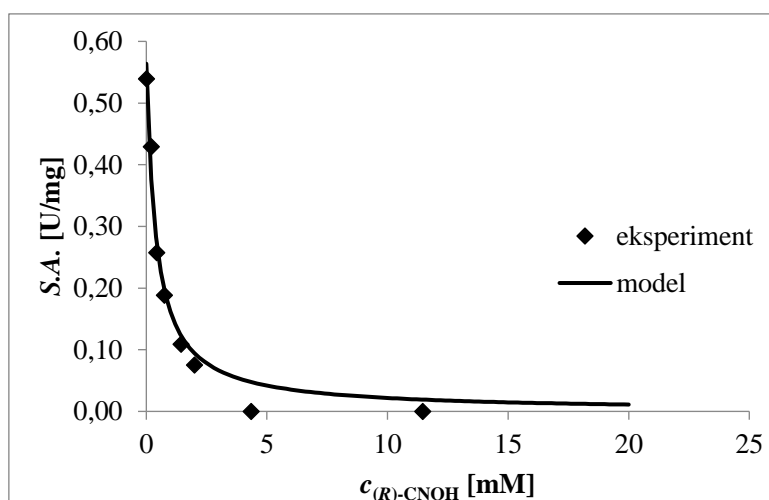


**Slika 22.** Utjecaj koncentracije epiklorhidrina na specifičnu aktivnost enzima HheB2-T120A u reakciji otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina



**Slika 23.** Utjecaj koncentracije cijanida na specifičnu aktivnost enzima HheB2-T120A u reakciji otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina

Slika 24. prikazuje utjecaj koncentracije produkta cijanoalkohola na specifičnu aktivnost enzima HheB2-T120A. Analizom dobivenih eksperimentalnih podataka uočen je inhibicijski učinak produkta što je numerički izraženo vrlo niskom vrijednosti konstante inhibicije  $K_i^{\text{CNOH}} = 0,181 \text{ mM}$ . Već pri vrlo niskim koncentracijama (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila dolazi do značajnog pada specifične aktivnosti enzima te povećanjem koncentracije dolazi do sve većeg pada, odnosno vrijednost specifične aktivnosti se sve više približava nuli.



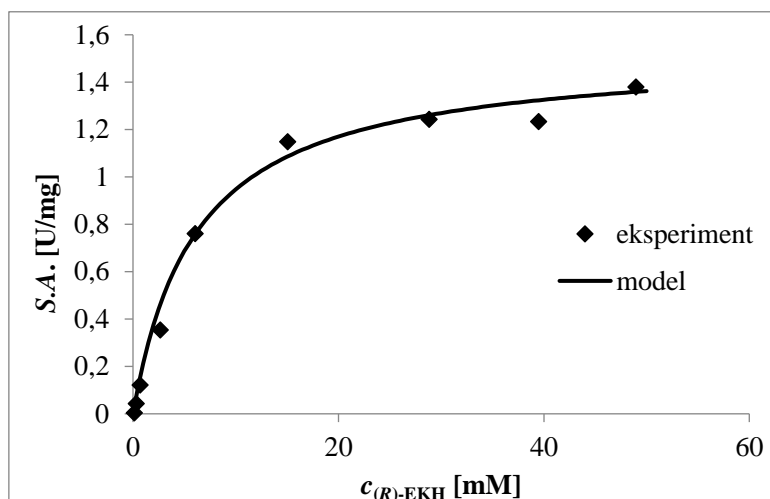
**Slika 24.** Utjecaj koncentracije cijanoalkohola na specifičnu aktivnost enzima HheB2-T120A u reakciji otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina

**Tablica 16.** Procijenjeni kinetički parametri za reakciju otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina kataliziranu enzimom HheB2-T120A

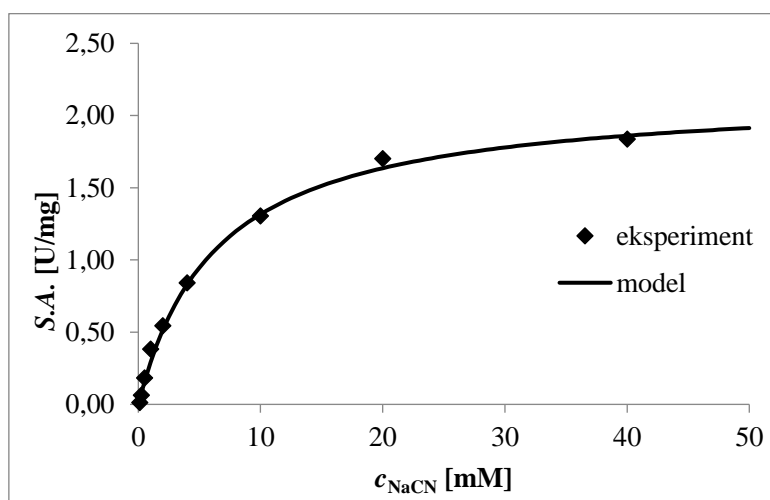
| Parametar           | Jedinica           | Vrijednost        |
|---------------------|--------------------|-------------------|
| $V_{m3}$            | $\text{U mg}^{-1}$ | $4,177 \pm 0,540$ |
| $K_m^{\text{EKH}}$  | mM                 | $9,090 \pm 1,772$ |
| $K_m^{\text{NaCN}}$ | mM                 | $9,191 \pm 1,282$ |
| $K_i^{\text{CNOH}}$ | mM                 | $0,181 \pm 0,030$ |

Rezultati ispitivanja utjecaja koncentracija svih komponenata reakcijskog sustava otvaranja epoksidnog prstena na specifičnu aktivnost enzima HheB2-36-120-124-125 dani su na slikama 25. – 27. Na slikama 25. i 26. prikazani su utjecaji supstrata i nukleofila na specifičnu aktivnost

enzima. Analizom dobivenih rezultata uočava se kako epiklorhidrin i cijanid prate dvosupstratnu Michealis-Menteničinu kinetiku. Procijenjeni kinetički parametri prikazani su u tablici 17. Maksimalna brzina reakcije iznosi  $V_m = 3,485 \text{ U mg}^{-1}$ , a dobivene vrijednosti parametara  $K_m^{\text{EKH}}$  i  $K_m^{\text{NaCN}}$  upućuju na nizak afinitet enzima prema oba spoja.

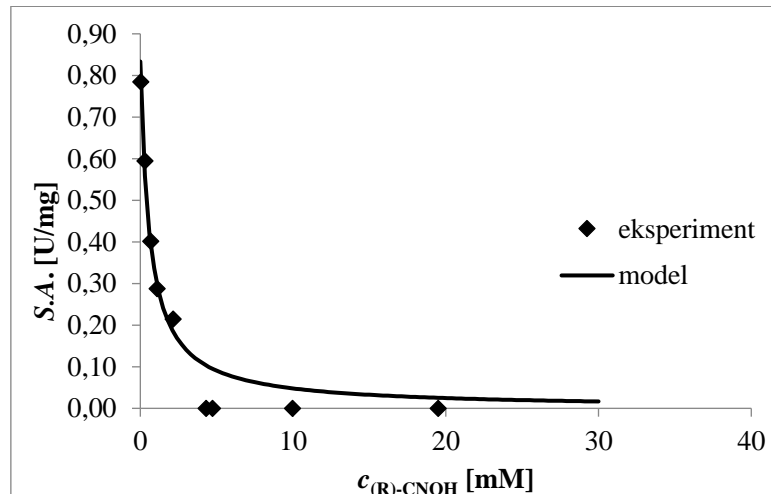


**Slika 25.** Utjecaj koncentracije epiklorhidrina na specifičnu aktivnost enzima HheB2-36-120-124-125 u reakciji otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina



**Slika 26.** Utjecaj koncentracije cijanida na specifičnu aktivnost enzima HheB2-36-120-124-125 u reakciji otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina

Slika 27. prikazuje utjecaj koncentracije produkta cijanoalkohola na specifičnu aktivnost enzima HheB2-36-120-124-125. Analizom dobivenih eksperimentalnih podataka uočen je inhibicijski učinak produkta što je numerički izraženo vrlo niskom vrijednosti konstante inhibicije  $K_i^{\text{CNOH}} = 0,315 \text{ mM}$ . Već pri vrlo niskim koncentracijama (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila dolazi do značajnog pada specifične aktivnosti enzima, a povećanjem koncentracije vrijednost specifične aktivnosti se sve više približava nuli.



**Slika 27.** Utjecaj koncentracije cijanoalkohola na specifičnu aktivnost enzima HheB2-36-120-124-125 u reakciji otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina

**Tablica 17.** Procijenjeni kinetički parametri za reakciju otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina kataliziranu enzimom HheB2-36-120-124-125

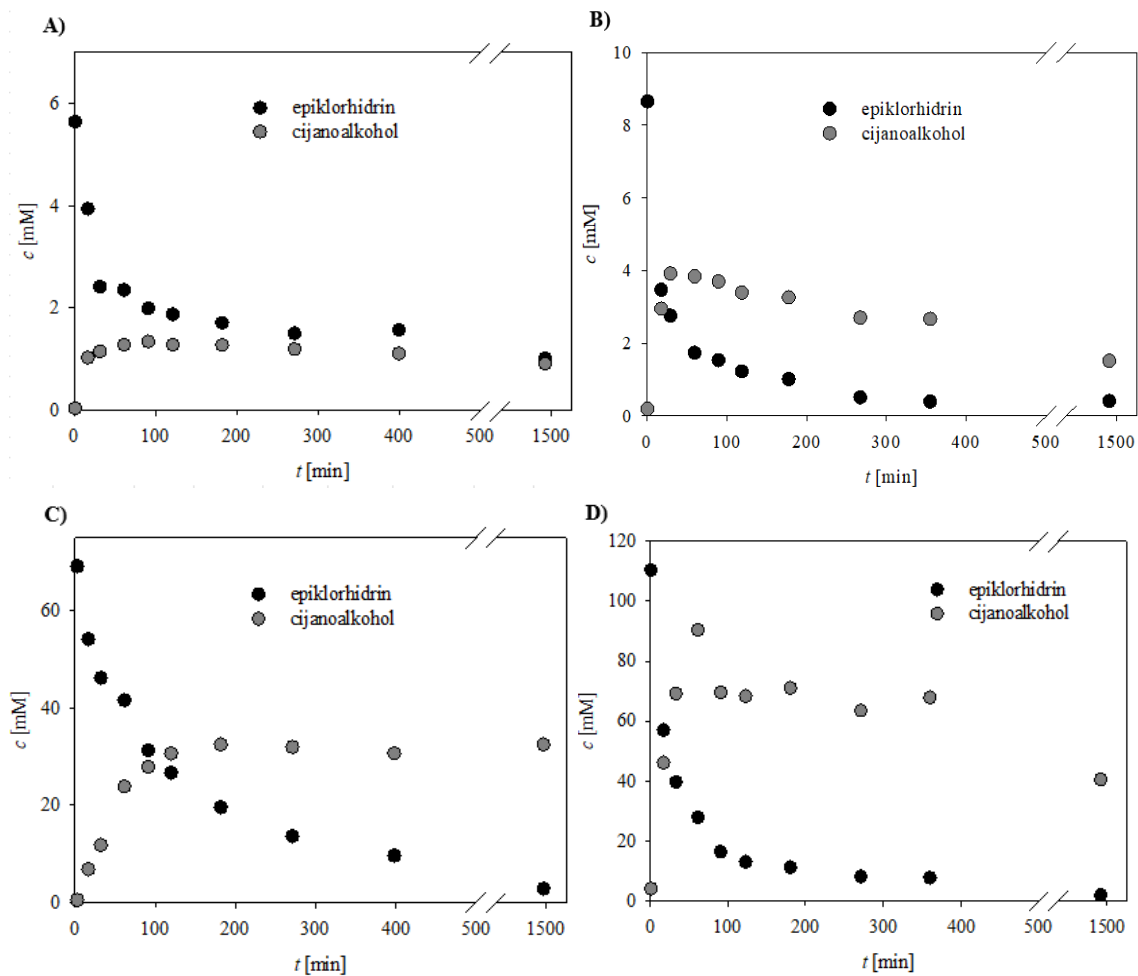
| Parametar           | Jedinica           | Vrijednost        |
|---------------------|--------------------|-------------------|
| $V_{m3}$            | $\text{U mg}^{-1}$ | $3,485 \pm 0,209$ |
| $K_m^{\text{EKH}}$  | mM                 | $6,148 \pm 0,723$ |
| $K_m^{\text{NaCN}}$ | mM                 | $6,391 \pm 0,506$ |
| $K_i^{\text{CNOH}}$ | mM                 | $0,315 \pm 0,058$ |

Kod oba enzima dobivene vrijednosti parametara  $K_m^{\text{EKH}}$  i  $K_m^{\text{NaCN}}$  upućuju na nizak afinitet enzima prema epiklorhidrinu i cijanidu, odakle je vidljivo da je za uspješno provođenje ove reakcije u reaktor potrebno dodati veliku količinu oba spoja. Kod enzima HheB2-T120A vrijednosti parametara su nešto više u odnosu na enzim HheB2-36-120-124-125 iz čega se može

zaključiti da kada se reakcija provodi u prisutnosti enzima HheB2-36-120-124-125 potrebna je manja količina reaktanata za uspješno provođenje reakcije. Također, u prisutnosti oba enzima dolazi do inhibicije produktom i to već pri niskim koncentracijama te porastom koncentracije vrijednost specifične aktivnosti se sve više smanjuje. Uspoređujući konstante vidljivo je da je inhibicija nešto izraženija kod enzima HheB2-T120A u odnosu na reakciju u prisutnosti enzima HheB2-36-120-124-125. Iz navedenog se može zaključiti kako enzim HheB2-36-120-124-125 pokazuje bolja svojstva u prisutnosti reakcijskih komponenti. Vrijednost maksimalne brzine reakcije je visoka u oba slučaja što znači da se reakcija odvija brzo. Budući da se reakcija odvija brzo, a već pri niskim koncentracijama dolazi do značajne inhibicije produktom može se očekivati kako će enzim vrlo brzo izgubiti svoja svojstva, odnosno doći će do pada njegove aktivnosti već pri nižim koncentracijama produkta.

### 4.3 Biokatalitička sinteza (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom

Reakcija otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina uz natrijev cijanid kao nukleofil, katalizirana halogenhidrin-dehalogenazom (HheB2-T120A i HheB2-36-120-124-125) provedena je u kotlastom reaktoru. Koncentracije supstrata, nukleofila i enzima prikazane su u tablicama 12. i 13. Reakcije su se provodile 24 sata.



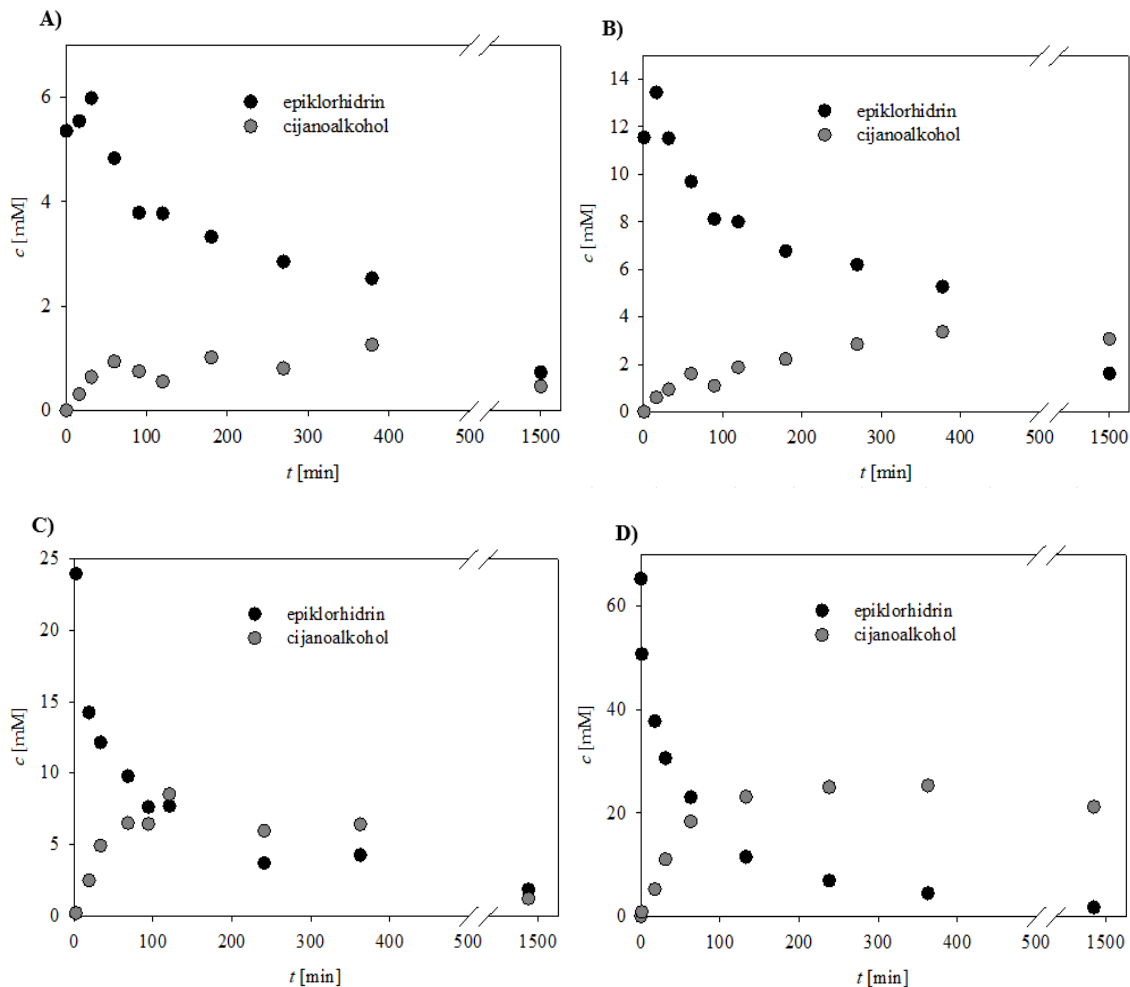
**Slika 28.** Enzimska reakcija otvaranja prstena epiklorhidrina katalizirana HheB2-T120A provedena u kotlastom reaktoru pri ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila

**A.**  $C_{\text{epiklorhidrin}} = C_{\text{NaCN}} = 6 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-T120A}} = 0,184 \text{ mg/mL}$ , **B.**  $C_{\text{epiklorhidrin}} = C_{\text{NaCN}} = 9 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-T120A}} = 1 \text{ mg/mL}$ , **C.**  $C_{\text{epiklorhidrin}} = C_{\text{NaCN}} = 69 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-T120A}} = 0,184 \text{ mg/mL}$ , **D.**

$C_{\text{epiklorhidrin}} = C_{\text{NaCN}} = 110 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-T120A}} = 2 \text{ mg/mL}$  (Tris- $\text{SO}_4$  pufer,  $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , 1000 okr/min)



Rezultati ispitivanja s enzimom HheB2-T120A prikazani su na slici 28. U svim ispitivanjima došlo je do reakcije otvaranja epoksidnog prstena te je nastao željeni produkt, (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril. Na svim grafovima je vidljivo kako dolazi do pada koncentracije epiklorhidrina s vremenom. Do najvećeg pada koncentracije epiklorhidrina dolazi u početku odvijanja reakcije, odnosno reakcija sinteze započinje odmah po pokretanju reakcije. Koncentracija produkta raste s vremenom kako pada koncentracija epoksida. Konverzije epiklorhidrina u svakoj od provedenih reakcija iznose:  $X_A = 82\%$ ,  $X_B = 95\%$ ,  $X_C = 96\%$  te  $X_D = 98\%$ . Može se primijetiti da porastom koncentracije epiklorhidrina, također dolazi do porasta konverzije, međutim ne priđe sav epiklorhidrin u produkt. Pretpostavlja se da dolazi do nastanka međuprodukata. Osim toga, može se vidjeti kako količina potrošenog epiklorhidrina ne odgovara količini nastalog produkta. Iskorištenje u svakoj od provedenih reakcija za točke nakon 6 sati iznosi:  $\eta_A = 20\%$ ,  $\eta_B = 31\%$ ,  $\eta_C = 44\%$  te  $\eta_D = 61\%$ . Kao i kod konverzije, može se primijetiti da dolazi do porasta iskorištenja reakcije porastom koncentracije epiklorhidrina. Budući da se pretpostavlja da dolazi do nastanka međuprodukata, može se zaključiti kako u provedenim ispitivanjima postoji utjecaj kemijske reakcije, odnosno uz reakciju sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila, odvijaju se i sporedne neželjene kemijske reakcije koje dovode do smanjenja koncentracije supstrata koja nije razmjerna s nastalom količinom produkta. U posljednjoj reakciji (početna koncentracija:  $c_{\text{epiklorhidrin}} = c_{\text{NaCN}} = 110\text{ mM}$ ) veća je koncentracija enzima zbog čega je i iskorištenje reakcije visoko. Kod malih koncentracija enzima dolazi do brzog zasićenja aktivnih mjesta na enzimu te prestanka odvijanja biokatalitičke sinteze produkta. Prema tome proces bi se vjerojatno mogao poboljšati povećanjem koncentracije enzima u reaktoru.



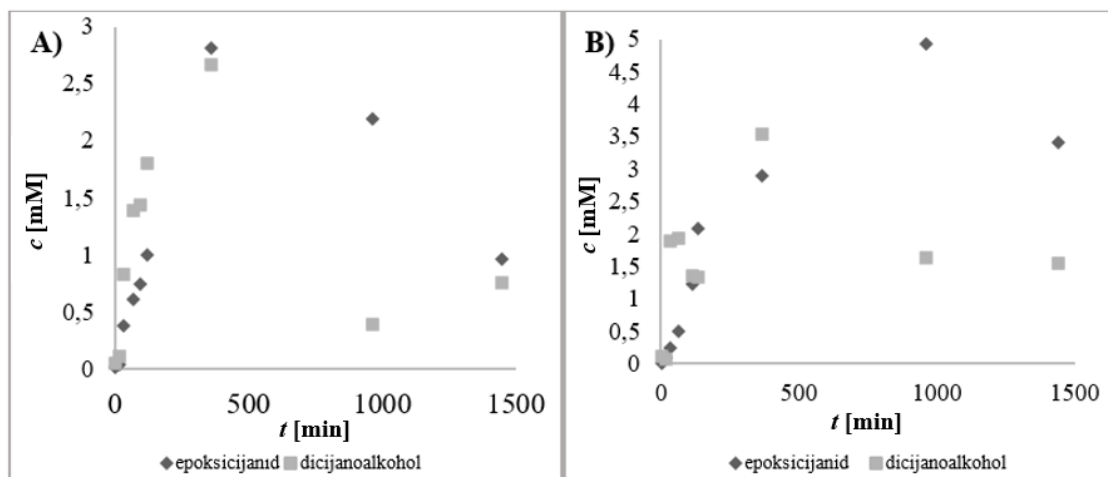
**Slika 29.** Enzimska reakcija otvaranja prstena epiklorhidrina katalizirana HheB2-36-120-124-125 provedena u kotlastom reaktoru pri ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila

**A.**  $c_{\text{epiklorhidrin}} = c_{\text{NaCN}} = 6 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-36-120-124-125}} = 0,184 \text{ mg/mL}$ , **B.**  $c_{\text{epiklorhidrin}} = c_{\text{NaCN}} = 12 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-36-120-124-125}} = 1 \text{ mg/mL}$ , **C.**  $c_{\text{epiklorhidrin}} = c_{\text{NaCN}} = 24 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-36-120-124-125}} = 0,184 \text{ mg/mL}$ , **D.**  $c_{\text{epiklorhidrin}} = c_{\text{NaCN}} = 65 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-36-120-124-125}} = 2 \text{ mg/mL}$  (Tris- $\text{SO}_4$  pufer,  $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , 1000 okr/min)

Rezultati ispitivanja s enzimom HheB2-36-120-124-125 prikazana su na slici 29. Kao i kod reakcija s enzimom HheB2-T120A, i u ovim slučajevima je došlo do reakcije otvaranja epoksidnog prstena te je nastao željeni produkt, (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril. Može se zamijetiti nagli pad koncentracije epoksida na samom početku reakcije, odnosno reakcija sinteze započinje odmah, čim se doda enzim. Koncentracija produkta povećava se s vremenom. Konverzije epiklorhidrina u svakoj od provedenih reakcija iznose:  $X_A = 86 \%$ ,  $X_B = 88 \%$ ,  $X_C = 95 \%$  te  $X_D = 98 \%$ . Međutim, može se primijetiti kako količina potrošenog epiklorhidrina ne odgovara količini nastalog produkta. Iskorištenje u svakoj od provedenih reakcija za točke

nakon 6 sati iznosi :  $\eta_A = 24 \%$ ,  $\eta_B = 29 \%$ ,  $\eta_C = 35 \%$  te  $\eta_D = 40 \%$ . Budući da je uočeno da je iskorištenje reakcija dosta nisko, prilikom provedbe reakcija u kotlastim reaktorima u kojima je početna koncentracija supstrata i nukleofila bila 5 mM, odnosno 12 mM pretpostavilo se da dolazi do nastanka međuprodukata, odnosno da se uz reakciju sinteze odvijaju i sporedne reakcije. Iz tog razloga, prilikom provedbe reakcija u kotlastim reaktorima u kojima je početna koncentracija supstrata i nukleofila bila 24 mM, odnosno 65 mM, osim što se pratila koncentracija produkta, također se pratila i koncentracija međuprodukata, epoksicijanida i dicijanoalkohola. Na slici 30. može se vidjeti kako prilikom biokatalitičke sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila dolazi do nastanka spomenutih međuprodukata.

Budući da su iskorištenja reakcija niža u odnosu na iskorištenja reakcija s enzimom HheB2-T120A, može se zaključiti kako je aktivnost enzima HheB2-36-120-124-125 manja od aktivnosti enzima HheB2-T120A. Mogući razlog je gubitak aktivnosti tijekom vremena. Naime, mikroorganizam iz kojeg je izoliran enzim HheB2-36-120-124-125 uzgojen je skoro godinu dana ranije nego mikroorganizam iz kojeg je izoliran enzim HheB2-T120A. Kao i kod ispitivanja provedenih s enzimom HheB2-T120A u ovom slučaju također dolazi do povećanja iskorištenja povećanjem koncentracije enzima u reaktoru.

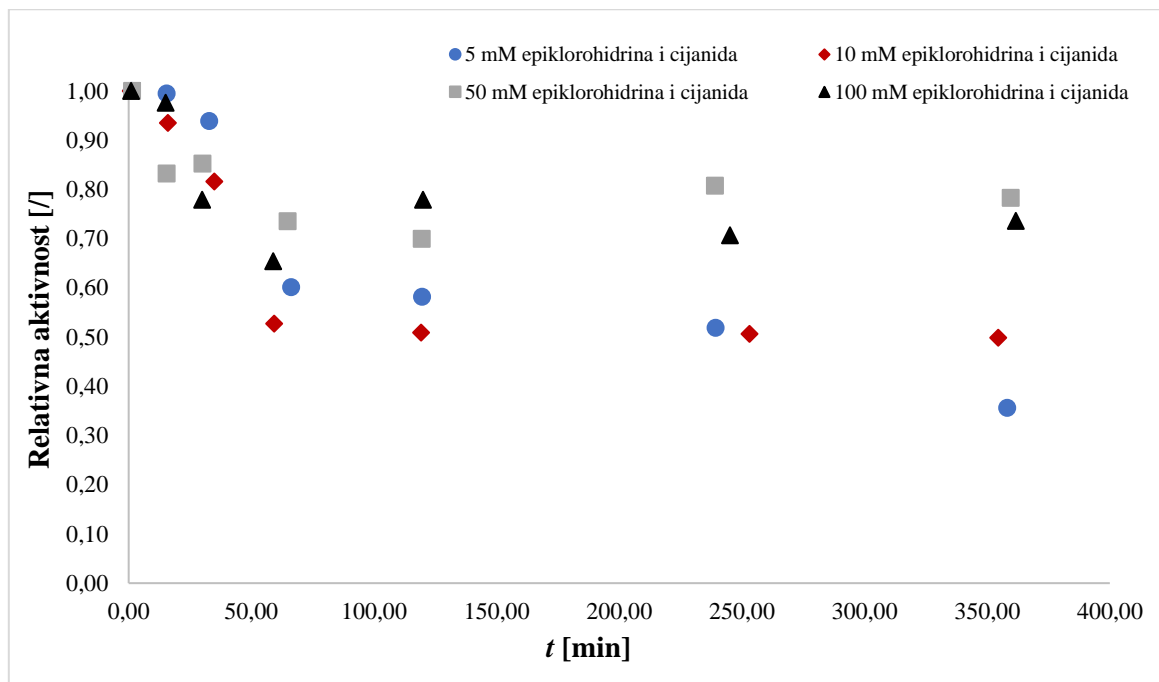


**Slika 30.** Nastajanje međuprodukata prilikom provođenja reakcije otvaranja prstena epiklorhidrina katalizirane enzimom HheB2-36-120-124-125 u kotlastom reaktoru pri ekvimolarnim koncentracijama supstrata i nukleofila

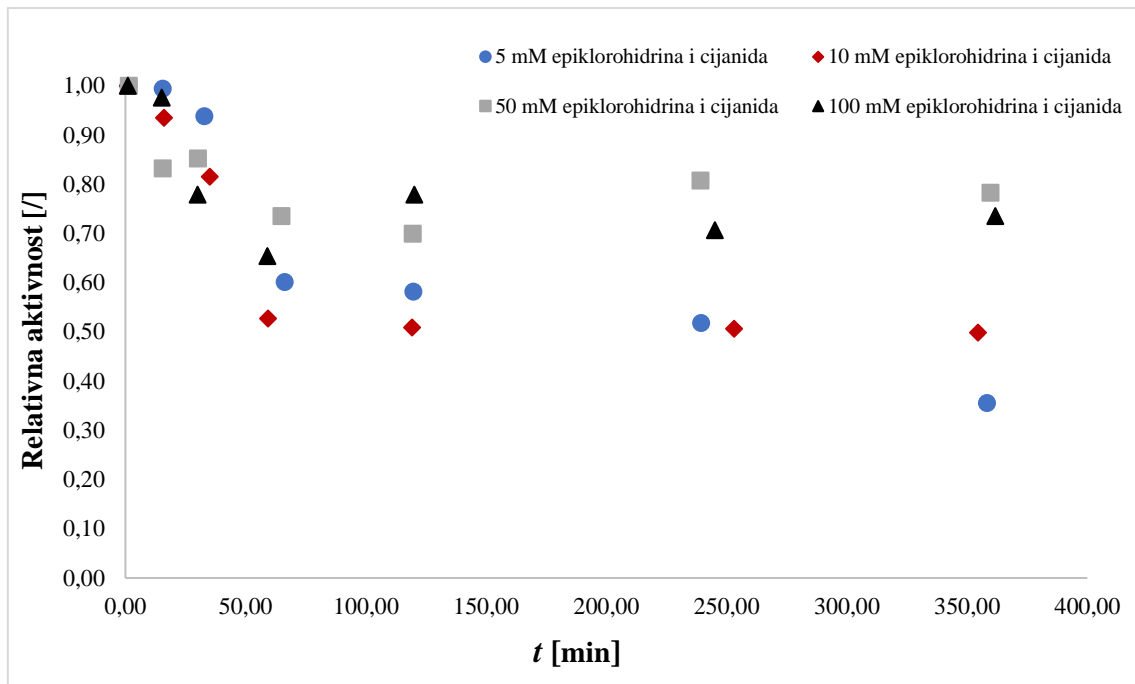
- A.**  $c_{\text{epiklorhidrin}} = c_{\text{NaCN}} = 24 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-36-120-124-125}} = 0,184 \text{ mg/mL}$ , **B.**  $c_{\text{epiklorhidrin}} = c_{\text{NaCN}} = 65 \text{ mM}$ ,  $\gamma_{\text{HheB2-36-120-124-125}} = 2 \text{ mg/mL}$  (Tris-SO<sub>4</sub> pufer,  $T = 25 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , 1000 okr/min)

#### 4.4 Operacijska stabilnost HHDH tijekom reakcije u kotlastom reaktoru

Praćenjem operacijske stabilnosti HHDH tijekom reakcija u kotlastom reaktoru provedenih pri različitim koncentracijama supstrata te mjerenjem aktivnosti u vremenu na spektrofotometru dobivene su specifične aktivnosti enzima. Kako bi se te vrijednosti mogle uspoređivati preračunate su relativne aktivnosti, izražene u postotku, %. Da bi se odredila stabilnost enzima u prisutnosti supstrata i nukleofila, na slikama 31. – 32. prikazana je relativna aktivnost pojedinog enzima u ovisnosti o vremenu te se može primijetiti da kod oba enzima dolazi do pada aktivnosti s vremenom, odnosno do deaktivacije enzima.



Slika 31. Stabilnost HheB2-T120A enzima tijekom reakcije u kotlastom reaktoru



**Slika 32.** Stabilnost HheB2-36-120-124-125 enzima tijekom reakcije u kotlastom reaktoru

## 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada bio je provesti reakciju otvaranja prstena (*R*)-epiklorhidrina uz natrijev cijanid kao nukleofil, kataliziranu halogenhidrin-dehalogenazom u kotlastom reaktoru. Produkt reakcije je (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril koji se koristi u farmaceutskoj industriji za sintezu aktivnih farmaceutskih supstanci. U radu su također uspoređene dvije halogenhidrin-dehalogenaze te ispitane njihove aktivnosti tijekom reakcije u kotlastom reaktoru kroz 24 sata.

U radu je također ispitan utjecaj koncentracije svih sudionika reakcije na kinetiku otvaranja epoksidnog prstena epiklorhidrina katalizirane enzimom HheB2-T120A te HheB2-36-120-124-125. Ispitivanjem utjecaja koncentracije supstrata epiklorhidrina i nukleofila cijanida na kinetiku navedene reakcije utvrđeno je da prate Mihaelis-Menteničinu kinetiku uz inhibiciju produktom. Za reakciju provedenu s enzimom HheB2-T120A, vrijednost parametra  $K_m^{\text{EKH}} = 9,090 \pm 1,772$  mM, dok  $K_m^{\text{NaCN}} = 9,191 \pm 1,282$  mM. Navedene vrijednosti ukazuju na nizak afinitet enzima prema oba spoja. Za reakciju provedenu s enzimom HheB2-36-120-124-125, vrijednost parametra  $K_m^{\text{EKH}} = 6,148 \pm 0,723$  mM, dok  $K_m^{\text{NaCN}} = 6,391 \pm 0,506$  mM. Dobivene vrijednosti ukazuju na nizak afinitet enzima prema oba spoja. Kao produkt reakcije nastaje (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitril. Ispitivanjem utjecaja koncentracije produkta na kinetiku reakcije kod oba enzima dobiveno je kako produkt ima značajan inhibicijski utjecaj na enzim što se može vidjeti iz niskih vrijednosti konstanti inhibicije. U reakcijama provedenim s enzimom HheB2-T120A inhibicijska konstanta iznosi  $K_i^{\text{CNOH}} = 0,181 \pm 0,030$  mM, dok u reakcijama provedenim s enzimom HheB2-36-120-124-125 ona iznosi  $K_i^{\text{CNOH}} = 0,315 \pm 0,058$  mM. Kinetika reakcije sinteze (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila opisana je dvosupstratnim Mihaelis-Menteničinim modelom s inhibicijom produktom.

Provedbom reakcije u kotlastom reaktoru potvrđeno je da reakcijom otvaranja epoksidnog prstena (*R*)-epiklorhidrina u prisutnosti cijanida kao nukleofila te halogenhidrin-dehalogenaze kao katalizatora dolazi do nastanka željenog produkta, (*R*)-4-klor-3-hidroksibutironitrila. Pokazano je kako osim reakcije sinteze, u kotlastom reaktoru dolazi i do sporednih reakcija u kojima nastaju epoksicijanid i dicijanoalkohol. Sporedne kemijske reakcije su neželjene jer dolazi do potrošnje supstrata bez da nastaje željeni produkt zbog čega je i iskorištenje reakcije nisko. Kod reakcija u kojima se koristio enzim HheB2-T120A iskorištenje reakcije raste porastom koncentracije epiklorhidrina i cijanida. Pri višim koncentracijama reaktanata, brže su i kemijske reakcije, međutim dodatkom enzima ubrzava se enzimaska transformacija zbog čega

ona više dolazi do izražaja. Također je uočeno da porastom koncentracije enzima, raste i iskorištenje reakcije. Kod reakcija provedenih s četverostrukim mutantom iskorištenje reakcije je niže u odnosu na reakcije provedene s enzimom HheB2-T120A.

Praćenjem operacijske stabilnosti HHDH tijekom reakcije u kotlastom reaktoru pokazano je kako kod oba enzima dolazi do pada aktivnosti s vremenom, odnosno do deaktivacije enzima. Kako bi se enzim stabilizirao moguće je provesti metodu imobilizacije enzima koja omogućava veću kemijsku i toplinsku stabilnost te ponovno korištenje. Imobilizacija također omogućuje lakše rukovanje, izdvajanje i recikliranje enzima što smanjuje cijenu proizvodnje.

## 6. POPIS POKRATA I SIMBOLA

$A$  – apsorbancija, /

BSA- albumin goveđeg seruma (engl. *Bovine serum albumin*)

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

CBB – Coomassie Brilliant Blue, boja

$d$  – debljina kvarcne kivete, cm

DMSO – dimetil sulfoksid

1,3-DCP – 1,3-diklor-2-propanol

$E$  – enantiomerni omjer, %

EKH - epiklorhidrin

E – enzim

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

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

HHDH- halogenhidrin dehalogenaza (engl. *Halohydrin dehalogenase*)

HheB – B tip halogenhidrin dehalogenaze

$m$  – masa, g

$M$  – molarna masa,  $\text{g mol}^{-1}$

MTBE – metil-*terc*-butileter

pH – negativan logaritam aktiviteta vodikovih atoma

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

PNSO - *p*-nitrostiren oksid

(*R*)-CNOH – (*R*)-cijanoalkohol ili (*R*)-4-kloro-3-hidroksibutironitril

S.A. – specifična aktivnost,  $\text{U mg}^{-1}$

$T$  – temperatura, °C

$t$  – vrijeme, min

TO – temeljna otopina

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

Tris-SO<sub>4</sub> – 2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol sulfatni pufer



U – jedinica enzimske aktivnosti

UV zračenje – ultraljubičasto zračenje ( engl. *Ultraviolet radiation*)

V – volumen,  $\text{cm}^3$

V. A. – volumna aktivnost,  $\text{U cm}^{-3}$

w – maseni udio komponente, /

X – konverzija, %

$\gamma$  – masena koncentracija,  $\text{mg dm}^{-3}$

$\Delta$  – promjena

$\varepsilon$  – ekstinkcijski koeficijent,  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$

$\lambda$  – valna duljina, nm

$\eta$  – iskorištenje, %

---

## 7. LITERATURA

- [1] Soy S., Prabha R., Kumar Nigam V., Potential of Biocatalysis in Pharmaceuticals u: Sedykh S., Molecular Biotechnology, IntechOpen, (2020.)
- [2] Bommarius A. S., Riebel B. R., Introduction to Biocatalysis u: Biocatalysis, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2005.) 1-18.
- [3] Schmid, A.; Hollmann, F.; Byung Park, J.; Bühler, B.: The use of enzymes in the chemical industry in Europe, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **13** (2002.) 359.
- [4] Biond I. P., Palkhiwala P., Gaikawai R., Nampoorhiril K. M., Duggal A., Dey K., Pandey A., Industrial Enzymes - Present status and future perspectives, *J. Sci. Ind. Res.*, **72** (2013.) 271-286.
- [5] Meghwanshi G. K., Kaur N., Verma S., Dabi N. K., Vashishtha A., Charan P.D., Purohit P., Bhandari H.S., Bhojak N., Kumar R., Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **67** (4) (2020.) 1-16.
- [6] Zou, S.P., Gu, K., Zheng, Y.G., Covalent immobilization of halohydrin dehalogenase for efficient synthesis of epichlorohydrin in an integrated bioreactor, *Biotechnol. Progr.*, **3** (34) (2018.) 784-792.
- [7] Worthington C., Worthington V., Worthington A., Worthington Biochemical Corporation, Manual of clinical enzyme measurements, New Jersey, Worthington Diagnostics, (1972.) 1-56.
- [8] Roskoski R.; Enzyme Structure and Function, u: Enna S. J., Bylund D. B., xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, New York, Elsevier, (2007.) 1-7.
- [9] Findrik Blažević Z., Bioreaktori: interna skripta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2017.)
- [10] Liu S., Enzymes, u: Liu S., Bioprocess Engineering: Kinetics, Sustainability and Reactor Design, New York, Elsevier, (2016.) 297-373.
- [11] Suzuki H.; How Enzymes Work: From Structure to Function, Taylor & Francis, Boca Raton, (2015.), 1-46.
- [12] Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Biokemija, 1. izd. (hrvatsko), Školska knjiga, Zagreb (2013.)

- [13] Bošković, M., Podhorsky, R., *Enzimi*, Tehnička enciklopedija, 5. izdanje, Zagreb (1976.) 334–345.
- [14] Rucker R.B, Chowanadisai W.; Coenzymes and Cofactors, u: Caballero B., Finglas P. M., Toldrá F., Food Science Encyclopedia of Food and Health, New York, Elsevier, (2016.), 206-224.
- [15] Illanes, A., Enzyme biocatalysis: principles and application, Introduction, Springer (2008.) 1- 4.,16-18.
- [16] Brahmachari, G., Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications, 1st Edition, Academic Press, New York, (2016.) sections 1, 2, 6, 7, 11, 16
- [17] Nikalje A.P., Tathe A.C., Ghodke M. S., Biocatalysis: A Brief Review, Asian J. Research Chem., **4** (9) (2011.) 1355-1360.
- [18] Sheldon R. A., Brady D., The limits to biocatalysis: pushing the envelope, Chem. Commun. **54** (2018.) 6088-6104.
- [19] Thapa S., Li H., Ohair J., Bhatti S., Chen F.C., Nasr K.A., Johnson T., Zhou S., Biochemical Characteristics of Microbial Enzymes and Their Significance from Industrial Perspectives, Mol. Biotechnol., **61** (2019.) 579-601.
- [20] Patel K.A., Singhanian R.R., Pandey A., Production, Purification, and Application of Microbial Enzymes, u: Brahmachari G., Biotechnology of Microbial Enzymes, Academic Press (2017.) 14-41.
- [21] Zhu D., Wu Q., Wang N., Industrial Enzymes, u: Comprehensive Biotechnology, Academic Press (2019.) 3-13.
- [22] Schmid A., Hollmann F., Park J. B., Bühler B., The use of enzymes in the chemical industry in Europe, Curr. Opin. Biotechnol., **13** (4) (2002.) 359-366.
- [23] Pollard D. J., Woodley J.M., Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future in now, Trends Biotechnol., **25** (2) (2006.) 16418-16422.
- [24] Zaks A., Industrial biocatalysis, Curr. Opin. Chem. Biol., **5** (2001.) 130-136.
- [25] Sanchez S., Demain A.L., Useful Microbial Enzymes – An Introduction, u Demain A. L.,

- Adrio J. L., *Biotechnology of Microbial Enzymes*, Amsterdam, Elsevier (2017.) 1-11.
- [26] Majerić Elenkov, M., Tang, L., Hauer, B., & Janssen, D. B. Sequential kinetic resolution catalyzed by halohydrin dehalogenase. *Organic lett.*, **8** (19) (2006.) 4227-4229.
- [27] Majerić Elenkov, M., Tang, L., Meetsma, A., Hauer, B., Janssen, D. B., Formation of enantiopure 5-substituted oxazolidinones through enzyme-catalysed kinetic resolution of epoxides, *Organic Letters* **10** (12) (2008.) 2417-2420.
- [28] Janssen, D.B., Majerić-Elenkov, M., Hasnoui, G., Hauer, B., Lutje Spelberg, J.H., Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases, *Biochemical Society Transactions* 34, part 2 (2006.), *Biocatalysis*, 291-295.
- [29] Zhang X., Shi, P., Deng, H., Wang, X., Liu, Z., Zheng, Y.G, Biosynthesis of chiral epichlorohydrin using an immobilized halohydrin dehalogenase in aqueous and non-aqueous phase, *Bioresource Technology* **263** (2018.) 483-490.
- [30] de Jong, R.M., Tiesinga, J.J.W., Villa, A., Tang, L.X., Janssen, D.B., Dijkstra, B.W., Structural basis for the enantioselectivity of an epoxide ring opening reaction catalyzed by haloalcohol dehalogenase HheC, *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005.) 13338-13343.
- [31] Schallmey A., Schallmey M., Recent Advances on Halohydrin Dehalogenases – From Enzyme Identification to Novel Biocatalytic Applications, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100** (2016.) 7827-7839.
- [32] Majerić Elenkov, M., Szymanski, W., Janssen, D. B., *Biocatalysis*, Section 2.6.2., George Thieme Verlag Kf (2014.)
- [33] Xue, F., Gao, J., Zhang, L. *et al.* Identification and Characterization of a Novel Halohydrin Dehalogenase from *Bradyrhizobium erythrophleia* and Its Performance in Preparation of Both Enantiomers of Epichlorohydrin. *Catal lett.* **148** (2018.) 1181-1189.
- [34] Hopmann, K.H., Himo, F., Cyanolysis and azidolysis of epoxides by 406 haloalcohol dehalogenase: Theoretical study of the reaction mechanism and 407 origins of regioselectivity. *Biochemistry-US*. **47** (2008.) 4973-4982.
- [35] Mikleušević A., Primožić I., Hrenar T., Salopek-Sondi B., Tang L., Majerić Elenkov M., Azidolysis of epoxides catalysed by the halohydrin dehalogenase from *Arthrobacter* sp. AD2

and a mutant with enhanced enantioselectivity: an (*S*)-selective HHDH, *Tetrahedron: Asymmetry* **27** (2016.) 930-935.

[36] Schallmeyer M., Tarabion C., Tang L., Postema C., Production and isolation of halohydrin dehalogenases, Sveučilište u Groningenu, (2008.) 11.

[37] Česnik M., Sudar M., Roldan R., Hernandez K., Parella T., Clapés P., Charnock S., Vasić-Rački Đ., Findrik Blažević Z., 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** (2019.) 140-152.

[38] Majerić Elenkov M., Čičak M., Smolko A., Knežević A., Halohydrin dehalogenase-catalysed transformations of epifluorohydrin, *Tetrahedron Lett.* **59** (2018.) 406–408.

[39] Ariens EJ. Stereochemistry, a basis for sophisticated nonsense in pharmacokinetics and clinical pharmacology. *Eur J Clin Pharmacol* (1984.) 26:663- 8.

[40] Faber K. Biotransformations in organic chemistry: a textbook. 5. izdanje. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; (2004.)

[41] Tucker GT. Chiral switches. *Lancet* (2000.) 355:1085- 7.

[42] Williams KM, Day RO. Clinical applications of enantiomeric drugs. *Aust Prescr* (1989.) 12:22-5.

[43] Cahn RS, Ingold CK, Prelog V. Specification of molecular chirality. *Angew Chem Int Ed Engl* (1966.) 5:385-415

[44] E. Juaristi, Introduction to Stereochemistry and Conformational Analysis, John Wiley & Sons, New York (1991.)

[45] J. D. Morrison, H. S. Mosher, Asymmetric Organic Reactions, Prentice-Hall, New Jersey, (1971.)

[46] Nakano K., Nozaki K., Polymerization of Epoxides, u Mingos D. M. P., Crabtree R. H., *Comprehensive Organometallic Chemistry III: From Fundamentals to Applications*, New York, Elsevier, **11** (2007.) 595-621.

[47] Solomons, T.W.G., Fryhle, C.B., Snyder, S.A., *Organic Chemistry*, 10th Edition, John Wiley & Sons, (2011.) 502-548.

[48] McMurry, J., *Fundamentals of Organic Chemistry*, 7th Edition. Cornell University, Brooks/Cole, Cengage Learning, USA (2011.) 277-283.

[49] Jespersen, A.N.D., Brady, J.E., Hyslop, A., *Chemistry; The molecular Nature of Matter*, 6th Edition, Wiley (2012.) 71-76.

- [50] Schallmeyer, M., Floor, R.J., Szymanski, W., Janssen, D.B., Hydrolysis and Reverse Hydrolysis: Halohydrin Dehalogenases, University of Groningen, Groningen, The Netherlands, Elsevier Ltd., (2012.) 143-155.
- [51] Lutje Spelberg J. H., Tang L., van Gelder M., Kellogg R. M. , Janssen D. B.; Exploration of the Biocatalytic Potential of a Halohydrin Dehalogenase Using Chromogenic Substrates, *Tetrahedron Asymmetry*, **13** (2012.) 1083-1089.
- [52] Koopmeiners J., Halmschlag B., Schallmeyer M., Schallmeyer A., Biochemical and biocatalytic characterization of 17 novel halohydrin dehalogenases, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **100** (2016.) 7517-7527.
- [53] Koopmeiners J., Diederich C., Solarczek, Voß H., Mayer J., Blankenfeldt W., Schallmeyer A., HheG, a Halohydrin Dehalogenase with Activity on Cyclic Epoxides, *ACS Catal.*, **7** (2017.) 6877- 6886.
- [54] You Z. Y., Liu Z. Q., Zheng Y. G., Chemical and Enzymatic Approaches to the Synthesis of Optically Pure Ethyl (R)-4-Cyano-3-Hydroxybutanoate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98** (2014.) 11-21.
- [55] Carey, F. A., Organic chemistry, 5th ed., McGraw-Hill Education, London (2003.) 676-684, 1124.
- [56] Rebsdats S., Mayer D., Ethylene Oxide, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 564.
- [57] Trent, D. L., Propylene Oxide, *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (2001.) doi:10.1002/0471238961.1618151620180514.a01.pub2
- [58] 1. Jackson, W. R.; Jacob, H. A.; Jayatilake, G. S.; Matthews, B. R.; Watson, K. G., *Aust. J. Chem.* **43** (1990.) 2045.
- [59] Elliot, J. D.; Choi, V. M. F.; Johnson, W. S., *J. Org. Chem.* **48** (1983.) 2294.
- [60] Hayashi, M; Matsuda, T.; Oguni, N., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1990.), 1364.
- [61] Effenberger, F., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (1994.) 33, 1555.
- [62] Kasai, N.; Tsujimura, K.; Unoura, K.; Suzuki, T., *J. Indust. Microbiol.* (1992.) 9, 97.
- [63] Kasai, N.; Tsujimura, K.; Unoura, K.; Suzuki, T., *J. Indust. Microbiol.* (1992.), 10, 37.
- [64] Kasai, N.; Sakaguchi, K.; Takano, S.; Ogasawara, K. (DAISO, Co., Ltd.), *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP63316758*, (1987.)

- [65] Yoshimura, H.; Furukawa, Y.; Takehira, K. (DAISO, Co., Ltd.), Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP05-310671 (1992.)
- [66] Kasai, N.; Sakaguchi, K., *TetrahedronLett.* (1992.), 33, 1211.
- [67] Fraekel, G.; Friedman, S. In *Vitamins and Hormones*, Haaris, R. S.; Marrian, G. F.; Thimann, K., V. (EDs.), Academic Press, New York, Vol. 15 (1957.) 73-118.
- [68] Brower, P. L.; Butler, D. E.; Deering, C. F.; Le, T. V.; Millar, A.; Nanninga, N.; Roth, D., *Tetrahedron Lett.* (1992.), 17, 2279.
- [69] Beck, G.; Jendralla, H.; Kessler, K., *Synthesis* (1995.), 1014.
- [70] Grundy, S. M., *New. Engl. J. Med.* (1988.), 319, 24.
- [71] Reichel, H.; Koeffler, H. P.; Norman, A. W., *New. Engl. J. Med.* (1989.), 320, 980.
- [72] Trost, B. M.; Hanson, P. R., *TetrahedronLett.*, (1994.), 35, 8119.
- [73] Jung, M. E.; Shaw, T. J., *J. Am. Chem. Soc.* (1980.), 102, 6304.
- [74] Bock, K.; Lundt, I.; Pedersen, C., *Acta Chem. Scand.* (1983.), 37, 341.
- [75] Rossiter, B. E.; Sharpless, K. B., *J. Org. Chem.* (1984.), 49, 3707.
- [76] Pifferi, G.; Pinza, M., *Farmaco, Ed. Sci.* (1977.), 32, 602.
- [77] Pellegata, R.; Pinza, M.; Pifferi, G., *Synthesis* (1978.), 614.
- [78] Nakamura, T.; Nagasawa, T.; Yu, F.; Watanabe, I.; Yamada, H., *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* (1991.), 180, 124.
- [79] Z. Gomzi, *Kemijski reaktori, udžbenik*, Zagreb:HINUS (2009.)
- [80] Liu, S., *Batch reactor. Bioprocess Eng.* (2020.) 109-140.
- [81] Stricker, A.E., Béland M., *Sequencing batch reactor versus continuous flow process for pilot plant research on activated sludge*, Environment Canada, Wastewater Technology Centre (WTC) (2006.)
- [82] Robinson P. K., *Enzymes: principles and biotechnological applications, Essays Biochem.*, **59** (2015.) 1-41.
- [83] . Roskoski R., *Michaelis-Menten Kinetics*, u: *Reference Module in Biomedical Sciences*, Elvisier (2015.) 1-9.

- [84] Hegyi G., Kardos J., Kovács M., Málnási-Csizmadia A., Nyitray L., Pál G., Radnai L., Reményi A., Venekei I., Introduction to Practical Biochemistry, ELTE TTK, Budimpešta (2013.) 121–139.
- [85] Najafpour G., Enzyme Technology u: Biochemical Engineering and Biotechnology, Elsevier B.V. (2015.) 19-49.
- [86] Biaglow, A., Erickson, K., McMurrin, S., Enzyme Kinetics and the Michaelis-Menten Equation, PRIMUS, **20**(2) (2010.) 148-168.
- [87] Bisswanger H., Enzyme Kinetics, Principles and Methods, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA (2008.) 59-124.
- [88] Schallmeyer M., Tarabion C., Tang L., Postema C., Production and isolation of halohydrin dehalogenases, Protokol, Biotransformation and Biocatalysis, Sveučilište u Groningenu (2008.)
- [89] Milčić N., Česnik M., Sudar M., Findrik Blažević Z., Primjena matematičkog modeliranja u razvoju enzimatskih kaskadnih reakcija, Kem. Ind., **68** (9-10) (2019.) 397-406.

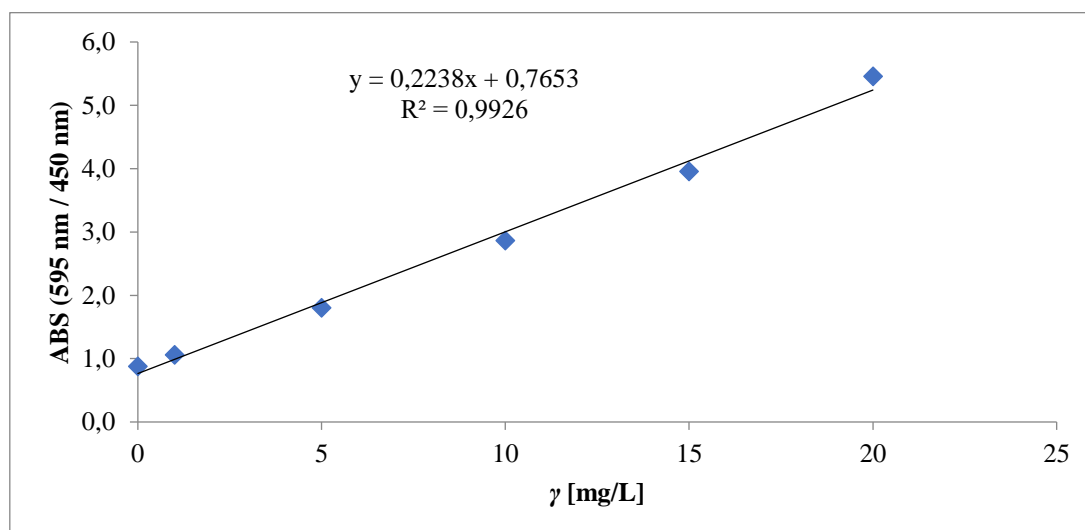


## 8. PRILOZI

Prilog 1. Sastav otopine u kivetu pri izradi baždarnog pravca za određivanje koncentracije proteina

|  | $\gamma$ , mg L <sup>-1</sup> | V <sub>TO BSA</sub> , $\mu$ L | V <sub>UPW</sub> , $\mu$ L |
|--|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
|  | 1                             | 5                             | 495                        |
| $\gamma_{TO BSA}$ , mg L <sup>-1</sup> | 5                             | 25                            | 475                        |
| 100                                    | 10                            | 50                            | 450                        |
| V <sub>ukupni</sub> , $\mu$ L          | 15                            | 75                            | 425                        |
| 500                                    | 20                            | 100                           | 400                        |

Prilog 2. Baždarni pravac za određivanje koncentracije proteina



Prilog 3. Svojstva temeljnih otopina epiklorhidrina i natrijevog cijanida

|                              | epiklorhidrin | NaCN    |
|------------------------------|---------------|---------|
| $\rho$ , g L <sup>-1</sup>   | 1180          | /       |
| w, -                         | 0,99          | /       |
| M, g mol <sup>-1</sup>       | 92,5          | 49,0072 |
| cBOČICA, M                   | 12,62919      | /       |
| $\gamma$ , g L <sup>-1</sup> | 1168,2        | /       |

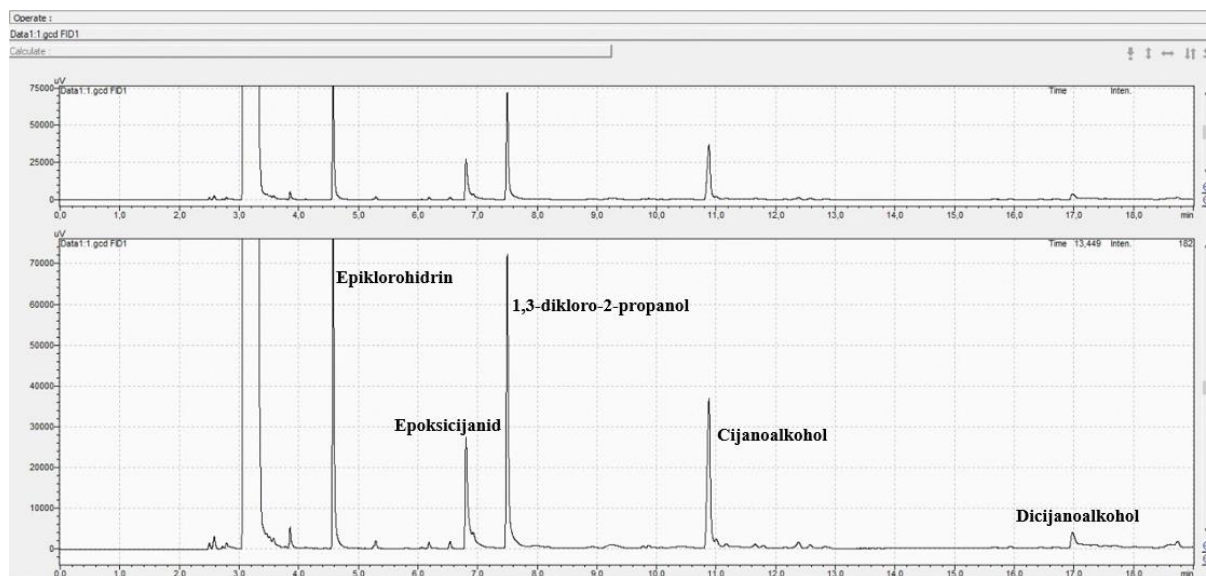
Prilog 4. Priprema temeljne otopine epiklorhidrina

|               | c, mM | V <sub>TO</sub> , $\mu$ L | V <sub>Tris-SO4</sub> (500 mM, pH 7,5), $\mu$ L |
|---------------|-------|---------------------------|---|
| Epiklorhidrin | 500   | 14,7                      | 356,3   |

## Prilog 5. Priprema temeljne otopine natrijevog cijanida

|      | $c$ , mM | $m_{\text{soli NaCN}}$ , g | $V_{\text{Tris-SO4 (500 mM, pH 7,5)}}$ , $\mu\text{L}$ |
|------|----------|----------------------------|--|
| NaCN | 400      | 0,011                      | 550  |
|      | 800      | 0,022                      | 550  |

## Prilog 6. Kromatogram s plinskog kromatografa



## Prilog 7. Baždarni pravci za A) epiklorhidrin, B) 1,3-diklor-2-propanol, C) cijanoalkohol

